

Mogućnosti određivanja diseminiranih stanica raka prostate

Ivan Šamija, dipl. ing.¹, prof. dr. sc. Mirko Šamija², akademik Zvonko Kusić¹

¹Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu, KB "Sestre milosrdnice", Zagreb

²Služba za radioterapijsku onkologiju, Klinika za tumore, Zagreb

Značajan udio bolesnika s klinički lokaliziranim rakom prostate razvije recidiv ili udaljene metastaze. S ciljem da se izdvoje ti bolesnici kako bi im se omogućio najprikladniji oblik liječenja istražuje se primjena molekularnih metoda za određivanje diseminiranih stanica raka prostate. Najviše su istraživani sljedeći molekulski biljezi za otkrivanje tumorskih stanica metodom RT-PCR u perifernoj krvi, koštanoj srži i limfnim čvorovima bolesnika s rakom prostate: antigen specifičan za prostatu (PSA, prostate-specific antigen), membranski antigen specifičan za prostatu (PSMA, prostate-specific membrane antigen) i humani kalikrein 2. Ovi biljezi su se pokazali specifičnima za rak prostate. Međutim, prognostička vrijednost određivanja ovih biljega u bolesnika s rakom prostate nije jednoznačno potvrđena u objavljenim istraživanjima. Istražuju se i nove metode i pristupi koji bi mogli povećati kliničku vrijednost određivanja diseminiranih stanica raka prostate.

Unatoč napretku u liječenju i dijagnostici raka prostate, još uvijek značajan broj bolesnika s lokaliziranim rakom prostate razvije recidiv ili udaljene metastaze.¹ Kada bi se moglo izdvajati bolesnike s lokaliziranim rakom prostate koji će kasnije razviti recidiv ili metastaze, mogao bi im se ponuditi prikladniji i djelotvorniji oblik liječenja. Upravo se zato intenzivno istražuju mogućnosti otkrivanja malog broja stanica raka prostate u krvotoku, koštanoj srži i limfnim čvorovima. Metastatski proces je vrlo složen i smatra se da tek vrlo mali dio tumorskih stanica prisutnih u krvotoku u konačnici razvije udaljene metastaze.² Usprkos tome istraživanja kod različitih tumorova pokazala su da određivanje diseminiranih tumorskih stanica može imati prognostički značaj.³

Metode

U početku su istraživači pokušavali odrediti diseminirane tumorske stanice imunohistokemijskim metodama.^{3,4} Međutim, prag detekcije tih metoda koje omogućuju otkrivanje otprilike jedne tumorske stanice među 105 drugih stanica nije se pokazao dovoljno niskim s obzirom na vrlo mali broj tumorskih stanica koje su prisutne u krvotoku bolesnika.^{3,4} Tek je razvoj metode lancane reakcije polimerazom nakon reverzne transkripcije (RT-PCR, *reverse transcription – polymerase chain reaction*) omogućio dostizanje dovoljno niskog praga detekcije koji omogućuje određivanje jedne tumorske stanice među 107 drugih stanica.^{3,5} Metodom RT-PCR se s vrlo visokom osjetljivošću i specifičnošću u velikom broju kopija umnaža komplementarna DNA (cDNA, *complementary DNA*) dobivena reverznom transkripcijom točno odredene ciljne glasničke RNA (mRNA, *messenger RNA*). Tako umnoženu cDNA lako je detektirati elektroforezom u gelu agaroze ili nekim drugim postupcima. Na taj se način može odrediti prisutnost malog broja stanica u kojima je prisutna ciljna mRNA, koja u tome slučaju ima ulogu specifičnog biljega.

Biljezi

Idealni biljeg za određivanje diseminiranih stanica raka prostate metodom RT-PCR bila bi mRNA koja nastaje transkripcijom gena koji se eksprimira isključivo u stanicama raka prostate koje imaju metastatski potencijal. Također bi se taj gen morao eksprimirati jednoliko u svim stanicama raka prostate. Takav biljeg još nije otkriven. Kao biljezi za određivanje diseminiranih stanica raka prostate me-

todom RT-PCR najčešće se primjenjuju antigen specifičan za prostatu (PSA, *prostate-specific antigen*), membranski antigen specifičan za prostatu (PSMA, *prostate-specific membrane antigen*) i humani kalikrein 2.⁴⁻⁶ Svi ovi biljezi su specifični za stanice prostate, i zdrave i maligno transformirane.^{4,5} Budući da zdrave stanice prostate normalno nisu prisutne u krvi, koštanoj srži i limfnim čvorovima, ovi biljezi ipak mogu poslužiti za otkrivanje stanica raka prostate u ovim tkivima. Pri određivanju biljega treba voditi računa i o rezultatima nekih istraživanja koja su pokazala vrlo nisku razinu njihove ekspresije i u nekim drugim zdravim i tumorskim stanicama i tkivima.^{7,8} Pravilnim odabirom uvjeta reakcije PCR najčešće se mogu izbjegić lažno pozitivni rezultati koji su posljedica ekspresije biljega u drugim stanicama, u slučaju da je ta ekspresija značajno niža nego u stanicama raka prostate.

Specifičnost i osjetljivost

Moreno i suradnici su prvi, 1992. godine, pokazali da se metodom RT-PCR uz primjenu PSA kao specifičnog biljega mogu odrediti stanice raka prostate u krvotoku bolesnika, nakon čega su uslijedila brojna druga istraživanja mogućnosti određivanja diseminiranih stanica raka prostate.⁹

Većina negativnih kontrola (uzorci krvi zdravih dobrovoljaca i osoba s benignom hiperplazijom prostate) bile su negativne u dosad provedenim istraživanjima, što pokazuje visoku specifičnost ove metode.³⁻⁶ Malobrojni lažno pozitivni rezultati mogu biti posljedica vrlo visoke osjetljivosti ove metode, kojom se može detektirati i vrlo niska razina ekspresije specifičnih biljega u drugim stanicama prisutnim u krvotoku, koštanoj srži ili limfnim čvorovima. Budući da su biljezi koji se primjenjuju specifični za tkivo prostate, a ne za stanice raka prostate, lažno pozitivni rezultati mogu biti i posljedica prisutnosti zdravih stanica prostate u cirkulaciji, do čega može doći nakon invazivnog terapijskog ili dijagnostičkog postupka, kao što je npr. prostatektomija.

Iako je potvrđena visoka specifičnost određivanja diseminiranih stanica raka prostate metodom RT-PCR, klinička vrijednost ovog postupka je ograničena. Jedno od glavnih ograničenja je relativno veliki broj bolesnika s klinički potvrđenim udaljenim metastazama koji su se pokazali negativnima na bilo koji od istraživanih biljega u većini istraživanja.³⁻⁶ Prosječni udio pozitivnih među bolesnicima

s klinički potvrđenim udaljenim metastazama u relevantnim kliničkim studijama objavljenim do 2003. godine bio je 57%, dok je među bolesnicima s lokaliziranim rakom prostate bio 24%.⁴ Ovi postoci odnose se na određivanje stanica raka prostate u cirkulaciji, dok su postoci pozitivnih veći kada se stanice raka prostate određuju u koštanoj srži.⁵ Nekoliko je mogućih objašnjenja ovakvih rezultata. Moguće je da se u dijelu stanica raka prostate tijekom tumorske progresije smanji ili potpuno dokine ekspresija gena za istraživani biljeg. U tom bi slučaju istovremena analiza više biljega poboljšala određivanje diseminiranih stanica raka prostate. Pokazano je da istovremeno određivanje PSA i PSMA biljega omogućuje otkrivanje stanica raka prostate u više bolesnika s rakom prostate nego određivanje samo jednog biljega.¹⁰ Drugo moguće objašnjenje negativnog nalaza specifičnih biljega u bolesnika s klinički potvrđenim udaljenim metastazama temelji se na modelu metastatskog procesa po kojem se tumorske stanice otpuštaju u krvotok nasumično i diskontinuirano.

Klinička primjena

Istraživalo se nekoliko mogućih kliničkih primjena određivanja diseminiranih stanica raka prostate. Jedna je pomoć pri preoperativnom stupnjevanju klinički lokaliziranog raka prostate. Samo su neka od objavljenih istraživanja pokazala da postoji povezanost između detekcije stanica raka prostate u krvotoku, odnosno koštanoj srži i patološkog stadija bolesti, pozitivnih kirurških margina i izvankapsularne proširenosti raka prostate.⁴⁻⁶

Određivanje diseminiranih stanica raka prostate istraživalo se i kao potencijalni prognostički čimbenik u smislu predviđanja progresije bolesti, preživljjenja ili biokemijskog relapsa. Većina, ali ne i sva istraživanja, potvrdila su prognostičku vrijednost ovog postupka.^{3,4,6} Jedno istraživanje je pokazalo da određivanje stanica raka prostate metodom RT-PCR u uzorcima krvi uzetim nakon prostatektomije ima prognostičku vrijednost, za razliku od analize uzoraka uzetih prije operacije koja u tome istraživanju nije pokazala prognostičku vrijednost.¹¹

Istraživao se i utjecaj invazivnih terapijskih i dijagnostičkih postupaka na otpuštanje stanica prostate u krvotok. Tako je pokazano da se nakon radikalne prostatektomije, brahiterapije i transrektnalnog ultrazvuka povećava vjeratnost pozitivnog nalaza stanica prostate u krvotoku.^{4,5} Međutim, stvarni klinički značaj ovih rezultata nije jasan jer biljezi koji su analizirani ne omogućuju razlikovanje zdravih stanica prostate od stanica raka prostate. Zanimljivi su rezultati koji su pokazali da je u bolesnika koji su liječeni neoadjuvantnom ablacija androgena smanjena vjeratnost nalaza stanica prostate u cirkulaciji i u koštanoj srži.^{12,13}

Iako dosad nisu objavljeni rezultati takvih istraživanja u bolesnika s rakom prostate, rezultati kod nekih drugih tumorova upućuju na moguću primjenu određivanja diseminiranih stanica raka prostate i u praćenju odgovora na terapiju.^{14,15}

U više istraživanja je pokazano da metoda RT-PCR omogućuje otkrivanje metastaza limfnih čvorova u većeg broja bolesnika s rakom prostate nego standardna patohistološka analiza (bojanje hematoksilinom i eozinom) i imunohistokemijska analiza.^{5,6} Međutim, stvarni klinički značaj tih mikrometastaza u limfnim čvorovima otkrivenih metodom RT-PCR tek treba potvrditi u većem broju prospektivnih studija.

Najnoviji pristupi i metode

Razvoj nekih novih metoda u posljednje vrijeme omogućio je i neke nove pristupe određivanju diseminiranih stanica raka prostate koji bi mogli značajno utjecati na kliničku vrijednost i primjenu ovog postupka.

Jedno od osnovnih ograničenja trenutačno primjenjivanih biljega za određivanje diseminiranih stanica raka prostate je što se njihovom primjenom ne mogu razlikovati zdrave stanice prostate od stanica raka prostate. Međutim, razvoj i sve veća primjena transkriptomike značajno povećavaju vjeratnost otkrivanja novih boljih biljega.

Primjena kvantitativnog PCR-a nudi neke prednosti u odnosu na standardni PCR, posebno u slučaju lažno pozitivnih rezultata.

Međutim, zbog različite ekspresije ciljnih gena u različitim stanicama raka prostate kvantitativni PCR ne omogućuje pouzdano određivanje ni usporedbu stvarnog broja stanica raka prostate u uzorku.^{4,6} Zbog toga i zbog nekih drugih ograničenja malo je vjerojatno da će primjena kvantitativnog PCR-a značajno povećati kliničku vrijednost određivanja diseminiranih stanica raka prostate.

Još jedan pristup kojim se pokušava riješiti problem lažno pozitivnih rezultata te povećati osjetljivost određivanja diseminiranih stanica raka prostate je primjena imunomagnetskog razdvajanja prije analize metodom RT-PCR.^{3,4} Tom metodom se značajno povećava udio epitelnih stanica prostate u uzorku, čime se smanjuje vjerojatnost lažno pozitivnih rezultata uslijed ekspresije ciljnih gena u drugim stanicama.

Posebno su zanimljivi rezultati istraživanja u kojem je primijenjen originalni pristup određivanju cirkulirajućih stanica raka prostate nazvan izolacija epithelialnih tumorskih stanica po veličini (ISET, *Isolation by Size of Epithelial Tumor cells*).¹⁶ Ovim postupkom se filtracijom značajno povećava udio većih epithelialnih tumorskih stanica u odnosu na manje leukocite u uzorku krvi, nakon čega se broj tumorskih stanica određuje citopatološkom analizom pod mikroskopom. U istraživanju provedenom na 109 bolesnika s lokaliziranim rakom prostate pokazano je da je ovako određena prisutnost stanica raka prostate u cirkulaciji značajno povezana s vrijednošću serumskog PSA i sa stadijem bolesti, te je kao neovisna varijabla povezana s rizikom od recidiva bolesti.¹⁶

Zaključak

Usprkos proturječnim rezultatima različitih istraživanja s obzirom na prognostičku vrijednost određivanja diseminiranih stanica raka prostate, dovoljno je rezultata na osnovi kojih se može zaključiti da ovaj postupak ipak može pomoći u kvalitetnijem zbrinjavanju bolesnika s rakom prostate. No, s obzirom na izuzetno visoku osjetljivost i relativnu zahtjevnost postupka, pri njegovu provođenju i posebno pri interpretaciji rezultata treba biti vrlo oprezan i voditi računa o ograničenjima metode i mogućim pogreškama. Nove znanstvene spoznaje i razvoj novih metoda (kao što su npr. transkriptomika i ISET) omogućuju razvoj i poboljšanje određivanja diseminiranih stanica raka prostate i na taj način otvaraju dodatne mogućnosti kliničke primjene ovoga postupka. M

LITERATURA

1. Lerner SP, Seale-Hawkins C, Carlton CE, Scardino PT. The risk of dying of prostate cancer in patients with clinically localized disease. *J Urol* 1991; 146:1040-5.
2. Fidler IJ. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* 1970; 45(4):773-82.
3. Zieglschmid V, Hollmann C, Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2005; 42(2):155-96.
4. Schanhart DH, Maizza R, Kurth KH. Identification of circulating prostate cancer cells: a challenge to the clinical implementation of molecular biology (review). *Int J Oncol* 2005; 26(3):565-77.
5. Su SL, Boynton AL, Holmes EH, Elgamal AA, Murphy GP. Detection of extraprostatic prostate cells utilizing reverse transcription-polymerase chain reaction. *Semin Surg Oncol* 2000; 18(1):17-28.
6. Ghosein RA, Bhattacharya S. Molecular detection and characterization of circulating tumor cells and micrometastases in prostatic, urothelial, and renal cell carcinomas. *Semin Surg Oncol* 2001; 20(4):304-11.
7. Lintula S, Stenman UH. The expression of prostate-specific membrane antigen in peripheral blood leukocytes. *J Urol* 1997; 157:1969-72.
8. Smith MR, Biggar S, Hussain M. Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: implications for detection of micrometastasis. *Cancer Res* 1995; 55:2640-4.
9. Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mulholland SG, Gomella LG. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52:6110-2.
10. Zhang Y, Zippe CD, Van Lente F, Klein EA, Gupta MK. Combined nested reverse transcription-PCR assay for prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in detecting circulating prostatic cells. *Clin Cancer Res* 1997; 3(7):1215-20.
11. Shariat SF, Kattan MW, Song W, Bernard D, Gottenger E, Wheeler TM, Slawin KM. Early postoperative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy. *Cancer Res* 2003; 63:5874-8.
12. Wood DP, Beaman A, Banerjee M, Powell I, Pontes E, Cher ML. Effect of neoadjuvant androgen deprivation on circulating prostate cells in the bone marrow of men undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 1998; 4:2119-23.

13. Su SL, Heston WD, Perrotti M. Evaluating neoadjuvant therapy effectiveness on systemic disease: use of a prostatic-specific membrane reverse transcription polymerase chain reaction. *Urology* 1997; 49(3A suppl.):95-101.
14. Reynolds SR, Albrecht J, Shapiro RL, Roses DF, Harris MN, Conrad A, Zeleniuch-Jacquotte A, Bystryn JC. Changes in the presence of multiple markers of circulating melanoma cells correlate with clinical outcome in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(4):1497-502.
15. Mellado B, Del Carmen Vela M, Colomer D, Gutierrez L, Castel T, Quinto L, Fontanillas M, Reguart N, Domingo-Domenech JM, Montagut C, Estape J, Gascon P. Tyrosinase mRNA in blood of patients with melanoma treated with adjuvant interferon. *J Clin Oncol* 2002; 20(19):4032-9.
16. Vielh P, Nalpas B, Mejean A, Desitter I, Brousse N, Diamotte D, Lacour B, Paterlini-Brechot P. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells (CTC) in patients with prostate cancer without metastases. *Cytopathology* 2005; 16(Suppl. 2):30.