dermatologie_3_07 27.6.2007 7:23 Str. 128
proLékaře.cz | 21.11.2026

Čes.-slov. Derm. 82, 2007, No. 3, p. 128–135

Kvantitativní stanovení cirkulujících melanomových buněk k včasné detekci progrese onemocnění

Arenberger P.[1], Arenbergerová M.[1], Křemen J.[2,2A], Stříbrná J.[2], Mühlsteinová Z.[2A], Gkalpakiotis S.[1], Lippert J.[1], Jandová E.[3], Stuchlík D.[4]

[1]Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FNKV, Praha
přednosta prof. MUDr. Petr Arenberger, DrSc., MBA
[2]Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK, Praha
přednosta doc. MUDr. Bohuslav Matouš, CSc.
[2A]Ústav biochemie a patobiochemie FNKV a 3. LF UK, Praha
přednosta doc. MUDr. Petr Čechák, CSc.
[3]Dermatovenerologická klinika LF UK a FN Hradec Králové
přednosta doc. MUDr. Karel Ettler, CSc.
[4]Dermatologické oddělení nemocnice v Pardubicích
primář MUDr. David Stuchlík

Souhrn

Kvantitativní stanovení cirkulujících melanomových buněk k včasné detekci progrese onemocnění

Detekce melanomových buněk z periferní krve je slibnou metodou k monitoringu diseminace nádorových buněk krevní cestou a tedy k včasnému rozpoznání metastáz. V dostupných publikacích není jednotný názor na klinickou relevanci této metody. V této práci je popisována multimarkerová real-time RT-PCR, kterou autoři pro tyto účely úspěšně etablovali. Kvantitativně bylo z periferní krve stanoveno 5 markerů melanomových buněk: Melan-A/MART-1, gp 100, MAGE-3, MIA a tyrozináza. V této prospektivní studii byl proveden screening 65 pacientů po resekci rizikového kožního melanomu. Krevní odběry od pacientů k průkazu cirkulujících buněk a stagingová vyšetření byla prováděna každé 3 měsíce po dobu 15 měsíců. Během studie došlo k progresi u 18 pacientů. U všech těchto pacientů byla zaznamenána statisticky signifikantní elevace nádorových markerů v období od 0 do 9 měsíců od progrese onemocnění. Nejcitlivějším markerem progrese byl MAGE-3. U nemocných s progredující chorobou se nejčastěji našly současně pozitivní 3 markery (39 %), dále 1 marker (33 %), následován současně pozitivními 2 markery (28 %).

Zjistilo se, že kvantitativní detekce melanomových markerů je spolehlivá a užitečná metoda k včasnému rozpoznání hematogenního rozsevu u pacientů s melanomem. Tato metoda může sloužit jako důležitý prognostický faktor a v budoucnu se může uplatnit při screeningu rizikových pacientů a k monitoringu úspěšnosti terapie.

Klíčová slova: **maligní melanom – nádorové markery – real-time RT-PCR**

Summary

Quantitative Analysis of Circulating Melanoma Cells for Early Detection of Disease Progression

Detection of melanoma cells in the peripheral blood is a promising method in monitoring of haematogenic tumor cell dissemination and thus in early detection of metastases. The opinion on a clinical relevance of the method is not uniform. Authors describe multimarker real-time PCR they successfully established for this purpose. Five melanoma cells markers were quantitatively analyzed from the peripheral blood: Melan-A/MART-1, gp 100, MAGE-3, MIA and tyrosinase. During prospective study 65 patients after high risk skin melanoma excision were screened. Staging and blood sample analyses for circulating cells were performed every three months during 15 months period. In 18 patients progression was noted during the study. All of them showed statistically significant elevation of tumor markers 0 to 9 months from disease progression. MAGE-3 was the most sensitive marker. In patients with disease progression three markers

Podporováno grantem Ministerstva zdravotnictví ČR IGA 1A/8243-3.

dermatologie_3_07 27.6.2007 7:23 Str. 129
proLékaře.cz | 21.11.2026

were positive in 39%, one marker in 33% and two markers in 28%. Quantitative detection of melanoma markers was identified as a reliable and useful method of early haematogenic dissemination in melanoma patients. It might be used as an important prognostic method and may play role in the screening of patients at risk and monitoring of the therapeutic effect in the future.

Key words: **malignant melanoma – tumor markers – real-time RT-PCR**

ÚVOD

Maligní melanom patří k nejzhoubnějším nádorům kůže vzhledem ke svému agresivnímu biologickému chování a schopnosti zakládat časné metastázy. Maligní melanom metastazuje ze 70 % lymfogenní cestou. Při hematogenním metastazování jsou nejčastěji postižena játra, plíce, mozek a kosti.

Přestože se diagnostické metody stále vylepšují, zobrazovací metody jsou schopné odhalit metastázy v lymfatickém systému a vnitřních orgánech až v pokročilém stadiu. Stále proto hledáme neinvazivní metodu, která by nás včas informovala o hematogenním rozsevu nádorových buněk a pomohla nám tak definovat pacienty, kteří mají vysoké riziko progrese onemocnění.

Nádorové buňky se v cirkulaci pacientů vyskytují ve velmi malém množství. K jejich detekci se používají metody molekulární biologie založené na reverzní transkripci (RT) s následnou polymerázovou řetězovou reakcí, vyznačující se vysokou citlivostí a specifitou. Pomocí této techniky jsou vyhledávány mRNA kódující protein specifický pro určitý typ nádorové buňky. Přesnější kvantifikaci mRNA genů umožňuje metoda real-time RT-PCR, použitá v této práci.

Detekce cirkulujících melanomových buněk je označována jako citlivá metoda k výběru pacientů, kteří mají velké riziko relapsu (15, 20). Od publikování první práce, popisující monitorování cirkulující melanomové buňky pomocí RT-PCR (29), nepanuje jednotný názor na klinickou relevanci tohoto vyšetření. Výsledky studií zabývajících se diseminací melanomových buněk v různých stadiích onemocnění se v různých laboratořích totiž doposud lišily (5, 6, 8, 10, 11, 13, 18, 19, 21, 24, 27, 31). Existují dva možné důvody rozdílných výsledků těchto prací: (a) detekce pouze jednoho markeru, (b) použití konvenční semikantitativní RT-PCR metody. K důvodu (a) je třeba uvést, že melanom patří k nádorům vyznačujícím se značnou heterogenitou exprese nádorově specifických proteinů (15). Sledování dvou a více markerů může výrazně zvýšit účinnost detekce (14). Většina studií sledovala například tyrozinázu jako jediný marker. Mnohé z nich však ukázaly, že tyrozináza jako marker melanomu selhala (12, 16). K argumentu (b) lze namítnout, že použití konvenční semikvatitativní RT-PCR jako prognostického faktoru při detekci cirkulujících melanomových buněk má svá omezení. Použití real-time RT-PCR je rychlé, přesné a navíc kvantitativní vyšetření. Měří expresi housekeepingového genu a expresi mRNA specifické pro melanom (17, 28).

Zatím bylo identifikováno pouze několik markerů asociovaných s primárním a metastazujícím maligním melanomem. V této studii jsme se zaměřili na 5 z nich: melanoma antigen recognized by T cells (Melan-A/MART-1), melanosomal matrix protein (gp 100), melanoma antigen-A3 family (MAGE-3), melanoma inhibitory protein (MIA) a klíčový enzym při biosyntéze melaninu (tyrozináza).

Do naší sledované skupiny bylo zařazeno 65 nemocných, kteří byli léčeni pro maligní melanom. Odběry u pacientů k průkazu cirkulujících buněk a stagingová vyšetření byla prováděna každé 3 měsíce po dobu 15 měsíců. Během studie jsme zaznamenali progresi u 18 pacientů. Progrese byla doprovázená elevací nádorových markerů v období od 0 až do 9 měsíců před progresí onemocnění. Nejcitlivějším markerem progrese byl MAGE-3. U nemocných s progredující chorobou se nejčastěji našly současně pozitivní 3 markery (39 %), dále 1 marker (33 %), následován současně pozitivními 2 markery (28 %).

Vyvinuli jsme metodu kvantitativní multimarkerové real-time RT-PCR, která nám podává přesnou informaci o přítomnosti a hladině různých nádorových markerů v krvi. Tato metoda nám podává informaci o četnosti genových transkriptů s melanomem asociovaných a pomáhá monitorovat jejich dynamiku v krvi. Časový průběh množství (tumor load) melanomových buněk v krvi je důležitým údajem pro označení pacientů, kteří mají vysoké riziko relapsu, nebo nás informuje o úspěšnosti terapie. Konečným cílem této práce je rutinní použití této metody pro rychlý screening u rizikových pacientů k detekci včasných metastáz a k pozorování dynamiky onemocnění.

METODY

Pacienti

Do studie bylo zařazeno 65 pacientů. Ve skupině bylo 39 mužů a 26 žen ve věku od 20 do 78 let. Průměrný věk pacienta byl 55 let. Podle klasifikace American Joint Committee of Cancer z roku 2003 se jednalo o nemocné s histologicky potvrzeným maligním melanomem ve stadiu IIA – IIIC. Tito pacienti byli po excizi primárního tumoru léčeni po celé sledované období imunoterapií interferonem α 2a (3x týdně 6 MIU s.c.). Pacienti byli klinicky a laboratorně sledováni každé 3 měsíce po dobu 15 měsíců. V tříměsíčních intervalech byl zároveň prováděn kompletní staging.

Izolace RNA z krevních vzorků

Celková buněčná RNA byla extrahována z neerytrocy-

dermatologie_3_07 27.6.2007 7:23 Str. 130
proLékaře.cz | 21.11.2026

tární buněčné frakce získané centrifugací (30 min, 1200 x *g*) 7 ml nesrážlivé krve v gradientu Histopaque Sigma 1119 a 1077 (2:1). Pro izolaci RNA byl použit High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, SRN) anebo byla provedena automatická izolace přístrojem MagNAPure Compact (Roche Diagnostics GmbH, SRN) a soupravou MagNAPure Compact RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH, SRN). Kvalita RNA byla ověřena elektroforeticky v 1,5% agarózovém gelu s ethidiumbromidem a kvantita byla měřena spektrofotometricky.

Linie melanomových buněk

Pozitivní kontrolní RNA byla izolována z buněčné linie SK-MEL-28, kterou poskytl MUDr. M. Vejražka, Ph.D., z Ústavu lékařské biochemie 1. LF UK v Praze. Tato linie exprimuje všechny sledované melanomové markery. RNA získaná ze suspenze buněk naředěných na koncentrace 10^5 – 10^1 byla použita k otestování citlivosti metody.

Negativní kontrola

Jako negativní kontrola sloužily RNA získané od 23 zdravých jedinců.

Testované melanomové markery

Pomocí kvantitativní real-time RT-PCR byla testována exprese následujících markerových mRNA: hTYR (tyrozináza), MIA (melanoma inhibitory antigen), MART-1/Melan-A (melanoma antigen recognized by T cells), MAGE (melanoma antigen gene), gp100 (melanosomal matrix glycoprotein).

Kvantitativní real-time RT-PCR

Amplifikace cílových sekvencí sledovaných markerů byla provedena real-time RT-PCR s primery a sondami uvedenými v tabulce 1. Použité primery a LightCycler (FRET) sondy byly navrženy a syntetizovány TIB-MolBiol (Berlín, SRN). První sonda byla označena na 5'-konci LCRed-640 a 3′-konec byl blokován fosfátem, druhá sonda měla 3′-konec značený fluoresceinem.

cDNA byla syntetizována ze 2 μg celkové buněčné RNA pomocí komerční soupravy First Strand cDNA Transcriptor Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, SRN) za podmínek uvedených výrobcem a použití náhodných hexanukleotidů jako primerů. Výhodou náhodných hexamerních primérů je možnost primingu po celé délce RNA pro získání uniformního zastoupení všech sekvencí RNA a současně i reverzní transkripce mRNA, které chybí poly(A) část.

V dalším kroku byla cDNA (2,5 μl) amplifikována v 10 μl reakční směsi za použití soupravy LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} Hybridization Probes Kit (Roche Diagnostics GmbH, SRN), doplněné o uvedené primery, LightCyclerové sondy a LC-Uracil-N-glycosylázy (Roche Diagnostics GmbH, SRN), která znemožňuje kontaminaci reakce amplikony z předcházejících PCR.

Pro kinetickou real-time PCR byl použit LightCycler Instrument (Roche Diagnostics GmbH, SRN) za následujících amplifikačních podmínek: inkubace při 37 °C/ 10 min s LC uracil-N-glykosylázou; 95 °C/10 min inaktivace uracil-N-glykosylázy a současná aktivace LC Fast TaqPolymerázy; amplifikace 55 cyklů: 95 °C/10 s,

Tab. 1. Použité primery a FRET-sondy

	hu TYR, mRNA		**NM_000372**	**Tm**
HTYR-F	TCTTCTCCTCTTggCAgATTgT	S	1305–1326	56,2 °C
HTYR-R	CAgTAAgTggACTAgCAAATCCTTC	A	1559–1535	56,3 °C
	FRET sonda hu TYR, mRNA			
HTYR-FL	CCAAggCTCCCCTCTTCAgCTg X	S	1430–1451	65,2 °C
HTYR-LC	TgTAgAATTTTgCCTgAgTTTgACCCAAT p	S	1453–1481	64,2 °C
	Primer hu Melan A, mRNA		**NM_005511**	**Tm**
Melan-se	TggATAAAAgTCTTCATgTTggC	S	226–248	55,9 °C
Melan-as	gTggAgCATTgggAACCAC	A	357–339	57,6 °C
	FRET sonda hu Melan A			
Melan-FL	gCTgTCCCgATgATCAAACCCTTC X	A	305–282	64,3 °C
Melan-LC	TgTgggCATCTTCTTgTTAAggCACA p	A	280–255	65,2 °C
	hu Primer MAGE3, mRNA		**NM_175742**	**Tm**
MAGE3-S	gAgAAgATCTgCCAgTgggTCT	S	135–156	58,3 °C
MAGE3-A	gCCTCCTgCTCCTCAgTAgC	A	322–303	58,3 °C
	FRET sonda hu MAGE3			
MAGE3-FL	gAggCATgATgACTCTggTCAgggC X	A	216–192	66,3 °C
MAGE3-LC	ACAggCgggAgTgTgggCA p	A	190–172	66,6 °C
	Primer hu gp100 mRNA		**NM_006928**	**Tm**
gp100 F	AAggTCCAgATgCCAgCTCAATCA	S	1341–1364	63,6 °C
gp100 R	AggATCTCggCACTTTCAATACCC	A	1527–1504	61,7 °C
	FRET sonda hu gp100 mRNA			
gp100 FL	AgTCCCCCTggATTgTgTTCTgTATCgA X	S	1441–1468	66,5 °C
gp100 LC	TggTTCCTTTTCCgTCACCCTggAC p	S	1471–1495	67,9 °C

dermatologie_3_07 27.6.2007 7:23 Str. 131
proLékaře.cz | 21.11.2026

55 °C/10 s (s odečtem fluorescence), 72 °C/13 s. Kontrola produktu byla provedena pomocí stanovení Tm.

Exprese jednotlivých markerů byla porovnávána s expresí housekeepingového genu PBGD (porfobilinogendeaminázа) pomocí LightCycler-h-PBGD Housekeeping Gene Set (Roche Diagnostics, GmbH, SRN).

Analýza dat

Zjištěné hodnoty počtu kopií/ml amplifikovaných markerových RNA byly vztaženy k počtu kopií housekeepingového genu (počet kopií markeru/ml : počet kopií PBGD/ml). Statistická analýza byla provedena s použitím SPSS softwaru (verze 10.0) a Studentovým *t* testem.

VÝSLEDKY

Studijní protokol

Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas před zařazením do studie. Do skupiny bylo zařazeno 65 nemocných, kteří byli léčeni pro maligní melanom. Pacienti byli rozděleni do skupin podle klasifikace American Joint Committee on Cancer. Jednalo se o nemocné ve stadiu IIA (33,9 %), ve stadiu IIB (24,6 %), ve stadiu IIC (12,3 %), ve stadiu IIIA (15,4 %), ve stadiu IIIB (9,2 %) a ve stadiu IIIC (4,6 %).

Odběry u pacientů k průkazu cirkulujících buněk byly prováděny každé 3 měsíce po dobu 15 měsíců. Každé 3 měsíce následovalo standardně stagingové vyšetření: rtg plic, sonografie břicha a sonografie spádových lymfatických uzlin. Individuálně podle konkrétního stavu pacienta se tato vyšetření doplnila jinou zobrazovací metodou.



Obr. 1. Pacient s klinickou progresí – satelitní metastázy.

Exprese mRNA MIA, Melan-A, MAGE-3, gp 100 a tyrozinázy z krevních vzorků pacientů s progresí onemocnění

Během 15 měsíců sledování došlo u 18 z 65 pacientů k progresi onemocnění (obr. 1). Přitom u všech těchto nemocných se zvýšily hladiny 1 až 3 markerů do patologických hodnot. Jednalo se o nemocné v původním stadiu IIA-IIIB. Konkrétně bylo 5 pacientů ve stadiu IIA, 3 ve stadiu IIB, 4 ve stadiu IIC, další 4 ve stadiu IIIA a 2 ve stadiu IIIB. Výsledky hladin markerů byly porovnány u každého konkrétního pacienta s cutoff hodnotami markerů naměřených ve skupině zdravých dobrovolníků.

Tab. 2. Maximální zvýšení jednotlivých markerů jako násobek hodnoty cutoff u 18 z 65 pacientů, u kterých byla klinicky prokázána progrese melanomu

Pac. č.	Počáteční stadium	MIA progrese/ cutoff	Melan A progrese/ cutoff	MAGE-3 progrese/ cutoff	gp 100 progrese/ cutoff	Tyrozináza progrese/ cutoff	Typ progrese (druh metastázy)
1	IIB	5,03	v normě	23,43	1,21	v normě	satelitní
2	IIA	2,19	v normě	298,52	3,57	v normě	regionální lymfatické uzliny
6	IIA	v normě	v normě	28,06	v normě	v normě	satelitní
7	IIC	v normě	v normě	16,16	v normě	v normě	regionální lymfatické uzliny
8	IIIA	7,25	v normě	202,10	3,08	v normě	regionální lymfatické uzliny
10	IIC	v normě	v normě	2,41	1,54	v normě	játra
14	IIIB	1,95	v normě	86,75	v normě	v normě	ledvina, plíce
17	IIB	13,02	v normě	28,07	16,33	v normě	intranzitní
20	IIC	v normě	v normě	1265,19	v normě	v normě	kůže, mozek
21	IIC	5,16	v normě	13,49	6,49	v normě	mozek
24	IIA	v normě	v normě	171,72	125,91	v normě	regionální lymfatické uzliny
25	IIIA	1,81	v normě	26,04	5,33	v normě	regionální lymfatické uzliny
28	IIB	4,14	v normě	24,52	2,22	v normě	játra
35	IIA	v normě	v normě	24,39	1,57	v normě	mozek
44	IIIB	5,20	v normě	118,77	v normě	v normě	regionální lymfatické uzliny
58	IIIA	v normě	v normě	v normě	v normě	poz.	peritoneum
60	IIA	v normě	v normě	23,40	v normě	v normě	oko, satelitní
62	IIIA	v normě	v normě	10,67	v normě	v normě	regionální lymfatické uzliny, satelitní

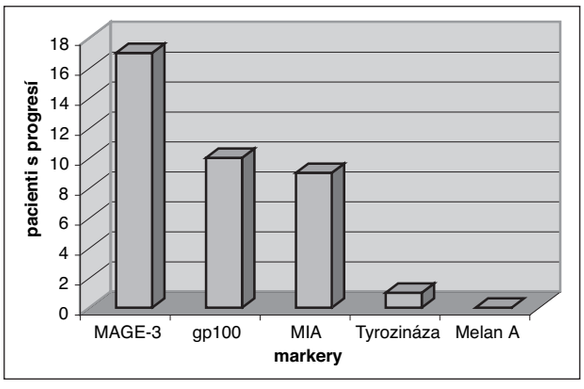
dermatologie_3_07 27.6.2007 7:23 Str. 132
proLékaře.cz | 21.11.2026

Pro MIA se jednalo o hodnotu (marker/PBGD) 0,832 ± 0,073, pro Melan-A 0,012 ± 0,002, pro MAGE-3 2,75 ± 0,302 a pro gp100 0,057 ± 0,006. Jde o hodnoty průměr ± SD. Hodnoty při progresi jsou uvedeny ve stejném formátu a jsou v průměru pro MIA 4,272 ± 2,183 (statisticky signifikantní rozdíl oproti hodnotě cutoff, p<0,01), pro Melan-A 0,026 ± 0,016 (statisticky nesignifikantní oproti cutoff, p>0,05), pro MAGE-3 332,927 ± 196,239 (statisticky signifikantní rozdíl oproti hodnotě cutoff, p<0,01) a pro gp100 0,953 ± 0,827 (statisticky signifikantní rozdíl oproti hodnotě cutoff, p<0,05).

Pro přehlednost uvádíme v tabulce 2 hodnoty markerů u všech 18 pacientů s progresí jako násobky hodnoty cutoff příslušného markeru. U markerů MIA byl průměrný poměr progrese/cutoff 5,08, u MAGE-3 153,07, u gp100 16,72. U jednoho pacienta s progresí byla pozitivní tyrozináza a ani u jednoho nedošlo k signifikantnímu zvýšení hodnot markerů Melan-A oproti cutoff (p>0,05).

EXPRESE VYŠETŘENÝCH MARKERŮ U JEDNOTLIVÝCH PACIENTŮ S PROGRESÍ

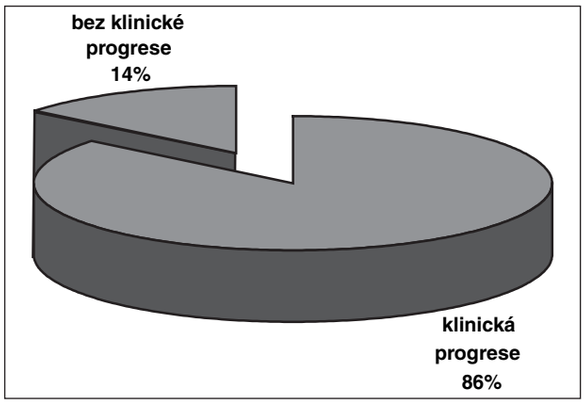
Pacienti s progredujícím onemocněním měli nejčastěji pozitivní marker MAGE-3 (17 z 18 nemocných, 94,4 %), dále byl pozitivní marker gp100 (10 z 18 nemocných, 55,6 %), MIA (9 z 18, 50 %) a tyrozináza (1 z 18, 5,6 %). U Melan-A nedošlo ke statisticky signifikantnímu zvýšení oproti cutoff u všech sledovaných pacientů s progresí (obr. 2). U nemocných s progredující chorobou se nejčastěji našly současně pozitivní 3 markery (v 7 případech z 18, 38,9 %), dále 1 marker (v 6 případech z 18, 33,3 %) a následovaly současně pozitivní 2 markery (v 5 případech z 18, 27,8 %).



Obr. 2. Exprese vyšetřených markerů u pacientů s progresí. V této podskupině byl nejčastěji pozitivní MAGE-3 (17krát), následovaný gp100 (10krát), dále MIA (9krát) a tyrozináza (1krát). U markeru Melan-A nedošlo k signifikantnímu zvýšení jeho hladin oproti cutoff.

Korelace s klinickým průběhem

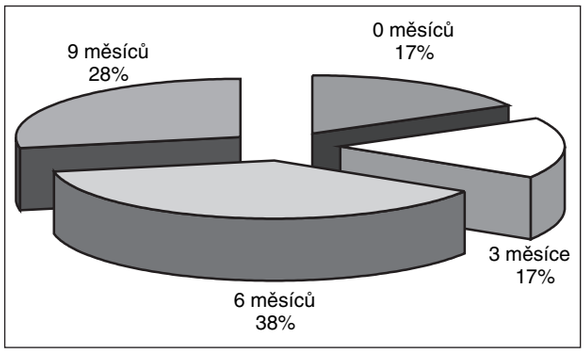
Ve sledovaném souboru 65 pacientů došlo ke zvýšení hladin markerů nad hodnoty cutoff celkem u 21 pacientů (obr. 3). Osmnáct pacientů (86 %) již bylo podrobně popsáno dříve a během sledovaného období u nich zároveň došlo ke klinické progresi choroby. U všech těchto zmíněných pacientů bylo zjištěno zvýšení jednoho markeru nebo současně dvou až tří markerů. Další 3 pacienti (14 %) měli také statisticky signifikantně zvýšené hodnoty oproti cutoff, ale klinická progrese u nich nebyla (zatím) zjištěna.



Obr. 3. Korelace s klinickým průběhem. Ve sledovaném souboru došlo ke zvýšení hladin markerů nad hodnoty cutoff celkem u 21 pacientů. U 18 pacientů (86 %) došlo ke klinické progresi choroby. U dalších 3 pacientů (14 %) klinická progrese (zatím) nebyla zjištěna.

Elevace nádorových markerů předcházela klinické progresi až o 9 měsíců

Zvýšení hladin nádorových markerů se zjistilo ve většině případů mnohem dříve, než došlo ke klinické progresi (obr. 4). Podle protokolu se krev ke stanovení hladin



Obr. 4. Doba od první zachycené elevace markerů ke klinické progresi. Elevace nádorových markerů předcházela klinické progresi až o 9 měsíců. Zvýšení jejich hladin se zjistilo ve většině případů mnohem dříve než došlo ke klinické progresi. U 28 % pacientů bylo prokázáno zvýšení hladiny markerů 9 měsíců před progresí, v 38 % případů 6 měsíců před progresí, v 17 % případů 3 měsíce před progresí a pouze dalších 17 % pacientů přišlo na odběr markerů v době, kdy byla zároveň zjištěna progrese onemocnění.

dermatologie_3_07 27.6.2007 7:23 Str. 133
proLékaře.cz | 21.11.2026

markerů odebírala každé 3 měsíce a zároveň se prováděla zobrazovací vyšetření v rámci stagingu. U 28 % pacientů došlo ke zvýšení hladiny markerů 9 měsíců před progresí, v 38 % případů 6 měsíců před progresí, v 17 % případů 3 měsíce před progresí a pouze dalších 17 % pacientů přišlo na odběr markerů, které byly poprvé zvýšeny ve stejnou dobu, kdy se klinickým a zobrazovacím vyšetřením prokázala progrese onemocnění.

DISKUSE

Při odhadu prognózy pacienta s melanomem hraje důležitou roli stadium podle AJCC klasifikace (2–4). Se stoupajícím stadiem se zhoršuje prognóza pacienta. I přes neustálou modernizaci zobrazovacích metod se snažíme nalézt metodu, která by včas odhalila hematogenní rozsev nádorových buněk a pomohla nám tak definovat pacienty, kteří mají vysoké riziko progrese onemocnění. Jako nejslibnější se nám jeví detekce sérových markerů. Shrnutím poznatků o významu laktátdehydrogenázy (LDH), S100 proteinu nebo neuron-specifické enolázy (NSE) se dospělo k závěru, že tyto sérové markery nejsou dostatečně citlivé pro časnou detekci progrese nebo úspěšnosti terapie (7).

Přínosem pro včasnou diagnostiku a detekci progrese nádorů budou jistě metody molekulární biologie detekující mRNA cestou RT-PCR. Rychlejší analýzu, větší spolehlivost a přesnější kvantifikaci mRNA genů umožňuje metoda real-time RT-PCR, použitá v této práci. Každé 3 měsíce jsme za použití této metody detekovali v periferní krvi nádorové markery pro melanom. Během 15 měsíců trvání studie se statisticky signifikantně zvýšily melanomové markery nad cutoff u 21 pacientů. U 18 z nich (86 %) se objevila ještě během studie progrese onemocnění. Tři pacienti z této skupiny (16 %) měli zvýšené markery a tato elevace nebyla doprovázena progresí onemocnění. Vysvětlením může být na jedné straně falešně pozitivní výsledek. Na druhé straně můžeme spekulovat, že u těchto pacientů došlo k elevaci markerů s předstihem a klinická progrese je teprve čeká. Všichni 3 se nacházejí v období 9 měsíců po elevaci markerů. V naší práci jsme zaznamenali 28 % pacientů, u nichž elevace markerů předcházela klinické progresi o 9 měsíců. Všichni 3 pacienti jsou pod intenzivním dohledem v naší ambulanci.

Zvýšení hladin nádorových markerů se zjistilo ve většině případů výrazně dříve, než došlo ke klinické progresi. Jak již bylo řečeno, u 28 % pacientů došlo ke zvýšení hladiny markerů 9 měsíců před progresí, v 38 % případů pak 6 měsíců před progresí, v 17 % případů 3 měsíce před progresí a pouze dalších 17 % pacientů přišlo na odběr markerů, které byly poprvé zvýšeny ve stejnou dobu, kdy se klinickým a zobrazovacím vyšetřením prokázala progrese onemocnění. Elevaci nádorových markerů můžeme považovat za metodu sloužící k včasné detekci hematogenního rozsevu a přítomnosti metastáz.

Melanom patří k nádorům, vyznačujícím se značnou heterogenitou exprese nádorově specifických proteinů. Sledování dvou a více markerů může výrazně zvýšit účinnost detekce. V naší studii jsme se soustředili na 5 markerů: Melan-A/MART-1, gp 100, MAGE-3, MIA a tyrozináza. Nejcitlivějším markerem progrese se ukázal MAGE-3 (17 z 18 nemocných), dále byl pozitivní marker gp100 (10 z 18 nemocných), MIA (9 z 18) a tyrozináza (1 z 18). U Melan-A nedošlo k statisticky signifikantnímu zvýšení oproti cutoff u všech sledovaných pacientů s progresí. Tyrozináza byla jako marker pro cirkulující melanomové buňky používána v minulosti nejčastěji. Její role jako markeru je velice diskutovaná a liší se v různých publikacích. Například úspěšnost vyšetřování tyrozinázy jako jediného markeru progrese se pohybovala od 6 % do 59 % (1, 12, 22, 25, 30). Důvodem může být technická chyba, vysoké procento falešně pozitivních výsledků např. z důvodů kontaminace nebo snížení exprese tyrozinázy v pokročilejších stadiích, jež je spojené se snížením diferenciace nádorových buněk a poklesem melanizace nádoru (26). Vzhledem k tomu, že v naší práci se u progredující choroby nejčastěji našly současně 3 pozitivní markery, podporuje to detekci několika markerů jako velmi vhodnou a senzitivní metodu.

Zajímavým faktem je, že elevace markerů doprovázela progresi onemocnění ve smyslu hematogenního i lymfogenního šíření. Původně jsme předpokládali, že vzhledem k tomu, že cirkulující buňky detekujeme z periferní krve, bude zachycen především a téměř výlučně hematogenní rozsev. Tento závěr poukazuje na to, že šíření nádorových buněk lymfogenními cestami je doprovázeno i postižením krevního oběhu. Tento fakt může být i jedním z vysvětlení, proč přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách výrazně zhoršuje celkové přežívání pacientů.

Během naší studie byly nádorové markery vyšetřovány každé 3 měsíce. Tato frekvence je důležitá, abychom s co největším předstihem před klinicky zjistitelnou progresí mohli zaznamenat elevaci markerů. Otázkou je, zda tříměsíční odstup lze považovat za optimální, krátký nebo naopak dlouhý. Určitou limitací je finanční náročnost a fyzická zatíženost pacienta (vzorky se musí zpracovat do 2 h po odběru, takže pacient musí k vyšetřením dojíždět někdy i několik stovek kilometrů) na straně jedné a snaha o co nejčastější sledování hladin markerů na straně druhé.

Opakované sledování hladin markerů je významné i z jiného důvodu. Při některém odběru krve se nemusí nádorové buňky v oběhu zachytit. To jsme prokázali i u dvou našich pacientů, u kterých došlo ke klinické progresi po 9 měsících od prvního signifikantního zvýšení hladin markerů. U nich byl první odběr pozitivní, druhý negativní a třetí opět pozitivní. Může to souviset s řadou faktorů – fyzické neodebrání bolusu nádorových buněk ve sledovaném krevním vzorku, přímé nebo nepřímé ovlivnění hladiny markerů adjuvantní terapií, variabilní biologické chování nádorové tkáně v závislosti na čase

dermatologie_3_07 27.6.2007 7:23 Str. 134
proLékaře.cz | 21.11.2026

a další (9, 23). Organizačně i údajově se nám při plánování studie zdál tříměsíční odstup jako vhodný a dostačující a klinická praxe v průběhu experimentů nám tento předpoklad v podstatě potvrdila.

Závěrem lze říci, že multimarkerová kvantitativní real-time RT-PCR je senzitivní metodou pro detekci cirkulujících nádorových buněk. Je včasným signálem pro metastatické šíření u melanomových pacientů. Tato metoda je důležitým a spolehlivým prognostickým faktorem. Dá se předpokládat, že v budoucnu může sloužit ke screeningu rizikových pacientů a k monitoringu úspěšnosti terapie.

LITERATURA

1. AUBIN, F., CHTOUROU, M., TEYSSIER, JR., et al. The detection of tyrosinase mRNA in the peripheral blood of stage I melanoma patients is not of clinical relevance in predicting metastasis risk and survival. *Melanoma Res*, 2000, 10, p.113–118.
2. BALCH, CM., BUZAID, AC., ATKINS, MB., et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer*, 2000, 88, p. 1484–1491.
3. BALCH, CM., BUZAID, AC., SOONG, SJ., et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*, 2001, 19, p. 3635–3648.
4. BALCH, CM., SOONG, SJ., GERSHENWALD, JE., et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol*, 2001, 19, p. 3622–3634.
5. BERKING, C., SCHLÜPEN, EM., SCHRADER, A., ATZPODIEN, J., VOLKENANDT, M. Tumor markers in peripheral blood of patients with malignant melanoma: Multimarker RT-PCR versus a luminoimmunometric assay for S-100. *Arch Dermatol Res*, 1999, 291, p. 479–484.
6. BLAHETA, HJ., PAUL, T., SOTLAR, K., MACZEY, E., SCHITTEK, B., et al. Detection of melanoma cells in sentinel lymph nodes, bone marrow and peripheral blood by a reverse transcription-polymerase chain reaction assay in patients with primary cutaneous melanoma: association with Breslow's tumour thickness. *Br J Dermatol*, 2001, 145, p. 195–202.
7. BROCHEZ, L., NAEYAERT, JM. Serological markers for melanoma. *Brit J Dermatol*, 2000, 143, p. 256–268.
8. CURRY, BJ., MYERS, K., HERSEY, P. MART-1 is expressed less frequently on circulating melanoma cells in patients who develop distant compared with locoregional metastases. *J Clin Oncol*, 1999, 17, p. 2562–2571.
9. DE VRIES, TJ., FOURKOUR, A., PUNT, CJA. Reproducibility of detection of tyrosinase and MART-1 transcripts in the peripheral blood of melanoma patients: a quality control study using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Cancer*, 1999, 80, p. 883–891.
10. FOSS, AJ., GUILLE, MJ., OCCLESTON, NL., HYKIN, PG., HUNGERFORD, JL., et al. The detection of melanoma cells in peripheral blood by reverse transcription polymerase chain reaction. *Br J Cancer*, 1995, 72, p. 155–159.
11. GHOSSEIN, RA., COIT, D., BRENNAN, M., ZHANG, ZF., WANG, Y., et al. Prognostic significance of peripheral blood and bone marrow tyrosinase messenger RNA in malignant melanoma. *Clin Cancer Res*, 1998, 4, p. 419–428.
12. GLASER, R., RAS, K., SEITER, S., HAUSCHILD, A., CHRISTOPHERS, E., et al. Detection of circulating melanoma cells by specific amplification of tyrosinase complementary DNA is not a reliable tumor marker in melanoma patients: a clinical two-center study. *J Clin Oncol*, 1997,15, p. 2818–2825.
13. HANEKOM, GS., STUBBINGS, HM., JOHNSON, CA., KIDSON, SH. The detection of circulating melanoma cells correlates with tumour thickness and ulceration but is not predictive of metastasis for patients with primary melanoma. *Melanoma Res*, 1999, 9, p. 465–473.
14. HOON, DS., BOSTICK, P., KUO, C., OKAMOTO, T., WANG, HJ., et al. Molecular markers in blood as surrogate prognostic indicators of melanoma recurrence. *Cancer Res*, 2000, 60, p. 2253– 2257.
15. HOON, DS., WANG, Y., DALE, PS., CONRAD, AJ., SCHMID, P., GARRISON, D. Detection of occult melanoma cells in blood with a multiplemarker polymerase chain reaction assay. *J Clin Oncol*, 1995, 13, p. 2109–2116.
16. JUNG, FA., BUZAID, AC., ROSS, MI., WOODS, KV., LEE, JJ., et al. Evaluation of tyrosinase mRNA as a tumor marker in the blood of melanoma patients. *J Clin Oncol*, 1997,15, p. 2826–2831.
17. KEILHOLZ, U., GOLDIN-LANG, P., BECHRAKIS, NE., MAX, N., LETSCH, A., et al. Quantitative detection of circulating tumor cells in cutaneous and ocular melanoma and quality assessment by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Clin Cancer Res*, 2004, 10, s.1605–1612.
18. LE BRICON, T., STOITCHKOV, K., LETELLIER, S., GUIBAL, F., SPY, J., et al. Simultaneous analysis of tyrosinase mRNA and markers of tyrosinase activity in the blood of patients with metastatic melanoma. *Clin Chim Acta*, 1999, 282, p. 101–113.
19. MELLADO, B., DEL CARMEN VELA, M., COLOMER, D., GUTIERREZ, L., CASTEL, T., et al. Tyrosinase mRNA in blood of patients with melanoma treated with adjuvant interferon. *J Clin Oncol*, 2002, 20, p. 4032–4039.
20. MOCELLIN, S., DEL FIORE, P., GUARNIERI, L., SCALERTA, R., FOLETTO, M., et al. Molecular detection of circulating tumor cells is an independent prognostic factor in patients with high-risk cutaneous melanoma. *Int J Cancer*, 2004,111, p. 741–745.
21. PALMIERI, G., STRAZZULLO, M., ASCIERTO, PA., SATRIANO, SMR., DAPONTE, A., et al. Polymerase chain reaction-based detection of circulating melanoma cells as an effective marker of tumor progression. Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 1999, 17, p. 304–311.
22. PITTMAN, K., BURCHILL, S., SMITH, B., et al. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood. *Ann Oncol*, 1996, 7, p. 297–301.
23. POHLREICH, P., STŘÍBRNÁ, J., KLEIBL, Z. Detection of neoplastic cells in blood of miniature pigs with hereditary melanoma. *Vet Med Czech*, 2001, 46, p. 199–204.
24. PROEBSTLE, T.M., JIANG, W., HÖGEL, J., KEILHOLZ, U., WEBER, L., et al. Correlation of positive RT-PCR for tyrosinase in peripheral blood of malignant melanoma patients with clinical stage, survival and other risk factors. *Br J Cancer*, 2000, 82, p. 118–123.

dermatologie_3_07 27.6.2007 7:23 Str. 135
proLékaře.cz | 21.11.2026

25. REINHOL, DU., LUDTKE HANDJERY, HC., SCHNAUTZ, S., et al. The analysis of tyrosinase specific mRNA in blood samples of melanoma patients by RT-PCR is not a useful test for metastatic tumor progression. *J Invest Dermatol*, 1997, 108, p. 166–169.
26. SARANTOU, T., CHI, DDJ., GARRISON, DA. Melanoma associated antigens as messanger RNA detection markers for melanoma. *Cancer Res*, 1997, 57, p. 1371–1376.
27. SCHITTEK, B., BODINGBAUER, Y., ELLWANGER, U., BLAHETA, HJ., GARBE, C. Amplification of MelanA messenger RNA in addition to tyrosinase increases sensitivity of melanoma cell detection in peripheral blood and is associated with the clinical stage and prognosis of malignant melanoma. *Br J Dermatol*, 1999, 141, p. 30–36.
28. SCHUSTER, R., MAX, N., MANN, B., HEUFELDER, K., THILO, F., et al. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J Cancer*, 2004, 108, p. 219–227.
29. SMITH, B., SELBY, P., SOUTHGATE, J., PITTMAN, K., BRADLEY, C., et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet*, 1991, 338, p. 1227–1229.
30. STEVENS, GL., SCHEER, WD., LEVINE, EA. Detection of tyrosinase mRNA from the blood of melanoma patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,* 1996, 5, p. 293–296.
31. TSUKAMOTO, K., UEDA, M., HIRATA, S., OSADA, A., KITAMURA, R., et al. gp100 mRNA is more sensitive than tyrosinase mRNA for RT-PCR amplification to detect circulating melanoma cells in peripheral blood of melanoma patients. *J Dermatol Sci*, 2000, 23, p. 126–131.

Došlo do redakce: 29. 12. 2006

Prof. MUDr. Petr Arenberger, DrSc., MBA
Dermatovenerologická klinika 3. LF UK a FNKV
Šrobárova 50
100 34 Praha 10
E-mail: pa@verum.cz