

## ZPRÁVA Z 28<sup>th</sup> MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ONCODEVELOPMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE

ŠIMÍČKOVÁ M.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

Pravidelné setkání této společnosti se konalo tento rok 8.-13. 9. 2000 v Mnichově. Kongres je v poslední době výrazně orientován nejen na sérové nádorové markery, ale i na vybrané oblasti nádorové biologie se vztahem k prediktivní onkologii. K základním tématům letošního sjezdu patřily: prognostické a prediktivní tkáňové i sérové faktory se zaměřením na angiogenezi, apoptózu, proliferaci, růstové faktory a jejich receptory a proteinázy. Velká pozornost byla věnována matematickému modelování dynamiky změn hladin sérových nádorových markerů při terapii a v neposlední řadě klasickým sérovým nádorovým markerům z pohledu nejnovějších poznatků. Jedna z nejobsáhlejších sekcí se zabývala **HER2/neu** (od synonyma c-erbB-2 se definitivně upouští). Hledají se odpovědi na několik základních otázek: a) Jaký je prediktivní, ev. prognostický význam amplifikace tohoto onkogenu ev. jeho overexpresie (= nadměrná exprese) ve tkáni karcinomu prsu v širších prospektivních studiích, b) výběr nemocných vhodných pro imunoterapii anti-HER2/neu protilátkou (Herceptinem), c) srovnání metod průkazu HER2/neu amplifikace genu či overexpresie onkoproteinu, d) význam stanovení sérového HER2/neu, e) význam pro další nádorové lokalizace.

**Prognostický a prediktivní význam HER2/neu** ve tkáni byl potvrzen v mnoha studiích. Jeho amplifikace a overexpresie je spojena s vyšší rezistencí na hormonoterapii, především ve skupině ER a PR pozitivních nemocných: zvažuje se možné negativní ovlivnění tamoxifenem ve smyslu stimulace HER2/neu exprese. Nebyla jednoznačně prokázána horší odpověď na terapii CMF v případě HER2-pozitivních primárních nádorů. Odpověď na léčbu antracykliny a taxolem může být naopak u HER2-pozitivních případů zlepšena. Pro zhodnocení odpovědi jsou studovány rovněž hladiny tohoto onkoproteinu v séru nemocných. Zjištěné zvýšené hodnoty při negativním primárním nádoru byly interpretovány jako možná metodická odlišnost, ev. klonální změny.

Z dosud uveřejněných prací je pozorována částečná neshoda mezi amplifikací onkogenu a overexpresí onkoproteinu. Zatímco byla amplifikace pozorována pouze u 17-20 % nádorů, imunohistochemická lokalizace prokazuje pozitivitu až u 16-38 % případů. Především hodnocení imunohistochemické (IHC) pozitivity se score 2+ (např. Herceptestem firmy Dako) se jeví být v neshodě s průkazem reakcí FISH (fluorescenční in situ hybridizace firmy PathVysion). Bylo proto navrženo používat v těchto nevyhraněných případech (IHC 2+) jako doplňující FISH metodu, podle níž se rozhoduje, zda užít terapii Herceptinem. Jednotlivé protilátky se v IHC hodnocení liší, z panelu 9 srovnávaných protilátek byla většina monoklonálních, lišily se specificitou proti extracelulární doméně HER2/neu či specificitou proti intracelulární části. Srovnáním protilátek firem Oncogene, Zymed, Novocastra, Oncor a Dako bylo prokázáno, že výsledky IHC stanovení při užití Herceptestu se lišily od ostatních protilátek

a dávaly rovněž vyšší diferenci s výsledky FISH ve smyslu falešné (?) pozitivivity.

Pokusy o **standardizaci technik stanovení HER2/neu** jsou soustředěny na srovnání techniky FISH a IHC. Zdá se, že k základním nesrovnalostem při hodnocení vztahu FISH a IHC nedochází v případě extrémně vysoké amplifikace nebo zvýšené exprese proteinu, ale v oblasti středních zvýšení. Dosud se v tomto rozhodovacím procesu neužilo kvantitativní stanovení z membránového extraktu tkáň primárního nádoru. Rozdíly mezi průkazem na úrovni genu a proteinu jsou komentovány jako možné rozdíly především v technice stanovení. Příčiny neshody mohou být dále způsobeny těmito fakty: a) overexpresie je výsledkem deregulace spíše než amplifikace genu, b) FISH vykazuje lepší specificitu c) ev. existuje heterogenita vzorku zkoumaného na úrovni genu a proteinu. Ve všech systémech je tendence postupy standardizovat a zavádět kontrolní materiál.

HER2/neu pozitivita u karcinomu prsu byla podle vyšetření 860 primárních nádorů nalezena v 19 % případů (IHC, R. Molina, Španělsko), byla v korelaci s histologickým gradingem a v nepřímé korelaci s obsahem steroidních receptorů. HER2/neu tkáňová pozitivita u nemocných nevykazovala vztah k DFI při hodnocení multivariační analýzou. Sérové hodnoty HER2/neu byly zvýšeny ve skupině 690 nemocných se senzitivitou 44 % pro progresivní onemocnění. Při hodnocení vztahu sérové hodnoty HER2/neu k predikci odpovědi na terapii se jeví vyšší hodnota před terapií jako prognosticky nevýhodná, podobně se však chová i CEA. Sérová koncentrace HER2/neu je nezavislým prognostickým faktorem při hodnocení adjuvantní terapie v multivariační analýze. Vyšetření bylo prováděno automatickým analyzátořem firmy Bayer.

Další velký soubor analyzovaných vzorků HER2/neu publikoval dlouholetý pracovník v oblasti nádorových markerů M. Schwartz (USA). Podle jeho hodnocení má HER2/neu dosud neověřený význam pro prognózu nemocných s karcinomem prsu, má velký význam pro výběr terapie a monitorování průběhu onemocnění. Autor publikoval výsledky analytického testování, firemní soupravy Bayer vykazují lepší analytické parametry metody např. ve srovnání s testem firmy Oncogene (manuální stanovení), korelace mezi oběma soupravami byla však vysoká. Sérové hodnoty HER2/neu přímo korelují s hodnotami ve tkáni. Byla zhodnocena falešná pozitivita u nemaligních onemocnění - pohybuje se do 5 %, senzitivita ve vztahu k stadiu onemocnění roste od 8 do 40 %. Senzitivita pro karcinomy onemocnění je lepší než pro CEA (47 versus 40 %), CA 15-3 v kombinaci s HER2 vykazuje senzitivitu až 76 % (se specificitou pouze 54 %). Nebyl prokázán vliv interference Herceptinu na stanovení HER2. Pro klinické rutinní monitorování sérového HER2 byly doporučeny pouze nemocné produkující HER2 v primárním nádoru, obzvláště před terapií, ev. v průběhu terapie Herceptinem.

K výraznému pokroku došlo rovněž při studiu **funkce HER2/neu onkoproteinu** jako jednoho ze skupiny receptorů růstových faktorů: kromě EGFR patří do této rodiny i HER3 a HER4. Vedle ověřené role v signálním přenosu vedoucím k proliferaci má HER2/neu nemenší význam i pro metastazování. Aktivace tohoto receptoru vazbou s dosud neznámým ligandem vede k heterodimerizaci s dalšími členy této rodiny. Tyrosinkinázová aktivita spojená s touto aktivací pak spouští další kroky v signální cestě zahrnující aktivaci fosfolipázy, fosfoinositidu, přestup kalcia a následně reorganizaci aktinu. Je tedy zřejmé, že tato signální cesta se může podílet na změně buněčné motility, a tím je ovlivněn i metastatický potenciál buňky. Pokrok v poznání vztahu struktury a funkce heterodimerů HER2/neu s HER3 a HER4 jsou podmínkou pro vývoj vhodných terapeutických látek na bázi ligandů pro tyto receptorové dimery. Dosud není znám ligand vážící se na HER2 homodimer. Na receptor HER3 se sice může navazovat ligand (ze skupiny heregulinů), tento receptor však nemá tyrosinkinázovou aktivitu. Pro tvorbu funkčních komplexů je tedy třeba kooperace mezi jednotlivými členy této rodiny.

Princip účinku Herceptinu je dosud vysvětlován jako souborné působení protilátky navázané na receptor s důsledky prevence tvorby heterodimerů, indukce klidové fáze buněčného cyklu, inhibice angiogeneze a indukce buněčné cytotoxicity závislé na protilátce. V několika sděleních byly zveřejněny současné výsledky terapie Herceptinem. Probíhající klinické studie stále potvrzují benefit této terapie ve formě mono- i kombinované terapie metastatického procesu i při adjuvantním podání.

Závažnost kardiotoxických změn je dosud rovněž neuzavřena, jejich podíl zřejmě vzroste především při kombinaci Herceptinu s antracykliny.

Z faktorů spojených s **apoptózou** se objevilo především zajímavé sdělení o dalších detailech v poznání apoptotických signálních cest. Intenzivně je studována aktivace caspáz jako významných apoptotických efektorů. Bylo prokázáno, že na uvolnění apoptogenních faktorů se podílejí i mitochondrie. K charakteristickým projevům procesu apoptózy patří tedy vedle fragmentace DNA, změn v plasmatické membráně, aktivace caspáz, přítomnosti antigenů specifických pro apoptózu i mitochondriální alterace. Byla vyvinuta nová protilátka M30 proti neo-epitopu v pozici 387-396 aminokyselinového řetězce dostupném po štěpení cytokeratinu 18 caspázami 3, 6 a 7 během apoptózy v epitelálních buňkách. Tento antigen, který se uvolňuje do buněčného lyzátu v in vitro kulturách, byl prokázán rovněž v séru. Zvýšení jeho hladiny bylo pozorováno především při zahájení terapie. Vyšetření je založeno na komerčně dostupném setu. Tento parametr se zdá být nadějným markerem monitorování apoptózy indukované léčbou v sérech onkologických nemocných. Zajímavý přístup využití této protilátky se objevil v práci skupiny dr. Napa (Holandsko). Protilátka M30 byla využita pro simultánní stanovení apoptózy a proliferace flow cytometrií. Při definici nádorového fenotypu karcinomu kolorekta se jevil tento vztah jako nezávislý prognostický ukazatel. Jako účinný nástroj pro sledování efektu terapie se jeví být i měření nukleosomů v séru. Tyto komplexy histonů a DNA uvolněných do cirkulace po buněčné smrti indukované chemo- či radioterapií lze stanovit modifikovanou komerční soupravou (Cell Death Detection – ELISA kit, Roche).

Na procesu apoptózy se pravděpodobně podílí i  $\alpha$ -fetoprotein (AFP), a to podle nejnovějších hypotéz, podložených experimenty in vitro, v procesu selektivní internalizace pomocí AFP-receptorů nádorových buněk s následným působením na proces aktivace caspáz.

Zajímavé bylo sdělení o nových možnostech stanovení telomerázy pomocí PCR v reálném čase, které tuto metodu výrazně zjednodušuje.

Problematika **proteináz** se stále posunuje do detailnějších poznání jejich účinku, prognostického a prediktivního významu i ke zlepšeným postupům jejich vyšetřování. Potvrzuje se (studie s 2800 pacienty), že zvýšená hladina urokinázového typu plasminogenového aktivátoru (uPA), jeho inhibitoru PAI 1 a katepsinu D v extraktu tkáně je asociována s časným relapsem a kratší dobou přežití. Bylo prokázáno, že uPA silně koreluje se špatnou odpovědí na tamoxifen. Receptory uPA stanovené v séru mohou indikovat prognózu u kolorektálního karcinomu. V nabídkách komerčních souprav i při hodnocení prognostického významu matrix metaloproteináz se vyhraňují ty z mnoha enzymů této skupiny, které mají význam pro onkologii.

Nový přístup k identifikaci dalších významných nádorových antigenů přináší metodický vývoj v oblasti výzkumu proteinů jako funkčních produktů exprese genů (nová oblast výzkumu je nazývána **proteomika**). Tento výzkum je podporován dále i z důvodů identifikace nejlepšího cíle pro terapii. Dosavadní postupy analýzy – především dvojrozměrná elektroforéza a hmotnostní spektrometrie jsou kapacitně limitovány, objevují se projekty hodnotící antigeny i protilátky v robotizovaném systému (arrays –based proteomika).

**Sérová placentární alkalická fosfatáza** v podobě komerčního ELISA setu slibuje vyplnit mezeru v lepších možnostech monitorování seminomů. Její dosud publikovanou nevýhodou je nespecifické zvýšení hladin u kuřáků. Z dalších enzymů, které se zdají být nadějnými kandidáty v možnostech monitorování onkologických nemocných je **izoenzym pyruvát kinázy, tumor M2 PK**. Je to nádorová dimerní forma normálně se vyskytujícího tetrameru tohoto klíčového glykolytického enzymu. Tato dimerní pyruvát kináza je méně aktivní, což se projevuje i zvýšením hladin fosfometabolitů odvozených z glykolytického cyklu, nutných k syntéze DNA, fosfolipidů a sacharidů. Kvantifikace tohoto enzymu exprimovaného v nádorech a uvolněného do krve je prováděna pomocí komerční soupravy, a zdá se být výhodná např. pro monitorování nemocných s karcinomem ledviny, seminomů, GIT i dalších lokalizací. Na sjezdu se objevila i práce zpochybňující význam tohoto stanovení – především bakteriální infekce, ale i mnohé benigní onemocnění způsobují zvýšení tohoto markeru v séru, nemůže tedy být užít při primární diagnostice.

Detekce **minimální reziduální choroby** vede dosud ke kontroverzním výsledkům. I když je myšlenka využití flow-cytometrii, FISH nebo PCR amplifikace k průkazu okultní diseminace obvykle v kostní dřeni, ev. v cirkulaci již delší dobu ověřovaná, existují dosud pochybnosti o její senzitivitě a specificitě. Z několika přednesených prací sice vyplynula možnost detekce metastatického procesu pomocí uvedených technik u karcinomu prsu, prostaty, ledvin a akutní leukemie. Metody detekce však stále trpí falešnou pozitivitou, postupy je třeba standardizovat a dále určit klinicky významné limity senzitivity a specificity.

Z palety **méně užívaných nádorových markerů** se objevilo hodnocení imunochemického stanovení S100 proteinu a MIA (melanoma-inhibiting activity) pro monitorování nemocných s melanomem. Obzvláště S 100 jako protein vázající vápník má nižší stabilitu v séru (snad nestabilita dimerní podoby). O jeho významu pro monitorování byly zveřejněny kontroverzní výsledky. Multicentrické studie však oba markery pro tyto účely doporučují. Stanovení tyrozináza - mRNA pomocí RT PCR se jeví být pro nemocné s melanomem zřejmě významnou metodou.

Cancer-associated serum antigen (CASA) může zlepšit kombinací se sérovým CA 125 diskriminační výpověď při rozhodování mezi benigním a maligním tumorem v oblasti břišní. Zdá se však, že příspěvek tohoto stanovení nepřinesl výrazné zlepšení senzitivity záchytu progresu onemocnění u ca ovaria.

Nádorové markery užívané v rutinní praxi jsou stále podrobovány hodnocením ve vztahu k prognostické, a nyní především prediktivní odpovědi. Na kongresu pokračovaly každoroční workshopy pro hodnocení stávajících a nových protilátek i hodnocení antigenů obecně. Zvláště významné jsou závěry z jednání o HCG, jehož význam (především  $\beta$ -složky) je pro onkologii důležitý. Z hodnocených přístrojů se zdá být výhodné stanovení HCG na imunochemickém analyzátoru ELECSYS (Roche).

Pozornost věnovaná PSA přináší výsledky – přehodnocuje se oblast pod 4 ug PSA/l, která podle dřívějších představ byla méně suspektní, vyhodnocují se screeningové programy. Objevují se další sdělení podporující význam stanovení TPS při monitorování efektu terapie nemocných s karcinomem prsu a ovaria.

Pokusy o **hodnocení efektu terapie** pomocí stanovení nádorových markerů, ať už klasických, nebo ev. dalších generací je stále aktuální. Zajímavý přístup k hodnocení terapeutické odpovědi za srovnatelný časový úsek je výpočet plochy pod křivkou závislosti koncentrace analytu na čase. Efekt terapie bývá hodnocen jako poměr maximální a minimální hodnoty, ev. jako poměr pre-terapeutické a minimální hodnoty nádorového markeru v séru. Matematické modelování dynamiky změn hladin sérových nádorových markerů bylo náplní jednoho bloku – prezentované postupy jsou na úrovni (nebo v začátcích) ve srovnání s naším programovým vybavením pražských autorů (Ústav infomatiky). Hodnocení neznámého primárního nádoru podle hladin nádorových markerů doporučují renomovaná pracoviště pouze podle výpočtu koeficientu dvou markerů pro vybrané diagnózy, ev. podle manuálního hodnocení vybraných mezí.

Kongres byl navštíven asi 250 účastníky z celého světa, konal se na mnichovské klinice v Grossshardenu, což je pracoviště významně pracovnice v oboru nádorových markerů dr. Stieberové. Vybavení poslucháren (které slouží především pro studenty) audio- i videotechnikou bylo na vysoké úrovni. Prezentace českých autorů (Plzeň – skupina prof. Topolčana, Praha – dr. Pecan i naše – výsledky studia telomerázy) se setkaly s pozitivním ohlasem.

Abstrakta kongresových sdělení jsou publikována jako supplementum časopisu Tumor Biology, 21, suppl.1, 2000, s-1-161.

**Účast na sjezdu byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. M173.**