

Translačný výskum v onkológii – prvé skúsenosti Jednotky translačného výskumu

Doc. MUDr. Michal Mego, PhD., RNDr. Daniela Svetlovská, PhD., doc. MUDr. Jozef Mardiak, CSc.

II. onkologická klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Národný onkologický ústav, Bratislava

Onkológia (Bratisl.), 2014; roč. 9(5): 305–307

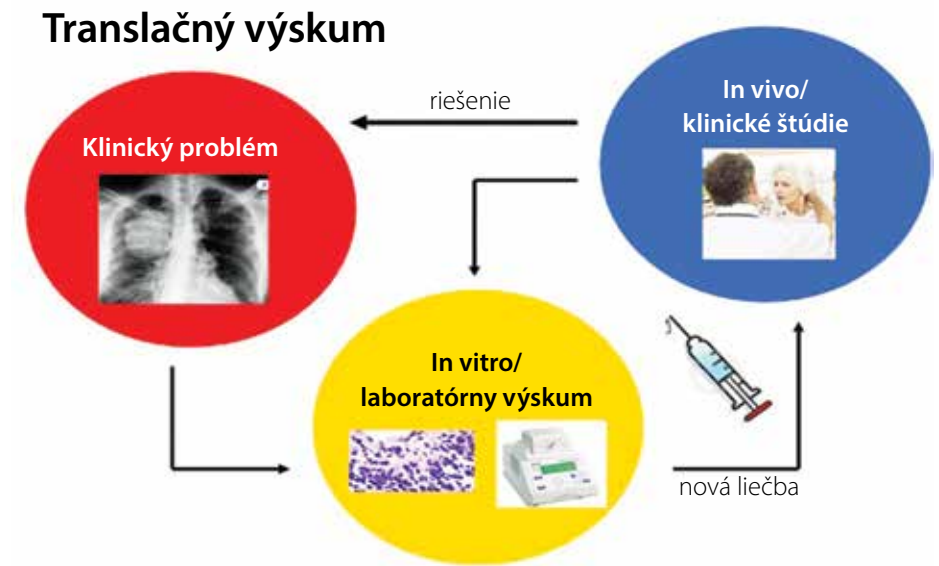
Úvod

V onkológii dochádza k neustálemu prírúbaniu poznatkov, ktorých aplikácia v klinickej praxi môže viesť k zlepšeniu liečebných výsledkov. Na druhej strane mnohé klinické pozorovania zostávajú neobjasnené na molekulárnej úrovni, pričom tieto poznatky môžu prispieť k individualizácii liečby pacientov a tým i k zvýšeniu efektivity liečby, prípadne k zníženiu nežiaducich účinkov liečby. V oblasti medicíny je snaha o rýchlejší a efektívnejší prenos výsledkov základného výskumu do lekárskej praxe. Štátna grantová podpora ako i farmaceutické spoločnosti, ktoré investujú obrovské sumy na základný výskum v medzinárodnom meradle, majú záujem o návratnosť týchto investícií, pričom táto návratnosť je podstatne nižšia, než sa predpokladalo. Translačný výskum môže predstavovať spôsob, ako tieto ciele dosiahnuť. Translačný výskum je výskum, ktorý umožňuje prenášanie poznatkov základného výskumu do klinickej praxe, ale i spätné riešenie klinicky významných problémov v onkológii využitím experimentálnych prístupov *in vitro* alebo *in vivo* na animálnych modeloch (obrázok 1).

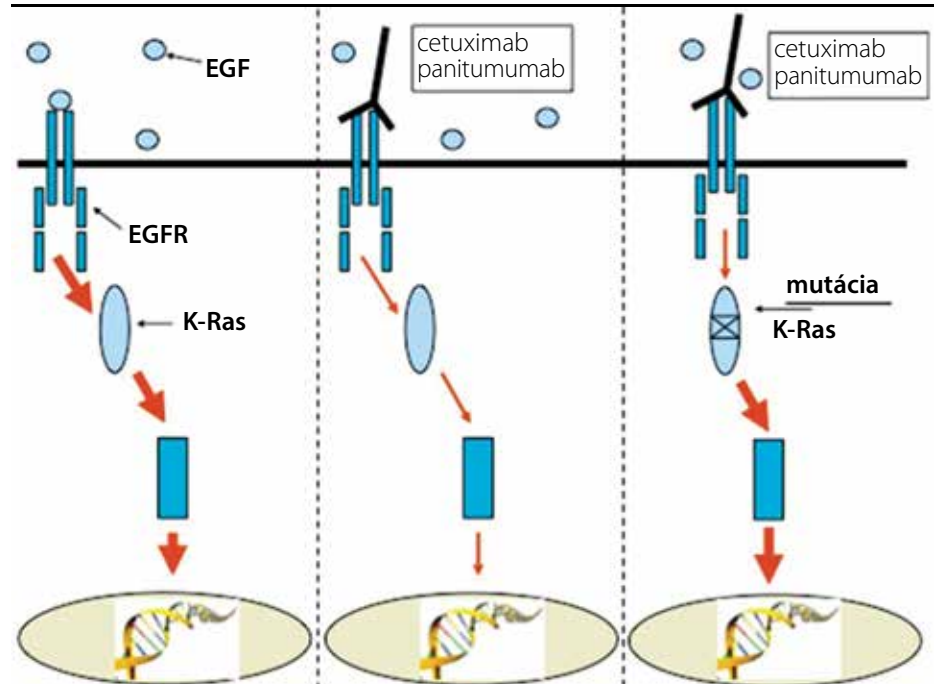
Existuje viacero **definícií** translačného výskumu. Podľa medzinárodnej pracovnej skupiny (Translational Research Working Group – TRWG) je translačný výskum definovaný ako výskum, ktorý transformuje vedecké objavy vychádzajúce z laboratória, klinických alebo populačných štúdií do klinických aplikácií, ktoré vedú k zníženiu incidencie, morbidity a mortality na rakovinu. V širšom slova zmysle môžeme hovoriť o translačnom výskume v medicíne. Translačný výskum sa niekedy delí do dvoch domén, **T1 výskum**, (bench-to-bedside), ktorý slúži na prenos poznatkov zo základného výskumu do praxe, a **T2 výskum**, ktorého úlohou je prenos poznatkov z klinických štúdií do každodennej praxe.

Translačný výskum vyžaduje, aby sa informácie a údaje z nemocníc, kliník a o účastníkoch štúdií dostali v organizovanej forme do výskumných zariadení a laboratórií. Okrem toho, vzhľadom na úroveň, rozsah a multidisciplinárny charakter, ktorý translačný výskum vyžaduje, je potreba novej úrovne schopnosti riadenia

Obrázok 1. Translačný výskum – schéma



Obrázok 2. Prediktívny význam konštitučnej aktivácie *K-ras* onkogénu na efektívnosť EGFR inhibítorov. Signalizácia sprostredkovaná cez EGFR receptor vedie k aktivácii génov vedúcich k deleniu bunky. Monoklonové protilátky namierené proti EGFR vedú k inhibícii takejto signalizácie a tým i k inhibícii delenia buniek. Aktivačná mutácia *K-ras* onkogénu vedie k aktivácii signálnej dráhy nezávisle od inhibície EGFR a tým i k neúčinnosti takejto liečby u pacientov s mutáciou *K-ras* onkogénu. Preto je vyšetrenie *K-ras* mutácie v nádorovej vzorke dôležitým prediktívnym faktorom efektivity monoklonových protilátok namierených proti EGFR.



Vysvetlivky: EGF – epidermálny rastový faktor, EGFR – receptor pre epidermálny rastový faktor, cetuximab, panitumumab – monoklonové protilátky proti EGFR

medzi klinickými pracoviskami, laboratóriami a archiváciou údajov. Zároveň to zvyšuje požiadavky na informatiku vzhľadom na neustále rastúce počty vzoriek, pacientov a zákonné regulácie biomedicínskeho výskumu za účelom integrácie klinických a laboratórných údajov. Väčšina informačných systémov v súčasnosti je nedostatočných, pokiaľ ide o zložité operácie v oblasti správ údajov a ich analýzy.

Translačný výskum je výskum, ktorý **by do značnej miery mali iniciovať a koordinovať klinickí pracovníci**. Nevyhnutným predpokladom sú klinické znalosti a skúsenosti, na základe ktorých je lekár schopný identifikovať klinicky významné problémy, ktorých výskum následne presiahne bežnú klinickú prax a realizuje sa v spolupráci s biológmi, biochemikmi, štatistikmi a ďalšími profesiami na experimentálnych modeloch. Takto získané riešenia sa následne opätovne overujú v praxi. Môžeme teda konštatovať, že **pacient je v strede takéhoto výskumu** a výstupy z translačného výskumu môžu mať následný priamy vplyv na starostlivosť o pacienta. Existuje veľa príkladov užitočnosti translačného výskumu, ako príklad možno spomenúť identifikáciu prediktívneho významu mutácie K-ras u pacientov s kolorektálnym karcinómom liečeným liečbou na báze monoklonálnych protilátok proti receptoru pre epidermálny rastový faktor (EGFR). Efektivita anti-EGFR protilátky pri kolorektálnom karcinóme je limitovaná, ale len malá časť neselektovaných pacientov s kolorektálnym karcinómom má z nej prospech. Pochopenie signálnej dráhy sprostredkovanej EGFR viedlo k poznaniu, že aktivačná mutácia K-ras onkogénu vedie k aktivácii tejto dráhy nezávisle od inhibícií EGFR a tým aj k predikcii rezistencie na liečbu. Uvedené poznatky umožňujú, aby pacienti s mutáciou K-ras neboli vystavení nežiaducim účinkom takejto liečby a, naopak, umožňuje nám to identifikovať skupinu pacientov majúcejch prospech z cielej liečby (obrázok 2).

Ďalším príkladom translačného výskumu, t. j. rýchleho prenesenia poznatkov základného výskumu do praxe, je objav fúzneho génu *EML4/ALK*, kódujúceho proteín s tyrozínkinázovou aktivitou pri nemalobunkovom karcinóme pľúc. Fúzny gén bol prvýkrát hlásený v roku 2007 a už v roku 2010 boli prezentované prvé klinické výsledky s inhibítorom tejto špecifickej tyrozínkinázy. Čas od objavu génu k efektívnej liečbe pacienta bol menej ako 3 roky, čo je podstatne menej ako príklady podobne efektívnej liečby v minulosti. Znamená to, že pochopenie fungovania nádorových buniek, identifikácia mutácií

stimulujúcich rast nádorov, sa môže v krátkom čase preniesť do zlepšenia starostlivosti.

Translačný výskum má oproti základnému, ale i klinickému výskumu niektoré zvláštnosti. Dôležitým predpokladom štúdií translačného výskumu je dostupnosť vhodného biologického materiálu od skúmanej populácie pacientov. Na realizáciu translačného výskumu v praxi vplýva aj možnosť odberu a spracovania biologického materiálu. Dôležitým predpokladom je, aby boli vytvorené **podmienky na kontinuálny odber biologického materiálu a jeho spracovanie** tak, aby klinický pracovník (lekár) nemusel plánovať odber materiálu, ale aby sa mohol uskutočniť, kedykoľvek je k dispozícii vhodný pacient. Ak sa tento predpoklad nedarí dodržať, väčšinou sa to prejaví v nedostatočnom nábore pacientov do štúdií, čo má, samozrejme, vplyv aj na úspech výskumu. Ďalšou podmienkou relevancie údajov translačného výskumu je správna klinická prax na úrovni najnovších poznatkov medicíny. V opačnom prípade ani najlepšie výskumné technológie neumožnia zodpovedať na skúmanú otázku, pretože *in vitro* získané údaje budú korelované s nesprávnou/neadekvátnou liečbou pacienta.

Je dôležité, aby klinickí pracovníci, ktorí sa zúčastňujú na translačnom výskume, boli predovšetkým dobrými lekármi a aby výsledky ich liečby boli porovnateľné s medzinárodnými štandardmi.

Dňa 1. januára 2010 bola na pôde II. onkologickej kliniky LF UK a Národného onkologického ústavu zriadená Jednotka translačného výskumu ako prvé špecializované pracovisko svojho druhu na Slovensku. Od svojho vzniku počas prvých piatich rokov činnosti bolo iniciovaných niekoľko translačných štúdií, na ktorých doteraz participovalo viac ako 600 onkologických pacientov a uplynulý rok boli publikované prvé výsledky týchto štúdií *in extenso*, týkajúce sa výskumu testikulárnych nádorov z germinatívnych buniek (TGCT), ako i cirkulujúcich nádorových buniek pri karcinóme prsníka. Klinickí ako aj výskumní pracovníci majú často limitované informácie o systéme práce na kooperujúcom pracovisku, čo môže viesť k zlyhaniu výskumného projektu. Radi by sme sa preto podelili o niektoré naše skúsenosti, ktoré sme pri realizácii štúdií získali, a ktoré, dúfame, môžu byť užitočné pre kolegov hlavne z oblasti experimentálnej onkológie plánujúcich translačný výskum. V nasledujúcich bodoch sme sa pokúsili zosumarizovať skúsenosti, ktoré považujeme za najdôležitejšie:

Vstupné kritériá na zaradenie pacienta do štúdie by mali byť jednoducho definova-

né. Lekár, ktorý zaraďuje pacienta, je na ambulancii/oddelení väčšinou zaťažený medicínskou starostlivosťou o pacienta, a preto by malo byť pre neho rozhodovanie o tom, či pacient spĺňa inklúzne/exklúzne kritériá na zaradenie do štúdie, čo najviac zjednodušené. V opačnom prípade, ak sa stanoví priveľa požiadaviek, ktoré musí vhodný pacient spĺňať, hrozí, že sa nezaradia ani potenciálne vhodní pacienti. Lekár pri väčšom pracovnom zaťažení výskumnú štúdiu odsunie ako neprioritnú, a bude do štúdie zaraďovať pacientov len vtedy, keď bude mať viac času, čo sa nevyhnutne odrazí na nábore pacientov. Preto je výhodnejšie vstupné kritériá definovať voľnejšie, a vybrane podskupiny, ktoré sú z klinického hľadiska významné, je možné analyzovať aj následne *ex post*.

Laborant musí byť kedykoľvek k dispozícii na spracovanie vzoriek. Nespracované vzorky, respektíve problémy s ich spracovaním, následne odradia klinických pracovníkov od ďalšieho odberu. Je nereálne očakávať od zdravotníckeho pracovníka, aby „behal“ s každou jednou vzorkou do laboratória, prípadne vedel dopredu plánovať odber vzoriek. V našich podmienkach, ak lekár má čas, aby toto všetko vedel zabezpečiť, väčšinou má v starostlivosti málo pacientov, a teda aj málo pacientov vhodných do štúdie alebo má veľa pacientov, ale potom tieto sprievodné činnosti reálne nedokáže zabezpečiť. Vhodné je, ak je k dispozícii laborant, ktorý môže kedykoľvek spraviť predspracovanie vzorky (napríklad izolácia plazmy), ktorá umožňuje dlhodobjšiu archiváciu vzorky pred finálnou, väčšinou sofistikovanejšou analýzou (napríklad RT-PCR, sekvenovanie).

Každá biologická vzorka je jedinečná a neopakovateľná. Zjednodušene možno povedať, že jedna patientska vzorka = jedna bunková línia, s bunkovou líniou je však možné opakovane pracovať, avšak biologická vzorka od pacienta umožňuje len obmedzený počet analýz. Preto je potrebné si dopredu stanoviť priority v parametroch (bielkoviny, DNA, RNA, mutácie), ktoré sa chystáme vo vzorkách analyzovať.

Zber vzoriek je dlhodobý proces. Ak plánujeme translačnú štúdiu, musíme počítať s tým, že čas, kým nazbierame dostatočný počet vzoriek na analýzu, môže byť aj jeden až dva roky. Vzorky môžeme analyzovať buď všetky naraz na konci štúdie, vtedy však musíme počítať s nerovnomerným časom archivácie vzoriek. Ak čas archivácie má vplyv na analýzu, je lepšie sa tomuto prístupu vyhnúť. Na druhej strane hromadná analýza všetkých vzoriek naraz umožňuje minimalizovať variabilitu podmienok pri analýze.

Ak sa rozhodneme analyzovať vzorky priebežne, je potrebné dbať, aby analýza všetkých vzoriek prebiehala za rovnakých podmienok, na rovnakých prístrojoch, pričom je dôležité, aby pri každej analýze boli použité rovnaké štandardy, ktoré umožnia posúdiť, či výsledky meraní v rôznych časových obdobiach sú kompatibilné.

Označovanie vzoriek. Nám sa osvedčilo označovanie skúmaviek systémom Brady, ktoré umožňuje uchovanie označenia aj pri teplote $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ v tekutom dusíku. Z hľadiska kooperácie s inými pracoviskami, ale i z hľadiska dlhodobej archivácie vzoriek je výhodné, ak sú skúmavky reprodukovateľne označené pomocou tlačných štítkov, ideálne je, ak je na nich okrem základných identifikačných údajov aj čas spracovania vzorky.

Domnievame sa, že vytvorenie tkanivových bánk by mali primárne iniciovať klinickí pracovníci. Ideálne v spolupráci chirurgických odborov (chirurgov, gynekológov, urológov) a klinických onkológov. Je to dané jednak potrebou získania informovaného súhlasu, ktoré by malo prebiehať na chirurgickom pracovisku, keďže hlavným zdrojom biologického materiálu je tkanivo získané počas chirurgického zákroku. Rovnako dôležitý je zber klinických údajov a výsledkov liečby pacienta, bez ktorých je výskumná hodnota biologického materiálu obmedzená. Klinický onkológ má väčšinou prístup k údajom o liečbe a dlhodobom výstupe liečby, preto je asi najpovolanejší na zber klinických údajov k biologickému materiálu. Klinický patológ väčšinou neprichádza do styku s pacientom a má obmedzený prístup k údajom, ale zohráva kľúčovú úlohu pri správnom odbere a spracovaní biologického materiálu.

Nerealistické požiadavky na čas a podmienky spracovania. V praxi sa krv odoberá na lôžkových oddeleniach okolo 5.30 až 6.30 hodine ráno nalačno, je štandardne skladovaná pri izbovej teplote a následne analyzovaná v hematologických a biochemických laboratóriách. Všetky výskumné testy v rámci klinickej štúdie, ktoré vyžadujú čerstvú krv, respektíve jej okamžité spracovanie (alebo vo veľmi krátkom čase, napríklad do dvoch hodín) alebo skladovanie vzoriek do ich ďalšieho spracovania pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (v chladničke), budú narúšať rutinný odber, respektíve skladovanie vzoriek a môžu mať vplyv na efektívny priebeh štúdie. V praxi môže dôjsť buď k tomu, že sa „zabudne“ odobrať krv vhodnému pacientovi, alebo sa vzorka odobe-

rie „štandardne“ a bude skladovaná pri izbovej teplote a nie v chladničke, respektíve sa spracuje za viac ako dve hodiny. To ovplyvní následný výsledok laboratórnych analýz, keďže predanalytická fáza nebude pre všetky vzorky rovnaká. Pre zdravotníckeho pracovníka je vždy prioritou odber indikovaný z medicínskeho hľadiska, odber z výskumného hľadiska je vždy sekundárny. Preto pri plánovaní odberu vzoriek je vhodné zaradiť odber biologického materiálu medzi štandardne medicínske postupy a snažiť sa minimalizovať prácu navyše pre zdravotníckych pracovníkov. Vhodné je, ak sa takýto odber vykonáva s ostatnými rutinnými odbermi, a tak nevyžaduje ďalší vpich pre pacienta. Štandardizácia odberu vzoriek = reprodukovateľnosť údajov = aplikovateľnosť pre klinickú prax.

Klinická charakterizácia súboru je rovnako dôležitá ako odber biologického materiálu v rámci výskumnej štúdie. Pokým biologický materiál je možný analyzovať aj po 20 rokoch, klinické vyšetrenia (napríklad anamnéza, fyzikálne vyšetrenie, ECHO srdca, EKG, CT) je potrebné spraviť v krátkom čase pred odobratím biologického materiálu (ideálne nie viac ako 14 dní). Ak sa v tom čase tieto vyšetrenia nespravia, nebude možné korelovať výsledok analýzy biologického materiálu s týmito klinicky relevantnými údajmi. Preto je potrebné dopredu starostlivo naplánovať, ktoré klinické údaje budú potrebné na výskum.

Množstvo odoberaného biologického materiálu. Je potrebné realisticky odhadnúť množstvo odobratého materiálu, inak sa to prejaví na náboře. Nesúhlas častí pacientov s väčším odberom krvi sa prejaví na celom náboře, väčšinou to povedie k nechote zdravotníckych pracovníkov participovať na štúdiu.

Analytická validita testu musí byť známa pred začatím analýz vzoriek. Biologický materiál pre translačný výskum nemá slúžiť na optimalizáciu analytických metód, na tento účel je potrebné využiť zdravých dobrovoľníkov, bunkové línie, spiking experimenty alebo dopredu stanovený súbor vzoriek tkanivovej banky.

Informovaný súhlas – každý pacient musí podpísať informovaný súhlas, preto je potrebné, aby na štúdiách participovali klinickí pracovníci, ktorí majú kontakt s pacientom a ku ktorým má pacient dôveru a ktorí cítia zodpovednosť za pacienta.

Počítačové prepojenie pracovísk – nám sa osvedčilo intranetové prepojenie umožňu-

júce online sledovať spracovanie biologického materiálu, kde participujúce pracoviská môžu priebežne dopĺňať údaje, každý v rámci svojej časti výskumu.

Záver

Záverom by sme sa chceli touto cestou poďakovať všetkým pacientom a ich príbuzným, ktorí sa rozhodli zúčastniť na štúdiách zameraných na translačný výskum, a tým prispieť k lepšiemu poznaniu onkologických ochorení a v konečnom dôsledku aj k lepším liečebným výsledkom. Chceli by sme sa poďakovať aj všetkým spolupracovníkom z Národného onkologického ústavu, Onkologického ústavu sv. Alžbety, Ústavu experimentálnej onkológie Slovenskej akadémie vied, ako i jednotlivých pracovísk LF UK a SAV, ktorých spolupráca umožnila a naďalej umožňuje úspešný priebeh tohto druhu výskumu na Slovensku.

Podakovanie

Štúdie na Jednotke translačného výskumu boli sú realizované vďaka finančnej podpore nasledovných grantov: APVV-0016-11, VEGA 1/0724/11, VEGA 1/0722/11, MZ - 2007/30-NOU-01, grant UK, VEGA 1/0614/12.

Literatúra

1. Bang Y, Kwak EL, Shaw AT, et al. Clinical activity of the oral ALK inhibitor PF-02341066 in ALK-positive patients with non-small cell lung cancer. 2010 ASCO Annual Meeting. Abstract 3. Presented June 6, 2010.
2. Cambrosio A, Keating P, Mercier S. Mapping the emergence and development of translational cancer research. *European Journal of Cancer* (Elsevier Ltd). 42(28):3140–3148.
3. Feldman A. Does Academic Culture Support Translational Research? CTS: Clinical and Translational Science. 2008;1(2):87–88.
4. Goldblatt EM, Lee WH. From bench to bedside: the growing use of translational research in cancer medicine. *Am J Transl Res*. 2010;2(1):1–18.
5. Woolf SH. The Meaning of Translational Research and Why It Matters. *JAMA*. 2008;299:211–213.
6. Cierna Z, Mego M, Janega P, et al. Matrix metalloproteinase 1 and circulating tumor cells in early breast cancer. *BMC Cancer*. 2014;28(14):472.
7. Mego M, Cierna Z, Svetlovská D, et al. PARP expression in germ cell tumours. *J Clin Pathol*. 2013;66(7):607–612.
8. Mego M, Karaba M, Minarik G, et al. Correlation between blood markers of hemostasis and circulating tumor cells (CTCs) in early breast cancer patients. *The Breast Journal*. 2014 (In press).

Doc. MUDr. Michal Mego, PhD.
II. onkologická klinika LF UK a NOÚ
Klenová 1, 833 10 Bratislava
misomego@gmail.com

