

Zvýšení presnosti diagnostiky karcinómu prostaty glykoprofiláciou vybraných sérových onkomarkerov: klinický a ekonomický dopad na pacienta

Ing. Tomáš Bertók, PhD.¹, MUDr. Roman Sokol, PhD., MPH², doc. MUDr. Juraj Fillo, CSc.³, Ing. Ján Tkáč, DrSc.¹

¹Glycanostics, s. r. o., Bratislava

²Privátna urologická klinika, Trenčín

³Univerzitná nemocnica Bratislava

V práci stručne opisujeme možnosti využitia metód tzv. tekutej biopsie, teda detekcie vysoko nádorovo-špecifických markerov z telových tekutín, na diagnostiku karcinómu prostaty (CaP). V tomto prípade je dôležité hodnotiť biomarkery, ktoré sú orgánovo-špecifické, ako napríklad kalikreíny (rôzne formy PSA), avšak tie nie sú rakovinovo-špecifické. Na zvýšenie spoľahlivosti diagnostiky CaP je preto nutné použiť biomarkery, ktoré sú orgánovo-špecifické a zároveň rakovinovo-špecifické, k takým biomarkerom patrí glykoprofilácia fPSA (free PSA, free prostate-specific antigen/volný prostatický špecifický antigén) vo forme Giasay (glycopy immunoassay) testu. Giasay test poskytuje vysokú hodnotu AUC = 0,82 (AUC, area under curve/plocha pod ROC krivkou; ROC, receiver operating curve/operačná charakteristika prijímača), oveľa vyššiu v porovnaní s kalikreínovými testami (vrátane PHI, prostate health index/index zdravia prostaty), a vopred odhalí aj kastračne rezistentnú formu či veľmi skoré štádiá ochorenia. Zároveň Giasay test preukáže podľa výsledkov validácií 63–70 % negatívnych prípadov biopsií v populácii. Tieto hodnoty prevyšujú na Slovensku a v Čechách dostupné laboratórne metódy využívané na skrining a diagnostiku CaP.

Kľúčové slová: Giasay test, glykoprofilácia fPSA, glykány, tekutá biopsia, diagnostika, biomarkery, biopsie, karcinóm prostaty.

Increasing the accuracy of prostate cancer diagnostics by glycoprofiling of selected serum oncomarkers: clinical and economic impact per patient

In this work, we briefly describe the possibilities of using the so-called liquid biopsy i.e. the detection of highly tumor-specific markers from body fluids, for the diagnosis of prostate cancer (CaP). For this purpose, it is important to use biomarkers that are organ-specific, such as kallikreins (different forms of PSA). Unfortunately, such biomarkers are not cancer-specific. To increase the reliability of CaP diagnosis, it is therefore necessary to use biomarkers that are organ-specific and at the same time cancer-specific, and such biomarkers include glycoprofiling of fPSA (free form of prostate specific antigen) in the form of Giasay (glycopy immunoassay) test. The Giasay test provides a high value of AUC = 0.82 (AUC – area under curve i.e. the area under receiver operating curve), much higher compared to kallikrein tests (including PHI, prostate health index), and it also reveals the castration-resistant form or very early stages of the disease in advance. At the same time, the Giasay test reveals, according to the validation results, 63–70% of negative cases of biopsies in the population. These values exceed the laboratory methods available in Slovakia and the Czech Republic for the screening and diagnosis of CaP.

Key words: Giasay test, fPSA glycoprofiling, glycans, liquid biopsy, diagnostics, biomarkers, biopsies, prostate cancer.

Tekutá biopsia pri karcinóme prostaty

Na potvrdenie zhubnej diagnózy je v súčasnosti takmer vždy potrebný biotický

odber vzorky a histologické vyšetrenie tkaniva. V prípade biopsie prostaty sa však vytvára medzi urológom a pacientom bariéra pre prípadnú re-biopsiu z dôvodu negatívneho zážit-

ku pacienta z biopsie a prípadným následným zdravotným následkom. Zároveň k psychickému nepokoju pacienta prispieva aj PSA dýnia, teda strach zo zvýšenej hladiny sérového tPSA

(celkový PSA, hK3 – serínová proteáza) (1), ktorý sa síce označuje ako onkomarker, je však veľmi nespoľahlivý – málo nádorovo-špecifický a zvýšený aj pri benígnych patológiách či početných rutinných aktivitách (2). Aby sa mohol znížiť počet negatívnych biopsií (štatisticky až 3 zo 4, pričom falošná negativita sa pohybuje okolo 20%) (3, 4), je potrebný spoľahlivejší marker. Ideálnym nástrojom ako „test druhej voľby“ sa ukazujú práve metódy tzv. tekutej biopsie, teda detekcie vysoko nádorovo-špecifických markerov z telových tekutín. V súčasnosti ide prevažne o metódy detekcie cirkulujúcich nádorových buniek (CTC, circulating tumour cells), extracelulárnych vezikúl (exozómov), cfDNA (cell free DNA – voľná cirkulujúca DNA) či miRNA (mikro RNA). Ide o postupy často náročné na úpravu vzorky, v čom sa odráža aj nákladovosť ponúkaných testov na svetovom trhu (5). V tomto texte autori opisujú svoje skúsenosti s diagnostikou karcinómu prostaty (CaP) s využitím jednoduchého a inovatívneho testu založeného na detekcii zmien glykánových štruktúr (glykány sú komplexné sacharidy viazané na proteíny alebo lipidy) na tkanivovo-špecifickom markeri – fPSA, ako jedného z moderných prístupov tzv. tekutej biopsie.

Incidencia CaP sa pritom bude ďalej zvyšovať – od 1,41 milióna prípadov celosvetovo v roku 2020 až po 2,43 milióna v roku 2040. Rovnaký trend sa predpokladá v súvislosti s mortalitou, pri ktorej sa v rovnakom období očakáva nárast z 375 tisíc na 740 tisíc úmrtí (6). Celkové sérové PSA, často nesprávne využívané na skrining CaP, má až 70% falošnú pozitivitu – na tento fakt často upozorňoval aj objaviteľ PSA patológ Richard Ablin (7). Test vznikol ako súčasť implementácie viacerých európskych projektov na Slovenskej akadémii vied. Dá sa univerzálne využiť aj na detekciu a monitoring iných typov nádorových ochorení za predpokladu, že sú známe tkanivovo-špecifické markery prítomné v sére či iných telových tekutinách, ktoré sú zároveň glykozylované.

Genomika, proteomika a glykomika

Genomika a proteomika ako odbory, ktoré sa zaoberajú štúdiom súboru všetkých génov a proteínov v danom organizme, his-

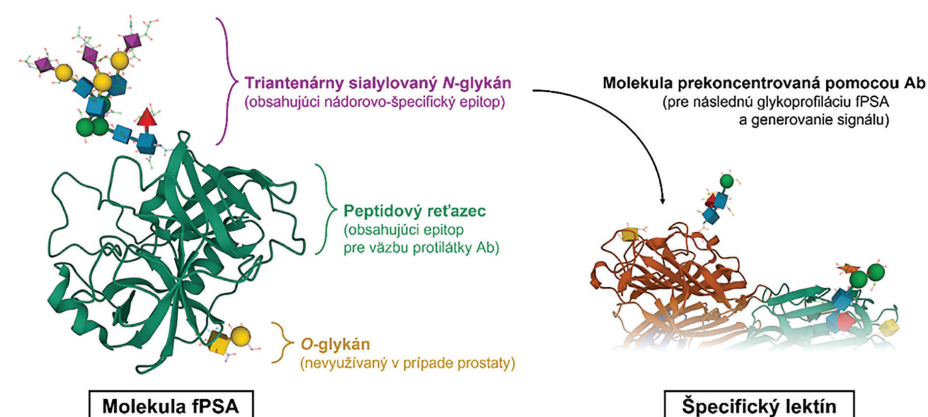
toricky napredovali rýchlejšie ako glykomika z dôvodu dostupnosti PCR metódy a sekvenčných technológií. Glykány, komplexné a vetvené sacharidy konjugované s proteínmi (N- a O-glykoproteíny či proteoglykány) a lipidmi (glykosfingolipidy), majú v porovnaní s nukleovými kyselinami a peptidmi vyšší kombinatorický potenciál, a teda môžu dobre slúžiť na kódovanie biologickej informácie. Zároveň sú zodpovedné za mnohé bunkové deje vrátane adhézie či medzibunkovej signalizácie, zodpovedajú za stabilitu, rozpustnosť a skladanie do natívnej štruktúry niektorých proteínov (rôzne enzýmy) či ich biologickej funkcie (IgG – imunoglobulín G), ako aj za určenie krvných skupín (systém AB0) (8). Zmeny glykánových štruktúr sú typickým znakom nádorovej bunky v dôsledku zmeny exprese glykán modifikačných enzýmov a fragmentácie Golgiho aparátu (9). Aj preto sa zvyknú glykány označovať ako tretia abeceda molekulárnej biológie. Na analýzu glykánov sa rutinne využívajú metódy, ktoré pre svoju časovú a finančnú náročnosť, ako aj náročnosť na expertízu operátora, nie sú kompatibilné s klinickou praxou. Patrí sem najmä hmotnostná spektrometria s tzv. mäkkými ionizačnými metódami v kombinácii s kvapalinovou chromatografiou a kapilárnou elektroforézou. Autori nižšie prezentujú výsledky využitia slovenskej technológie založenej na analýze glykánov viazaných na molekulu fPSA v štandardnom ELISA (enzyme linked immunosorbent assay – enzýmová imunosorpčná

analýza) formáte s kolorimetrickým detekčným princípom (patent PCT/EP2019/057386) (10, 11).

Glykoprolácia pri diagnostike karcinómu prostaty

Zatiaľ čo je súčasná laboratórna diagnostika prostaty centralizovaná okolo imunoanalýtického stanovenia (kvantitatívnej analýzy) kalikreínov, ako tPSA (cPSA + fPSA), f/tPSA (%), PHI index (kombinácia tPSA, fPSA a p2PSA) či 4k Score® (kombinácia tPSA, fPSA, iPSA a hK2), glykoprolácia kombinuje tkanivovú špecifitu vyššie uvedených markerov s nádorovou špecifitou zmien glykánov. Test je (oproti zlatému štandardu v analýze glykánov – hmotnostnej spektrometrii a kvapalinovej chromatografii) založený na jednoduchom ELISA formáte, rutinne využívanom prakticky v každom klinickom laboratóriu. Ľahká dostupnosť robí z tohto formátu rýchly, robustný a reprodukovateľný test dosahujúci vysokú presnosť najmä v sivej zóne (tPSA = 2 až 10 ng/ml), využívajúc krvné sérum. Princíp testu je znázornený na obrázku 1. Glykozylácia je najbežnejšia posttranslačná modifikácia proteínov v eukaryotických bunkách, pričom určité zmeny v štruktúre glykánov sú typické pre nádorové bunky (Lewisove antigény, hypersialylácia, fukozylácia či výskyt komplexnejších štruktúr s vysokým stupňom vetvenia) (12). Porovnanie testu s ostatnými možnosťami na komerčnom trhu, konkrétne tPSA a testami druhej voľby – fPSA (%) a PHI, sa realizovalo

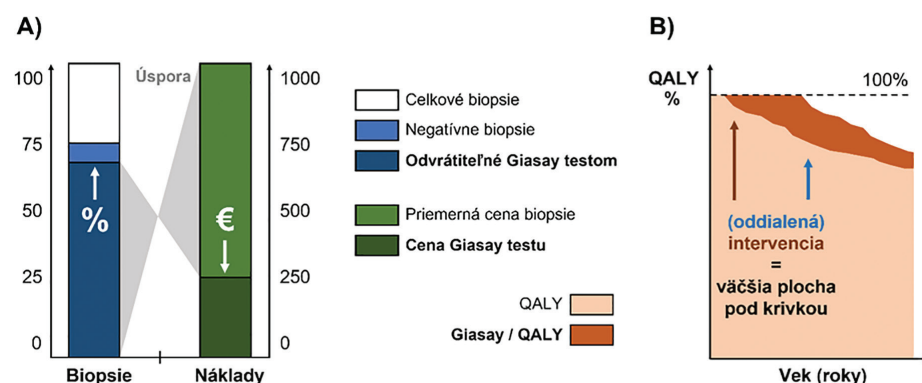
Obr. 1. Princíp glykoprolácie fPSA (vľavo, kód 3QUM) ako tkanivovo-špecifického markera CaP pomocou lektínov rozpoznávajúcich glykán (vpravo, kód *Wisteria floribunda* aglutinínu (WFA) 5KXB – proteín schopný rozoznávať glykány). fPSA nesie štandardne komplexný typ N-glykán na Asn-69 (Asn – aminokyselina asparagín), pričom môže byť aj O-glykozylovaný – podobne ako napríklad mucín 1. Zdroj štruktúr: RCSB Protein Data Bank



na kohortách pacientov s diagnostikovaným CaP oproti kontrolnej skupine s diagnostikovanou benígnou hyperpláziou prostaty, s blízky vekovým mediánom a hodnotou tPSA nepresahujúcou 10 ng/ml. Veľkosť populácie bola v prvom kroku predklinickej validácie 140 pacientov, v druhom prípade 501 pacientov. Všetci pacienti patrili ku kaukazskej rase a pochádzali zo Slovenska, Česka, Rakúska a Nemecka. Využíva sa pritom sledovanie aberantnej N-glykozylácie fPSA (v prípade glykoprolifácie tPSA by dochádzalo ku generovaniu signálu ovplyvneného glykánmi prítomnými na α -1-antichymotrypsíne či α -2-makroglobulíne). Niektoré štúdie však poukazujú aj na prítomnosť O-glykánů na molekule fPSA – podobne ako v prípade prostatickej acidickej fosfatázy či mucínu 1 (13).

Technológia bola validovaná v troch fázach pri porovnávacích retrospektívnych štúdiách pacientov s diagnostikovaným CaP oproti pacientom s benígnou hyperpláziou prostaty. Proof-of-concept štúdia sa realizovala na malom počte pacientov – 24, predklinická validácia na populácii 140 pacientov a klinická validácia zahŕňajúca vzorky z európskych biobáň, ako aj vzorky od pacientov na počte 501 vzoriek. Hodnota AUC pritom počas týchto validácií neklesla pod 0,82. Pri skorej diagnostike Giasay test dosahuje hodnoty AUC vyššie ako v súčasnosti v Českej a Slovenskej republike používané kalikreínové testy (vrátane PHI) a vopred odhaľuje aj kastrofálne rezistentnú formu či veľmi skoré štádiá – v dvoch prípadoch dokonca upravil falošne negatívne biopsie, ktoré sa štatisticky pohybujú na úrovni vyše 20 % (14, 15). Test odhaľuje podľa výsledkov validácií 63–70 % negatívnych prípadov biopsií v populácii. Okrem prínosu pre samotného pacienta (psychická pohoda a oddialenie negatívnych biopsií v čase neprítomnosti CaP alebo prítomnosti iba klinicky nesignifikantného CaP) spočíva výhoda testu v poznatkoch pre ošetrojúceho lekára, ktoré iný test neprináša a ktoré umožňujú robiť informovanejšie rozhodnutia o ďalšom manažmente pacienta. V neposlednom rade spočíva výhoda dostatočne presného testu aj v úspore financií verejného zdravotného systému v prípade, že cena testu je nižšia ako cena biopsie – čo neplatí pri všetkých testoch (obrázok 2). Napr. Galleri test spoločnosti Grail

Obr. 2. A) Z celkového počtu biopsií môže byť až 75 % negatívnych. Z negatívnych biopsií Giasay test odhalí 63–70 % prípadov. Zaradenie Giasay testu do rutínnej praxe ako tzv. second opinion testu predstavuje pri štvrtinových nákladoch významnú úsporu pre zdravotný systém a tiež prináša ďalšie výhody pre pacienta i lekára. B) Kvalita života pre ďalšie roky dožitia (meraná pomocou QALY), vyjadrená plochou pod krivkou, sa môže pomocou Giasay testu významne zvýšiť pri eliminácii „naddiagnostiky“ (z angl. overdiagnosis) a „nadterapie“ (z angl. overtherapy), ktoré pacientovi kvalitu života znižujú



QALY – quality-adjusted life years

(dostupný v USA a UK a založený na sledovaní metylácie DNA) má cenu porovnateľnú s cenou jednej biopsie v EÚ, navyše pri veľmi nízkej presnosti v diagnostike CaP v skorom štádiu (16).

Podobná hodnota AUC sa dosahuje aj pri sledovaní úspešnosti liečby, pričom nerozlišuje konkrétny typ terapie – ide o mix brachyterapie, rádioterapie, chemoterapie či hormonálnej terapie. Test dosahuje najmä vysokú špecifitu, pričom významnejšie zvýšenie senzitivity testu je možné doceliť jednoduchým pridaním piateho markera – objemu prostaty meraného u urológa – do rovnice poskytujúcej finálnu hodnotu testu. Nakoľko tento parameter je možné získať veľmi jednoducho a zisťuje sa rutinne. Tento krok nepredstavuje dodatočné zvýšenie nákladov na test (finančných ani personálnych). Hodnota senzitivity a špecifity pri 95 % špecifite a senzitivite predstavuje 40,4 %, resp. 38,0 %. Tieto hodnoty prevyšujú na Slovensku a v Čechách dostupné laboratórne metódy využívané na skrining a diagnostiku nádorov prostaty.

Sociálny impakt

Viacere štúdie poukazujú na skutočnosť, že skorá diagnostika významne prispieva k úspešnosti liečby a tiež k eliminácii jej vedľajších účinkov na minimum. Napriek tomu sa pacienti môžu okrem výsledku liečby skôr obávať bolesti, inkontinencie či sexuálnej dysfunkcie. Z toho pohľadu je v našom regióne stále nedostatočná kampaň ohľadom

povedomia o rakovine prostaty v laickej verejnosti na odstránenie týchto tabuizovaných tém (17, 18). Skorá diagnostika a skrining pomocou dostupných metód majú v súčasnosti nezastupiteľnú úlohu v manažmente urologických pacientov v našom regióne. Rozvoj a implementácia nových a presnejších metód, neinvazívnych (metódy tekutej biopsie) aj invazívnych (fúzne transperineálne biopsie), má priamy vplyv na kvalitu života pacientov a úsporu v zdravotnom systéme z hľadiska šetrenia nákladov na drahšiu a štatisticky menej úspešnú liečbu v neskorom štádiu ochorenia. Giasay test teda predstavuje nenákladnú, neinvazívnu, presnú a robustnú diagnostickú metódu, aplikovateľnú už v skorom štádiu ochorenia u mužských pacientov po 45. roku života, ako ukázali viaceré retrospektívne štúdie. Aktuálne po komerčnom uvedení Giasay testu na slovenský trh prebieha prospektívna štúdia, ktorá preskúma koreláciu glykoprolifácie diagnostiky s pokročilými zobrazovacími metódami. Giasay test našiel svoje uplatnenie v skorej diagnostike ochorenia ako tzv. second opinion test a tiež v monitorovaní úspešnosti liečby (v prípade, ak nebola u pacienta vykonaná prostatektómia). Zahŕnutie testu v diagnostickom algoritme znázorňuje obrázok 3.

Podakovanie: Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-20-0476 a Európskou Inovačnou radou EIC na základe zmluvy č. 190185443.

