

MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN MELANOMA. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGY, DETECTION AND CLINICAL RELEVANCE OF MICROMETASTASES, SEPTEMBER 17.18.,1999, HOMBURG/SAAR.

V. FAIT, V. VAGUNDA

Minimální residuální choroba je fenomén, který je v současné době skloňován v onkologii stále častěji v souvislosti s nejrůznějšími typy nádorů. Jedná se jev, který je v onkologii v zásadě znám již poměrně dlouhou dobu a s ohledem k tomuto jevu je směřována adjuvantní terapie. Nicméně teprve v relativně krátké době se běžněji setkáváme s metodami, které jsou schopny minimální zbytkovou chorobu přímo zjišťovat a začíná být možno tyto metody postupně zavádět i do klinické praxe. Na meetingu v Homburgu bylo k tomuto tématu prezentováno 33 přednášek z evropských a amerických pracovišť.

Mikrometastázy byly například citlivými metodami zjištěny u tzv. časných karcinomů v kostní dřeni v 15% u karcinomu prsu, ve 32% u karcinomu kolorekta a v 41% u karcinomů jícnu. Setkání v Homburgu mělo za cíl shrnout současný stav těchto metod a možnosti u maligního melanomu.

Byla nastíněna biologie metastazování, zahrnující děje uvolnění metastatických buněk, průnik cévní stěnou, uvolnění do oběhu i problematika průniku cévní stěnou a založení viabilní metastázy. Byly zdůrazněny rozdíly mezi makrometastázou a latentní mikrometastázou (tzv. dormantní) metastázou, kte-

rá kromě výrazně menšího počtu buněk nemá vlastní cévní zásobení, má nižší proliferaci i apoptotický index a je schopna v relativně klidovém stavu setrvat velmi dlouhou dobu. Další typ metastázy – extravaskulární migratorní – se vyskytuje u angiotropního melanomu, kdy se nádorové buňky plazí jako pericyty po novotvořené cévě směrem od periferie centrálně. Vyvolávajícím momentem tohoto jevu je pravděpodobně kontakt s „volným“ lamininem před dokončení výstavby cévy.

Byl znova konstatován fakt, že populace metastatických nádorových buněk je i u jednoho pacienta mnohdy výrazně nehomogenní, což prokazují studie fenotypu (např. MAGE). Na genetické úrovni se využívají metody jako multicolor fluorescenční hybridizace in situ a komparativní genomová hybridizace. Tento fakt důsledek v různorodé citlivosti k chemoterapii, ale také ztěžuje diagnostiku minimální residuální choroby pro obtíže s výběrem nejvhodnější antigenní determinanty.

Samotná detekce minimální residuální choroby je možná několika způsoby, z nichž každý si pravděpodobně časem najde svá nejvhodnější uplatnění.

Relativně nejjednodušší, ale v zásadě nenahraditelné je sériové histologické zpracování a vyšetření zkušeným patologem, užívané u sentinelových uzlin, které jsou predilekčním místem první metastázy.

Metodika sentinelové lymfadenektomie je u maligního melanomu již prakticky standardní součástí diagnostiky a léčby ve všech specializovaných centrech. Metodika vyhledávání sentinelové uzliny je za pomoci barviva, či za pomoci radionuklidu se speciální sondou, či kombinace obou metod. V zahraničí se většinou využívá metody s pomocí sondy či kombinovanou pro vyšší procento nálezu. Námi prezentovaný soubor 220 pacientů se sentinelovou lymfadenektomií pomocí barvení měl pochopitelně lehce nižší procento nálezu, v ostatních parametrech, tedy v procentech relapsů a v přežívání byl plně srovnatelný. Všechny prezentované soubory pak plně podporují předpoklad, že v současné době lze stav sentinelové uzliny u maligního melanomu považovat za nejsilnější prognostický faktor.

Další možností je využití imunohistochemických metod, za jejichž pomoci lze vylepšit záchyt histologický, například v sentinelové uzlině, ale které lze užít i například při hodnocení vzorků kostní dřene.

Metoda, o které se v současné době vedou nejvíce zpráv, která je používána mnohými pracovišti, ale současně která přináší i nejvíce rozporů je zjišťování pomocí RT-PCR. Jedná se o extrémně citlivou metodu, za jejíž pomoci lze nalézt až jednu nádorovou buňku na 10 ml. krve. Vysoká citlivost je jak předností, tak i záporem této metody. Při této citlivosti je nesmírně důležitý způsob zpracování vzorků i extrémní nároky na čistotu – například v periferní krvi při stanovování melanomových buněk nesmí být nabrána první porce krve po punkci, neboť kontakt punkční jehly s normálními melanocyty při průchodu kůže je již schopen navodit falešně pozitivní výsledky. Metoda má prozatím značně vysoké procento falešné positivity, dle některých laboratoří až 33%, takže použití jako jediné metody, na níž budovat terapeutická rozhodnutí je zatím zcela nevhodné. Situace je navíc zatím komplikována i tím, že metodika dosud není plně standardní, takže srovnávání výsledků jednotlivých laboratoří je velmi obtížné. K detekci melanomových buněk bývá obvykle využíváno stanovování mRNA tyrosinázy, melan-A/Mart-1 či GAGE, buňky mohou být detekovány v kostní dřeni, v periferní krvi, metody může být využito i k zvýšení přesnosti vyšetření sentinelových uzlin. Presentované studie se neshodovaly v otázce prognostického významu RT-PCR nálezů. Nejmoderněji se zavádí kvantifikovaná RT-PCR. Vyžaduje mimořádně pečlivé zpracování materiálu (zmražení čerstvého vzorku) a standardizaci.

Další metodou izolace a detekce nádorových buněk, využitel-

nou i u melanomu je imunomagnetické třídění – metoda spočívá v použití protilátky vázané na drobná magnetická tělíska, vytvoří komplex s buňkou nesoucí žadáný antigen. Buňka se tímto stane magnetickou a lze ji za použití silného magnetického pole mechanicky oddělit od zbytku vzorku. Výhodou metody je to, že jsou detekovány celé buňky a nikoliv pouze fragmenty jako u PCR, je možná optická kontrola buněk, je dokonce možná i další kultivace izolovaných buněk. Metoda je zatím poměrně nová, její citlivost (1 na milion) je pravděpodobně srovnatelná s PCR. Problémem metody je pochopitelně opět výběr nejvhodnějšího antigenu k detekci.

Probrány byly i další metody časně detekce metastáz, byt u těchto metod již nelze mluvit o minimální residuální chorobě.

U časně detekce relapsu melanomu jako nejlepší marker se ukazuje protein S100, druhým nejlepším je MIA, nejpřesnější je zřejmě kombinace obou. Prvním místem relapsu u melanomu bývá nejčastěji regionální uzlina, je tedy pochopitelná pozornost věnována i časně diagnostice uzlinového relapsu. Rutinní sledování bývá obvykle zabezpečováno palpačním vyšetřením. Dle několika studií bylo prokázáno, že záchyt metastáz je časnější při rutinním používání sonografie – rozdíl byl ale pravděpodobně ovlivněn i subjektem hodnotícím palpační vyšetření. Jedná se o závěr jistě logický, nicméně v našich podmínkách bude palpce ještě dlouho hlavním způsobem vyšetření, když pomínu finanční náročnost rutinního sonografického sledování, jeho zavedení u nás je omezeno i propustností sonografů. Nicméně i v našich podmínkách je možno jakoukoliv palpační nejasnost objasnit sonograficky eventuálně ve spojení s cytologií.

Další zmiňovanou metodikou je pozitronová emisní tomografie, což je metodika, dle literatury schopná nalézt tumor o velikosti 5mm, dle zkušeností přednášejících však ve většině případů i tumory od 2mm. Metoda má výhodu i v tom, že je skenováno prakticky celé tělo, takže nehrozí tak velké nebezpečí vynechání některé oblasti. Nevýhody metody jsou vcelku dobře známy, hlavní je pak extrémní finanční náročnost.

Nastíněny byly opět imunologické experimentální terapeutické postupy pro melanom.

Polyvalentní vakcína (proti MART-1, tyrosinase, gp100, MAGE-3 aj. antigenům melanomových buněk) statisticky významně zlepšila bezpříznakový interval ale ne celkové přežití. Co se týká mechanismu působení, bylo prokázáno snížení cirkulujících melanomových buněk po vakcinaci.

Jako forma návratu k B imunitě byly zkoušeny antiidiotypické protilátky, které po vazbě na melanomovou buňku stimulují B odpověď – nicméně produkované antiidiotypické protilátky mají nízkou afinitu. Tento nedostatek by měl být odstraněn použitím modifikovaného peptidu namísto antiidiotypické protilátky, kdy by následně došlo k produkci vysoko-afinitních protilátek proti melanomovým bb.

CTL (CD8+) mohou rozpoznat a ničit melanomové bb. ale jsou jen zřídka indukovány, poněvadž melanom (pravděpodobně přes IL10) konvertuje antigen prezentující dendritické bb. do tolerujících formy. Je možno indukovat melanomovými antigeny maturaci dendritických buněk in situ i generovat je ex vivo (GM-CSF plus IL4). Tento postup vedl k remisím u některých melanomů, kdy regredující nádorová ložiska byla infiltrována CD8+ lymfocyty. K optimalizaci postupů je nutný podrobný imunomonitoring.

Asi 50% melanomů je deficitní na HLA1, takže unikají T buněčnému dozoru. Byla vyvinuta strategie k obejití MHC restrikce T odpovědi konstrukcí chimérického T receptoru. Tento má spojenou signální doménu gamma/delta s vazebnou doménou imunoglobulinovou (z B buněk). Je tedy odstaněna variabilní doména T receptoru, která při vazbě na nádorovou bb. závisí na MHC. Chimérický receptor je možné transferovat do buněk prostřednictvím retroviru. Následně stimulovaný T lymfocyt může zničit až 100 nádorových buněk.