

ZPRÁVA Z 20. MEZINÁRODNÍ KONFERENCE O LIDSKÝCH NÁDOROVÝCH MARKERECH 2003

ŠIMIČKOVÁ M.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

20th International Conference on Human Tumor Markers, pořádaná IATMO (International Academy on Human Tumor Markers) se konala v tomto roce 21.-25.6.03 v Sieně, Itálie. Kongres je v poslední době výrazně orientován nejen na sérové nádorové markery, ale i na vybrané oblasti nádorové biologie se vztahem k prognostické a prediktivní onkologii. K základním tématům letošního sjezdu patřily především oblasti molekulární onkologie, od praktických ukázek využití DNA-arrays, přes možnosti průkazu mRNA významných buněčných regulátorů, až k proteomice na úrovni detekční i s orientací na terapeutické využití. Sjezd byl dále zaměřen na protinádorovou vakcinaci, na význam kmenových buněk, na biologickou nádorovou terapii, a na metody diagnostiky a specifické léčby na molekulárním podkladě pro jednotlivé nádorové lokalizace.

Na rozdíl od předcházejících sjezdů této mezinárodní společnosti, kde převažovaly práce zabývající se klasickými sérovými markery, bylo celé jednání vedeno v duchu úvodní plenární přednášky dr. Fratiho (Itálie) s názvem: **Nádorové markery v éře molekulární medicíny**. V prezentaci byl shrnut vývoj za období od první publikace o karcinoembryonálním antigenu (1965) do dnešních dnů. Na příkladu tohoto antigenu je možno vidět, že teprve po více než 15 letech od jeho objevu byl doporučen jako vhodný sérový nádorový marker. Hybridomová technologie umožnila v polovině 80. let identifikaci a kvantifikaci dalších antigenů pomocí monoklonálních protilátek, čímž bylo zahájeno období intenzivního klinického využití klasických sérových nádorových markerů. Podobná přednáška zazněla od předního italského odborníka zabývajícího se nádorovými markery (dr. Gion). Zatímco klasické nádorové markery obvykle korelují s nádorovou hmotou a jsou tedy vhodné především k monitorování pokročilejších forem maligního onemocnění, v posledním desetiletí byly identifikovány substance vztažené ke klíčovým mechanismům buněčného metabolismu. Tyto látky jsou měřitelné jak v ve tkáni nádoru, tak i v tělních tekutinách. Jejich kvantifikace může přinést významné informace o nádorové biologii a zároveň mohou mít význam i pro protinádorovou terapii. Vzhledem k překotnému vývoji těchto poznatků je stále nedostatek obecných doporučení, která by byla založena na metaanalýze výsledků vhodné uspořádaných studií. Ani pro nejužívanější marker (CA15-3 u karcinomu prsu) však nejsou studie s definovanou úrovní (evidence level I či II) k dispozici.

Otázky nových biomarkerů jsou často spojeny s novými problémy: K rozporným výsledkům lze dospět při studiu molekuly na úrovni exprese genu, transkripce její mRNA, koncentrace proteinu, ev. hodnocením její biologické aktivity. Komplexní molekulární struktura některých biomarkerů může vést k rozdílné kvantifikaci různými detekčními systémy. Dosavadní zkušenost týkající se obvykle nedostatečné senzitivity jednoho biomarkeru vede k užití dvou, ev. až širokého panelu substancí, což vyžaduje vhodné statistické systémy pro hodnocení výsledků. Kategorizace podle diskriminační hladiny markeru je značnou simplifikací problému, i zde je třeba využívat matematické modely pro individuální hodnocení. Neméně důležitá je i preanalytická fáze přípravy vzorku, která speciálně pro studie na úrovni genu musí být jasně standardizována. Je poněkud paradoxní, že do detailu definované pro-

tokoly klinických studií nejsou dosud doprovázeny podobně striktními pravidly hodnocení biologických markerů.

Na podkladě experimentálních studií byly v poslední době navrženy, preklinicky testovány a uvedeny do klinické praxe **nové terapeutické látky, které jsou namířeny specificky proti určitým molekulám**. Patří k nim protilátka proti onkoproteinu HER-2/neu (*Herceptin*), inhibitory tyrosinkinázy EGFR (*Iressa = Gefitinib, Tarceva = Erlotinib, Erbitux = Cetuximab*), proti tyrosinkináze bcr-abl (*Gleevec*), proti antigenům buněčného povrchu (*MabThera = Rituximab*), proti VEGF (*Avastin = Bevacizumab*), proti matrix metaloproteinázám (*Neovastat*) apod. Význam těchto terapeutik bude však potvrzen dalšími studii. Význam receptorů růstových faktorů byl shrnut i v přednášce dr. Aaronsona. Jeho přednáška vyvolala diskusi o významu **časné detekci minimální reziduální choroby**. Přestože se předpokládá, že ne všechny cirkulující buňky jsou metastazující, tak bylo doporučeno na jejich průkaz pokračovat – teprve další studie mohou potvrdit jejich ev. význam pro možné další terapeutické rozvahy. Velice pěkná práce byla z této oblasti prezentována na příkladu mRNA pro CEA vyšetřované z cirkulujících buněk separovaných imunomagneticky z krve. Vzhledem k nízké senzitivě metody průkazu mRNA ověřili autoři, že in vitro upregulace CEA pomocí staurosporinu zvýší produkci mRNA o řád, čímž se výrazně zlepší možnost zachytu minimální reziduální choroby. Pro detekci poměru cirkulujících buněk v kostní dřeni a krvi nemocných před a po chemoterapii byla studována mRNA pro maspin, serinovou proteinázu s tumor-supresorovou aktivitou. Srovnání se stanovením mRNA pro CK19 bylo zjištěno, že CK19 je charakterizováno vyšší falešnou pozitivitou.

Otázky genetické dispozice k nádorovým onemocněním sice nebyly hlavním tématem konference, nicméně pro nádorovou diagnostiku je tento problém jeden z nejvíce studovaných – již nyní je známo kolem 20 maligních onemocnění s hereditárním výskytem. **V přednášce dr. Lynche byly shrnuty veškeré znalosti o hereditárním kolorektálním karcinomu**. Přes obecný diagnostický přístup, vedoucí od historie výskytu karcinomu v rodině, byly rozebrány postupy průkazu tohoto genetického onemocnění. Dvě třídy hereditárního karcinomu kolorekta jsou založeny rovněž na anatomické lokalizaci a biologickém chování: Distální lokalizace, kde se vyskytuje nejčastěji familiární adenomatózní polypóza (FAP) je charakterizována karcinomem s aneuploidním DNA obsahem, mutacemi v APC, p53 a k-Ras genech a chová se více agresivně. Maligní zvrát nastává ve věku 40-50 let, průkaz ACP mutací je známkou vysokého rizika a je doporučována kontrola od 10-12 let. Proximální kolorektální karcinomy typu Lynchova syndromu (HNPCC, hereditární nepolypózní kolorektální karcinomy) vykazují diploidní DNA charakter, mikrosatelitovou nestabilitu, zárodečné mutace v MMR genech (MLH1, MSH2 a MSH6) a jsou méně agresivní. Nové objevy v genomice, proteomice a mikročipové technologii považuje dr. Lynch za záruku vývoje preventivních a terapeutických možností.

Problematiku nádorů prsu z laboratorního hlediska rozebrala dr. Daidone (Itálie). Mezi prognostické a prediktivní faktory zahrnuje parametry na chorobě nezávislém (věk) a parametru vztahených k nádoru, jako je velikost nádoru, grade, postižení axilárních uzlin (podle doporučení NIH-NCI¹ či St. Gallen Consensus Conference z r. 1998) nově rovněž **některé biologické charakteristiky**. Z mnoha studovaných faktorů, souvisejících s proliferací, angiogenezí, invazí, metastazováním, hormonální závislostí jsou dosud prokázány jako

přínosné testy proliferativní aktivity, vyšetření hormonálních receptorů, HER-2/neu a plasminogen-aktivátoru.

Nová technologie **DNA mikročipů**, umožňující identifikaci molekulárních změn na genové úrovni, byla velice přehledně prezentována na výsledcích holandské skupiny autorů van de Vijvera a kol.² týkajících se prognostické role exprese profilu 70 vybraných genů u karcinomu prsu. Pomocí této metody bylo téměř 300 nádorů rozděleno do dvou skupin podle rozdílné exprese těchto genů se vztahem k metastazování. Kaplan-Meierovy křivky celkového i bezpříznakového přežití významně koreluje s expresním profilem uvedených genů podle rozdílné vazby na metastazování. Multivariační analýzou byl prokázán lepší prognostický význam DNA-analýzy ve srovnání s parametry klasickými (věk, stav postižení lymfatických uzlin, grading tumoru, obsah steroidních receptorů), jenom velikost tumoru vykazovala podobnou prognostickou sílu. Zdá se být zřejmé, že tento postup mohl patřit k významným parametrům pro výběr pacientů, u nichž bude adjuvantní léčba přínosem.

Klasifikace neuroendokrinních tumorů byla v posledním období rozšířena podle WHO doporučení na tři skupiny: a) dobře diferencované endokrinní tumory s nízkým stupněm malignity, b) málo diferencované endokrinní karcinomy s vysokým stupněm malignity, c) smíšené exo- a endokrinní tumory. Diagnostické postupy využívají stanovení cirkulujícího chromograninu A. Kromě klasického postupu terapie jsou i pro tyto nádory užívány určité biologické modality (somatostatinová analoga, interferon). Zajímavé sdělení bylo o mechanismu neuroendokrinní diferenciace u tumorů prostaty.

Z novinek o sérových markerech stojí za zamyšlení (ev. srovnání s našimi předběžnými studiemi) tyto prezentace:

1. **Chromogranin A** u neuroendokrinních tumorů jako sérový marker první volby pro tuto lokalizaci. Dvě metody pro jeho kvantifikaci v krvi existující na trhu vykazují slušnou korelaci. Odpověď na klinický stav je lepší než při užití stávajících markerů.
2. **Placentární alkalická fosfatáza**, jejíž užití v séru je komplikováno falešnou pozitivitou u kuřáků, by mohla být vhodná pro imunohistochemickou lokalizaci mikroinvazivních tumorů zárodečných buněk.
3. **Interleukin-6 (IL-6)** byl prokázán jako velice senzitivní marker hepatocelulárního karcinomu, nemocní s extrahepatálními metastázami vykazovali sérové hodnoty zvýšení až 50 násobku horní hranice zdravých kontrolních osob.
4. Výhledy týkající se vývoje onemocnění **karcinomem prostaty** jsou frustrující: zatímco nyní má tuto chorobu diagnostikováno v EU každý 25. muž ve věku 74 let, očekává se podle současných trendů vzrůst incidence v roce 2020 až na každého 10. muže téhož věku. Přes pokrok, který můžeme přičítat **diagnostickému využití PSA**, je mnoho zachycených nádorů inoperabilních. Androgen-deprivační terapie rozvinutého karcinomu prostaty je metodou volby již více než 50 let. Teprve nyní je detailně studován mechanismus inhibice buněčné proliferace a indukce apoptózy vlivem transkripce **androgenních receptorů**, které se v buňce chovají podobně jako estrogení receptory u karcinomu

prsu. Na rozdíl od toho onemocnění je však u maligního nádoru prostaty terapie jiného typu (chemo, radioterapie) v okamžiku relapsu neúčinná. Na podkladě experimentálních prací jsou popisovány mechanismy, které mohou vést k této hormonální neodpovídnosti. Androgení receptory totiž mohou v určitém procentu nádorů podléhat mutacím v ligand-vazebném i transkripčním místě, což může vést k poruše mechanismu potlačení jejich účinku. Není dosud vyjasněno, zda amplifikace a zvýšená exprese androgenních receptorů může být příčinou neúčinnosti hormonální blokády. Oba tyto jevy však nevysvětlují mechanismus úniku u všech pacientů. Velkou roli zřejmě hraje i posttranslační modifikace receptorů. Nevylučuje se ještě účinek alternativních cest indukce proliferace, a to zcela nezávislých na androgenních receptorech.

5. Exprese HER-2/neu ve tkáni byla podrobena metaanalýze ve vztahu k resistenci pacientek s karcinomem prsu k hormonální terapii. Závěry srovnání výsledků 12 studií (asi 2400 pacientů) jsou statisticky prokazatelné: pacienti s vyšší expresí HER-2/neu jsou méně senzitivní na hormonoterapii. Vyšetření sérových hodnot bude mít rovněž prediktivní hodnotu.

Z dalších sdělení je zajímavé si všimnout, že jako nejlepší prognostický faktor mezi testovanými konvenčními markery **kostních metastáz u karcinomu prostaty** (kostní alkalická fosfatáza, kolagen propeptid typ I, karboxyterminální peptid kolagenu typu I, močové kalcium), ev. dalšími charakteristikami nádoru i nemocného byl shledán Karnofski index. Byl popsán nový **marker pro časnou detekci karcinomu prsu** (TA-90, detekován je komplex antigenu s endogenní protilátkou), který v kombinaci s mammografií značně zvýší klinickou senzitivitu zachytu tohoto onemocnění.

Z molekulárně-biologických technik je třeba se zmínit především o několika prezentacích:

Přes nejasnosti o významu volných nebuděných **složek telomerázy** uvolněné přímo do plasmy byla prokázána korelace mezi klinickým stavem u karcinomu prsu a katalytickou podjednotkou tohoto ribonukleoproteinu – hTERT, a to modifikací PCR metody. Stanovení **mRNA thymidylátsyntázy** bylo provedeno na malém souboru kolorektálního karcinomu s následnou terapií 5-FU typu. Výsledky nejsou uzavřeny – byly ověřeny nesignifikantní trendy vyššího mediánu bezpříznakového intervalu i nižšího mediánu celkového přežití u nádorů s vyšší expresí mRNA pro thymidylátsyntázu. Přesto, že se na podzim tr. koná konference s podobným zaměřením v Edinburgu (International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM), bylo setkání poměrně dobře zastoupeno světovými odborníky. Příští rok se koná 21. ročník IATMO v Číně.

Literatura

1. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: adjuvant therapy for breast cancer. November 1-3, 2000. J.Natl. Cancer Inst. Monogr. 2001, 30, 5-15.
2. van de Vijver M.J., He Y.D., Van't Veer L.J. et al: A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. New Engl.J.Med. 2002, 347, 1999-2009.