

## 19. KONFERENCE IATMO VE VEJLE, DÁNSKO, 25.-28.9.02

ŠIMÍČKOVÁ M., UMLAUF J.  
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

**19<sup>th</sup> International Conference on Human Tumor Markers** se konala v tomto roce 25.-29.8.02 ve Vejle, Dánsko. 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 změny genomu i proteomu. Úvodní plenární přednáška nositele Nobelovy ceny T. Hunta o **cyklin-dependentních kinázách**, základních efektorech buněčného cyklu, objasnila představy o regulaci buněčného cyklu ve vztahu k malignímu procesu. Zvýšená exprese pozitivních regulátorů – cyklinů – i snížená exprese negativních regulátorů, např. inhibitorů cyklin-dependentních kináz, se může projevit ovlivněním proliferace na různém stupni buněčného cyklu. Porozumění tomuto molekulárnímu mechanismu umožní nejen poznat podstatu přeměny normální buňky v maligní, ale především povede k rozvoji protinádorové strategie.

Přednáška S.Sella přinesla podle očekávání vyčerpávající **shrnutí současných představ vysvětlujících maligní proces na základě existence kmenových buněk**: potenciál nádorové buňky dělit se se liší podle různých nádorových typů, a to od totipotentních teratokarcinomů přes pluripotentní leukemie a bi-či unipotentní zhoubné nádory např. kůže a plic. Autor podpořil tuto hypotézu na příkladu různých nádorových typů existující více histologických typů karcinomu plic odvozených z bipotentních bronchiálních kmenových buněk nebo různých forem experimentálních jaterních poškození ve vztahu ke kmenovým buňkám pod.)

Využití znalostí z projektu poznání lidského genomu již přichází díky velkému technickému pokroku do klinické praxe. Firma Sequenom prezentovala techniku DNA analýzy využívající hmotnostní spektroskopii, která se liší od konvenčních metod především vysokou rozlišovací schopností a vysokou výkonností při detekci DNA-poruch.

Novou cestu při časně detekci maligních nádorů představují markery vyšší generace – **nebuněčné DNA fragmenty v plasmě** stanovené pomocí PCR v reálném čase s vysokou analytickou senzitivitou a reprodukovatelností. V plasmě nemocných s nádory nasofarynx byly např. kvantifikovány epizomy EBV s 95% senzitivitou při 95% specificitě. Fragmenty s hypermetylací byly prokázány u ca plic, jater a prostaty, mikrosatelitové alterace u ca močového měchýře, plic a prostaty. Onkogeny (HER-2/neu, K-ras) je možno ve formě fragmentů nalézt se senzitivitou 25 – 90 %. Dalšími příklady mohou být fragmenty genu kódujícího E-cadherin u karcinomu prsu nebo prostaty nebo BRCA1 genu u karcinomu prsu. Význam detekce RNA podjednotky telomerázy v plasmě jako obecného markeru malignity není dosud uzavřen. Je možno prokazovat rovněž cirkulující mRNA (např. pro mammaglobin u karcinomu prsu, pro tyrozinázu u maligního melanomu). Výzkum je zaměřen na automatizaci, výhodou je zmíněný velice nízký detekční limit uvedených látek, který může být prospěšný tam, kde klasické sérové nádorové markery nejsou vhodné – při primární diagnostice.

Kvantitativní změny v genech kódujících CEA a vaskulární endotheliální růstový faktor (VEGF) ve tkáni primárních nádorů (stanoveno reversní transkripcí mRNA, PCR v reál-

ném čase) byly prezentovány plzeňským pracovištěm na souboru více než 100 nádorů. Obzvláště CEA vykazuje zvýšení u většiny kolorektálních karcinomů a u některých hepatomů. Pro VEGF, parametr ovlivňující angiogenezi, nebyly nalezeny v různých nádorových lokalizacích významné rozdíly. Metoda může přispět k charakterizaci nádorů nejen na úrovni primárních nádorů, ale i při detekci minimální reziduální choroby.

Pokrok v poznání genomu jde souběžně s pokrokem v poznání **proteomu**. Expresí proteinů jako vlastních efektorů regulace buněčných procesů a jejich další modifikace nejsou však závislé výhradně na genetické informaci, ale mohou se uskutečňovat na úrovni složitých interakcí mezi jednotlivými proteiny. Vlastní analýza této velice heterogenní skupiny látek je poměrně obtížná, proto je vývoj soustředěn na detekci nádorově-specifických proteinů detekovaných elektroforézou v dvojrozměrném gelu s následnou hmotnostní spektroskopií. Proteomika umožňuje v současnosti detekci více než 18 000 proteinů na dvojrozměrné mapě. Má však svoje úskalí – příprava reprodukovatelného vzorku, zachování úrovně posttranslačních modifikací i vlastní elektroforéza a vizualizace proteinů. Kvantitativní srovnání mRNA a proteinové exprese nevede vždy k přesné shodě na obou vyšetřovaných úrovních, tento jev však může mít dosud nepoznaný význam pro regulaci buněčné aktivity. Je třeba si rovněž uvědomit, že data získaná na živočišných modelech nelze mnohdy extrapolovat na oblast humánní medicíny. Aplikace proteomiky byla prezentována na příkladu proteinů nukleární matrix studovaných v současnosti pouze imunoanalytickými metodami. Již delší dobu je doporučován NMP 22 pro detekci karcinomu močového měchýře v moči, jsou známy proteiny nukleární matrix specifické pro ca prsu, plic, tlustého střeva a děložního čípku. Využitím proteomiky lze identifikovat tyto proteiny s vyšší analytickou senzitivitou i s významnou prognostickou hodnotou.

Molekulární **regulace angiogeneze** souvisí s rovnováhou mezi **aktivátory** tohoto procesu (VEGF, bFGF, TGFbeta, matrixmetaloaproteinázami i dalšími faktory) a jeho **inhibitory** (VEGFR, TIMP, angiotatin, VE-cadherin apod). Významným nově sledovaným faktorem je hypoxie-inducibilní faktor (HIF-1) ovlivňující zvýšení angiogeneze.

Skupina matrix-metaloaproteináz, jejichž prognostický význam v primárních nádorech dosud není zhodnocen, je regulována skupinou inhibitorů. Jejich volná i vázaná forma je detekovatelná nově publikovanou metodou ELISA v plasmě (**tkáňový inhibitor metaloproteináz 1=TIMP1**) s prognostickým významem u kolorektálního karcinomu, se senzitivitou 72 % při 98% specificitě, což je výrazně víc než pro stanovení CEA.

Na konferenci se opět objevily výsledky srovnání senzitivity klasických markerů s **laktátdehydrogenázou (LD)** (včetně vyšetření izoenzymů), a potvrzují naše závěry: pro jisté lokalizace je LD markerem doplňujícím klasické markery (prezentováno využití LD pro monitorování metastatického postižení mozku u karcinomu prsu, LD je vhodné začlenit i do algoritmu testování rizika u testikulárních nádorů).

Oblast **klasických nádorových markerů** byla zastoupena několika bloky. Vedle novinek (komplexovaný cPSA, Cyfra 21-1 v moči, HER-2/neu v séru, S-100, chromogranin A) byly prezentovány studie zabývající se kontrolou kvality, algoritmy pro monitorování návratu choroby i sledování odpovědi na terapii pomocí sérových nádorových markerů.

Pro maligní melanom jsou vhodné sérové markery stále předmětem výzkumu. Ze všech skupin studovaných látek (antigeny typu S-100, melanoma inhibiting activity, NSE, dále cytokiny, adhezivní molekuly, enzymy a metabolity syntézy melaninu) se jeví nejvíce doložená prognostická hodnota **S-100B**, která bude zřejmě brzy dostupná na trhu od více výrobců.

Stanovení **chromograninu A** v plasmě nemocných s neuroendokrinními tumory včetně těch typů, které neprodukují známé hormony, se v poslední době díky vyvíjející se technice stanovení tohoto kyselého glykoproteinu stává důležitým pomocníkem v diagnostické fázi neuroendokrinních nádorů. Využití pro dlouhodobé monitorování těchto tumorů i odraz efektu terapie vyžadují další studie. Jeho hladiny však zřejmě reflektují nejenom masu nádoru, ale i jeho biologickou aktivitu.

**CYFRA21-1 v moči** se zdá být parametrem vhodným pro karcinom močového měchýře, v kombinaci s cytologií zlepšuje senzitivitu záchytu tohoto karcinomu.

**cPSA (v komplexu-vázaný PSA)** je sérový podíl tohoto antigenu vázaný na inhibitory proteináz (především alfa1-antichymotrypsin), který je (na rozdíl od volného a celkového PSA) podle prvních studií stanovován s vyšší citlivostí. Zdá se, že by to mohl být marker vhodnější pro screening než celkový PSA. Jeho velkou výhodou je i vyšší stabilita v séru, navíc zlepšuje diagnostické možnosti i v oblasti fyziologických hodnot PSA (2,4 - 4 µg/l), kde odkryje další díl z asi 25 % nezachycených karcinomů. Dlouhodobý prognostický rys tohoto markeru (zvýšení bylo prokázáno až 20 let před diagnózou karcinomu prostaty) však dosud nemá bezprostřední individuální klinický dopad.

Tématu **Her-2/neu** byl věnován celý blok zaměřený především na zhodnocení významu jeho sérových hodnot. Mechanismus odštěpení extracelulární domény HER-2/neu není dosud vyjasněn, nicméně již existují studie dokazující, že nejenom tkáňové, ale i sérové hodnoty mají prognostický charakter. Zvýšený HER-2/neu v séru predikuje odpověď na terapii (resistenci k hormonoterapii, možnou senzitivitu k antracyklinové léčbě), umožňuje potvrdit výběr nemocných vhodných pro Herceptinovou terapii. Bylo zjištěno, že až 30 % nemocných s primárním nádorem původně negativním je v aktuálním čase progresu zvýšená hladina tohoto onkoproteinu. Vzhledem k ekonomické náročnosti stanovení společnou Bayer (má být i u nás na trhu) však není doporučováno monitorování od okamžiku diagnózy, snahou skupiny významných pracovníků (dr.Schwartz, USA a další) je vyvinout tlak na snížení ceny u výrobce. Metoda použitá v námi prezentované studii (poloset firmy Bender-Medsystems s výrazně nižšími náklady na stanovení) může být další variantou řešení tohoto problému. Firma Dako připravila FISH-komerční set, a dále doporučuje přesný algoritmus pro zhodnocení pozitivitu HER-2/neu v primárním nádoru. Začíná se již (vzhledem k tlaku na rozvoj tkáňových bank) uvažovat i o metodách kvantitativní analýzy HER-2/neu v extraktu primárního nádoru.

Matematické modelování monitorování signifikantních změn ve hladinách sérových nádorových markerů má již svoje ustálená pravidla – je třeba kalkulovat především s analytickou nepřesností, s normální intra-individuální biologickou variabilitou pro daný marker, v neposlední řadě s definovanou cut-off hladinou. Skupina dánských statistiků prezentovala model využívající pro detekci progresu nemocných s karcinomem prsu změny v hladinách CEA a CA15-3. Podobné výsledky publikovali již pro karcinom ovárií, kde rozhodujícím krokem bylo navíc zvýšení CA 125 z hladiny pod detekčním limitem na minimálně 2,5násobek.

Přestože konference patřila počtem účastníků (asi 150) k méně rozsáhlým akcím, přinesla podle očekávání nové pohledy na vysoce aktuální tematiku v oblasti prognostické i prediktivní onkologie.