

# Prognostická a prediktivní medicína

MUDr. Jana Dvořáčková Ph.D

# Moderní patologie

- Hlavními úkoly moderní patologie se v současnosti stávají, kromě vysoce přesné diagnostiky a určení etiopatogeneze nemoci na molekulární, submikroskopické úrovni, také určení, respektive odhad prognózy nemoci, predikce reakce na léčbu a monitorování změn v průběhu léčby

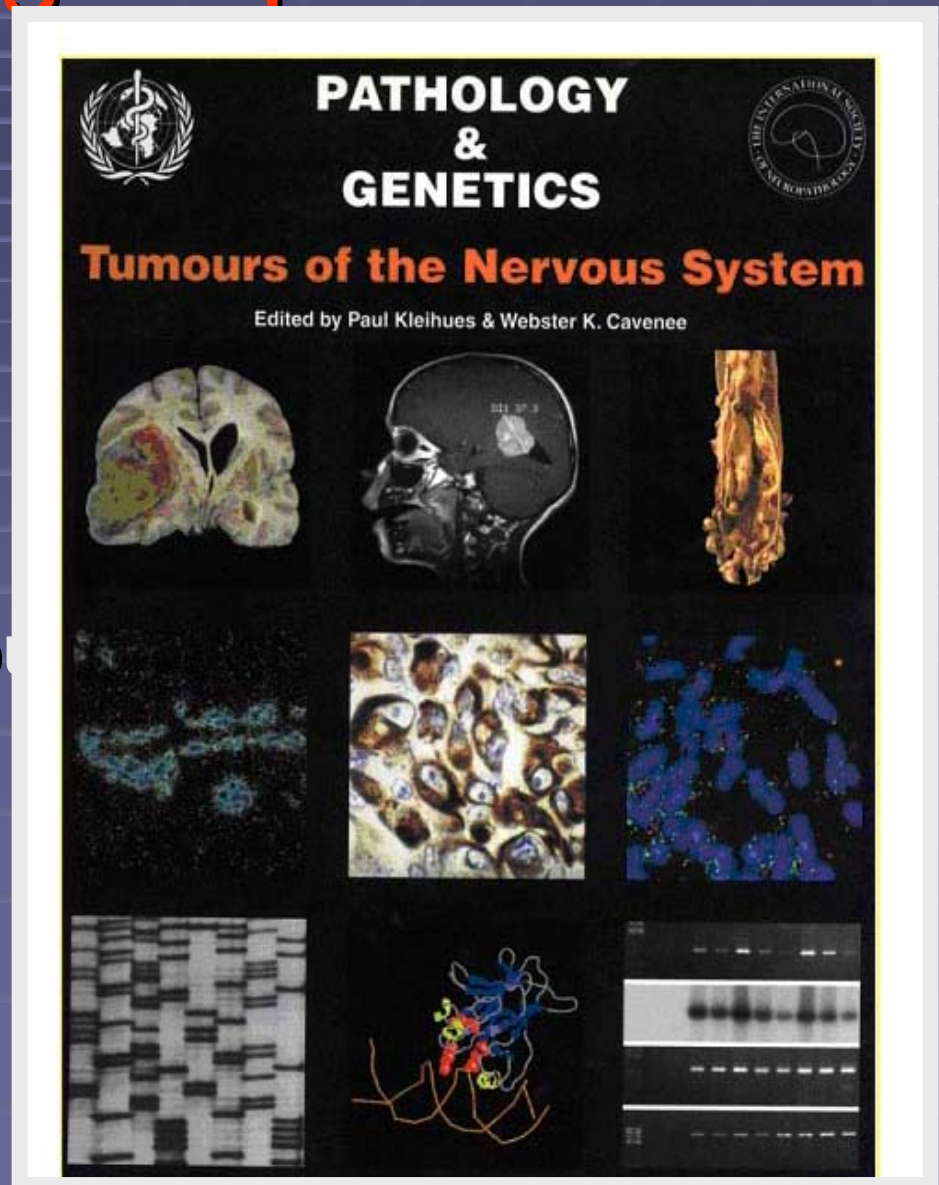
# Moderní patologie - pokračování

- těchto úkolů nelze dosáhnout klasickými metodami patologie
- potřeba zavádění nových metod
- Dominantní roli hraje:
  - molekulární patologie

Tak se stává z oboru morfologického obor komplexní

# Moderní patologie - pokračování

Komplexnost oboru patologie zvláště v onkologické oblasti dokazují například nejnovější edice klasifikace nádorů dle WHO, kde nezbytnou součástí diagnostiky jsou nejen údaje makroskopické a mikroskopické, ale také údaje vycházející z molekulární biologie a cytogenetiky



# Prognóza a predikce

- **Prognózou** - rozumíme odhad dalšího průběhu onemocnění bez ohledu na případnou léčbu
- **Predikcí** - rozumíme odhad průběhu onemocnění v závislosti na konkrétní léčbě
- **Jde tedy o informace zásadního významu a měly by být co nejpřesnější, protože na nich závisí například strategie léčby**

# Markery

- Objevují se pojmy „prognostický znak/marker“ a „prediktivní znak/marker“.
- Proto se v poslední době začal používat výraz „prognostická a prediktivní patologie“.

# Základní rozdělení prognostických a prediktivních znaků

- 1) Mezi znaky související s nádorem patří:
- *morfologické znaky*: jako jsou grading a staging velikost léze, charakter invaze (perineurální šíření, angioinvaze) či uspořádání nádorových buněk (papilární, tubulární, solidní, atd.)
- *laboratorní údaje*: jako jsou zvýšené hladiny prostatického specifického antigenu (PSA), a-fetoproteinu (AFP), karcinoembryonálního antigenu (CEA), atd.
- *molekulárně-biologické a genetické znaky*

# Základní rozdělení prognostických a prediktivních znaků - pokračování

- 2) Mezi znaky související s pacientem patří:
- *údaje demografické* : jako je věk (u většiny nádorů je se vyrůstajícím věkem prognóza horší), pohlaví či socioekonomická situace
- *znaky provázející nemoc (komorbidita)*: ztráta tělesné hmotnosti, stav imunitního systému, teploty, infekce a případná další onemocnění (například přítomnost paraneoplastického syndromu)
- *ostatní znaky*: recidiva nádoru (zhoršující prognózu), přítomnost či nepřítomnost nádoru v resekční linii po operačním výkonu, rychlost a dostupnost adekvátní léčby, atd.

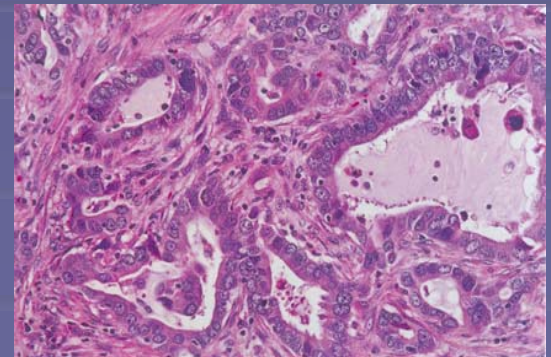
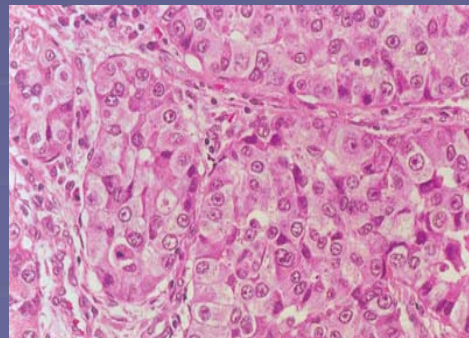
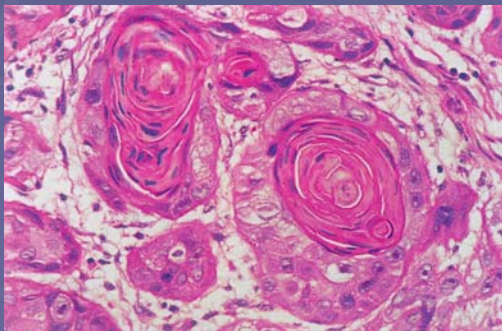


# Základní rozdělení prognostických a prediktivních znaků - pokračování

- 3) Mezi znaky související s okolním prostředím
- přítomnost *kancerogenních faktorů* (chemických, fyzikálních či biochemických - jako jsou například nadměrné sluneční záření, znečištění prostředí, atd.)

# Morfologické znaky

- **Gradingem nádoru** - označujeme stupeň jeho předpokládané agresivity a diferenciacie.
- Grading je založen na hodnocení stupně diferenciacie a proliferační aktivity buněk.
- **Při stanovení diferenciacie buňky se opíráme o**
  - - nukleoplazmatický poměr (vzrůstá s mírou anaplazie),
  - - velikost a pravidelnost buňky
  - - schopnost formovat určité struktury (například žlázové tubuly)
  - - stupeň kohezivity (soudržnosti) s ostatními buňkami
  - - přítomnost či nepřítomnost jáderka či více jáder.



# Morfologické znaky- pokračování

- **Proliferační aktivitu lze v běžných histologických a cytologických preparátech sledovat různými metodami**
  - - nejčastěji stanovením mitotického indexu
  - - imunohistochemickými metodami (PCNA, Ki67).
- **Na základě gradingu se nádory rozdělují do 4 skupin podle narůstajícího stupně anaplazie (grade, G1-G4).**

# Staging

- **Hodnocení stagingu se děje podle tří kritérií – takzvaný TNM systém.**
- T znamená stanovení primární lokalizace tumoru
- N určuje postižení lymfatických uzlin
- M hodnotí přítomnost metastáz.
- Stupně postižení jsou určeny numericky
- PRO DIAGNÓZU PATOLOGICKOU
- **pTNM**

# Molekulárně-biologické metody

- V poslední době je snaha, aby se určení potenciálního biologického chování nádoru opíralo nejen o **morfologické znaky**, ale i o znaky stanovené **molekulárně-biologickými metodami**
  - - například stanovení exprese onkogenů
  - - stanovení diferenciačních markerů
  - - analýza cytogenetických změn a změn obsahu DNA
  - - stanovení markerů angioneogeneze, atd.

# Prognostická a prediktivní patologie

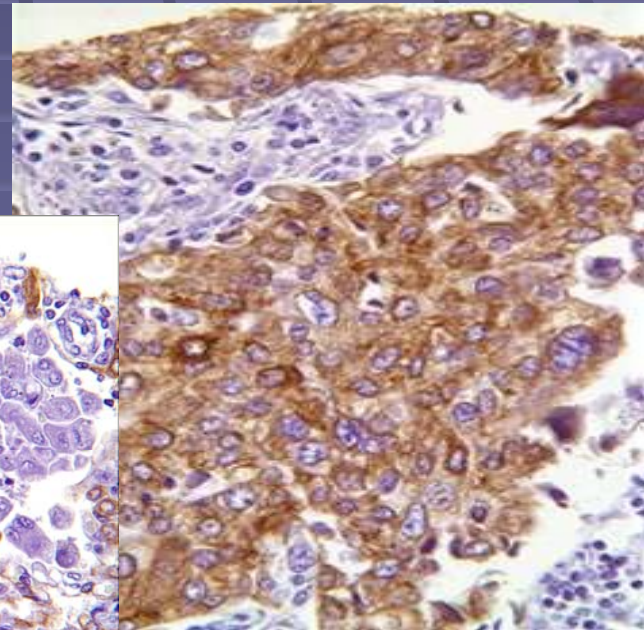
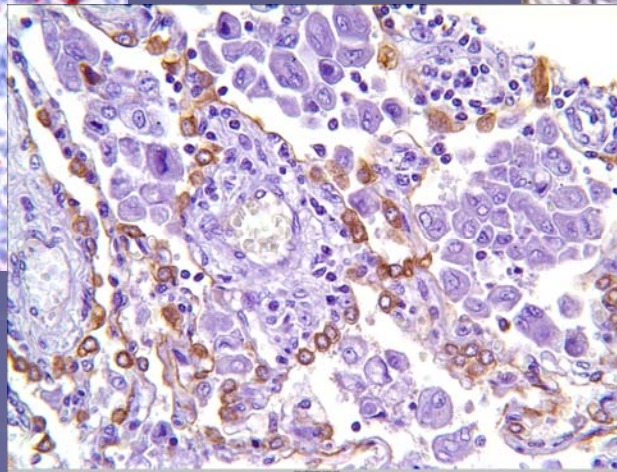
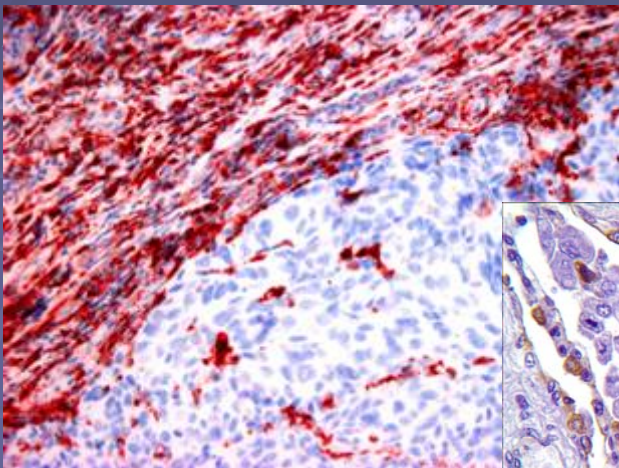
- Jak již bylo zmíněno, patologie již není oborem výhradně morfologickým, a proto je spektrum informací získaných z vyšetření tkání podstatně širší.
- Kromě významu prognostického a prediktivního mají tyto informace (související například s buněčným cyklem a apoptózou) význam:
  - - v časně detekci a diagnostice nádorů
  - - při stanovení citlivost nádoru na terapii
  - - při sledování efektivity léčby
  - - při analýze protinádorového efektu nových potencionálně účinných látek atd...

# Prognostická a prediktivní patologie

- Současným trendem v diagnostickém procesu je snaha o co nejmenší zátěž pacienta, tedy snaha získat z minimálního množství odebrané tkáně maximum informací.
- Z jednoho vzorku tkáně lze získat informace týkající se:
  - **morfologie**
    - metodou klasického histologického barvení, histochemie, elektronové mikroskopie, atd.

# Prognostická a prediktivní patologie

- imunofenotypu
  - metodou imunohistochemie
  - *in situ* hybridizace, FISH atd.



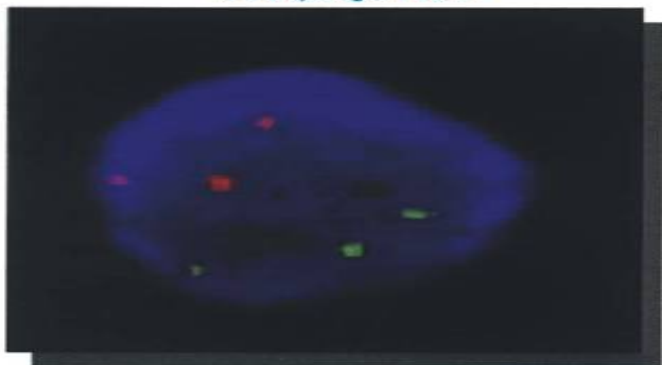
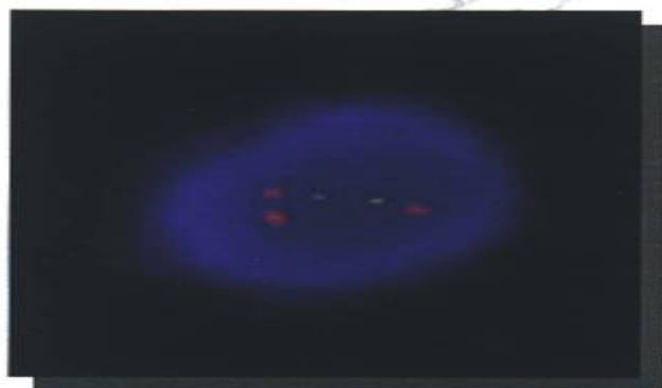


Možnost analýzy interfázních chromozomů (nevyžaduje kultivaci buněk a přípravu metafázických chromozomů)

Detekce polysomií, translokací, inverzí, delecí

# FISH

Multi color FISH/ high resolution banding kombinace fluorochromů



**Interphase cells showing trisomy 21 (red), top, and triploidy for chrom 13 (green) and 21 (red), above.**



*Complex rearrangement involving chromosomes 2 and 5 analyzed with XCyte5 mBAND probe kit. Original tetraploid metaphase spread exhibits two normal chromosomes 5, two chromosomes 5 with an interstitial deletion, and two chromosomes 2 with different insertions of chromosome 5 (Specimen kindly provided by Prof. M. Lessard, Brest, France).*

[www.metasystems.de](http://www.metasystems.de)

# Prognostická a prediktivní patologie

- molekulárních alterací
  - metodou PCR, sekvencováním,
  - komparativní genomickou hybridizací, atd.)
- komplexního funkčního profilu
  - „protein and gene micro-arrays“, atd.
- Komplexnost získané informace a aplikace takového spektra metod vyžaduje změny v přístupu při zpracování a uchovávání tkáňových vzorků, při zpracování výsledků a v neposlední řadě změny v uvažování diagnostikujícího lékaře.
- Nesmíme zapomínat ani na souhlas pacienta

# Legislativa

- Pro pacienta i diagnostikujícího lékaře zůstávají důležitým etickým problémem i otázky „vlastnictví“ genetického materiálu a otázky právní zodpovědnosti plynoucí z informací získaných na základě výsledků molekulárně-biologických vyšetření (prescreening, prenatální diagnostika).  
**Dosud neexistuje právní kodifikace těchto problémů.**

# Praktické použití metodik v prediktivní a prognostické patologii

Metodiky lze rozdělit na :

- metodiky používané běžně
- metodiky používané nedostatečně
- metodiky, které budou používané v nejbližší budoucnosti.

# Běžně používané metodiky

- Určení proliferační aktivity (imunohistochemické stanovení Ki67, PCNA)
- Stanovení DNA ploidie (počítačová obrazová analýza, průtoková cytometrie)
- Stanovení diferenciačních markerů (CD), onkoproteinů, onkofetálních antigenů (imunohistochemie, průtoková cytometrie)
- Stanovení exprese receptorů pro růstové faktory a hormony (steroidní hormony, c-erbB-2...) (imunohistochemie)
- Stanovení chromozomálních poruch – především v hematatoonkologii (FISH, CGH)

# Mezi metodiky používané nedostatečně patří:

- Stanovení exprese proteinů zapojených do regulace buněčného cyklu a apoptózy
- Stanovení exprese proteinů regulovaných růstovými faktory a hormony
- Stanovení apoptotického (nekrotického) indexu pro monitorování průběhu léčby
- Stanovení exprese proteinů zapojených do mnohotné lékové rezistence (MDR, multidrug resistance)

# Metodiky používané nedostatečně pokračování

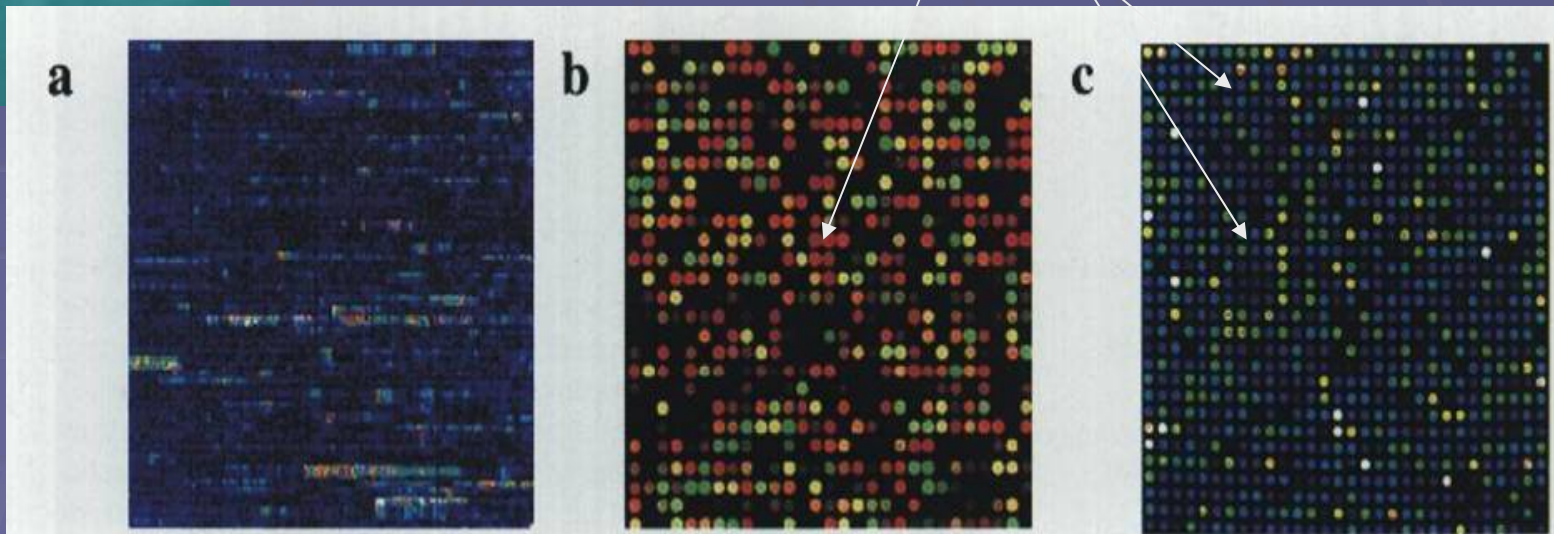
- Stanovení exprese klíčových nádorových supresorů, jejichž exprese souvisí s činností reparačních mechanismů
- Stanovení exprese produktů genů odpovědných za reparaci chybného párování
- Stanovení exprese proteinů zapojených do regulace cytochromu P-450

# Mezi metodiky, které budou používány v nejbližší budoucnosti patří:

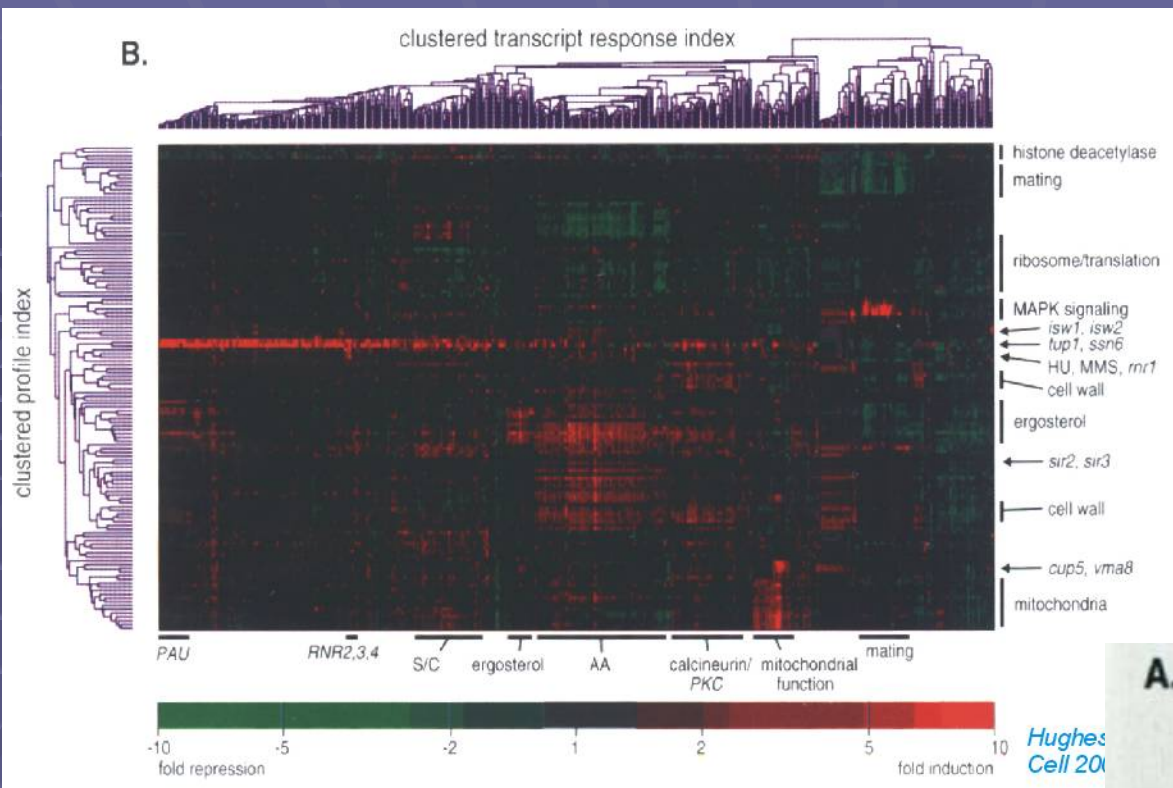
- Tkáňové „micro-arrays“ (tkáňové mikročipy)
- DNA „micro-arrays“ (DNA mikročipy)



DNA sekvence (array)

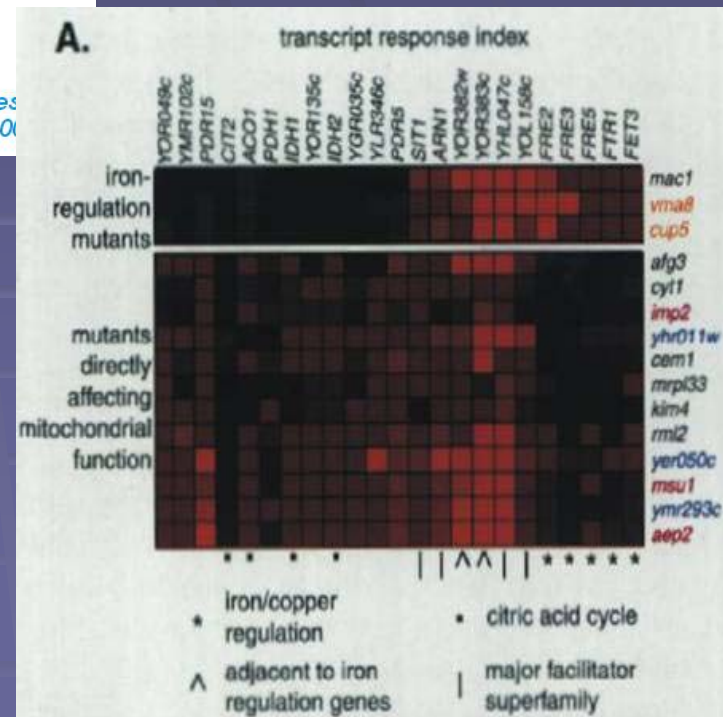






## DNA čipy

- identifikace nových genů
- unikátní informace o změnách v expresi celého genomu v odpovědi na pokusný zásah
- nové **diagnostické markery** (BRCA1, BRCA2-adenokarcinom mléčné žlázy nebo ovaria)



# Nejvýznamnější aplikace prognostických a prediktivních znaků

- Klinicky se stanovení prognostických a prediktivních znaků nejčastěji používá u
  - karcinomů plic
  - karcinomů zažívacího traktu
  - karcinomů mléčné žlázy
  - nádorů CNS
  - karcinomů urogenitální oblasti
  - hematologických malignit.

# Prognostické a prediktivní znaky u NSCLC

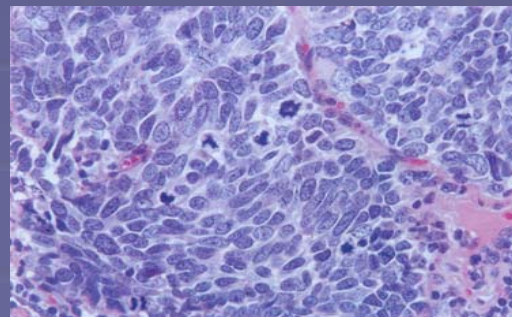
- Mezi nevýznamnější prognostické faktory u NSCLC patří
- Stanovení aktivace onkogenů (ras, myc, bcl-2)
- Ztráta či mutace nádorových supresorových genů (pRb, p53, p16)
- Význam má stanovení DNA ploidie (diploidní tumory mají lepší prognózu než tumory aneuploidní)
- Důležitou roli hraje také stanovení exprese EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor).

# Prognostické a prediktivní znaky u NSCLC

- Dobrým prognostickým a prediktivním znakem u NSCLC mohou být:
- známky neuroendokrinní diferenciace (imunohistochemický průkaz exprese chromograninu, neuron-specifické enolázy a Leu-7, elektronmikroskopický průkaz neuroendokrinních „dense core“ granul)
- V poslední době je za důležitý prognostický znak považována angiogeneze
- morfometricky hodnocená denzita cév, imunohistochemická detekce faktoru VIII., CD34, nestinu, atd.
- Ukazuje se, že u NSCLC koreluje míra angiogeneze s horší prognózou.

# Prognostické a prediktivní znaky u SCLC

- Kromě klasického stagingu (TNM) a některých biochemických hodnot (elevace LDH a neuron specifické enolázy v séru jsou známkami špatné prognózy) jsou v současné době testovány i některé molekulárně-biologické faktory
- například proteiny zahrnuté do vývoje mnohotné lékové rezistence, inhibitory cdk jako jsou p21WAF1/CIP1 a p27KIP1, atd
- většina z nich však patří do kategorie faktorů intenzivně studovaných a v klinické praxi nejsou ve větší míře používány



# Prognostické a prediktivní znaky u karcinomu GIT

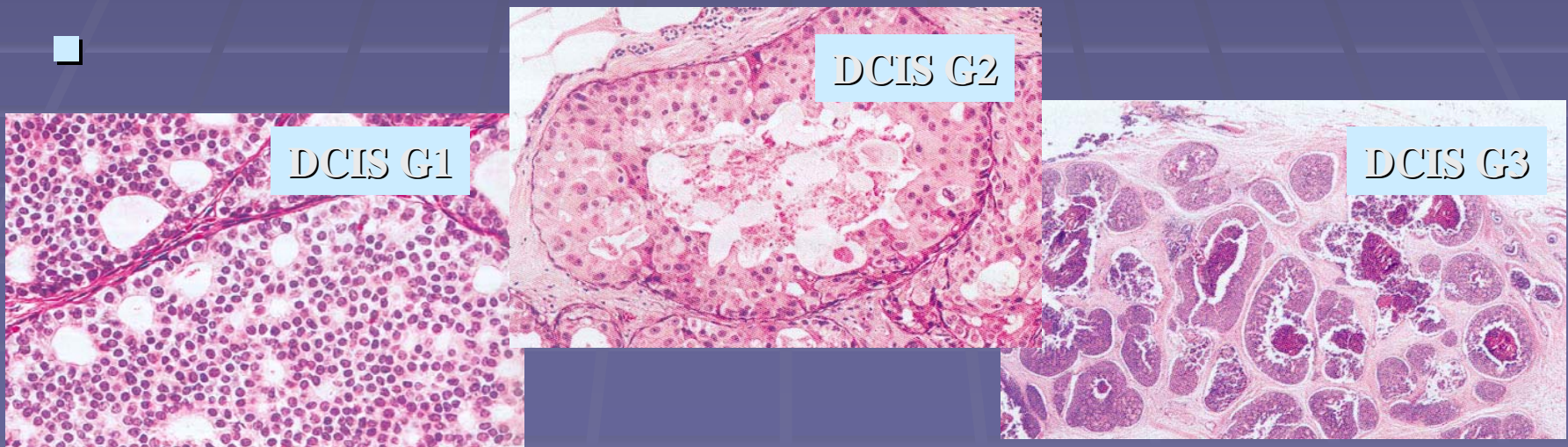
- Obecně lze ale konstatovat, že význam většiny těchto faktorů byl objeven v souvislosti se studiem vývoje nádorů zažívací roury. Typickým příkladem je vícestupňový proces vzniku kolorektálního karcinomu, na němž se v jednotlivých krocích podílí alterace genů kódujících proteiny MYC, RAS, p53, MCC („mutated in colorectal cancer“), DCC („deleted in colorectal cancer“), APC („adenomatous polyposis“) a defekty opravných mechanismů („microsatellite instability“).
- Genetické změny u familiárních forem kolorektálního karcinomu zahrnují alterace genů kódujících APC a HNPCC („hereditary non-polyposis colon cancer“).

# Prognostické a prediktivní znaky u karcinomu GIT - pokračování

- Na vzniku karcinomů GIT se též podílí mutace genů kódujících růstové faktory a jejich receptory (PDGF, EGF, TGF, EGFR,...), alterace cyklinu D, poruchy adhezních molekul, atd.
- V patogenezi maligních nádorů GIT nelze opomenout ani roli onkogenních virů jako je EBV, HBV a HCV. Vzhledem k tomu, že změny exprese jmenovaných znaků se podílí na vzniku nádorů, lze jejich průkaz použít nejen k účelům prognózy a predikce, ale také k monitorování rizika vzniku malignity resp. k její časné detekci.

# Prognostické a prediktivní faktory u karcinomů mléčné žlázy

- Problematika prognostických a prediktivních faktorů u karcinomů mléčné žlázy je velmi široká
- Podobně jako u karcinomů GIT je vývoj karcinomu mléčné žlázy vícestupňový proces (normální žláзка → hyperplasie → dysplasie [atypická lobulární/duktální hyperplasie] → adenom → karcinom)





# Prognostické a prediktivní faktory u karcinomů mléčné žlázy - pokračování

- Nejčastěji studovanými znaky jsou průkazy změn exprese proteinů :
  - p21RAS
  - MYC
  - p53
  - BRCA 1,2,
  - stanovení exprese a amplifikace c-erbB-2 (HER2/neu)
  - stanovení exprese estrogenových a progesteronových receptorů
  - stanovení proliferační aktivity
  - exprese BCL-2

# Nádory CNS

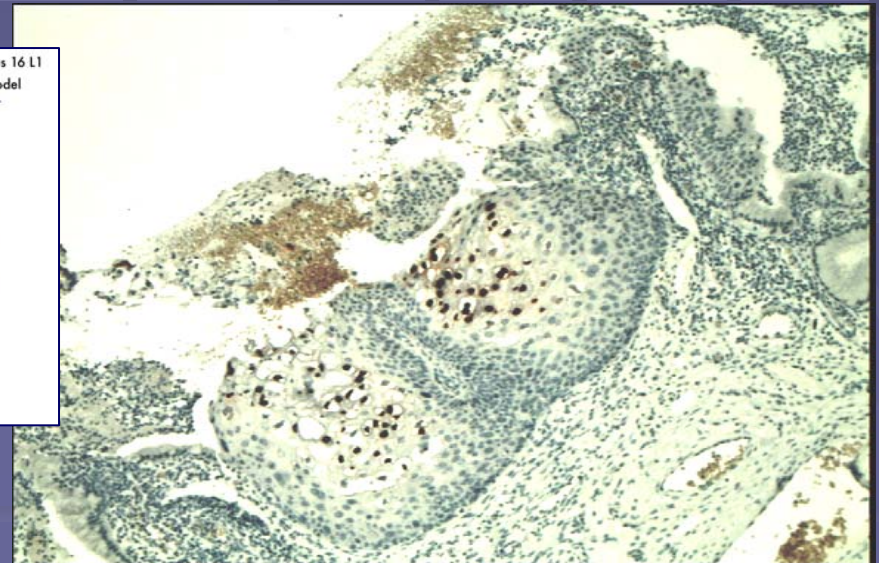
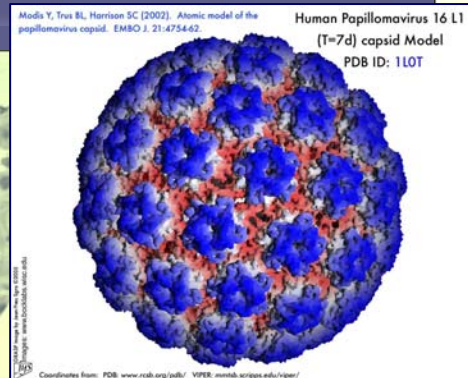
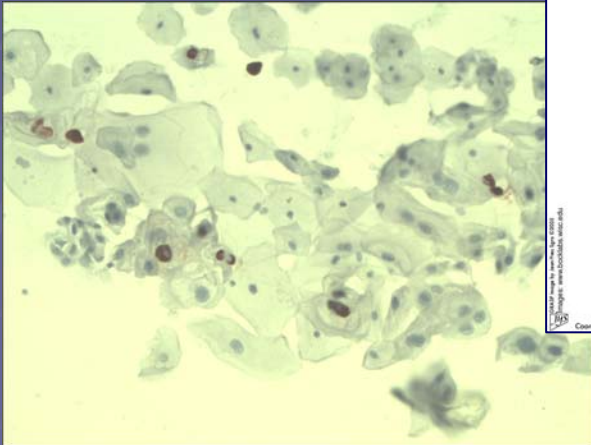
- Zájem neuropatologů, molekulárních patologů a neurochirurgů o prognostické a prediktivní faktory v oblasti tumorů CNS se týká především astrogliomů, a to vzhledem k tomu, že jsou nejčastějšími primárními nádory CNS (cca 40%).
- Bylo zjištěno, že u astrocytárních nádorů dochází k mnoha specifickým chromozomálním aberacím (například delece chromozomu 9p, 10q, 11p, 13q atd.) s následnými změnami exprese genových produktů. Některé tyto mutace mohou mít signifikantní vztah k prognóze a k biologickému chování.

# Prognostické a prediktivní faktory u astrogliálních tumorů

- V praxi se nejčastěji řeší následující otázky:
- Odlišení reaktivní gliózy (nenádorový proces) od astrocytomu nízké malignity (low grade astrocytom, dále LGA). Pro LGA svědčí například pozitivita exprese p53.
- Přejít LGA do sekundárního vysoce maligního astrocytomu (high grade astrocytom, glioblastom, dále HGA). Pro přechod do HGA může mimo jiné svědčit vysoká exprese proliferačního markeru Ki67.
- Určení prognostických a prediktivních faktorů u LGA a HGA (SAMS klasifikace, imunohistochemické stanovení exprese PTEN, MDM-2, p53, EGFR, atd.).

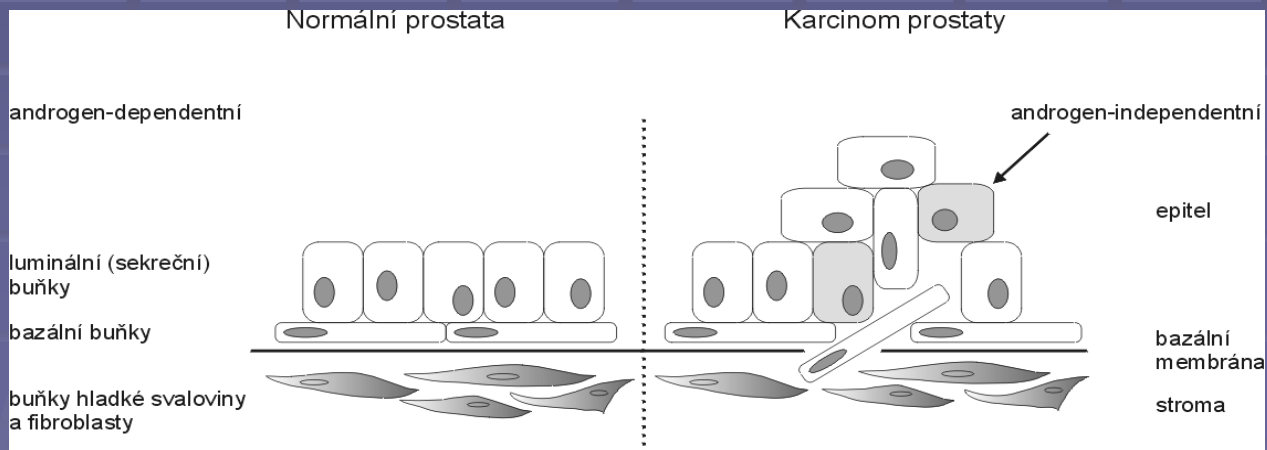
# Prognostické a prediktivní faktory u karcinomů urogenitální oblasti

- Jde opět o velmi širokou skupinu nádorů se specifickou problematikou, uvádíme jen nejdůležitější znaky.
- U **karcinomu děložního čípku** je důležitá rutinní typizace lidských papilomavirů (HPV) různými metodami k průkazu typů viru představujících vysoké riziko vzniku karcinomu (typy 16, 18, 31, 33, 35).



# Prognostické a prediktivní faktory u karcinomů urogenitální oblasti

- U **karcinomu močového měchýře** se na prognóze podílí mutace EGFR, p53 a změny ploidie.
- U **karcinomu prostaty** jsou za potencionální dobré indikátory prognózy/predikce považovány změny exprese androgenových receptorů, změny exprese inhibitorů cyklin dependentních kináz (cdk) proteinů p27KIP1 a p21WAF1/CIP1, alterace a následné změny exprese nádorových supresorů pRB a p53, alterace proteinů cytoskeletu (cytokeratiny, E-cadherin, atd.), alterace receptorů pro růstové faktory (EGFR) a také změny apoptotického indexu.



# Prognostické a prediktivní faktory u hematologických malignit

- Poznání molekulárních mechanismů vedoucích k hematologickým malignitám patrně pokročilo nejdále.
- U **leukemií a maligních lymfomů** se například běžně používá CD typizace, detekce chromozomálních aberací (translokací), stanovení proteinů buněčného cyklu a apoptózy (například imunohistochemický průkaz exprese BCL-2 u folikulárních lymfomů odlišující maligní lymfom od folikulární hyperplasie).

# Prognostické a prediktivní faktory u hematologických malignit

- Většina znaků stanovených pomocí molekulárně-biologických a cytogenetických metodik je součástí standardního diagnostického procesu a je zaimplementována do nejnovějších klasifikací hematologických malignit (REAL klasifikace, WHO klasifikace).
- V některých laboratořích se také rozvíjí testování *in vitro* citlivosti na cytostatika a analýza proteinů ovlivňujících mnohotnou lékovou rezistenci (MDR)
- Pro monitorování průběhu léčby je také důležité sledování změn exprese některých proteinů regulujících buněčný cyklus a apoptózu (pRB, p53, p21WAF1/CIP1, p27KIP1, atd.).

# Závěr

- V rutinní patologii se v současnosti objevují přístupy, jež byly dosud doménou biologie.
- V této souvislosti nelze opomenout ani zvyšující se podíl počítačových technologií a výraznou diverzifikaci personálu (stále se rozšiřující počet vysokoškolsky vzdělaných pracovníků nemedicínského směru).
- Tyto všechny požadavky vedou k vyšší finanční zátěži moderních pracovišť a mnohdy je třeba zhodnotit tzv. „cost-effectiveness“ plánovaných vyšetření



# Závěr - pokračování

Prognostická a prediktivní patologie sebou přináší také četné problémy metodické (dostupnost materiálu, laboratorní vybavení), problémy „interpretace“ výsledků a problémy etické).

Perspektivy prognostické a prediktivní patologie lze vidět v několika rovinách: v oblasti metodické dojde z rutinnímu zavedení velmi výkonných metod jako jsou „tissue arrays“ nebo DNA čipová technologie, své uplatnění také najdou metody mikrodisekce.

# Závěr - pokračování

V oblasti aplikace výsledků dojde patrně k těsnějšímu propojení prognostické a prediktivní patologie s nejmodernějšími léčebnými postupy (terapie pomocí monoklonálních protilátek, genová terapie, nové přístupy v hormonální terapii)

V oblasti eticko-právní dojde zcela jistě k vyřešení mnoha nejasných či sporných oblastí (tak, jak se to například zdařilo při zavádění rutinních transplantací)

***Děkuji za pozornost***