

Biomarkerek szolid daganatokban

Nagy Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem, Patológiai Tudományok Doktori Iskolája, programvezető: dr. Kopper László, témavezető: dr. Timár József

Az utóbbi évtizedben a molekuláris szintű technológia előretörésével a daganatokkal kapcsolatos ismereteink is rohamosan bővülnek. Ez vezetett ahhoz, hogy kezdünk rájönni a daganatokban kialakult kulcsfontosságú hibákra, azokra, amelyek terápiás célpontok lehetnek. A jelen és a közeljövő feladata az adott daganatról a minél pontosabb genetikai térkép azonosítása, a felelős molekuláris célpontok megjelölése, a találati valószínűséget, terápiás érzékenységet vagy a prognózist előre jelző molekulák (biomarkerek) kimutatása. Vizsgálataink, melyek e terület néhány részletkérdésére irányultak, a következő főbb megállapításokra vezettek: (1) Az anti-EGFR-kezelés második, sokszor többedik vonalban is klinikai előnyt (operabilitás, regresszió) ért el a vad típusú KRAS-t hordozó betegek 36%-ában. A KRAS-mutások között a G13D mutáció volt a leggyakoribb, amely újabb tapasztalatok szerint még érzékeny lehet anti-EGFR-kezelésre. (2) Vastagbélrákminták immunhisztokémiai (IHC) vizsgálata (TMA-val) arra utalt, hogy az IHC-értékek és a klinikai - elsősorban progresszióval kapcsolatos - jellemzők között kevés a kapcsolat. Az EGFR elleni antitesttel kapott eredmények szerint a diagnózishoz vett mintákban igen nagy arányban - a túlélés hosszától függetlenül - a normális bélhám proliferációjának szabályozása érvényesül. Ezt erősíti, hogy a jobb túlélést mutatók között az EGFR mellett az általa befolyásolt út elemei jelennek meg (RAS, RAF, ERK, STAT3). (3) A D-dimer szintje azonos vagy jobban emelkedett a daganatnövekedés korábbi stádiumaiban, mint a klasszikus markereké. A vizsgált daganattípusoknál (emlőrák, vastagbélrák, petefészekrák) a D-dimer szintje prognosztikai markernek mutatkozott, és meghatározása ajánlott a klasszikus markerek mellett - utóbbiak között viszont a CEA meghatározása pl. emlőráknál és petefészekráknál nem indokolt. A fentiek reményeink szerint hozzájárul(hat)nak ahhoz, hogy a daganatok kezelésében minél inkább az egyénre szabott stratégia érvényesüljön. Magyar Onkológia 57:56-62, 2013

Kulcsszavak: KRAS-mutáció, vastagbélrák, szöveti mikroarray, D-dimer

In the past decade the revolutionary development of molecular technology contributed a lot to the increase of our knowledge on cancer. These informations led to the discovery and understanding of those key regulatory changes in the genesis and progression of malignancies that can serve as targets in tumor diagnostics and therapy. One of the main challenges in the research field is to identify the most important molecular networks, the molecular targets, the markers (biomarkers) which can predict therapeutic responsiveness in order to select the appropriate patients, as well as markers to judge the prognosis of the disease. The aims of our study approached some details of the biomarker area and reached certain conclusions: (1) The anti-EGFR therapy, used in the second line or even further, proved to be effective, providing clinical advantage (operability, regression) in 36% of patients carrying wild-type KRAS. G13D mutations were the most frequent among the KRAS-mutants, which, according to current data, could react to anti-EGFR therapy. (2) Extended immunohistochemical (IHC) analysis on colorectal cancer samples (using tissue microarray) found rather few correlations between the IHC estimation and the clinical characteristics related mainly to survival. According to the results with anti-EGFR antibodies in the diagnostic histological samples, the regulatory pathway which rules the proliferation of normal colonic mucosa is also present in colonic cancer cells. This finding is supported by the increased activity of the downstream members (as RAS, RAF, ERK) of the EGFR signalling. (3) The level of D-dimer increased at least as much as the level of classical tumor markers in the early stages of tumor growth. D-dimer can be considered as a prognostic factor in tumor types studied (breast-, colorectal-, ovarian cancers) and its measurement is advised besides the classical markers. We hope that these results may contribute to the design of a more individual-based and more effective antitumor strategy.

Nagy Zs. Biomarkers in solid tumors. Hungarian Oncology 57:56-62, 2013

Keywords: KRAS mutation, colorectal cancer, tissue microarray, D-dimer

Levelezési cím: Szent Imre Kórház, Klinikai Onkológiai Profil, 1115 Budapest, Tétényi út 12-16., e-mail: zsulacz@chello.hu

Közlésre érkezett: 2013. január 2. • Elfogadva: 2013. február 10.

BEVEZETÉS

Napjainkban egyre inkább előtérbe kerül a daganatok „személyre szabott” terápiája, különösen a gyógyszeres kezelés területén. Ennek alapját elsősorban a molekuláris ismeretek bővülése jelenti, olyan génhibák és hibás termékek azonosítása, amelyek a daganatok keletkezésében, növekedésében és terjedésében kulcsszerepet játszanak. Ezek a hibák azok a molekuláris célpontok, amelyek ellen újabb és újabb gyógyszerek jelennek meg a klinikai gyakorlatban. A továbblépés több feladatot jelöl ki a ma és a holnap kutatói és klinikusai, a diagnosztikát és a terápiát végzők számára. Szerencsére a laborasztal és a betegágy időbeli távolsága, megfelelő együttműködés esetén, jelentősen csökkent, ami nem kis mértékben annak köszönhető, hogy a molekuláris szintű változásokat kimutató technikák, a preklinikai tesztrendszerek, a klinikai vizsgálatok finomodnak, olyan összefüggéseket, információkat hordozó molekuláris hálózatokat tárnak fel, amelyek egyre közelebb visznek a személyre (daganatra) szabott kezelési stratégia kialakításához. Ezek között az információk között igen fontos szerep jut a biológiai/klinikai választ jelezni tudó molekuláknak – a biomarkereknek. Biomarkerek (vagy ebben az esetben nevezhetjük tumormarkereknek) eddig is rendelkezésre álltak. Megjelenhetnek a keringésben (zömmel ezek a labor-diagnosztika klasszikus tumormarkerei), vagy kimutathatók a daganatsejteken.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink három különböző témára irányultak, amelyeket a biomarkerek daganatos betegségekkel kapcsolatos szerepe köt össze. Az első kettő a daganatsejteken található szabályozási zavarokkal foglalkozik, a harmadik pedig a keringésben megjelenő markerek aktivitását hasonlítja össze. Az egyes témák fontosabb kérdései a következők:

(1) Mennyire tükröződik beteganyagunkban (vastagbélrákok) a KRAS anti-EGFR-kezeléssel kapcsolatos prediktív szerepe? (2) Milyen összefüggés található a különböző szabályozási zavarok és a betegek túlélése között, azaz melyik marker vagy markercsoport rendelkezik prognosztikai szereppel? (3) A daganatokhoz gyakran társuló véralvadási zavar kapcsán keletkező szabályozók/tényezők képesek-e jelezni – legalább a jelenlegi biomarkerek hatékonyságával – a betegség prognózisát?

KRAS-MUTÁCIÓK VASTAGBÉLRÁKOKBAN

A vastagbélrákok klinikai ellátásának alapjául napjainkban is olyan klinikopatológiai tényezők szolgálnak, mint a TNM stádium, a szövettan, a sebészi szél épsége és a beteg álla-

pota. Ehhez csatlakozhat még a szövettan alapján a limfoid invázió jelenléte, a peritoneum érintettsége és a differenciáltság foka, olyan klinikai eseményekkel, mint az elzáródás vagy a perforáció a diagnózis idején (ASCO rizikótényezők). Az utóbbi időben számos olyan fehérjét és genomikai biomarkert írtak le, amelyek finomíthatják prognosztikai információinkat és pontosabbá tehetik azoknak a betegeknek a kiválasztását, akik adott szisztémás kezeléssel a legtöbb előnyt élvezhetik. Ezek közé a markerek közé tartozik vastagbélrákok esetében a KRAS (Kirsten RAS), amelynek mutációi EGFR-gátló monoklonális antitestek esetében prediktív értékkel rendelkeznek.

Feltételezték, hogy az EGFR hibái (mutáció, amplifikáció, génkópiaszám változása) miatt a vastagbélrákok reagálhatnak EGFR-t gátló szerekre. A klinikai hatékonyság monoklonális antitestek esetében (cetuximab, panitumumab), főleg kombinációban – előrehaladott, metasztatikus esetekben – be is következett, míg a kis molekulású, a receptor tirozinkináz részét gátló szerek esetében nem. A klinikai hatás magyarázata azonban még várat magára, mert kiderült, hogy az immunhisztokémiailag kimutatott EGFR-mennyiség nem megfelelő markere a várható klinikai hatásnak. Ezzel ellentétben prediktívnek bizonyult a KRAS aktiváló mutációja, mert ennek jelenlétében az EGFR gátlása eredménytelen, a mutáns KRAS ugyanis függetleníti magát a jelút felsőbb részeitől, így az EGFR-től is. Napjainkban az anti-EGFR monoklonális antitestek adásának feltétele az EGFR jelenlétének kimutatása mellett elsősorban az, hogy a daganat vad típusú KRAS-t hordozzon.

Saját vizsgálatok

45 beteg értékelhető adatai és mintái álltak rendelkezésre. A markerek meghatározása vagy a primer tumorból, vagy a metasztázisból történt (ugyanazon beteg primer és metasztatikus tumorát három esetben vizsgáltuk). Az EGFR-aktivitást immunhisztokémiával (Szent Imre kórház, Patológiai Osztály), a RAS-mutációt szekvenálással (KPS Kft.) határozták meg. (Az első minta vizsgálatára KRAS-mutáció irányába 2010. március 4-én került sor.)

A betegek klinikai jellemzői. 45 értékelt beteg közül 29 férfi (életkor: medián 66 év, szélső értékek 37–73), 16 nő (59 év, 47–76). Az operálható betegek adjuváns, a már metasztázissal jelentkezők palliatív terápiában részesültek. A leggyakrabban alkalmazott protokollok: de Gramont, FOLFOX, FOLFIRI, capecitabin, bevacizumab + FOLFIRI.

Anti-EGFR-kezelés. Anti-EGFR-kezelésre szinte kivétel nélkül többszörös kemoterápiás ciklus után került sor ECOG 0–2 állapotú betegeken, EGFR- és KRAS-meghatározás után. A betegeknél anti-EGFR-kezelésre csak vad típusú KRAS-t hordozó tumor és kimutatott metasztázisok esetén került sor, cetuximab+FOLFIRI kombinációval, vagy

panitumumab-monoterápiával. A cetuximab alkalmazott dózisa: 400 mg/m² testfelület telítő dózis, majd 250 mg/m² testfelület fenntartó dózis, hetente; a panitumumab alkalmazott dózisa: 6 mg/kg, 2 hetente. A kezelés progresszióig vagy nemkívánatos mellékhatások jelentkezéséig történt. Utóbbiak esetén a kezelésmentes időszak hosszabbodott meg. A leggyakoribb grade 3/4-es melléktünetként az akneszerű bőrtünetek (4 eset), és neutropenia (6 eset) jelentkeztek.

A vad RAS-t hordozó primer tumor esetén (11 eset) 5-nél történt anti-EGFR-kezelés (4 cetuximab, 1 panitumumab). Két esetben a 6 hónapos cetuximabkezelés során regresszió alakult ki, egy esetben progresszió, két esetben a kezelés most (1-2 hó) kezdődött. Ebben a csoportban a medián élettartam (teljes túlélés: a diagnózis és a halál beállta vagy az utolsó vizsgálat között eltelt idő) 21 hónap volt (12–72 hónap). A metasztázisokból történt vizsgálat esetén 9 betegből 8 részesült anti-EGFR-kezelésben. Egy betegnél cetuximab adása után a májmetasztázisok operábilissá váltak, egy másik esetben a 6 hónapos cetuximabkezelés során kialakult progressziót panitumumab követte, és 6 hónap után (jelenleg) a tumor regrediált. Ez a beteg mutatta a leghosszabb túlélést (108 hó), de az anti-EGFR-kezeléskor már kiterjedt áttétei (tüdő, mellékvese) voltak. Ebben a csoportban a medián teljes túlélés 45 hó (21–108) volt. Összességében a 13 anti-EGFR-rel kezelt betegből 11-nél lehetett a kezelést értékelni: 6 hónapos kezelés után klinikai előny 4 esetben mutatkozott (36,3%).

A KRAS-mutációt hordozó esetek. A primer tumorból történt meghatározásnál 19 beteg hordozott KRAS-mutációt, ami az összes eset 63,3%-a (19/30 eset). Feltűnő, hogy a 19 mutáns betegből 15 férfi és 4 nő. A metasztázisokból történő meghatározásnál az arány változott (6/15, 40%), a májmetasztázisok esetében még inkább (2/7, 28,6%). Az aktiváló mutációk típusai megoszlanak. A kis mintaszám ellenére azonban az megállapítható, hogy gyakori a G13D.

Megbeszélés

Bár a KRAS vizsgálata alapján meglehetősen csekély az értékelhető esetszám, néhány megfigyelés említést érdemel:

- A túlélők aránya (a vizsgált időpontban) a vad típusú KRAS-t hordozóknál 60% (12/20), a mutánsoknál 52% (13/25). A közeli értékek arra utalnak, hogy a KRAS-státusz nem befolyásolja a túlélést (azaz önmagában nincs prognosztikai szerepe), azonban éppen az anti-EGFR-rel történt kezelés – a KRAS predikciójára alapozva – befolyásolhatja az arányokat.
- A 45 értékelt betegből feltűnően magas a mutánsok aránya (55,5%, 25/45), mások tapasztalatai 35–45% között mozognak. Az arányt emelhetik a tüdőmetasztázisok, mert ezeknél a betegeknél gyakoribb a mutáció. Utóbbi

arra utal, hogy KRAS-mutáns primer vastagbélrákoknál még nagyobb figyelmet kell fordítani az esetleges tüdőáttétek korai felismerésére. Némileg fordított a helyzet a májmetasztázisoknál, ahol gyakoribb a vad típusúak aránya (71,5%). A vizsgált esetek közül háromnál értékeltük a primer tumort és a metasztázisait, és mindhárom esetben egyezést mutattunk ki.

- Az anti-EGFR-kezelés második – sokszor többedik – vonalban is klinikai előnyt (regresszió, operabilitás) ért el a vad típusú KRAS-t hordozó betegek 36,3%-ában. Bár megfelelő kontrollcsoport nem áll rendelkezésre, az valószínűsíthető, hogy az eredmények első vonalbeli kezelés esetén, szelektált betegeken még jobbak lehetnek.
- A mutánsok között a legtöbb a G13D mutációt hordozta, amely újabb tapasztalatok szerint érzékeny lehet anti-EGFR-kezelésre. Erre vonatkozóan követhető nemzetközi ajánlás még nincs.

A JELÁTVITELI UTAK VIZSGÁLATA

A tumormarkerek azonosítását nehezíti a daganatok növekedésével párhuzamosan felhalmozódó szabályozási zavarok sokasága, a heterogenitást elősegítő szubklónok megjelenése, és a szabályozási utak sokszínűsége, egymás aktivitását befolyásoló képességük. A fentiek is indokolják, hogy igen intenzíven folyik újabb biomarkerek, biomarker-„panelek” keresése, részben a már ismertek kapcsolatrendszerének figyelembevételével (ez általában kevés gént vagy génterméket érint), részben a sok száz vagy éppen ezer génből a valamilyen szempont alapján a leggyanúsabbak „kihalászásával”. Közöttük találjuk az immunhisztokémiát, amely számos előnnyel és hátránnyal rendelkezik. Némileg segít a problémákon a szöveti microarray (tissue microarray, TMA), amelynél sok mintán azonos blokkba ágyazva lehet elvégezni az immunhisztokémiai reakciót.

Saját vizsgálatok

Immunhisztokémiával (TMA-blokkokon) próbáltunk olyan szabályozót vagy szabályozó családot kimutatni, amelyeknek a jelenléte/aktivitása (mert a jelenlét – sajnos – nem mindig jelente aktivitást is, ennek áthidalására használtunk pl. foszforilált formák elleni antitesteket) összefügg a vastagbélrákok progressziójával, a betegek túlélésével. A cél tehát ebben az esetben elsősorban a prognózissal összefüggő biomarker(ek) azonosítása volt.

TMA. A vizsgálatokhoz vastagbélrákok (1996–2004) formalinban fixált és paraffinba ágyazott mintáit használtuk, amelyekből 3 TMA-t készítettünk. A TMA-hoz Panoramic TMA Mastert használtunk (3D Histech, Budapest). Minden TMA-blokk 70 db 2 mm átmérőjű hengert tartalmazott.

Betegek

Összesen 95 betegből származtak a minták (52,6% férfi és 47,4% nő), a medián életkor 62 év (34–78 év). A betegek kemoterápiás kezelésére, valamint a követésükre a Szent Imre Kórház Klinikai Onkológiai Profilján került sor. Az átlagos követési idő 76 hónap volt (8–181 hónap). A klinikai lefolyás jellemzésére a következő adatokat használtuk: a betegség stádiuma, teljes túlélés, progressziómentes túlélés (PFS: progression-free survival), és progresszív betegség. Ha a beteg nem a daganatos betegsége miatt halt meg, akkor a statisztikai értékelésnél nem vettük az adatait figyelembe.

Immunhisztokémia. A TMA-blokkokból 5 mikron vastag metszeteket készítettünk, és ezeken 36 fehérjét vizsgáltunk 51 antitesttel. A kiértékelést 3 patológus végezte, egymástól függetlenül, egyeztetett szempontok szerint. Jelentős eltérés esetén konzultatív értékelésre került sor. Minden mintát és reakciót részben a pozitívnak ítélt sejtek aránya, részben a reakció erőssége alapján egy számmal (0–9) jelöltünk, amit egyben a reakció aktivitásának tekintettünk. A TMA-készítés, az immunhisztokémia végzése és értékelése a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében történt (dr. Micsik Tamás, dr. Főnyad László, dr. Krenács Tibor). Mind a klinikai adatok, mind az immunhisztokémiai eredmények kiértékeléséhez a Statistica 9.1 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) és MedCalc 1.2.1.0. (MediCals Software, Mariakerke, Belgium) szoftvereket használtuk. Összefüggést kerestünk a vizsgált szabályozók egymás közötti aktivitása, valamint az aktivitások és a klinikai jellemzők között.

Összefüggés azonos szabályozók aktivitása között különböző antitestek esetén. Erősen szignifikáns összefüggést ($R > 0,7$) a következő antitestek között találtunk: (a) az EGFR két foszforilált formáját kimutató antitestek között (89 eset alapján, 0,74), (b) a p53-at kimutató három antitest között (30 eset, 0,85–0,87), (c) a fenti két csoport között (30 eset, 0,74–0,82), (d) az EGFR-t kimutató PharmDX és Ventana antitestek között (23 eset, 0,76).

Összefüggés az egyes szabályozók aktivitása között. Erősen szignifikáns összefüggést ($R > 0,7$) a következők között találtunk: (a) a p53 és pEGFR között, (b) az NFκB p65 és survivin aktivitása között (32 eset, 0,76), (c) a panAKT és NFκB vagy PDGFβ közötti erős összefüggés (0,88) azonban csak néhány esetben (8 és 7 eset) szorítkozott.

Összefüggés a klinikai adatok és az IHC-aktivitások között. Az adatok értékelésekor az IHC-reakciók aktivitása alapján két csoportot képeztünk: erős aktivitású minták (megfelel a 7–9 értékkel jellemzetteknek) és gyenge aktivitás (0–3), míg az átmeneti értékeket (4–6) mutató mintáktól eltekintettünk. Kritériumként szabtuk meg, hogy még ezen belül is csak azokat a szabályozókat vesszük figyelembe, amelyeknél legalább 8 eset értékelhető volt, és az értékelés

alapján legalább 70%-uk tartozott az erősen vagy gyengén aktív csoportba. A minták IHC-értékei és a klinikai jellemzők, elsősorban a progresszióval kapcsolatosak, kevés összefüggést mutattak. Az EGFR (Ventana) antitesttel kapott eredmények azok, amelyek elég egyértelműen utalnak arra, hogy a diagnózishoz vett mintákban igen nagy arányban a normális bélhám proliferációja szabályozási menetrendjének elemei ismerhetők fel. Ezt erősíti, hogy az össztúlélés és a progressziómentes túlélés esetén is az EGFR mellett az általa befolyásolt út résztvevői (RAS, RAF, ERK) jelennek meg gyakrabban. Önmagában tehát az EGFR expressziója nem jelent rossz prognózist (mint ahogy nem jelent pl. tüdőrák esetében az EGFR-mutáció). Valószínű, hogy vastagbélrákoknál a szabályozás normális gátlói (pl. szuppresszorgének) mondanak csődöt. A STAT3 szerepének tisztázása – amely ugyancsak kapcsolatban van az EGFR-úttal – további vizsgálatot igényel.

A daganatsejtek terjedését befolyásoló markerek közül az E-kadherin a hosszabb túléléssel, a CD44v6 a rosszabb prognózissal társult, ami egybehangzik az eddigi megfigyelésekkel. Az apoptózist jellemző markerek (pl. BAX, p53, kaszpáz-8, survivin, NFκB) nem mutattak jellemző képet a progresszióval kapcsolatban.

Megbeszélés

A vizsgálatok első része a szabályozók (potenciális markerek) IHC-vel értékelt aktivitását egymással hasonlította össze. Tapasztalataink szerint a 6 EGFR-t kimutató antitest egymáshoz igen közeli aktivitást mutatott. A legszorosabb kapcsolatot a PharmDX és Ventana, valamint a foszforilált antitestek között találtuk. Mivel a foszforilált állapot a jelenlét mellett a funkcióra is utal, ezek alkalmazása javasolható az EGFR meghatározására. Hasonlóan jó egyezést mutattak a p53 elleni antitestek. Bár az általánosításhoz kevés az adat, valószínű, hogy az IHC-nél alkalmazott reakciók elég megbízhatóan mutatják ki a kérdéses markereket.

A vizsgált beteganyag tradicionális kemoterápiában részesült, és a daganatsejtek, a daganatok terápiaira adott válaszában a jelek szerint nem az EGFR-út volt a meghatározó (legalábbis nem az egyetlen). Az a tény, hogy jelenleg a KRAS vad típusát hordozó esetekben az anti-EGFR monoklonális antitestekkel (cetuximab, panitumumab) végzett kezelések klinikai eredménye – az összes előrehaladot vastagbélrákot tekintve – elég korlátozott, jelzi egyéb terápiás választ befolyásoló események jelenlétét. Ezen a téren feltehető az esetek közötti jelentős heterogenitás, ami magyarázhatja azt, hogy statisztikailag szignifikáns marker család a progresszió szempontjából alig jelölhető meg, mert egy-egy szabályozó ritkán éri el az értékelési – azaz az előfordulási – küszöböt. Az ugyancsak valószínűsíthető, hogy a progresszióval járó heterogén válás előtt, amikor még feltehetően az EGFR-

út a későbbiekben jobban befolyásolja a tumor növekedését, az anti-EGFR-út (nem feltétlenül csak anti-EGFR) elleni terápiás támadás eredményesebb lehet.

VÉRALVADÁS ÉS A DAGANATOS PROGRESSZIÓ

Ismert, hogy kétirányú kapcsolat áll fenn a VTE (vénas tromboembólia) és a daganatok között. Egyrészt a daganatos betegekben fokozott a VTE rizikója (7–28-szoros), különösen a diagnózis utáni első néhány hónapban és távoli metasztázisok esetén; és fordítva, a daganat keletkezésének nagyobb az esélye az idiopátiás VTE első epizódját követő 2 éven belül. Hospitalizált daganatos betegeken a VTE a második leggyakoribb halálok, minden hetediknél tüdőembólia lép fel. A műtét ugyancsak emeli a rizikót.

Daganatos betegekben sok olyan tényező fokozhatja a koagulációs aktivitást (pl. TF, uPA, CP), amelyek rezisztensek a normális antikoagulációval szemben. A daganat növekedésével a koagulációs kaskád aktiválása fokozza egyben a fibrinolitikus rendszer aktivitását is. Ennek egyik markere a plazmában a D-dimer- (DD) szint emelkedése, amely egyben jelzi a trombus- és az embóliakeletkezés esélyének növekedését.

Tumoros (és nem tumoros) betegeken a trombózis kialakulásának megelőzésére és kezelésére leginkább elterjedt eszköz a nem frakcionált heparin (UFH, unfractionated heparin), illetve újabban származékai, az alacsony molekulásúlyú heparinok (LMWH, low molecular weight heparin). Az utóbbi időben felmerült, hogy a heparin és az LMWH-k a trombózist megelőző hatásuk mellett javíthatják a daganatos betegek túlélését. A preklinikai adatok szerint ez a hatás a metasztázisgátláson keresztül érvényesülne, de ennek a mechanizmusa nem ismert. Valószínű, hogy a tumorelles hatása független a hemosztázisra gyakorolt hatástól, bár a heparin sok olyan kapcsolattal rendelkezik, amelyek a metasztázisképződésben fontosak lehetnek. Partnerek lehetnek enzimek (pl. a heparináz), adhéziós molekulák (pl. P- és L-szelektin), növekedési faktorok, citokinek. A heparin/LMWH ebben az esetben megnehezítheti vagy meggátolhatja, hogy a tumorsejtek megvédjék magukat pl. a keringésben trombocita- vagy fibrinopénnyel, vagy kikapadást az endothelsejteken (és így az extravazációt). A heparin/LMWH hatása a lokálisan növekedő tumorra még kevésbé ismert, amit feltételeznek, az az, hogy ezen a téren az angiogenezis gátlása lenne igen fontos.

Saját vizsgálatok

1. VIZSGÁLAT

Betegek, kezelés. A randomizált, nyílt, retrospektív vizsgálatban LMWH-val kezelt és nem kezelt szolid daganatos – szinte kizárólag emlőrákos és vastagbélrákos – betegeket

értékelünk (96 beteg – 62 emlőrák, 29 vastagbélrák, 5 petefészekrák). Az LMWH-kezelés nadroparinnal (Fraxiparin) történt (GlaxoSmith Kline) a kemoterápiás kezelés alatt, illetve a ciklusok között, legalább 6 hónapig. Az LMWH-t csak a beteg, naponta egyszer, a testtömeg alapján számított dózisban.

A vizsgálat célja a betegeknél a progressziómentes és a teljes túlélés értékelése. A betegség stádiumát a TNM-rendszer alapján állapítottuk meg.

Eredmények. Az LMWH-kezelt betegek közül azoknál mutatkozott statisztikailag előnyös hatás, azaz hosszabb túlélés, akiknél a tumor T3 vagy T4 stádiumban volt. A nyirokcsomók érintettsége nem okozott eltérést a két csoport között. M0 vagy M1 stádium mindkét csoportban előfordult. Meglepetésre, az LMWH-kezelés hosszabb túléléshez vezetett akkor, ha a betegeknél a kezelés kezdetekor már kimutatható(k) volt(ak) a metasztázis(ok) (kivéve a központi idegrendszert). Az átlagos követési idő 4,9 év volt. A diagnózisakor észlelt klinikai állapothoz képest bekövetkező változást – regresszió, progresszió, változatlan állapot – képalkotókkal és markerekkel értékeltük. A vizsgált időszak végén (az utolsó kórházi vizit vagy az elhalálozás időpontja) az LMWH-val kezelt betegek 32,3%-ában alakult ki progresszió, a kontrollcsoportnál 50,7%-ban. A progressziómentes túlélés átlaga 35 hónap volt a kezelt és 26 hónap a kontrollcsoportban, míg regresszió (tumortömeg 25%-nál nagyobb csökkenése) 12,5%-ban, illetve 3,1%-ban fordult elő. Klinikai változás nem következett be a betegek 55,2%-ánál az LMWH-kezelt, illetve 46,2%-ban a kontrollcsoportban.

2. VIZSGÁLAT

Betegek. Összesen 299 – emlő-, vastagbél-, hasnyálmirigy- illetve petefészekrákban szenvedő – beteget választottunk be random módon abba a retrospektív vizsgálatba, amelynek elsődleges célja az LMWH-kezelés hatásának, valamint a D-dimer, mint potenciális prognosztikai faktornak a vizsgálata volt.

Markerek. A tumormarkereket – CEA, CA125, CA15-3, CA19-9 –, valamint a hemosztázis jellemző tényezőit rutin laboratóriumi módszerekkel mértük; a vizsgálatokat a kórház központi laboratóriuma és patológiai osztálya végezte.

Kezelés. Tromboprofilaxishoz a betegek nadroparint, enoxaparint vagy dalteparint kaptak. Az LMWH-t a betegek az adjuváns terápia (rendszerint a 6 hónapos ciklus során, majd ezután 3 hónapig), vagy a palliatív kezelés során (a kemoterápiával párhuzamosan) kapták. Terápia okozta szövődmény csak 4 esetben fordult elő. A kemoterápiás kezelés a megfelelő standard protokollok szerint történt.

Eredmények. A vizsgált esetekben az életkor értékei a szokásosnak mutatkoztak. Az sem meglepő, hogy a has-

nyálmirigyrákok több mint 80%-a előrehaladott vagy metasztatikus, inoperábilis állapotban került felismerésre, ez tükröződik a rövid túlélésben is. Bár az emlőrákok zöme a diagnóziskor az I/II. stádiumban volt, a késői felismerés aránya magas (több mint az esetek negyede), ami szűrési problémákra hívja fel a figyelmet.

Összefüggés az LMWH-kezelés és a hemosztáziszavarok között. Hemosztáziszavar (vénatrombózis, embolizáció) az LMWH-val kezelték között 11,5%-ban (24/208) fordult elő (15,8%-ban, ha az artériás trombotikusokat és embolizációt is értékeljük). Lényeges különbségek mutatkoztak az egyes tumortípusok között (pl. emlőráknál 6,6% – legalacsonyabb érték, hasnyálmirigyráknál 22,7 % – legmagasabb érték). Kérdés, hogy van-e kapcsolat a fenti adatok és a D-dimer (továbbiakban DD) szintje között, hiszen a DD-szint elvileg a fokozott koagulációs állapotot tükrözi. Ha minden daganatos esetet együtt értékelünk, akkor az emelkedett DD-szint sokkal rosszabb prognózist jelzett, mint a normális szint (élők/halottak aránya: 30,1% vs. 88,4%) a 12 éves értékelési periódus alatt.

Összefüggés az LMWH-kezelés, a DD-szint és a túlélés között. A túlélés értékelésekor (2011. november) csak azokat a betegeket vettük figyelembe, akiknél a diagnózis 2000. január és 2009. december között történt. Ezért a betegeket két csoportra osztottuk a túlélés szempontjából, azokra, akik kevesebb mint két évvel éltek túl a diagnózist (<2 év), és azokra, akik több mint 2 évvel (>2 év). Az összes LMWH-kezelte beteg adatát tekintve nem volt különbség a két csoport között. Ezt mutatták a petefészekrákos és a vastagbélrákos esetek, míg emlőráknál a betegek 76,5%-a, hasnyálmirigyráknál pedig csak 26,0%-a került a hosszabban túlélők közé. Utóbbiak szoros összefüggést mutatnak a daganatok előrehaladott stádiumával a diagnózis idején.

A stádium a tumor progresszióját jelzi. Az LMWH-val kezelték között a DD-szint emelkedése sokkal gyakoribb volt az előrehaladottabb, mint a korábbi stádiumban, így ezek az értékek a rosszabb prognózisra utaltak. A különbségek szignifikánsnak bizonyultak. Az ellenkezőjét találtuk a korai stádiumokban, ahol a normális DD-szintek a jobb prognózis mellett szóltak. Mindez arra utal, hogy a DD-szint potenciális prognosztikai marker lehet.

Összefüggés a „klasszikus” tumormarkerek és a DD szintjei között. A vizsgálatba bevont tumorok esetében mindennapos a markerek használata, elsősorban a progresszió megítélésére, ami egyben tükrözi a terápia eredményességét is, végső soron prognosztikai információt hordoznak. Az értékelt eseteknél részben a diagnóziskor mért értékeket vettük figyelembe, részben a betegség lefolyása során észlelteket.

A vizsgálatból az alábbi következtetéseket vontuk le. (a) A hasnyálmirigyrákok és a petefészekrákok esetében az

emelkedett DD-szint gyakorisága hasonló volt a klasszikus markerekéhez (pancreasrák: CA19-9 és petefészekrák: CA125/CEA), viszont sokkal gyakoribb volt vastagbélrákok és emlőrákok esetében a szokásos markereknél (vastagbél: CEA, emlőrák: CA15-3/CEA). (b) Ugyanezt a tendenciát lehetett megfigyelni a stádiumokkal jellemzett progresszió során. (c) Előfordult, hogy a klasszikus markerek és a DD szintjei együtt emelkedtek vagy maradtak normális szinten, de ennek az együttes változásnak a gyakorisága messze nem érte el a 100%-ot. (d) Az értékelés szerint emlőrákok és petefészekrákok esetében a CEA meghatározása feleslegesnek látszik.

Megbeszélés

Az LMWH-k (és a heparin) véralvadást gátló hatásuk mellett több megfigyelés szerint daganatellenes hatással is rendelkezhetnek. A tumorgátlás érvényesülhet lokálisan (erre utalnak az 1. kísérlet eredményei – gátlás a primer tumor és a metasztázis növekedésében), és a progresszió során egyaránt. Utóbbi elsősorban a metasztázis gátlását jelentené, amely azért látszik elfogadhatónak és magyarázhatónak, mert az LMWH-k képesek megakadályozni a véralvadási kaskádát, ezzel pl. a tumorsejtcsoportokat a keringés és immunrendszer ártalmaival szemben megvédő fibrinköpeny kialakulását. A gátló hatás sejtszinten is érvényesülhet, elsősorban a trombociták és az endothelsejtek koagulációt elősegítő hatásának kikapcsolásával. A tumorok lokális növekedésének befolyásolását elsősorban az angiogenezis gátlásán keresztül érhetik el az LMWH-k, de ezen a téren ellentmondások a megfigyelések. A magyarázat azért is nehéz, mert az angiogenezisnek több formája létezik, és ezek eltérő támadáspontokat igényelnek.

Feltételeztük, hogy ha a szervezetben a koagulációs állapot a tumornak kedvez, akkor az ezt jelző markerek közül pl. a DD is „viselkedhet” markerként. Erre utalt az, hogy – az összes tumort figyelembe véve – a DD emelkedett szintje rossz prognózissal párosult. A tumortípusokat tekintve az emelkedés leggyakrabban petefészekrák eseteiben volt kimutatható, legritkábban emlőráknál. Ezek az adatok indokolták azt, hogy a DD-szint emelkedését az egyes tumortípusokban széles körben használt markerekkel hasonlítsuk össze. Ez az összehasonlítás azért is indokolt, mert a jelenlegi markerek hatékonysága enyhén szólva nem, illetve csak bizonyos határok között megfelelő. Erre példa, hogy még a petefészekráknál alkalmazott CA125 is a korai esetek csak kb. felében (a mi vizsgálatainkban 34,0%-ban) emelkedett. Ezért további markereket kerestek, és azonosították a HE4/WFDC2-t, amely a CA125-tel kombinálva emeli a prognózis megítélésének pontosságát. Saját 2. vizsgálatunkban, nagyon hasonlóan, a DD-szint azonosan vagy jobban emelkedett a daganatnövekedés korábbi, majd a későbbi stádium

maiban, mint a klasszikus markerek. A hasnyálmirigyrák kivételével (amelyet szinte minden esetben késői stádiumban fedeztek fel) a többi tumornál (emlőrák, vastagbélrák, petefészekrák) a DD-szint prognosztikai markernek mutatkozott. Vizsgálatunk arra is rámutatott, hogy pl. emlőráknál és petefészekráknál nem indokolt a CEA meghatározása.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés témájához kapcsolódók

1. Nagy Zs. Daganatok és hemosztázis. *Pathol Oncol Res Suppl* 2:9–14, 2007
2. Nagy Zs, Turcsik V, Blaskó G. The effect of LMWH (nadroparin) on tumor progression. *Pathol Oncol Res* 15:689–692, 2009
3. Nagy Zs, Horváth O, Kádas J, et al. D-dimer as a potential prognostic marker. *Pathol Oncol Res* 18:669–674, 2012

Egyéb közlemények

4. Tallósy I, Vargha G, Pölöskey A, et al. Citosztatikus kezelések (CMF) szövődményeként kialakuló alveolitisek (pneumonitisek). *Orvosi Hetilap* 128:1621–1622, 1987

5. Moskovits K, Nagy Zs. Előrehaladott daganatos betegségben szenvedők fájdalomcsillapítása orális retard hatású morfinkészítménnyel, M-Eslon-nal. *Gyógyszereink*, 1995
6. The ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) Trialists Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised Trial. *The Lancet* 359:2131–2139, 2002
7. Dank M, Zergényi É, Torgyik L, Nagy Zs. Az emlőrák kemoterápiája. In: *Onkofarmakológia*. Szerk. Jeney A, Kralovánszky J. Medicina, 2005, pp. 679–714
8. Nagy Zs. Zolderonic acid (ZOMETA) a significant improvement in the treatment of bone metastases. *Pathol Oncol Res* 11:186–187, 2005
9. Nagy Zs. Emlőrák hormonterápiája premenopauzában levő betegeken. *Pathol Oncol Res Suppl* 3:1–7, 2007
10. Kopper L, Nagy Zs. Biszfoszfonátok hatása a csontokra és a csontokon kívül. *Pathol Oncol Res Suppl* 1:2–5, 2007
11. Nagy Zs. Emlőrákos betegek kezelése fulvesztranttal – lehetne hatékonyabb? *LAM* 20:733–736, 2010
12. Nagy Zs. Gyógyszeres terápiák. *Medical Tribune* 22:11, 2010
13. Nagy Zs. Az emlőrák kezelésének újabb eredményei. *Orvostovábbképző Szemle* 17:10–13, 2010
14. Kopper L, Tímár J, Becságh P, Nagy Zs. Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. *Semmelweis Kiadó*, Budapest 2009