

TKÁŇOVÁ NÁDOROVÁ BANKA A JEJÍ ROLE V MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGII: PŘEDSTAVY A FAKTA 2003

TUMOR TISSUE BANK AND ITS ROLE IN MOLECULAR ONCOLOGY: CONCEPTION AND FACTS 2003

ŠIMÍČKOVÁ M., VAGUNDOVÁ M., KREJČÍ E., RAŠOVSKÁ L., SVOBODA M., CHRENKO V., COUFAL O., ŽALOUDÍK J.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: S rozvojem molekulárně-biologických technik v onkologii nabývá na významu dostupnost nádorové tkáně odebrané při operaci a zmrazené za přesně definovaných podmínek v tkáňové nádorové bance. Tento materiál může být zdrojem pro aktuální či budoucí výzkumné projekty, analyzující nové prognostické nebo prediktivní faktory jak na úrovni genomu, tak i proteomu, vyžadující jako výchozí materiál nefixovanou tkáň. Lze však očekávat využití i pro terapeutické rozhodovací procesy pro individuálního pacienta. Organizace podobných projektů na evropské úrovni již předpokládá v blízké budoucnosti virtuální variantu této databáze, dostupnou vědecké veřejnosti. Nádorová banka založená v Masarykově onkologickém ústavu v r.2000 má v současnosti uloženo přes 900 nádorů vybraných lokalizací.

Klíčová slova: Tkáňová nádorová banka, virtuální varianta, stabilita nukleových kyselin v zamrazené tkáni, banka Masarykova onkologického ústavu

Summary: Availability of tumor tissue obtained during operation and frozen in native status according to strictly defined procedures has a growing importance in the development of molecular biology methods in oncology. This material can serve not only as a source for actual or future research projects on the level of genome or proteome, dealing with non-fixed tissues, but also for therapeutic decision for individual patients. The similar European projects are planned at virtual variant of this database, accessible for scientific community. In the tumor tissue bank established in Masaryk Memorial Cancer Institute in 2000 are actually more than 900 tumors of selected types.

Key words: Tumor tissue bank, virtual version, stability of nucleic acids in frozen tissue, tumor bank of Masaryk Memorial Cancer Institute

Nové vědecké a technologické pokroky v oblasti genomové a proteomové analýzy i v oblasti bioinformatiky umožňují stále detailnější poznání dynamiky a funkčních aspektů onemocnění. Molekulárně-biologické markery v onkologii, využívající nefixovanou tkáň uchovanou ve zmrazeném stavu, mohou být přínosem nejen pro diagnostiku, ale i řízení léčby nádorů. Proto je nyní kladen značný důraz na zakládání tkáňových bank - doporučení nabývají v posledních několika málo letech na intenzitě úměrně rozšiřování molekulárně-biologických technologií do rutinní praxe.

Nádorová banka je zařízení pro organizaci sběru nativního materiálu, úschovu v zamrazeném stavu a následnou distribuci nádorové, ev. normální kontrolní tkáně pro další užití v základním nebo aplikovaném výzkumu (1). Vhodný materiál odebrá patolog z přebytku nádorové tkáně, která zůstává po zpracování materiálu pro histopatologické vyšetření. Bezprostředně po odběru, který je nutno provést do 15 min od vynětí tumoru chirurgem, jsou nativní vzorky zamrazovány, aby bylo zaručeno optimální zachování integrity nukleových kyselin. Vědecká hodnota tkáňové banky se zvýší, je-li vedle tkáně uložena i krev (ev. její izolované složky). Neméně významná je i znalost klinického stavu nemocného, především další vývoj onemocnění, následná terapie a odpověď na terapii.

Jak vypadá srovnání plánovaných představ s realitou? Ve zcela nedávném období se především změnil názor na charakter zamrazeného materiálu - trend sběru určitého typu nádorů pouze pro určitý projekt, který byl v minulosti pro mnohé výzkumné studie prováděn, je třeba nahradit **systematickým sběrem**

všech dostupných nádorů. Prospektivní ukládání vzorků od následně operovaných pacientů celého spektra nádorů se sice v prvních letech sběru jeví být zdánlivě bez aktuálního efektu pro konkrétní vědecké využití, je to však významný zdroj pro identifikaci již známých (ev. potenciálních nových) markerů, které jsou využívány pro biologickou charakterizaci maligních nádorů i optimalizaci léčby těchto nemocných. Činnost zabývající se sběrem, ukládáním, redistribucí materiálu a v neposlední řadě etickými problémy je koordinována nejen na národních, ale i nadnárodních úrovních (2-6).

Vedle tradičních forem nádorové banky se v poslední době začíná rozšiřovat i její **virtuální varianta**. Virtuální nádorová banka je databáze mikroskopických nálezů nádorů, z nichž je uložena rovněž tkáň ve zmrazeném stavu spolu s uvedením základních klinicko-patologických dat (7-10). Evropská online nádorová banka dosud sdružuje 10 onkologických center (8-9), projekt s názvem TUBAFROST (dotovaný grantem od roku 2002) předpokládá v budoucnu možné využití takto charakterizované zmrazené tkáně v mezinárodních studiích (8). Cílem je vytvořit síť tkáňových nádorových bank pro obecné využití vědeckou veřejností. Podle předpokladu bude mít tato virtuální banka k dispozici kvalitně odebrané, uložené a charakterizované vzorky nádorových tkání ve většině evropských onkologických center. Seznamy nádorových tkání budou dostupné vybraným skupinám evropské vědecké komunity. Vzhledem k tomu, že tkáň budou uschovány na jednotlivých spolupracujících ústavech, bude základní podmínkou vypracování standardních postupů zacházení se vzorky.

Z technických novinek je třeba se zamyslet nad standardizací úschovy, značením (barkódový popis?) a softwarovým zpracováním databáze uložených vzorků (11). V současnosti převládá názor podložený stabilitními experimenty, že pro účely tkáňové banky je dostatečnou skladovací teplotou -80°C (po rychlém zamražení odebrané tkáně v tekutém dusíku), teplota par dusíku (-140 až -150°C) však bude zřejmě podmínkou výše zmíněného projektu.

Dostupnost **klinických-patologických dat** nejen v okamžiku diagnózy a odběru vzorku, ale především v průběhu vývoje onemocnění, patří k údajům, které jsou pro význam nádorové banky klíčové. Výsledky experimentálních studií na uloženém materiálu pak mohou být korelovány s prognostickými ukazateli, s vývojem onemocnění a s odpovědí na terapii.

Materiál pro molekulárně-biologickou analýzu. Úspěch molekulárně biologických metod je založen především na kvalitě nukleových kyselin purifikovaných z klinického materiálu. Pro tyto účely jsou různými pracovišti vypracovány optimální podmínky úschovy materiálu i izolace a úschovy purifikovaných nukleových kyselin. Využití dlouhodobě zamražených tkáňových vzorků pro molekulárně-biologické metody automaticky předpokládá dobrou molekulární stabilitu DNA a RNA ve tkáních dlouhodobě zamražených obvykle při -80°C . Bylo ověřeno, že až 80% uložených nádorových tkání vykazuje velice dobrou kvalitu DNA i po víceletém (až 7 letém) uložení (12-14), po této době je vysoká kvalita RNA zachována asi u 60% nádorů.

Obecně je možno pro DNA analýzu využít i archivní materiál (materiál fixovaný, zalitý v parafínu). V tomto případě jsou však studovány fragmenty o velikosti méně než 500 párů bazí. Pro extrakci RNA z archivního materiálu (velikost fragmentů méně než 200 párů bazí) je vhodná vedle etanol-fixované rovněž OCT fixovaná tkáň, optimální je však tkáň zamražená. Pro extrakci proteinů se využívá pouze nefixovaná tkáň.

Vedle ukládání zmrazené nádorové tkáně v tkáňových bankách se rozvíjí pro účely molekulárně-genetické analýzy i **izolace a ukládání DNA z krve (DNA banking)**. Tento materiál je vhodný pro porozumění změnám v oblasti nukleových kyselin u obecných i hereditárních onemocnění. Byly vypracovány přesné protokoly, které zhodnotily postup extrakce DNA jak co se týče délky stání plně krve, tak i stability nukleových kyselin: izolovaná DNA zamražená při -80°C vykazovala stabilitu alespoň 10 let (14).

Velký prostor je aktuálně věnován diskusím o **informovaném souhlase nemocného**, který zabezpečuje z právního hlediska možnost úschovy a využití tkáně pro uvedené účely. Legislativa týkající se tohoto problému je zatím především v Evropě v začátcích – první pokusy o vytvoření zákonných pravidel pro sběr a využití nádorového materiálu byly provedeny pouze ve Švédsku, v Německu a na Islandu (review viz 9), přestože se tímto problémem zabývají poradní sbory na národních i mezinárodních úrovních. Informovaný souhlas v uvedených zemích

je požadován pro každý projekt, který předpokládá využití nádoru individuálního dárce. Souhlas pro provádění výzkumu určité choroby je méně striktní, zcela obecný souhlas pro jakýkoliv výzkum je nejběžnější formou souhlasu dárce. Jeho identita by měla být experimentátorům nepřístupná, trendem je zachovat co nejvyšší anonymitu dárce. Nicméně, objevují se již snahy individuálních nemocných ovlivnit možnost uložení operované nádorové tkáně pro ev. budoucí terapeutické rozhodování v případě progresu choroby. Podle nedávno publikované studie je i v případě striktních požadavků pro ev. další využití tkáně informovaný souhlas poskytnut více než 90% dárců (15). Je třeba velice pečlivě zvážit, zda příliš přísná pravidla možnosti úschovy a využití nádorové tkáně nepovedou v budoucnu spíše k poškození pacienta z důvodu nemožnosti provést ev. doplňkové analýzy prediktivních markerů než k jeho ochraně.

Tkáňová banka Masarykova onkologického ústavu byla založena koncem roku 2000. Je zaměřena především na vybrané nádorové lokality, a to karcinomy kolorekta, mammy, melanomu, karcinomy ovarii a ledvin.

Organizace a sběr materiálu je po běžných počátečních problémech prováděn rutinně podle přesně předepsaného protokolu. Vhodnost materiálu určeného pro tkáňovou banku je předběžně označena již před operací. Těsně před operací je proveden rovněž odběr krve pro uložení séra nemocného. Definitivní zhodnocení a odběr tkáně do nádorové banky (vždy pouze přebytečné nádorové tkáně, která není nutná na histopatologické vyšetření) provede do 15 minut od vynětí nádoru patolog. Materiál je ihned uložen v 1 ml kryozkumavkách do tekutého dusíku (obvykle 2 – 4 alikvoty tkáně o velikosti optimálně $3\times 3\times 2$ mm, současně je odebrána sousedící tkáň pro histologickou charakteristiku). Je-li dostupná sousední zdravá tkáň, ev. uzlinové metastázy, jsou uloženy stejným způsobem. Ve zhruba týdenních intervalech jsou zkumavky přeneseny do hlubokomrazáčích boxů (-80°C), jejich seznam, charakterizace a pozice v tkáňové bance je označena v databázi nemocničního informačního systému, takže veškeré dostupné informace o nemocném (operační protokol, histologická charakterizace a další klinický vývoj) jsou snadno dostupné. Pro účely poskytnutí vzorku bude zajištěna anonymita dárce. **Dosud bylo odebráno více než 900 nádorových tkání** individuálních nemocných.

Předpokládané využití souvisí v krátkodobém horizontu především s možností charakterizovat u individuálních nemocných prognostické a prediktivní markery, ev. s použitím nádorové tkáně jako definovaný modelový materiál pro řešení vybraných výzkumných projektů jak MOÚ, tak i grantových projektů řešených ve spolupráci s dalšími ústavu. Budoucí vývoj využití lze v daném okamžiku nastínit pouze rámcově, nicméně uvedený materiál je cenný nejen pro budoucí projekty na nejrůznějších úrovních výzkumu, ale i pro individuální predikci odpovědi nemocného na navrhovanou terapii.

Literatura

1. Coufal O., Žaloudík J., Pačovský Z., Svoboda M., Talač R.: Tkáňová banka v onkologickém výzkumu – základní předpoklady a otázky. *Klinická onkologie* 15, 2002, 41-46.
2. Whyte B.: National tumor bank set up in United Kingdom. *J.Natl.Cancer Inst.* 21, 2003, 706-710.
3. The European Group on Ethics in Science: Adoption of an Opinion on Ethical Aspects of Human Tissue Banking. Online: [http://europa.eu.int/comm/european_group_ethics/docs/cp11_en.pdf], cit.July 1998.
4. Dutch Federation of Medical Scientific Societies : Code for proper use of human tissues, version 2002. [Online:http://www.fmwv.nl/gedragcodes/goedgebruik/CodeProperSecondaryUseOfHumanTissue.pdf], cit. Jan.2003.
5. The University of Manchester, UK Biobank Coordinating Center: UK Biobank Ethics and Governance Framework. Online: [http://www.ukbiobank.ac.uk/], cit.Sept.2003.
6. University of Minnesota: Cancer Center: Cancer Center Research Projects. Online: [http://www.cancer.umn.edu/page/news/CoresRep8_00.html], cit. Sept. 2000.
7. National Cancer Institute: Cancer Diagnosis Programme, Cooperative Human Tissue Network. Online:[http://www.cancerdiagnosis.nci.nih.gov/specimens/index.html], cit.Nov.2002.

8. EORTC and Erasmus University Rotterdam , Dept.of Pathology: European Human Frozen Tumor Tissue Bank. Online:[http://www.eortc.be/vtb/vtboverwebsite/TuBaFrostFrameSet.asp], 2002.
9. Oosterhuis J.W., Coebergh J.W., van Veen E.-B.: Tumor banks: well guarded treasures in the interest of patients. *Nature Reviews/Cancer*, 2003, 73-77.
10. Adam D.: Online tumor bank aims to offer ready route to tissues. *Nature* 416, 2002, 464.
11. Holland N., Smith M.T., Eskenazi B., Bastaki M.: Biological sample collection and processing for molecular epidemiologic studies. *Mut.Res./Reviews in Mutation Res.*, 534, 2003, 217-234.
12. Chu T.Y., Hwang K.S., Yu M.H., Lai H.C., Liu J.Y.: A research-based tumor tissue bank of gynecologic oncology: Characteristics of nucleic acids extracted from normal and tumor tissues from different sites. *Int.J.Gynecol.Cancer* 12, 2002, 171-176.
13. Jewell S.D., Srinivasan M., McCarth L.M., Williams N., Grizzle W.H., Li Volsi V., MacLennan G., Sedmak D.D.: Analysis of the molecular quality of human tissues. *Am.J.Clin.Pathol.*, 118, 2002, 733-741.
14. Visvikis S., Schlenck A., Maurice M.: DNA extraction and stability for epidemiological studies. *Clin.Chem.Lab.Med.* 36, 1998, 551-555.
15. Malone T., Catalano P.J., O'Dwyer P.J., Giontonio B.: High rate of consent to bank biological samples for future research: The Eastern cooperative oncology group experience. *J.Nat.Cancer Inst.* 94, 2002, 769-771.