

VYDÁVÁ
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ
IČO 444359

V NAKLADATELSTVÍ
ApS BRNO, spol. s r. o.
IČO 543535

REDAKCE:
Masarykův onkologický ústav Brno
Žlutý kopec č. 7
656 53 Brno

Sekretář redakce:
ing. Zdeněk Bouša

Grafická a technická úprava:
Bohuslav Havlíček

Tiskne Moravská typografie, a. s.
Brno, Moravské náměstí 13
IČO 15549763

Vychází 6krát ročně
Roční předplatné 180 Kč
pro studenty LF 90 Kč

Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce

Ministerstvo kultury ČR
MK ČR 5158
ISSN 0862-495 X

INTERNET – vstupní adresa:
<http://www.linkos.cz>

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

**ZÁSTUPCE VEDOUcíHO
REDAKTORA:** KOZA IVAN

VÝKONNÝ REDAKTOR: FAIT VUK

REDAKTOŘI:

BEDNAŘÍK OTAKAR
MAYER JIŘÍ
ČOUPEK PETR

HÁJEK ROMAN
KOCÁK IVO
ŽALOUĐÍK JAN

REDAKČNÍ RADA

ADAM ZDENĚK, Brno
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno
BEŠKA FRANTIŠEK, Ostrava
BILDER JOSEF, Brno
ČOUPEK PETR, Brno
DRBAL JOSEF, Brno
ECKHARDT SANDOR, Budapešť
FAIT VUK, Brno
HÁJEK ROMAN, Brno
JURGA LUDOVIT, Trnava
KALLAY JOZEF, Bratislava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava
KLAŠTERSKÝ JAN, Brusel
KLENER PAVEL, Praha
KOCÁK IVO, Brno
KOUTECKÝ JOSEF, Praha
KOVARŇÍK JAN, Brno

KOZA IVAN, Bratislava
LAGINOVÁ VIERA, Bratislava
MAYER JIŘÍ, Brno
MECHL ZDENĚK, Brno
NĚMEC JAROSLAV, Brno
ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
PLEŠKO IVAN, Bratislava
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
REJTHAR ALEŠ, Brno
SIRACKÝ JÁN, Bratislava
SPURNÝ VLADIMÍR, Brno
UJHÁZY VILIAM, Bratislava
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
VYZULA ROSTISLAV, Brno
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
ŽALOUĐÍK JAN, Brno

Přehled	
Tomášek J., Vyzula R., Coufal O., Rjthar A., Kiss I.	
Mikrometastázy a volné nádorové buňky, metody detekce, význam vyšetření u kolorektálního karcinomu	203
Tomova A., Babušíková O.	
Najnovšie prístupy v diagnostike leukémií pomocou imunofenotypizácie a sledovaní minimálnej reziduálnej choroby	207
Původní práce	
Kovářová L., Svobodník A., Büchler T., Musilová R., Váňová P., Klabusay M., Krejčí M., Adam Z., Hájek R.	
Monitorování dendritických buněk a jejich podtypů v průběhu léčby nemocných s mnohočetným myelomem	211
Petera J., Dvořák J., Melichar B., Kabeláč K., Zoul Z., Vobořil Z., Hazuková R.	
Chemoradiotherapie v neoadjuvantní léčbě karcinomu žaludku	216
Coufal O., Žaloudík J., Svobodník A., Šefr R., Penka I., Kaplan Z., Tomášek J., Fait V.	
Standartní klasifikace kolorektálních karcinomů – realita nebo iluze?	219
Šachlová M., Beneš M., Ilievová M., Papírková D., Staníček J.	
Hodnocení slizniční toxicity pomocí neinvazivního testu střevní propustnosti s ⁵¹ Cr-EDTA	226
Kazuistika	
Valík D., Zapletal O., Demlová R.	
Závažná a neočekávaná CNS toxicita u dítěte léčeného high dose methothrexátem - otázky z minulosti zůstávají nezodpovězeny	230
Sdělení	
Kepák T., Pavelka Z., Hrstková H., Šlampa P., Kiss I., Žaloudík J., Vorlíček J., Štěrba J.	
Dlouhodobá dispenzární péče po léčbě nádorových onemocnění v dětství v rámci Univerzitního onkologického centra	234
Foretová L., Goetz P., Žaloudík J.	
Návrh spolupráce klinických genetiků a onkologů v oblasti detekce a vyšetřování hereditárních forem nádorů	235
Zprávy	
Šimíčková M., Umlauf J.	
19.konference IATMO ve Vejle, Dánsko - 25.-28. 9. 2002	237
Boudný V.	
Konference „APOPTÓZA“	238
Informace	
Vítová V.	
Maligní kožní nádory u pacientů s vícečetnými malignitami	210
– knihy	215, 218
– Jubileum Doc.MUDr.Bek Václav	233
Rejstřík věcný + osobní	239
Onkologické společnosti	240

CONTENTS

Reviews	
Tomášek J., Vyzula R., Coufal O., Rjthar A., Kiss I.	
Micrometastases and isolated tumor cells, methods of detection, examination, significance in colorectal cancer	203
Tomova A., Babušíková O.	
Modern trends in leukemia diagnosis by immunophenotyping and monitoring of minimal residual disease	207
Original publication	
Kovářová L., Svobodník A., Büchler T., Musilová R., Váňová P., Klabusay M., Krejčí M., Adam Z., Hájek R.	
Monitoring of dendritic cells and their subsets during treatment in multiple myeloma	211
Petera J., Dvořák J., Melichar B., Kabeláč K., Zoul Z., Vobořil Z., Hazuková R.	
Chemoradiotherapy in neoadjuvant treatment of gastric cancer	216
Coufal O., Žaloudík J., Svobodník A., Šefr R., Penka I., Kaplan Z., Tomášek J., Fait V.	
Correct staging of colorectal cancer – reality or illusion?	219
Šachlová M., Beneš M., Ilievová M., Papírková D., Staníček J.	
Evaluation of mucosal toxicity usány intestina oermeability ⁵¹ CR-EDTA	226
Case Report	
Valík D., Zapletal O., Demlová R.	
Significant and unexpected toxicity in a child treated with high-dose therapy with methotrexate-past questions remaining unanswered	230
Communication	
Kepák T., Pavelka Z., Hrstková H., Šlampa P., Kiss I., Žaloudík J., Vorlíček J., Štěrba J.	
Long-term dispensary care after the treatment of paediatric malignancies provided by the University Oncological Centre (UOC)	234
Foretová L., Goetz P., Žaloudík J.	
Proposed cooperation of clinical geneticists and oncologists in the detection and examination of hereditary forms of cancer	235
Report	
Šimíčková M., Umlauf J.	
19th International Conference on Human Tumor Markers	237
Boudný V.	
Conference on „APOPTÓZA“	238
Notification	
Vítová V.	
Malignant skin tumors in patients with multiple malignancies	210
– books	215, 218
– Jubileum	233
Register nominal and factual	239
Oncological associations	240

MIKROMETASTÁZY A VOLNÉ NÁDOROVÉ BUŇKY, METODY DETEKCE, VÝZNAM VYŠETŘENÍ U KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

MICROMETASTASES AND ISOLATED TUMOR CELLS, METHODS OF DETECTION, EXAMINATION SIGNIFICANCE IN COLORECTAL CANCER

TOMÁŠEK J.¹, VYZULA R.², COUFAL O.², REJTHAR A.³, KISS I.¹

¹ ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE, FN BRNO

² MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

³ FAKULTNÍ NEMOCNICE U SVATÉ ANNY, BRNO

Souhrn: Přítomnost metastáz je podstatný faktor, který ovlivňuje prognózu pacientů se solidními nádory. Vysoké procento relapsů choroby se objevuje také u velké skupiny pacientů, kde po primární, nejčastěji chirurgické léčbě, nebylo běžnými diagnostickými metodami prokázáno zbytkové onemocnění. Děje se tak díky časně diseminaci nádorových buněk, které nejsou při standardním stagingu zachyceny. K tomuto rozsevu nádorových buněk muselo dojít již před operací nebo teoreticky při resekcí primárního nádoru. Tyto jednotlivé buňky mohou být detekovány různými imunohistochemickými nebo molekulárními metodami. Doposud nevyřešeným problémem zůstává skutečný prognostický význam záchytu volných nádorových buněk a neorganoidních mikrometastáz u kolorektálního karcinomu a jeho váha při rozhodování o indikaci adjuvantní terapie.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, volné nádorové buňky, mikrometastázy, detekce mikrometastáz, imunohistochemie, RT-PCR

Summary: The presence of metastases is one of the important prognostic determinants in patients with solid tumours. Despite obtaining a potentially curative primary treatment (mostly resection), many patients do develop recurrent disease. The residual disease, however, is not found by routine diagnostic methods. Tumour progression can be caused by early tumour cell dissemination, undetectable by current standard techniques of clinical staging. Obviously, such tumour cell dissemination must have occurred prior to, or, theoretically, at the time of surgical manipulation. Tumour cells can be detected by various immunohistochemical methods or molecular techniques. The real prognostic significance of the detection of isolated tumour cells and micrometastases in colorectal carcinoma and its importance for indication of adjuvant therapy still remains a question.

Key words: colorectal carcinoma, isolated tumor cells, micrometastases, micrometastases detection, immunohistochemistry, RT-PCR

Úvod

Většina pacientů s karcinomem tlustého střeva a konečníku má v případě kompletní resekcí primárního nádoru s histologicky negativními uzlinami (stadium Dukes' A nebo B) relativně dobrou prognózu. Pět let po resekcí karcinomu kolorekta však přežívá přibližně jen 85 - 95 % pacientů stadia Dukes' A a 60 - 70 % pacientů stadia Dukes' B. U 5 - 40% pacientů se tedy objevuje během 5 let lokální recidiva onemocnění nebo vzdálené metastázy (1, 2, 3). Prospěch adjuvantní chemoterapie nebyl u této skupiny nemocných prokázán, podle současných kritérií tedy není indikována. Relaps onemocnění po potenciálně kurativním resekcím výkonu lze vysvětlit v naprosté většině případů pouze hematogenní nebo lymfogenní diseminací nádorových buněk ještě před resekcí, eventuálně teoreticky možným peroperačním rozsevem. Běžnými stagingovými metodami nejsou tyto buňky a mikroskopické částičky nádorové tkáně zachyceny. Právě na takovéto minimální zbytkové onemocnění je cílena adjuvantní terapie, nyní běžně indikovaná až při histologickém průkazu nádorových buněk v lymfatických uzlinách (stadium Dukes' C s pětiletým přežíváním 30 - 50%). Detekce diseminovaných nádorových buněk v časných stádiích kolorektálního karcinomu tedy může pomoci identifikovat rizikovou skupinu pacientů, která bude mít prospěch z adjuvantní léčby (4). Problémem zůstává určit kdy přítomnost jednotlivých izolovaných nádorových buněk v krvi, kostní dřeni a v dalších orgánech znamená skutečně časnou formu vzdáleného metastazování a tedy vlastně klinické stadium IV. a kdy jde pouze o migrující buňky bez metastatického potenciálu.

Mikrometastázy a volné nádorové buňky, definice a otázka klasifikace

Průkaz volných nádorových buněk (VNB) je nutné jednoznačně odlišit od diagnostiky mikrometastáz. Mikrometastázy jsou ložiska nádorových buněk menší než 2mm, vzdálená od primárního nádoru. Dochází zde k implantaci nádorových buněk do postiženého orgánu, průniku cévní stěnou nebo stěnou lymfatických sinusů, velmi často je patrná stromální reakce hostitelské tkáně. Extravaskulárně nebo extrasinusoidálně dochází k proliferaci nádorových buněk (5). Je tedy patrné, že mikrometastázy lze prokázat pouze histologickým vyšetřením. Zásadní biologickou charakteristikou, která je odlišuje od makroskopických metastáz, je nepřítomnost cévního zásobení těchto útvarů. Buňky mikrometastáz jsou plně závislé na pasivní difúzi kyslíku a živin, což omezuje jejich růst přibližně na 2 mm. K další progresi dochází až nastartováním angiogenní kaskády s novotvorbou cév v metastatické tkáni. – mikrometastáza se mění v klasickou makroskopickou metastázu (6,7). Naproti tomu VNB jsou jednotlivé cirkulující buňky nebo maximálně shluky několika buněk mimo tkáňový svazek, které neproliferují a nevyvolávají reakci stromatu hostitelské tkáně. Většina těchto buněk je v Go fázi buněčného cyklu. Pouze velmi malé procento (0,05%) z nich přežívá a stává se zárodkem skutečného metastatického ložiska (8).

V posledních letech došlo k velkému rozvoji metod používaných v diagnostice VNB. VNB lze diagnostikovat morfologickými metodami (imunohistochemie, flow cytometrie), jednak nemorfologickými molekulárními metodami (polymerázová řetězová reakce).

Vzhledem k velmi rozporným výsledkům studií, které sledují prognostický význam detekce minimálního onemocnění je nezbytné pro jejich porovnávání používat jednotnou klasifikaci mikrometáz a VNB. Průkaz mikrometastáz a VNB nelze jednoduše zařadit do současné TNM klasifikace a např. průkaz VNB v uzlině popsat jako pN1. Přesun některých pacientů do vyšších stádií onemocnění by znemožnil porovnávat léčebné výsledky. Vedlo by to k nárůstu počtu pacientů ve vyšších stádiích a zároveň k obrovské nehomogenitě souborů pacientů (9). Na druhé straně je nutné výsledky vyšetření VNB popisovat jednotně. Hermanek (5) navrhuje velmi dobrý systém klasifikace rozšiřující TNM systém. V případě, že je histologické vyšetření lymfatické uzliny negativní a je pátráno morfologickými metodami po VNB, použije se symbol „i“ v závorce za pN0, pokud je použita některá nemorfologická - molekulární metoda, objeví se „mol“ (tbl 1)

Tabulka 1: Návrh klasifikace VNB v lymfatických uzlinách (Hermanek P).

pN0	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, nebylo pátráno po VNB
pN0(i-)	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, negativní výsledek morfologického vyšetření na VNB
pN0(i+)	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, pozitivní výsledek morfologického vyšetření na VNB
pN0(mol-)	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, negativní výsledek nemorfologického vyšetření na VNB
pN0(mol+)	Histologicky nezachycena uzlinová metastáza, pozitivní výsledek nemorfologického vyšetření na VNB

V případě, že se jedná o sentinelovou uzlinu, použije se symbol „(sn)“ (např. pN0 (i+)(sn)).

Obdobně je popisován název VNB v kostní dřeni, krvi nebo jiných orgánech se specifikací vyšetřované tkáně (např. M0(i+,liver), M0(mol-, blood)).

Karcinom prsu již má v TNM klasifikaci zakotven popis mikrometastázy v uzlině (pN1a). Pro ostatní nádory a lokalizace mikrometastáz je navržen symbol „(mi)“ (např. pN1(mi), pM1(mi)). Je vhodné znovu zdůraznit, že mikrometastázy lze diagnostikovat pouze histologicky.

Metody zjišťování mikrometastáz a volných nádorových buněk

Histopatologie

Přítomnost nádorových buněk v krvi byla popsána již v 19. století (10). V polovině 20. století se objevují úvahy o mikrometastázách u karcinomu prsu. Tato diagnóza patří svým charakterem mezi systémové nemoci (11), metastická kaskáda je nastarována již v časném stadiu, kdy je primární nádor minimální velikostí. Jedinou možností, jak prokázat nádorové postižení v uzlinách, které byly při standardním vyšetření negativní, tehdy bylo seriové prořezání uzlin. V roce 1948 byla v časopisu Cancer publikována práce autorů Saphira a Amromina (12), kteří každý blok materiálu s axilárními uzlinami rozřezali více než 300x. Touto metodou byly zachyceny metastázy u 33% pacientek, které měly původně negativní nález. Klasické barvení preparátů hematoxylinem a eosinem bylo dominantní metodou do počátku osmdesátých let. V řadě publikovaných studií z té doby bylo demonstrováno, že mnohočetné prořezání preparátů barvených tímto způsobem zvyšuje počet záchytů metastatického postižení uzlin až o 20 – 30% (13,14). Výsledek vyšetření samozřejmě podstatným způsobem ovlivňuje počet nalezených lymfatických uzlin v operačním preparátu. Vyššího počtu nalezených uzlin v resekátu lze dosáhnout použitím metodik projasnění tukové tkáně. Tyto metody barevně a konzistencí odlišují lymfatické uzliny od okolní tkáně, což je důležité pro záchyt velmi drobných uzlin (15).

Imunohistochemie

Imunohistochemické metody citlivost záchytu buněk epiteliálních nádorů dále zvýšily asi o 15% (16,17,18,19). Základem tohoto vyšetření je stábilní přítomnost cytokeratinů nebo jiných antigenů v epiteliální nádorové buňce a naopak jejich absence v normální vyšetřované tkáni. U různých typů epiteliálních nádorů lze detekovat např. epiteliální membránové antigeny (EMA), specifické epiteliální glykopeptidy, CEA, Ca 19-9 a s menší specifitou i estrogenové a progesteronové receptory nebo PSA (7). Pomocí monoklonálních protilátek např. proti cytokeratinům lze detekovat 1 nádorovou buňku mezi 10⁵ mezenchymálními buňkami kostní dřeni (20). Často není používána monoklonální protilátka proti jednomu cytokeratinu ale směs protilátek proti několika cytokeratinům. Do praxe se metoda nejdříve dostala u karcinomu prsu. Podle typu použité protilátky se objevují 1 – 3% falešně pozitivních nálezů (21). Většina publikovaných studií neprokázala prognostický význam imunohistochemické detekce nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem stadia Dukes' A a Dukes' B (tbl. 2). Ovšem např. von Greenon takovou závislost nepopsal (22). 6 ze 14 pacientů s imunohistochemicky prokázanými uzlinovými metastázami zemřelo během 66 měsíců, naproti tomu jen 1 z 38 pacientů, kteří měli toto vyšetření negativní. Isaka (23) na svém souboru pacientů prokazuje signifikantně horší prognózu pacientů s karcinomem rekta v případě imunohistochemicky prokázaného postižení uzlin. Je ovlivněno pětileté přežívání pacientů, v případě desetiletého přežívání již rozdíl zachycen nebyl.

Tabulka 2: Detekce VNB v lymfatických uzlinách u pacientů s kolorektálním nádorem stadia Dukes' A a Dukes' B imunohistochemicky.

autor	antigen ^a	počet uzlin ^b	počet pacientů ^c	prognostický význam
Adell (24)	cytokeratin	81/467, 17,3%	39/100, 39%	ne
Broll (25)	cytokeratin	neuvedeno	6/32, 19%	ne
Öberg (2)	cytokeratin	77/609, 11,6%	47/147, 32%	ne
Greenon (22)	TAG 72, cytokeratin	33/568, 5,8%	14/50, 28%	ano
Isaka (23)	cytokeratin 8,18	19/644, 2,9%	9/42, 21,4%	ano
Nakanishi (26)	cytokeratin, p53	127/1633, 8% 13/522, 2,5%	30/44, 68% 8/18, 44%	ne ne

^a většinou není použita monoklonální protilátka specifická proti jednomu cytokeratinu ale proti více cytokeratinům (AE1/AE3, K1-1, CAM5.2, Ber-EP4 a další)

^b pozitivní uzliny/celkový počet vyšetřených uzlin

^c pacienti s pozitivními uzlinami/celkový počet vyšetřených pacientů stadia Dukes' A a Dukes' B

Flow cytometrie

VNB nejsou v jednotlivých tkáních roztroušeny rovnoměrně. Může to vést k falešně negativitě vyšetření. K detekci VNB v kostní dřeni lze použít flow cytometrické vyšetření. Imunocytochemicky označené nádorové buňky jsou touto metodou rychle stanoveny a na rozdíl od klasické imunohistochemie in situ je možná také jejich přesnější kvantifikace. Senzitivita vyšetření je vysoká, lze zachytit deset nebo méně buněk mezi 10⁵ buňkami kostní dřeni (47).

Molekulárně-biologické metody

Počátkem devadesátých let se objevuje metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). PCR umožňuje detekovat přítomnost i naprosto minimálního množství určitého fragmentu DNA v záplavě ostatní DNA. Děje se tak díky mnohonásobné specifické amplifikaci hledaného úseku DNA. Proti imunohistochemickým metodám má PCR vyšší senzitivitu a specifitu, v optimálním případě umožňuje detekovat 1 nádorovou buňku mezi 10⁷ buňkami zdravé nepostižené tkáně (21). Velkou výhodou je částečná automatizace vyšetření. Limitující je

naopak, kromě PCR in situ, chybějící možnost morfologického posouzení detekovaných nádorových buněk. Technika PCR in situ však zmenšuje objem vyšetřené vzorku. Jsou v zásadě 3 přístupy k detekci VNB pomocí PCR.

a) *detekce nádorové specifických chromozomálních aberací*
Tuto metodu lze použít v diagnostice hematologických malignit nebo některých sarkomů (27). Doposud nebyla nalezena chromozomální aberace specifická pro kolorektální karcinom, u této diagnózy tedy zatím nemá toto vyšetření použití.

b) *detekce nádorové specifických mutací DNA (mutant allele specific amplification method „MASA“)*

V případě kolorektálního karcinomu se jedná například o mutace K-ras (kodon 12 nebo 13) nebo mutace p53. Metodu lze použít pouze v případě jednoznačně prokázané přítomnosti mutace v primárním nádoru. Mutace k-ras nebo p53 lze detekovat u 60-80% kolorektálních karcinomů. Dalším omezujícím faktorem je možnost falešné pozitivní vyšetření v případě detekce volné nádorové DNA, která se může uvolňovat z nekrotických rozpadlých nádorových buněk (28). I při těchto limitech metody byly publikovány pozoruhodné výsledky. Při použití MASA techniky je v časných stádiích kolorektálního karcinomu prokazována přítomnost nádorových buněk u 52–64% pacientů. Hayashi (29) retrospektivně vyšetřil 120 pacientů Dukes' A nebo B. 71 pacientů mělo mutaci K-ras resp. p53. Z těchto 71 pacientů mělo 37 pozitivní nález v lymfatických uzlinách. Z těchto 37 pacientů mělo 27 recidivu onemocnění do 5 let od diagnózy. 34 z 71 pacientů mělo negativní vyšetření uzlin a ani u jednoho nedošlo během 5 let k recidivě. Tyto výsledky jistě bude nutno ověřit prospektivní studií.

c) *detekce exprese genů charakteristických pro nádorové buňky pomocí RT – PCR*

Karcinomové buňky exprimují určité „markerové“ geny. Zjištěním této exprese (m-RNA) lze karcinomové buňky detekovat. Předpokladem samozřejmě je, že nejsou exprimovány buňkami normálně přítomnými ve vyšetřované tkáni. Metoda polymerázové řetězové reakce reverzní transkriptázy (RT PCR) umožňuje amplifikaci a tedy detekci mRNA cytokeratinu (CK) 18,19, 20, CEA, matrilysin nebo guanylyl-cyklyasy C (33,34,35) eventuálně jiných bílkovin. Nález m-RNA odpovídá přítomnosti živých buněk, protože volná RNA z nekrotických buněk je velmi rychle rozložena (36). Proti imunohistochemii nabízí tato metoda vyšší senzitivitu. V optimálním případě lze zachytit 1 nádorovou buňku mezi 10⁷ nenádorovými buňkami (37). Tak vysoká senzitivita ovšem může negativně ovlivnit specifitu metody. K falešně pozitivním výsledkům může dojít kontaminací prób při jejich zpracování, amplifikací pseudogenů nebo nelegitimní expresí zkoumaného genu. Nelegitimní exprese znamená nepatrnou minimální expresi tkáňověspecifického genu jinou tkání (38). Většina autorů udává vzhledem k uvedeným skutečnostem senzitivitu nižší (1:10⁴ až 1:10⁶). Při důkladném odzkoušení metody s velkým počtem odpovídajících negativních kontrol s nenádorovou tkání je také specifita vysoká.

Pomocí RT-PCR v různých modifikacích lze detekovat nádorové buňky v lymfatických uzlinách podle různých autorů u 16 – 100% pacientů stadia Dukes' A nebo Dukes' B (tbl 3). Liefers (39) ve svém souboru 26 pacientů popsal signifikantně horší prognózu pacientů s pozitivními uzlinami. K detekci VNB použil CEA – RT-PCR. Výsledky této studie jsou však kontroverzní, protože bylo vyšetřeno průměrně jen 7 uzlin na pacienta a autoři použily malý počet negativních kontrol. Navíc je nedostatečná specifita CEA – RT-PCR, byla zachycena exprese CEA také v uzlinách pacientů bez nádorové onemocnění (40,41). Futamura (42) kombinoval detekci CEA a cytokeratinu 20 pomocí RT-PCR u 13 pacientů stadia Dukes' A nebo B. Překvapivě u všech pacientů byly VNB zachyceny. Pomocí CK 20 – RT – PCR detekoval Weitz nádorové buňky u 87% pacientů stadia Dukes' A a Dukes' B (43). Záchyt VNB v lymfatických uzlinách je mnohem vyšší než známé procen-

to relapsů odpovídající časným stádiím kolorektálního karcinomu. Při stratifikaci souboru (16 pacientů) podle lokalizace postižených uzlin se ukázalo, že v 8 případech (50%) byly postiženy pouze uzliny kolem velkých cév, ve 2 (12%) pouze parakolické uzliny. Tyto uzliny jsou při lymfadenektomii odstraněny a nemají tedy asi žádný prognostický význam. U 6 pacientů (38%) však byla pozitivní tzv. apikální uzlina. Apikální uzlina je v tomto smyslu poslední spádová uzlina nádoru před resekcí linií. Opakovaně bylo prokázáno, že histopatologicky prokázané meta v apikální uzlině zhoršují prognózu pacienta (45,46). U 30 – 40 % pacientů Dukes' A a Dukes' B dochází k relapsu onemocnění. Nabízí se tedy hypotéza, že prokázané VNB v apikální uzlině prokazují diseminaci nádorových buněk za hranice resekcí linií. Tito nemocní by mohli mít prospěch s adjuvantní terapií. Nyní probíhá follow up tohoto souboru pacientů, výsledky by mohly podpořit prognostický význam vyšetření apikální uzliny na VNB pomocí detekce CK 20 – RT-PCR.

Tabulka 3: Detekce VNB v lymfatických uzlinách u pacientů s kolorektálním nádorem stadia Dukes' A a Dukes' B metodou RT-PCR.

autor	detekovaný gen	počet uzlin ^a	počet pacientů ^b
Liefers (39)	CEA	36/192, 19%	14/26, 54%
Futamura (42)	CK20, CEA	10/202, 50,5%	13/13, 100%
Weitz (43)	CK20	137/269, 50,9%	14/16, 87,5%
Mori (40)	CEA	47/87, 54%	4/7, 57%
Dorudi (4)	CK20	8/127, 6,2%	4/14, 28,6%
Wong (44)	CD 44	neudáno	1/6, 16%
Waldman (34)	guanylyl cyklyasa C	6/23, 26,1%	2/7, 28,6%
Ichikawa (35)	matrilysin	8/60, 13%	2/10, 20%

^a pozitivní uzliny / celkový počet vyšetřených uzlin

^b pacienti s pozitivními uzlinami / celkový počet vyšetřených pacientů stadia Dukes' A a Dukes' B

Diseminace VNB kolorektálního karcinomu v krvi a v kostní dřeni

Vysoké procento záchytu VNB v regionálních lymfatických uzlinách ve stadiu Dukes' A a Dukes' B podporuje terapeutický význam lymfadenektomie v časných stádiích kolorektálního karcinomu. Je ovšem nutné posoudit také význam hematogenní cesty nádorové diseminace. Pokud jsou nádorové buňky prokázány v krvi nebo v kostní dřeni, nevede chirurgický výkon k úplné eliminaci nádorových buněk z organismu. Klinický význam takového nálezu zůstává nejasný.

Hematogenní diseminace VNB časných stádiích kolorektálního karcinomu detekovaná imunocytologicky korelovala s časnějším relapsem a kratší dobou přežívání (48). Pacienti s flow cytometricky detekovanými VNB v kostní dřeni měli vyšší pravděpodobnost vzniku vzdálených metastáz (49). S vyšším klinickým stadiem stoupá také procento pacientů s nálezem VNB v kostní dřeni (50, 51). Weitz (52) uvádí následující rozložení četnosti postižení kostní dřeni: Dukes' A - 9%, Dukes' B - 32%, Dukes' C - 44%, Dukes' D - 83%. Záchyt VNB v kostní dřeni neznamená vyšší pravděpodobnost relapsu onemocnění v kostech (51). Bylo prokázáno, že při resekcím výkonu se zvyšuje počet VNB v krvi (52) a to více v krvi spádových mesenterických žil proti vzorkům krve periferní a z centrální žíly (53). To ukazuje na filtrační funkci jater a dalších orgánů pro tyto nádorové buňky. Jaký je skutečný metastatický potenciál těchto buněk a zda to ovlivňuje prognózu pacientů je zatím nejasné.

Perspektivy detekce VNB

Nález VNB v lymfatických uzlinách, kostní dřeni, krvi nebo jiných tkáních může znamenat vyšší riziko metastazování v blízké nebo vzdálenější budoucnosti a tedy horší prognózu paci-

enta. Vyšetření VNB může být užitečné k selekci rizikovějších pacientů, kteří by mohli profitovat z další adjuvantní terapie. VNB, které mají metastatický potenciál ve své většině neproliferují, nachází se v Gó fází buněčného cyklu. Možnosti klasické adjuvantní chemoterapie, která působí jen na proliferující buňky, jsou při jejich likvidaci velmi omezené. Perspektivní se ale v této indikaci jeví terapeutické použití monoklonálních protilátek a jejich kombinace s chemoterapií (54). Fenotypizace VNB a mikrometastáz na přítomnost cílových antigenů by pomohla v cílené indikaci takovéto léčby (55).

Přítomnost VNB nelze na základě současných znalostí hodnotit jako nezávislý prediktivní faktor. Aby bylo možno zhodnotit skutečný význam VNB, bude nutné standardizovat metodu vyšetření do studií zařadit velké množství pacientů na více pracovištích a výsledky zhodnotit multivariační analýzou se zahrnutím všech známých a uvažovaných možných prediktivních faktorů.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MZČR č. 00065269705.

Literatura:

1. Audisio R.A., Setti - Carraro P., Segala M., Capko D. et al: Follow-up in colorectal cancer patients: a cost benefit analysis. *Ann. surg. Oncol.* 3, 1996, 349 – 357
2. Öberg A., Stenling R., Tavelin B. et al: Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colorectal cancer? *Dis. Colon Rectum* 41, 1998, 1244-1249
3. Deans G.T., Parks T.G., Rowlands B.J. et al: Prognostic factors in colorectal cancer. *Br. J. Surg.* 1992, 79: 608 –13
4. Dorudi S., Kinrade E., Marshall N.C. et al: Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancer. *Br. J. Surg.* 85(1), 1998, 98-100
5. Hermanek P., Hutter R.V.P., Sobin L.H. et al: Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* 1999, 86 : 2668 – 73
6. Kell M.R., Winter D.C., O'Sullivan G.C. et al: Biological behaviour and clinical implications of micrometastases. *Br. J. Surg.* 2000, Dec, 87(12): 1629 – 39
7. Hermanek P.: Disseminated tumor cells versus micrometastasis: definitions and problems. *Anticancer Res.* 1999, Jul – Aug, 19 (4A): 2771 – 4
8. Abati A., Liotta L.A.: Looking forward in diagnostic pathology. The molecular superhighway. *Cancer* 1996, 78: 1-3.
9. Feinstein A.R., Sosin D.M., Wells C.K.: The Will Rogers Phenomenon. Stage migration and new diagnostic techniques as a source of misleading statistics for survival in cancer. *N. Engl. J. Med.* 1985, 312: 1604 – 8
10. Sanson M. Fait remarquable de diathése. *Gaz Med de Paris* 1834, 2:140. Citoval Papac R.: Bone marrow metastases. *Cancer* 1994, 74:2403-13
11. Brown D.C., Purushotham A.D., Birmie G.D. et al.: Detection of intraoperative tumor cell dissemination in patients with breast cancer by use of reverse transcription and polymerase chain reaction. *Surgery* 117, 1995, 96-101
12. Saphir O., Amromin G.D. Obscure axillary lymph node metastasis in carcinoma of the breast. *Cancer* 1948, 1:238. Citoval: Giuliano A., Kelemen P.: Sophisticated techniques detect obscure lymph node metastases in carcinoma of the breast. *Cancer* 83, 1998, 391-393
13. Gusterson B. Are micrometastases clinically relevant? *Br. J. Hosp.* 1991, 47: 247
14. Wilkinson E.J., Hause L.: Probability in lymph node sectioning. *Cancer* 1974, 33: 1269
15. Haboubi N.Y., Abdalla S.A., Amini S. et al. The novel combination of fat clearance and immunohistochemistry improves prediction of the outcome of patients with colorectal carcinomas: a preliminary study. *Internat. J. Colorect. Dis.* 1998,13,(2),99-102
16. Giuliano A., Kelemen P.: Sophisticated techniques detect obscure lymph node metastases in carcinoma of the breast. *Cancer* 83, 1998, 391-393
17. Trojani M., de Mascarel I., Candre J.M., Bonichon F.: Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *Br. J. Cancer* 55, 1987, 303-306
18. Hainsworth P.J., Tjandra J.J., Stillwell R.G. et al.: Detection and significance of occult metastases in node-negative breast cancer. *Br. J. Surg* 80, 1993, 459-463
19. Nasser I.A., Lee A.K.C., Bosari S. et al.: Occult axillary lymph node metastases in „node negative“ breast carcinoma. *Hum. Pathol.* 24, 1993, 950-957.
20. Osborne M.P., Wong G.Y., Asina S. et al.: Sensitivity of immunocytochemical detection of breast cancer cells in human bone marrow. *Cancer Res.* 51, 1991, 2706-2709
21. Johnson P.W.M., Burchill S.A., Selby P.J.: The molecular detection of circulating tumor cells. *Br. J. Cancer* 1995, 72:268
22. Greenson J.K., Insehart C.E., Rice R. et al.: Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Dukes B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. *Cancer* 1994, 73: 563
23. Isaka N., Nozue M., Doy M. et al.: Prognostic significance of perirectal lymph node micrometastases in Dukes B rectal carcinoma: an immunohistochemical study by CAM5.2. *Clin. Cancer Res.* 1999, 5: 2065
24. Adell G., Boeryd B., Fralund B. et al.: Occurrence and prognostic importance of micrometastases in regional lymph nodes in Dukes B colorectal carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur. J. Surg.* 1996, 162: 637
25. Broll R., Schauer V., Schimmelpenning H. et al.: Prognostic relevance of occult tumor cells in lymph nodes of colorectal carcinomas. *Dis Colon Rectum* 1997 Dec, 40(12): 1465-71
26. Nakanishi Y., Ochiai A., Yamauchi Y. et al.: Clinical implications of lymph node micrometastases in patients with colorectal cancers. A case control study. *Oncology* 1999 Nov., 57(4):276-80
27. Willeke F., Ridder R., Mechttersheimer G. et al.: Analysis of FUS-CHOP fusion transcripts in different types of soft tissue liposarcoma and their diagnostic implications. *Clin. Cancer Res.* 1998, 4: 1779
28. Yamamoto N., Kato Y., Yanagisawa A. et al.: Predictive value of genetic diagnosis for cancer micrometastasis. *Cancer*, 1997, 80: 1393
29. Hayashi N., Arakawa H., Nagase H. et al.: Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res* 54:3853
30. Hayashi N., Ito I., Yanagisawa A. et al.: Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet*, 1995, 345: 1257
31. Nakamori S., Kameyama M., Fukurawa H. et al.: Genetic detection of colorectal cancer cells in circulation and lymph nodes. *Dis. Colon Rectum* 1997 Oct., 40(10 Suppl.): 29-36
32. Thebo J.S., Senagore A.J., Reinhold D.S. et al.: Molecular staging of colorectal cancer: K-ras mutation analysis of lymph nodes upstages Dukes B patients. *Dis. Colon Rectum* 2000 Feb.,43(2):155-9, discussion 159-62
33. Gunn J., Mc Call J.L., Yun K., Wright P.A.: Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K 19 and K 20 reverse transcription polymerase chain reaction. *Lab. Invest* 75(4), 1996, 611-616
34. Waldman S.A., Cagir B., Rakinic J. et al.: Use of guanylyl cyclase C for detecting micrometastases in lymph nodes of patients with colon cancer. *Dis. Colon Rectum* 41(3), 1998, 310-315
35. Ichikawa Y., Ishikawa T., Momiyama N. et al.: Detection of regional lymph node metastases in colon cancer by using RT-PCR for matrix metalloproteinase 7, matrilysin. *Clin. Exp. Metastasis* 16(1), 1998, 3-8
36. Knebel M.D., Koch M., Weitz J. et al.: Diagnostik und Bedeutung der „Minimal Residual Disease“ bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. *Zentralbl. Chir.* 125 (2000) Suppl. 1:15-19
37. Doerbert M.K., Weitz J., Koch M. et al.: Molecular tools in the detection of micrometastatic cancer cells – technical aspects and clinical relevance. *Recent Results in Cancer Research*, 2001, 158
38. Chelly J., Concordet J.P., Kaplan J.C. et al.: Illegitimate transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86:2617-2621
39. Liefers G.J., Cleton-Jansen A.M., van de Velde C.J. et al.: Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 339(4), 1998, 223-228
40. Mori M., Mimori M., Inoue H. et al.: Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 1995,55:3417-3420
41. Bostick P.J., Chatterjee S., Chi D.D. et al.: Limitations of the specific reverse transcriptase polymerase chain reaction markers in the detection of metastases in the lymph nodes and blood of breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 1998, 16: 2632
42. Futamura M., Takagi Y., Koumura H. et al.: Spread of colorectal cancer micrometastases in regional lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reactions for carcinoembryonic antigen and cytokeratin 20. *J. Surg. Oncol.* 68(1), 1998, 34-40
43. Weitz J., Kienle P., Magener A., Koch M. et al.: Detection of Disseminated Colorectal Cancer Cells in Lymph Nodes. *Clin. Cancer Res.*, 1999 (Jul) 5: 1830-1836
44. Wong L.S., Cantrill J.E., Odogwu S. et al.: Detection of circulating tumor cells and nodal metastasis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique. *Br. J. Surg.*, 1997, 84:834
45. Malhassagne B., Valleur P., Serra J. et al.: Relationship of apical lymph node involvement to survival in resected colon carcinoma. *Dis. Colon Rectum*, 1993, 36:645-653
46. Shida H., Ban K., Matsumoto M. et al.: Prognostic significance of location of lymph node metastases in colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* 1992, 35:1046-1050
47. O'Sullivan G.C., Collins J.K., O'Brien F. et al. Micrometastases in bone marrow of patients undergoing curative surgery for gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 1995, 109: 1535-40
48. Lindemann F., Schlimok G., Dirschedl P. et al.: Prognostic significance of micrometastatic tumor cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet*, 1992, 340:685-689
49. O'Sullivan G.C., Collins J.K., Kelly J. et al.: Micrometastases: marker of metastatic potential or evidence of residual disease? *Gut*, 1997, 40: 512-15
50. Soeth E., Roder C., Juhl H. et al.: The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int. J. Cancer* 69(4), 1996, 278-282
51. Schlimok G., Funke I., Bock B. et al.: Epitelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization and prognostic significance. *J.Clin. Oncol.* 8, 1990, 831-837
52. Weitz J., Kienl P., Lacroix J. et al.: Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 1998, 4:343-348
53. Koch M., Weitz J., Kienle P. et al. Comparative analysis of tumor cell dissemination in mesenteric, central and peripheral venous blood in patients with colorectal cancer. *Arch. Surg.* 2001, 136: 85 – 89
54. Riethmüller G., Holz E., Schlimok G. et al.: Monoclonal antibody therapy for resected Dukes C colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 1998, 16:1788-97
55. Hajdúch M., Michálek J., Papajík T., Štěrbá J., Talač R., Vyzula R., Žaloudík J. Monoklonální protilátky v onkologii, *Mediforum* 2000, Nové trendy

NAJNOVŠIE PRÍSTUPY V DIAGNOSTIKE LEUKÉMIÍ POMOCOU IMUNOFENOTYPIZÁCIE A SLEDOVANÍ MINIMÁLNEJ REZIDUÁLNEJ CHOROBY

MODERN TRENDS IN LEUKEMIA DIAGNOSIS BY IMMUNOPHENOTYPING AND MONITORING OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE

TOMOVÁ A., BABUŠIKOVÁ O.

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ ONKOLÓGIE SAV, BRATISLAVA, SLOVENSKÁ REPUBLIKA

Súhrn: Leukémia tvoria heterogénnu skupinu ochorení a postihujú deti aj dospelých. Diagnostiku vo veľkej miere uľahčuje prietoková cytometria, avšak relaps ochorenia zostáva veľkým problémom aj v súčasnosti. Stanovenie minimálnej reziduálnej choroby a hľadanie nových terapeutických stratégií zákonite musí byť založené na dôkladnom poznaní biologických vlastností jednotlivých typov buniek. V tomto bode má veľký význam práve prietoková cytometria s možnosťami viacfarebného značenia rôznych znakov súčasne, DNA analýzy, alebo kombinácie sortovania/separácie buniek na podklade imunofenotypu s následnou komplexnou analýzou jednotlivých bunkových populácií.

Kľúčové slová: akútna a chronická leukémia, minimálna reziduálna choroba, prietoková cytometria, sortovanie buniek

Summary: Leukemias create/represent a heterogenous group of diseases affecting both children and adults. Diagnosis is to a large extent facilitated by flow cytometry but the relapse of the disease remains a big problem also at present. Detection of minimal residual disease and finding new therapeutic strategies must be regularly based on consistent knowledge of biological characteristics of individual cell types. In this point, the great significance belongs to flow cytometry with the possibilities of multicolor staining of different markers simultaneously, DNA analysis, or combination of cell sorting on the basis of immunophenotype followed by the complete analysis of individual cell populations.

Key words: acute and chronic leukemia, minimal residual disease, flow cytometry, cell sorting

Fyziologický hematopoetický vývoj je špecificky regulovaný proces, ktorý zahŕňa sebaobnovu kmeňových buniek, expanziu triedovo-špecifickej progenitorovej populácie a dozrievanie do konečných krvných elementov (1). Pochopenie proliferácie a diferenciacie buniek sa už nezaobíde bez znalostí ich imunofenotypového profilu, ktorý je tvorený mozaikou membránových i vnútrobunkových molekúl. V poslednom období prebehla ich rozsiahla charakterizácia z hľadiska genetickej determinácie, chemickej štruktúry a funkcie; získané poznatky sa vo veľkej miere využívajú aj v súvislosti s diagnostikou leukémií a lymfómov (2, 31, 32).

Aplikácia metódy prietokovej cytometrie v diagnostike leukémií

Prínosom použitia monoklonálnych protilátok a prietokovej cytometrie je určenie triedy akútneho alebo chronického leukémií, najmä v prípadoch nejednoznačného morfológického nálezu, stanovenie prognózy na podklade imunofenotypu a využitie v detekcii minimálnej reziduálnej choroby. Najskôr používanou bola jednofarebná imunofluorescencia, prostredníctvom ktorej sa znaky analyzovali jednotlivo. Porovnávací analýza imunofenotypových charakteristík leukemických buniek a zdravých buniek je dôležitá pre exaktné odlišenie zdravých buniek od nádorových (6, 36). V značnej miere používaná jednofarebná imunofluorescenčná analýza však nemožňuje presnú detekciu aberantných populácií najmä z toho hľadiska, že leukemické bunky exprimujú prevažne rovnaké znaky ako zdravé bunky (42). Líšia sa však v určitých charakteristikách (intenzita expresie, počet molekúl daného znaku) (33, 34, 41). Vývoj monoklonálnych protilátok spojených s rozličnými typmi fluorochrómov umožnil použitie a analýzu kvantitatívnych a kvalitatívnych zmien viacerých znakov naraz, čo presnejšie definuje fenotyp jedinej bunky (3, 37). Preto sa v súčasnosti pristupuje k definícii populácií prítomných v zdravej kostnej dreni a periférnej krvi pomocou troj-

a štvorfarebnej analýzy, a k štandardizácii týchto techník vo viacerých laboratóriách (4, 5, 7).

Viacfarebná imunofluorescenčná analýza populácií zdravej kostnej drene a periférnej krvi

Použitím kombinácií priamo značených protilátok s následnou lýzou erytrocytov vo vzorke a citlivého merania sa získali detailné informácie o bunkových subpopuláciách prítomných v zdravej kostnej dreni a periférnej krvi aj vo veľmi nízkych frekvenciách, ktoré predtým nebolo možné detekovať klasickými metódami. Zvolené kombinácie protilátok proti povrchovým a vnútrobunkovým znakom a techniky značenia vychádzajú z doteraz získaných poznatkov o imunofenotype rôznych populácií leukocytoov (4, 7, 8).

Pomocou prietokovo-cytophotrickej analýzy sa podarilo identifikovať základné imunologické podtypy včasných progenitorov exprimujúcich znaky asociované s B-bunkovou triedou v kostnej dreni. Na základe použitia piatich trojkombinácií znakov (CD10/CD20/CD19, CD34/CD38/CD19, CD34/CD22/CD19, CD19/CD34/CD45, TdT/CD10/CD19) sa identifikovali dve subpopulácie CD19⁻ progenitorov, z ktorých jedna exprimovala znaky CD34⁺/CD22⁺/CD19⁻ a druhá TdT⁺/CD10⁺/CD19⁻. Tieto subpopulácie však predstavujú veľmi malé percento (0,11±0,09% a 0,04±0,05%) z celkového počtu buniek v kostnej dreni. Väčšina buniek exprimovala znak CD19 a podľa intenzity expresie (bright = silná intenzita expresie, dim = slabá intenzita expresie) ďalších znakov sa charakterizovali tri nasledovné podskupiny: veľmi nezrelé B-bunky, s imunofenotypom CD10⁺bright, CD34, TdT, CD19^{dim}, CD22^{dim}, CD38^{bright}, CD45^{-dim} a CD20⁻; bunky prechodného B-bunkového štádia dozrievania charakterizované imunofenotypom CD19, CD10, CD22, CD45, CD34⁻, TdT⁻, CD38^{bright}, CD22^{dim}, CD20^{dim}; zrelšiu B-bunkovú populáciu definovali znaky CD19⁺, CD22^{bright}, CD45^{bright}, CD20^{bright}, CD38^{dim}, CD10⁻, CD34⁻, TdT⁻. Prvé dve subpo-

pulácie prevládajú u detí do 15 rokov (v KD majú až 70% zastúpenie), počet buniek v tretej subpopulácii je vzhľadom k veku relatívne stabilný (4).

Podobná štúdia bola zameraná na charakterizáciu buniek s T-asociovanými znakmi, nachádzajúcimi sa v zdravej kostnej dreni. Opäť bolo použitých päť kombinácií znakov (CD7/CD5/CD3, CD7/CD4/CD8, CD7/CD2/CD3, CD7/CD38/CD34 a TdT/CD7/cCD3). V zdravej KD sa nezistili žiadne populácie buniek, ktoré by neexprimovali znak CD7, prípadne by jeho expresia bola slabá, taktiež ani populácie s koexpresiou znakov CD34⁺CD7⁺ a TdT⁺CD7⁺cCD3⁺. Preto sa analyzovali ostatné znaky na populácii CD7⁺ buniek. Dôležitým poznatkom je, že v zdravej kostnej dreni sa nenachádzajú populácie buniek, ktoré silne exprimujú znaky CD4⁺ a CD8⁺. V analyzovaných vzorkách KD sa sledovala aj možnosť koexpresie znakov CD19, CD13 a CD33 v zdravej populácii CD7⁺ buniek, pretože u leukémií T-bunkového typu sa ich expresia vyskytuje nezriedka (6, 40). Žiadna koexpresia CD7⁺CD19⁺ sa nezistila vo frekvencii vyššej než 10⁻⁴, avšak bunky CD7⁺CD13⁺ a CD7⁺CD33⁺ boli detekované v 10% vzoriek KD vo frekvencii vyššej ako 10⁻⁴ (0,06±0,03% a 0,05±0,04%) (7).

Vo vzorkách zdravej periférnej krvi sa analyzovali subpopulácie lymfocytov štvorfarebným značením s rôznymi CD markermi. Najviac zastúpenými populáciami boli lymfocyty s fenotypom CD3⁺CD8⁺CD2⁺CD4⁻ (25%), CD3⁺CD8⁻CD2⁺CD4⁺ (42%), CD3⁻CD8⁺CD2⁺CD4⁻ (4%), CD3⁻CD8⁺CD2⁻CD4⁻ (1%), tieto populácie CD3⁻CD8⁺ exprimovali znaky CD16⁺CD56⁺, lymfocyty negatívne pre všetky T-znaky boli CD19⁺ (11%) (8).

Na základe týchto poznatkov o fenotypových vlastnostiach buniek zdravých populácií možno vymedziť tzv. „empty spaces“ (oblasti na bodových histogramoch – „dot plots“, kde sa zdravé bunky KD nenachádzajú, ale malígne bunky sú lokalizované v týchto oblastiach kvôli ich aberantnej antigénnej expresii) (5). Takýmto spôsobom prichádza do úvahy definícia ektopického pôvodu leukémie, ako je to často pozorované u akútnej leukémie pochádzajúcich z T-buniek, predovšetkým z týmusu.

Podobná charakterizácia myeloidných bunkových subpopulácií v zdravej KD alebo PK ešte nebola publikovaná, i keď sú známe práce s použitím multiparametrovej analýzy a trojfarebného značenia na definovanie aberantných fenotypov a detekciu MRD u pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (9, 10, 35).

Detekcia MRD a jej prognostický význam pri viacfarebnej analýze

Detekcia malígnych buniek v „empty spaces“ má uplatnenie nielen na začiatku ochorenia pri stanovení diagnózy, ale aj v priebehu ochorenia na stanovenie efektivity liečby pri eliminácii leukemického klonu a dôkaze MRD (5, 7).

Detekcia MRD pomocou imunofenotypizácie s vysokou citlivosťou (10⁻⁴ až 10⁻⁵ pri použití špecifických s leukémiou-asociovaných imunofenotypových vlastností) umožňuje takto odlíšiť aj skupiny pacientov s vyšším rizikom relapsu. Na podklade hodnotenia minimálnej zvyškovej choroby po konsolidáčnej liečbe je možné rozdeliť pacientov do dvoch skupín. Deliacou hranicou je počet 3,5 x 10⁻⁴ reziduálnych leukemických buniek a u pacientov s nižším počtom reziduálnych buniek sa zistila menšia pravdepodobnosť relapsu, priaznivejší cytogenetický nález a dlhodobejšie prežívanie (9). K podobným záverom možno dospieť pri analýze hladiny zvyškových buniek s aberantným fenotypom už po indukčnej liečbe u pacientov s AML. U pacientov zaradených do skupiny s najväčším rizikom sa zistila MRD vo väčšej frekvencii než 10⁻² aberantných buniek a výskyt relapsu 85±9% v priebehu 3 rokov. Skupina pacientov v strednej rizikovej skupine mala počet zvyškových buniek 10⁻² až 10⁻³ a riziko relapsu 45±8%. Pacienti s obsahom aberantných buniek v menšom počte než 10⁻³

boli zaradení do skupiny s najnižším rizikom návratu ochorenia, 14±6%. U tých, ktorí mali počet aberantných buniek menší ako 10⁻⁴ sa v priebehu 3 rokov nevyskytol relaps (10).

Definícia vlastností buniek spojených s procesom vzniku leukémie

Mechanizmy zodpovedné za nekontrolovateľnú expanziu leukemických buniek sú úzko viazané s regulačnými mechanizmami zdravých hematopoetických buniek, najmä s reguláciou bunkového cyklu, proliferáciou a prežívaním buniek. Je všeobecne akceptovaný fakt, že leukemické bunky proliferujú vďaka zmenám v aktivácii proto-onkogénov a/alebo inaktivácii nádorových supresorových génov. Traduje sa názor, že leukemický fenotyp je odrazom úrovne hematopoetickej hierarchie, v ktorej sa genetický defekt vyskytuje (43). Najnovšie práce dokazujú, že genetická udalosť spúšťajúca leukémiu sa vyskytuje na úrovni kmeňovej bunky, bez ohľadu na fenotyp celkovej populácie leukemických blastov. Tento genetický defekt pravdepodobne sám determinuje diferenciatívny program postihnutého bunkového klonu (11).

Sortovanie leukemických buniek prietokovým cytometrom

Pri imunofenotypizácii patologických buniek v PK a KD pacienta možno analyzovať stupeň heterogenity v abnormálnej bunkovej populácii, spôsobený existenciou rôznych patologických klonov alebo prítomnosťou buniek v rozličných dozrievacích štádiách (12). Prietoková cytometria už v súčasnosti poskytuje viac ako len charakterizovanie imunofenotypu buniek. Separovanie bunkových populácií s následnou analýzou buniek fluorescenčnou in-situ hybridizáciou (FISH) alebo simultánnou analýzou fenotypu a obsahu DNA majú veľkú výpovednú hodnotu o vlastnostiach týchto buniek (12, 13, 14).

Separovanie/sortovanie buniek prietokovou cytometriou umožňuje získať suspenziu buniek, ktorá obsahuje viac ako 95% buniek s požadovaným fenotypom. Princípom je rozdelenie prúdu najťažšieho bunky kmitaním piezoelektrického kryštálu na jednotlivé kvapky, ktoré obsahujú len jednu bunku. Bunky sú potom vychyľované elektrickým nábojom do jednotlivých skúmaviek podľa zvolených parametrov (15).

Veľa prác sa zaoberá detekciou leukemických buniek v subpopulácii hematopoetických progenitorových buniek kostnej drene alebo periférnej krvi, predovšetkým na základe špecifických imunologických znakov a ich kombinácií a charakteristických chromozomálnych odchýlok.

Sledovaním pacientov v chronickej fáze CML sa zistilo, že v periférnej krvi sa u nich nachádza zvýšené množstvo progenitorových buniek, ktoré sa od seba fenotypovo veľmi neodlišovali. Pri ich skúmaní zistili prítomnosť ako normálnych (Ph⁻), tak aj Ph⁺ progenitorov (16). Paralelné štúdie buniek CML ukázali, že mnohé leukemické kmeňové a progenitorové bunky sa delia, je zaujímavé, že u všetkých sledovaných pacientov aj bunky v G₀ fáze bunkového cyklu obsahovali BCR-ABL mRNA (17).

Podobne ako u CML aj u AML boli detekované leukemické a zdravé progenitorové bunky. Ich fenotyp je veľmi podobný z hľadiska expresie CD34 a nízkej expresie CD38, môžu sa líšiť stratou expresie Thy-1 (18). K úplne opačným záverom dospeli autori v inej práci, ktorí demonštrovali, že prípady so silnou expresiou CD34 na leukemických kľudových kmeňových bunkách môžu reprezentovať neoplastickú dysreguláciu medzi CD34 negatívnou a schopnosťou pre rýchlu elimináciu (eflux) lipofilných molekúl (19). Separovanie nezrelých buniek AML periférnej krvi pacientov preukázalo, že progenitory schopné obnovovania exprimujú fenotyp CD34⁺CD71⁻HLA-DR⁻CD38⁻, teda podobne ako zdravé progenitory. Výsledky naznačili, že u týchto pacientov sa leukemická transformácia mohla vyskytnúť v primitívnych bunkách, ktoré exprimujú CD34 s následnou klonálnou evolúciou, ale napriek tomu si zachovali schopnosť proliferovať a obnoviť hematopoézu NOD/SCID myši (20).

Zistilo sa, že pacienti s AML a translokáciou t(8;21) majú dokázateľne aj dva mesiace po dosiahnutí klinickej remisie prítomných až 80% CD34⁺ buniek s touto translokáciou (13). Demonštrovalo sa tiež, že t(8;21)-špecifická AML1/ETO mRNA je exprimovaná v zrelých monocytoch a B-bunkách, ako aj HSC (hematopoietic stem cell), lymfoidných progenitoroch a myeloidných progenitoroch aj počas remisie pacienta, takže t(8;21)+ HSC v remisii sú schopné diferencovať do zrelých krvných buniek *in vivo* (21).

Na podklade predchádzajúcich štúdií ktoré ukázali, že viac ako 95% detských B-ALL exprimuje znak CD38, sa predpokladalo, že je možné izolovať v KD detí s B-ALL normálne CD34⁺CD38⁻ progenitory v čase remisie. CD34⁺ bunky boli separované do CD34⁺CD38⁺ a CD34⁺CD38⁻ populácií. Následná analýza u 10 detí ukázala, že u štyroch z nich sa vyskytujú pr tento typ leukémie netypické leukemické preskupenia TCR, charakteristické pre daného pacienta, aj v CD34⁺CD38⁻ populácii (22).

Zaujímavá štúdia bola urobená s izolovanými Ph⁺ progenitorovými bunkami ALL s rôznym fenotypom (CD34⁺CD38⁻, CD34⁺CD38⁺, CD34⁻, CD34⁺) od pacienta, ktorými transplantovali NOD/SCID myši. Najlepšiu proliferáciu schopnosť mali bunky CD34⁺⁺CD38⁻, schopné vytvoriť veľké množstvo leukemických blastov, ktoré exprimovali rovnaké aberantné kombinácie povrchových antigénov ako mal pacient (11).

Je pozoruhodné, že počas remisie sa HSC s translokáciou dokážu diferencovať do zrelých krvných buniek. „Klonálna remisia“ u pacientov s AML naznačuje, že dominantné „pre-leukemické“ kmeňové bunky schopné normálnej diferenciácie môžu existovať a že ďalšia mutačná udalosť/udalosti môžu transformovať tieto pre-leukemické kmeňové bunky do skutočných leukemických kmeňových buniek ako výsledok viac-

stupňovej leukemogenézy. V práci sa demonštruje, že t(8;21) nemusí špecificky značiť leukemické bunky. Na druhej strane je dôležité vedieť, či reziduálne bunky prítomné u rôznych hematologických malignít sú potomkami maligných alebo nemaligných kmeňových buniek s leukemickými špecifickými gémi (21).

Hodnotenie proliferčných markerov, bunkového cyklu, apoptózy a rezistencie pomocou prietokovej cytometrie

Definovanie leukemických buniek v populácii hematopoietických prekursorov má teda význam nielen z hľadiska definovania minimálnej reziduálnej choroby, ale aj z hľadiska objasnenia mechanizmov vzniku leukémie. Súčasná analýza povrchových, vnútrobunkových znakov a obsahu DNA umožňuje presnejšiu charakterizáciu vlastností leukemických buniek (23). Odpoveď leukemických buniek na indukčnú terapiu, prítomnosť MRD a prognóza ochorenia sú do značnej miery determinované práve schopnosťou proliferácie a apoptózy leukemických buniek v prítomnosti podaných liečiv. Metóda prietokovej cytometrie využíva rôzne metódy fixácie a permeabilizácie na dôkaz poliferačných znakov v spojení s detekciou obsahu DNA na stanovenie proliferčného indexu leukemických buniek (23, 24, 25). Detekcia zmien v expresii nádorových supresorových génov (p53, p21), anti- a pro-apoptických molekúl (Bcl-2, Bax, CD95), mnohopočetnej liekovej rezistencie (MDR) u hematologických malignít je zriedkavá v čase diagnózy, má však špecifický význam pre detekciu mechanizmov progresie leukemického procesu u niektorých diagnóz, ako sa potvrdilo napríklad u CML či AML (26, 27, 28, 29, 30, 38, 39).

Praca bola podporená Grantom c. 2/1109/21 Slovenskej grantovej agentúry.

Literatúra

1. Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Ratajczak, J., Ratajczak, M.Z. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cell* 2001, 19:99-107
2. Koubek, K. Výskyt CD znakov na hematopoetických buňkách. *Vnitř Lék* 1998, 44:609-623
3. Campana, D. and Coustan-Smith, E. Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 1999, 38:139-152
4. Lucio, P., Parreira, A., van den Beemd, M.W.M., van Lochem, E.G., van Wering, E.R., Baars, E., Porwit-MacDonald, A., Björklund, E., Gaipa, G., Biondi, A., Orfao, A., Janossy, G., van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: a frame of reference for the detection minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia* 1999, 13:419-427
5. Lucio, P., Gaipa, G., van Lochem, E.G., van Wering, E.R., Porwit-MacDonald, A., Faria, T., Björklund, E., Biondi, A., van den Beemd, M.W.M., Baars, E., Vidriales, B., Parreira, A., van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., Orfao, A. BIOMED-1 concerned action report: Flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple stainings. *Leukemia* 2001, 15:1185-1192
6. Babušková, O., Glasová, M., Koníková, E., Kusenda, J. Leukemia-associated phenotypes: their characteristics and incidence in acute leukemia. *Neoplasma* 1996, 43:367-372
7. Porwit-MacDonald, A., Björklund, E., Lucio, P., van Lochem, E.G., Mazur, J., Parreira, A., van den Beemd, M.W.M., van Wering, E.R., Baars, E., Gaipa, G., Biondi, A., Ciudad, J., van Dongen, J.J.M., San Miguel, J.F., Orfao, A. BIOMED-1 concerned action report: flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow-up of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 2000, 14:816-825
8. Schiavon, V., Roth, P., Bolton, W.E., farcet, J.P., Bensussan, A., Boumsell, L. Lymphocyte subsets in normal individuals: analysis by four color immunofluorescence and flow cytometry on whole blood. *Tissue Antigens* 1996, 48:312-318
9. Venditti, A., Buccisano, F., Del Poeta, G., Maurillo, L., Tamburini, A., Cox, C., Battaglia, A., Catalano, G., Del Moro, B., Cudillo, L., Postorino, M., Masi, M., Amadori, S. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 2000, 96:3948-3952
10. San Miguel, J.F., Vidriales, M.B., Lopez-Berges, C., Diaz-Mediavilla, J., Gutierrez, N., Canizo, C., Ramos, F., Calmunfia, M.J., Perez, J.J., Gonzales, M., Orfao, A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 2001, 98:1746-1751
11. Cobaleda, C., Gutierrez-Cianca, N., Perez-Losada, J., Flores, T., Garcia-Sanz, R., Gonzales, M., Sanches-Garcia, I. A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000, 95:1007-1013
12. Orfao, A., Schmitz, G., Brando, B., Ruiz-Arguelles, A., Basso, G., Braylan, R., Rothe, G., Lacombe, F., Lanza, F., Papa, S., Lucio, P., San Miguel, J.F. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: Current status and future directions. *Clin Chem* 1999, 45:1708-1717
13. Varella-Garcia, M., Hogan, C.J., Odum, L.F., Murata-Collins, J.L., Ai, H., Chen, L., Richkind, K., Paskulin, G., Andreeff, M., Brizard, A., McGavran, L., Gemmill, R.M., Berger, R., Drabkin, H.A. Minimal residual disease (MRD) in remission t(8;21) AML and *in vivo* differentiation detected by FISH and CD34+ cell sorting. *Leukemia* 2001, 15:1408-1414
14. Jordan, C.T., Yamasaki, G., Minamoto, D. High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Exp Hematol* 1996, 24:1347-1355
15. Eckschlager, T a kol.: Prútoková cytometrie v klinické praxi. Grada Publishing 1999, 169 s.
16. Petzer, A.L., Eaves, C.J., Lansdorp, P.M., Ponchio, L., Barnett, M.J., Eaves, A.C. Characterization of primitive subpopulations of normal and leukemic cells present in the blood of patients with newly diagnosed as well as established chronic myeloid leukemia. *Blood* 1996, 88:2162-2171
17. Holyoake, T., Jiang, X., Eaves, C., Eaves, A. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1999, 94:2056-2064
18. Feuring-Buske, M. and Hogge, D.E. Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34+CD38- progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2001, 97:3882-3889
19. Wulf, G.G., Wang, R., Kuehnie, I., Weidner, D., Marini, F., Brenner, M.K., Andreeff, M., Goodell, M.A. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001, 98:1166-1173
20. Blair, A., Hogge, D.E., Sutherland, H.J. Most acute myeloid leukemia progenitor cells with long-term proliferative ability *in vitro* and *in vivo* have the phenotype CD34+/CD71-/HLA DR-. *Blood* 1998, 92:4325-4335
21. Miyamoto, T., Weissman, I.L., Akashi, K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:7521-7526
22. George, A.A., Franklin, J., Kerhof, K., Shah, A.J., Price, M., Tsark, E., Bockstoce, D., Yao, D., Hart, N., Carcich, S., Parkman, R., Crooks, G.M., Weinberg, K. Detection of leukemic cells in the CD34(+)/CD38(-) bone marrow progenitor population in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001, 97:3925-3930
23. Garrido, S.M., Willman, Ch., Appelbaum, F.R., Banker, D.E. Three-color versus four-color multiparameter cell cycle analyses of primary acute myeloid leukemia samples. *Cytometry* 2000, 42:83-94
24. Bolton, W.E., Freeman, J.W., Mikulka, W.R., Healy, C.G., Schmittling, R.J., Kenyon, N.S. Expression of proliferation-associated antigens (PCNA, p120, p145) during the reentry of G0 cells into the cell cycle. *Cytometry* 1994, 17:66-74
25. Jordan, C.T., Yamasaki, G., Minamoto, D. High-resolution cell cycle analysis of defined phenotypic subsets within primitive human hematopoietic cell populations. *Exp Hematol* 1996, 24:1347-1355
26. Cory, S., Vaux, D.L., Strasser, A., Harris, A.W., Adams, J.M. Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 1999, 59:1685-1692

27. Di Bacco, A., Keeshan, K., McKenna, S.L., Cotter, T.G. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *The Oncologist* 2000, 5:405-415
28. Blau, O., Avigad, S., Stark, B., Kodman, Y., Luria, D., Cohen, I.J., Zaizov, R. Exon 5 mutations in the p53 gene in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 1997, 8:721-729
29. Lam, V., McPherson, J.P., Salmena, L., Lees, J., Chu, W., Sexsmith, E., Hedley, D.W., Freedman, M.H., Reed, J.C., Malkin, D., Goldenberg, G.J. p53 gene status and chemosensitivity of childhood acute lymphoblastic leukemia cells to adriamycin. *Leuk Res* 1999, 23:871-880
30. Tiirikajnen, M.I., Syrjälä, M.T., Jansson, S.-E., Krusius, T. Flow cytometry analysis of P-glycoprotein in normal and leukemic cells. *Ann Hematol* 1992, 65:124-130
31. Jennings, C.D. and Foon, K.A. Recent advances in flow cytometry: Application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997, 90:2863-2892
32. Braylan, R.C., Orfao, A., Borowitz, M.J., Davis, B.H. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry* 2001, 46:23-27
33. Glasová, M., Koníková, E., Kusenda, J., Babušíková, O. Evaluation of different fixation methods for simultaneous detection of surface, cytoplasmic markers and DNA analysis by flow cytometry in some human hematopoietic cell lines. *Neoplasma* 1995, 42:337-346
34. Weir, E.G., Cowan, K., LeBeau, P., Borowitz, M.J. A limited antibody panel can distinguish B-precursor acute lymphoblastic leukemia from normal B precursors with four color flow cytometry: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 1999, 13:558-567
35. San Miguel, J. F., Martínez, A., Macedo, A., Vidriales, M. B., Lopez-Berges, C., Gonzalez, M., Caballero, D., Garcia-Marcos, M.A., Ramos, F., Fernandez-Calvo, J., Calmuntia, M.J., Diaz-Mediavilla, J., Orfao, A. Immuno-

- phenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997, 90:2465-2470
36. Drach, J., Drach, D., Glassl, H., Gatringer, C., Huber, H. Flow cytometric determination of atypical antigen expression in acute leukemia for the study of minimal residual disease. *Cytometry* 1992, 13:893-901
37. Farahat, N., Lens, D., Zomas, A., Morilla, R., Matutes, E., Catovsky, D. Quantitative flow cytometry can distinguish between normal and leukemic B-cell precursors. *Br J Hematol* 1995, 91:640-646
38. Lacombe, F. and Belloc, F. Flow cytometry study of cell cycle, apoptosis and drug resistance in acute leukemia. *Hematol Cell Ther* 1996, 38:495-504
39. Wuchter, C., Karawajew, L., Ruppert, V., Büchner, T., Schoch, C., Haferlach, T., Ratei, R., Dörken, B., Ludwig, W.-D. Clinical significance of CD95, Bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult *de novo* acute myeloid leukemia in context of P-glycoprotein function, maturation stage, and cytogenetics. *Leukemia* 1999, 13:1943-1953
40. Babušíková, O., Glasová, M., Koníková, E., Kusenda, J., Čáp, J., Gyárfás, J., Koubek, K. Phenotypic heterogeneity and aberrant markers expression in T-cell leukemia. *Neoplasma* 1998, 45, 128-134
41. Babušíková, O., Glasová, M., Stašáková, J., Kusenda, J., Koníková, E. Quantitative immunocytofluorometry – new parameters for the definition of leukemia cells. *Neoplasma* 1997, 44, 348-355
42. Ratei, R., Sperling, C., Karawajew, L., Schott, G., Schrappe, M., Harbott, J., Riehm, H., Ludwig, W.-D. Immunophenotype and clinical characteristics of CD45-negative and CD45-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 1998, 77:107-114
43. Foon, K.A. and Todd, R.F. III Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 1986, 68:1-31

informace

MALIGNÍ KOŽNÍ NÁDORY U PACIENTŮ S VÍCEČETNÝMI MALIGNITAMI

MALIGNANT SKIN TUMORS IN PATIENTS WITH MULTIPLE MALIGNANCIES

VITOVÁ V.
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Zhoubné nádory (ZN) kůže (C43 - maligní melanom kůže, C44 - ostatní nádory kůže) poměrně často participují v diagnóze mnohočetné malignity. Vyskytují se jako primární i následné malignity. Zatím lze těžko určit, která z uvedených variant je častější, neboť existuje jen málo onkologických registrů (Finsko, Česká republika), které registrují i kožní basaliomy. Přesnější význam ZN kůže v rámci vícečetných malignit (VM) není tedy zatím zcela objasněn. Některé prameny (7, 10) však již na určité významné souvislosti upozorňují.

• **Maligní melanom kůže (MMK) jako primární ZN:**
Wassberg a kol. (Švédsko) (15) zjistili při analýze dat pacientů s MMK *in situ* zvýšené riziko rozvoje následných MMK a nemelanomových nádorů kůže (NMNK), dále ZN prsu u žen. V kohortě pacientů s rozvinutým MMK do 60 let věku našli významně zvýšené riziko následných MMK, NMNK a ZN neuroektodermální tkáně u obojího pohlaví (16).
Schenk (USA) (12) upozorňuje na 2x zvýšené riziko výskytu následného ZN pankreatu u pacientů s MMK diagnostikovaným do 50 let věku. *Bhatia a kol.* (2) z Univerzity v Karolině (USA) referují zvýšené riziko rozvoje subsekventních MMK a karcinomů močového měchýře. *Levi a kol.* (Švýcarsko) našli za dobu 20-ti let sledování pacientů s primárním MMK signifikantně zvýšený počet následných MMK i NMNK – nejvíce basaliomů, převážně u mužů (8). Na vysoké riziko následných ZN jiných topik (mozek, ORL oblast, chronická lymfatická leukémie) u obou pohlaví do 50 let věku upozorňuje *Swerdlow* (13). 16x zvýšenou incidenci následných lymfomů ve srovnání s normální populací uvádí *Riou* (11).

• **MMK jako následný ZN:**
Brennan (3) upozorňuje na významné riziko výskytu následných MMK vedle dalších následných ZN rizikových topik u non – Hodgkinských lymfomů. *Travis* (USA) zjistil u mužů se ZN varlete (přezívajících více než 1 rok) vedle jiných ZN vysoké riziko získání MMK (14). V obou případech není zmíněn významnější výskyt NMNK.

• **NMNK jako primární ZN:**
Dle údajů finského onkologického registru znamená zjištění kožního basaliomu do 40 let věku významné riziko pro vznik NMNK, MMK a ZN slinivky žlázy, rtu, tenkého střeva, nosu a pharyngu (10). *Hjalgrim a kol.* (Dánsko) uvádějí u pacientů s NMNK zvýšené riziko rozvoje non – Hodgkinského lymfomu (7). V souboru švédských pacientů (17) s primárním NMNK, zejména mladších 60 let z období 1958 – 1992 byl zjištěn trojnásobně vyšší výskyt následného MMK a dalších dleždicových buněčných ZN (rtu, respiračních orgánů, jícnu, čípku děložního, vulvy, vagíny), 2x zvýšené riziko malignit hematopoetických a lymfoproliferativních orgánů, i tzv. ZN tkání ovlivněných kouřením. *Frisch* (5) nalezl signifikantně

zvýšené riziko následných ZN respiračních orgánů, rtu, bukalní sliznice, pharyngu, MMK, hemoblastóz. Vyslovil v této souvislosti hypotézu o vlivu kouření na veškerý dleždicový epitel lidského těla. *Friedma (USA)* (4) popsal u pacientů s basaliomů kůže zvýšenou incidenci následných ZN všech topik, plic a MMK. U žen jde zejména o ZN plic, thyreoidey a MMK, u mužů jde o MMK, ZN ledviny, dutiny ústní a jícnu.

• **NMNK jako následný ZN:**
Dánští autoři (7) uvádějí, že zjištění následného NMNK u pacientů s non – Hodgkinským lymfomem mladších 80 let bylo asociováno se signifikantně zvýšenou mortalitou. *Levi* poukazuje kromě jiných následných nádorů u švýcarských žen s primárním ZN prsu též na zvýšený výskyt NMNK (9). Dle *Adami a kol.* (Švédsko) je mezi výskytem non – Hodgkinských lymfomů a NMNK silná asociace. Na jejich zvýšené incidenci v mladším věku se zřejmě podílí zvýšená expozice UV záření (1).

• **Obojí ZN kůže jako následné nádory:**
Řada autorů upozorňuje u VM na zvýšený výskyt následných MMK a NMNK vedle sebe. *Hall* (6) poukazuje u pacientů s non – Hodgkinským lymfomem na zvýšené riziko výskytu MMK v prvních 3 – 10 letech a NMNK v prvních 0 – 2 letech po iniciální diagnóze. Někteří autoři (10, 4) doporučují registraci všech ZN kůže (včetně basaliomů), neboť předpokládají přínos této aktivity pro výzkum i klinickou praxi.

Literatura

- Adami J., Frisch M., Yuen J. et al.: Evidence of an association non – Hodgkin's lymphoma and skin cancer. *B.M.J.* 310 (6993):1491-5, 1995
- Bhatia S., Estrada - Batres L., Maryon T. et al.: Second primary tumors in patients with cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 1999, 86: 2014-20
- Brennan P., Coates M., Armstrong B. et al.: Second primary neoplasms following non – Hodgkin's lymphoma in New South Wales, Australia. *British Journal of Cancer* (2000) 82 (7), 1344-1347.
- Friedma G.D., Tekawa I.S.: Association of basal cell skin cancers with other cancers (United States). *Cancer Causes Control* 2000 Dec 11(10):891-7
- Frisch M., Melbye M.: New primary cancers after squamous cell skin cancer. *Am.J.Epidemiol.* 141(10):916-22 1995
- Hall P., Rosendahl I., Mattson A.: Non – Hodgkin's lymphoma and skin malignancies – shared etiology? *Int.J.Cancer.* 62(5):519-22 1995
- Hjalgrim H., Frisch M., Storm H.H. et al.: Non melanoma skin cancer may be a marker of poor prognosis in patients with non – Hodgkin's lymphoma. *Int.J.Cancer.* 85, 639-642 (2000)
- Levi F., La - Vecchia C., Randimbison L. et al.: Incidence of invasive cancers following cutaneous malignant melanoma. *Int.J. Cancer* 72(5):776-9 1997
- Levi F., Randimbison L., La Vecchia C.: Second primary cancers in breast cancer patients in Vaud, Switzerland. *Cancer Causes and Control.* 1998, 9, pp 463-465
- Milán T., Pukkala E., Verkasalo P. K. et al.: Subsequent primary cancers after basal – cell carcinoma: A nationwide study in Finland from 1953 to 1995. *Int.J.Cancer.* 87, 283-288 (2000)
- Riou J.P., Ariyan S., Brandow K.R. et al.: The association between melanoma, lymphoma and other primary neoplasms. *Arch.Surg.*130(10):1056-61 1995
- Schenk M., Severson R.K., Pawlisch K.S.: The risk of subsequent primary carcinoma of the pancreas in patients with cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 82 (9): 1672-6 1998
- Swerlow A.J., Storm H.H., Sasieni P.D.: Risks of second primary malignancy in patients with cutaneous and ocular melanoma in Denmark, 1943-1989. *Int.J.Cancer* 61(6):773-9 1995
- Travis L.B., Curtis R.E., Storm H. et al.: Risk of second malignant neoplasms among long – term survivors of testicular cancer. *J.Nati.Cancer Inst.* 89(19):1429-39 1997
- Wassberg C., Thörn M., Yuen J. et al.: Cancer risk in patients with earlier diagnosis of cutaneous melanoma *in situ*. *Int.J.Cancer.* 83, 314-317 (1999).
- Wassberg C., Thörn M., Yuen J. et al.: Second primary cancers in patients with cutaneous malignant melanoma: a population – based study in Sweden. *Br.J.Cancer* 73(2):255-9 1996
- Wassberg C., Thörn M., Yuen J.: Second primary cancers in patients with squamous cell carcinoma of the skin: a population – based study in Sweden. *Int.J.Cancer.* 80, 511-515 (1999)

MONITOROVÁNÍ DENDRITICKÝCH BUNĚK A JEJICH PODTYPŮ V PRŮBĚHU LÉČBY NEMOCNÝCH S MNOHOČETNÝM MYELOMEM

MONITORING OF DENDRITIC CELLS AND THEIR SUBSETS DURING TREATMENT IN MULTIPLE MYELOMA

KOVÁŘOVÁ, L.¹; SVOBODNÍK, A.³; BÜCHLER, T.²; MUSILOVÁ, R.²; VÁŇOVÁ, P.²; KLABUSAY, M.¹; KREJČÍ, M.¹; ADAM, Z.¹; HÁJEK, R.^{1,2}

¹ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

² ODD. KLINICKÉ HEMATOLOGIE FN BRNO

³ CENTRUM BIostatistiky A ANALÝZ, PŘF A LF MU BRNO

Souhrn : Východiska : V této studii bylo hodnoceno zastoupení subtypů dendritických buněk (DB) - DB1, DB2 - pacientů s mnohočetným myelomem (MM) před počátkem léčby a v jejím průběhu. Metody a výsledky : Flowcytometrické stanovení počtu DB periferní krve bylo prováděno na základě pozitivní exprese povrchových antigenů - CD83 společně s HLA-DR, CD11c a CD123. Kontrolní skupina zdravých jedinců (n = 15; průměr 0,62±0,06% CD83+ buněk; poměr DB1/DB2 = 2,5) nevykazovala statisticky významný rozdíl při srovnání se vstupním hodnocením pacientů před léčbou (n = 15; 0,59±0,13% CD83+ buněk; DB1/DB2 = 2,17). U léčených pacientů (n = 10) došlo po indukční léčbě VAD (vincristin + adriamycin + dexamethazon) k nárůstu celkového počtu DB (0,84±0,4%; DB1/DB2 = 1,59) ve srovnání s počátečními hodnotami, po aplikaci G-CSF počet DB poklesl (0,66±0,6%; DB1/DB2 = 3,71). Nejnižších hodnot celkového počtu DB bylo dosaženo v aferézním produktu (0,36±0,2%; DB1/DB2 = 4,75). Aplikace GM-CSF vyvolala zvýšení počtu DB (0,56±0,3%; DB1/DB2 = 1,59) a v 6. měsíci po transplantaci se obnovila předléčebná hladina DB (0,83±0,6%; DB1/DB2 = 3,92). Závěr : Nejvyšší počty DB byly zjištěny po indukční léčbě a v šestém měsíci po transplantaci. Poměr DB1/DB2 vyzněl pro relativní převahu typu DB1, nejvyšší byl v aferézním produktu a v periferní krvi šestého měsíce po transplantaci.

Klíčová slova : dendritické buňky, mnohočetný myelom, imunoterapie

Summary : Background : In this study was evaluated the proportion of dendritic cells (DC) subsets - DC1, DC2 - in peripheral blood of patients with multiple myeloma (MM) before and during treatment. Methods and results: Flowcytometric determination of DC in the peripheral blood was based on the positive expression of surface antigens - CD83 in combination with HLA-DR, CD11c and CD123. No significant differences were found in initial values between the group of healthy volunteers (n = 15; mean count of CD83+ cells was 0,62±0,06%; ratio DC1/DC2 = 2,5) and the group of patients before treatment (n = 15; 0,59±0,13% CD83+; DC1/DC2 = 2,17). In the group of patients (n = 10), after induction treatment with VAD regimen (vincristin, adriamycin, dexamethason), mean percentage of DC (0,84±0,4% CD83+ cells; DC1/DC2 = 1,59) was higher than initial values. Administration of the G-CSF reduced the total DC numbers (0,66±0,6%; DC1/DC2 = 3,71). The lowest total DC counts were in the apheresis products (0,36±0,2%; DC1/DC2 = 4,75). Administration of the GM-CSF increased DC numbers (0,56±0,3%; DC1/DC2 = 1,59). Pre-treatment DC values were reached in the six months after transplantation (0,83±0,6%; DC1/DC2 = 3,92). Conclusions : The highest number of total DC was found after induction treatment and in the six months after transplantation. Ratio DC1/DC2 showed the relative predominance of DC1 subtype, the highest ratio was found in the apheresis products and in peripheral blood six months after transplantation.

Key words : dendritic cells, multiple myeloma, immunotherapy

Úvod

Dendritické buňky jsou účinné antigen-prezentující buňky, jež jsou schopny pohltit cizorodý antigen (Ag) a opracovaný jej následně nabídnout T lymfocytům, čímž může dojít k vyvolání primární T buněčné odpovědi (Hart, Blood 1997). Ve spojení s vhodným nádorovým antigenem lze indukovat protinádorovou imunitu u pacientů s MM (Kwak, Seminar Hematol 1999). DB se tak jeví vhodnými buňkami pro imunizační protokoly a pro přípravu protinádorových vakcín.

Vlastnosti, fenotyp a funkční stav DB jsou závislé na typu prekurzoru a stupni zralosti. Nezralé dendritické buňky periferní krve exprimují pouze omezenou řadu antigenů, přičemž aktivací se jejich repertoár rozšiřuje a exprese sílí. DB nesou na svém povrchu specifické znaky pro DB linii (CMRF-44, CMRF-56, CD83, S100), znaky makrofágů (CD68), znaky lymfoidních a myeloidních linií (CD4, CD5, CD13, CD33), Fc receptory (CD64, CD32), kostimulační molekuly (CD40, CD80, CD86), adhezní molekuly (CD11a, CD11c, CD50,

CD54, CD58, CD102), běžné leukocytární antigeny (CD45, CD45) a antigeny hlavních histokompatibilních tříd (HLA-ABC, -DP, -DQ, -DR) (Hart, Blood 1997). Jelikož prozatím neexistuje specifická metoda pro určení počtu DB v periferní krvi, bývají tyto často stanovovány jako buňky negativní z hlediska liniových znaků (lin⁻) a zároveň silně HLA-DR pozitivní, případně pozitivní z hlediska znaku CMRF44 a negativní v rámci znaků CD19 (exprimován B-lymfocyty) a CD14 (exprimován monocyty) (Fearley, Blood 1999). Exprese povrchového markeru CD83 - liniového znaku DB - je přičítána zejména aktivovaným či zralým DB. CD83 je 45kD transmembránový protein, člen imunoglobulinové (Ig) rodiny, skládá se z jednoduchého typu Ig extracelulární domény a C-terminálního cytoplasmatického konce. Antigen CD83 se nachází zejména na folikulárních dendritických buňkách, cirkulujících dendritických buňkách, interdigitujících DB v lymfatických tkáních, na *in vitro* generovaných DB a thymových dendritických buňkách. Jeho exprese však není omezena jen

na DB, CD83 je také exprimován v některých germinálních centrech B buněk a u některých lymfoblastoidních buněčných liniích. Ačkoliv jeho funkce dosud není známa, může hrát roli v mezibuněčných interakcích při prezentaci Ag (Lechmann, J Exp Med 2001).

Nezralé DB periferní krve a nelymfatických tkání vykazují vysokou fagocytární aktivitu a slabou schopnost stimulovat T lymfocyty. Po setkání s Ag a jeho zpracování (fagocytóza Ag, makropinocytóza extracelulární tekutiny nebo receptorem zprostředkovaná endocytóza) (Sallustio, J Exp Med 1995), dochází k jejich maturaci a diferenciaci, což je provázeno snížením schopnosti pohltit Ag, zvýšenou expresí kostimulačních a adhezivních molekul (Banchereau, Nature 1998) a migrací DB do sekundárních lymfatických orgánů, kde se uplatňuje zvýšený stimulační potenciál pro aktivaci a následnou proliferaci T buněk (Hart, Blood 1997). Proces vyzrávání je kontrolován signály v mikroprostředí DB, může též být indukován zánětlivými faktory, cytokiny atd. Je zřejmé, že přítomnost různých vývojových stádií DB je důležitá pro komplexní imunitní odpověď organismu (Hájek, Medical Oncology 1999).

V periferní krvi se dendritické buňky vyskytují ve velmi nízkém počtu 0,1-1% všech mononukleárních buněk (McCarthy, Immunology 1997). U lidí byly charakterizovány prozatím minimálně tři podtypy DB: CD14+CD11c+ monocyty, CD14-CD11c-IL3R α + plazmatocytoidní buňky, CD14-CD11c+ cirkulující DB (Brossart, Exp. Hematology 2001). Donedávna byly DB děleny dle svého původu, funkce a lokalizace do 2 populací – myeloidní a lymfoidní – navzájem se lišících v expresi CD8 α (Banchereau, Nature 1998). Soudilo se, že myši splenicke CD8 α DB (myeloidní) mohou indukovat T buněčnou proliferaci a iniciovat imunitní odpověď zatímco CD8 α ⁺ DB (lymfoidní) inhibují T proliferaci a naopak indukují Fas/FasL-mediovanou apoptózu CD4+ lymfocytů, a tedy hrají roli v periferní toleranci a negativní selekci v thymu (Suss, J Exp Med 1996). Tyto 2 subpopulace se také liší ve schopnosti prezentace antigenu T lymfocytům a *in vivo* studie navíc ukázaly, že antigenem ovlivněné CD8 α ⁺ DB řídí rozvoj T helper 1 (Th1) podtypu imunitní odpovědi a CD8 α DB se uplatňují v T helper 2 (Th2) podtypu imunitní odpovědi (Maldonado-Lopez, J Exp Med 1999). Bylo zjištěno, že CD8 α není markerem lymfoidního původu, oba subtypy u myši pocházejí z běžných myeloidních prekurzorů sleziny a thymu. Lze tedy předpokládat, že rozdíl ve funkci a fenotypu rozdílných subtypů DB je podmíněn mikroprostředím tkáně a maturačním stavem DB (Traver, Science 2000).

V této práci byly identifikovány a enumerovány dva níže uvedené podtypy dendritických buněk. Buňky DB1 s expresí CD14-CD11c+CD13+CD33+ vyžadují pro své přežívání GM-CSF a po stimulaci mají schopnost sekrece IL-12. Tyto DB aktivují nezadané T lymfocyty, řídí jejich diferenciaci směrem k Th1 imunitní odpovědi a generují tak protinádorovou imunitu. Podtyp DB2 s expresí CD14-CD11c-CD4+CD123+ vyžaduje pro dozrání IL-3 a v reakci na viry se jeví zdrojem INF typu I (Arpinati, Blood 2000; Brossart, Exp. Hematology 2001). Může vyvolat diferenciaci T buněk do Th2 imunitní odpovědi a modulovat rozvoj akutní „graft versus host disease“ (aGvHD) po allogenní transplantaci periferních kmenových buněk (PBSC) (Böck, ASH 2001), případně indukovat toleranci (Pullarkat, ASH 2001). Arpinati předpokládá, že ztráta cirkulujících DB2 může být spojena s rozvojem akutní či chronické GvHD (EBMT, 2002). Výhodnocením počtu těchto podtypů a poměru D1/D2 byl získán údaj o množství dendritických buněk v různých fázích léčby pacientů s mnohočetným myelomem. Tato data budou následně využita k určení nejvýhodnější doby sběru DB pro možnou expanzi dendritických buněk za účelem výroby nádorových vakcín.

Materiál a metody

Pacienti: Vzorky periferní krve byly získány od pacientů s MM naší kliniky (n = 10), kteří podstoupili vysokodávkovanou che-

moterapii s autologní transplantací periferních kmenových buněk. Odběry byly prováděny do EDTA v těchto daných časových intervalech, se současným stanovením krevního obrazu pacientů pro určení absolutního počtu DB: 1) po ukončení indukční chemoterapie (4 x VAD), 2) po stimulaci cyklofosfamidem CFA (5 mg/m²) a G-CSF (5 - 10 μ g/kg) - při leu > 5x10⁹/l, 3) ve štěpu periferních kmenových buněk (PBSC), 4) po provedení autologní transplantace (s přípravným režimem - jednorázovou dávkou melfalanu 200 mg/m²) následované aplikací GM-CSF (5 μ g/kg, od 7. dne po transplantaci) - při leu > 5x10⁹/l a 6. měsíc po transplantaci. Hodnocení počtu DB před léčbou bylo provedeno na odlišném vzorku neléčených pacientů při jejich vstupním vyšetření (n = 15). Jako kontrola vstupního hodnocení pacientů byla analyzována také periferní krev zdravých jedinců (n = 15).

Metodika: 50 μ l periferní krve (případně 10 μ l PBSC) bylo 20 minut inkubováno s 3x3 μ l monoklonálních protilátek. Použity byly tyto trojkombinace protilátek: antiCD83-TC/antiHLA-DR-FITC/antiCD11c-PE (vše Caltag, Burlingame, CA, USA) nebo antiCD83-TC/antiHLA-DR-FITC/antiCD123-PE (Caltag a Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Pro nastavení přístroje byla použita negativní izotypová kontrola - mouse IgG3-FITC/IgG2a-PE/IgG1-TC (Caltag, USA). Erytrocyty byly odstraněny lyzací kyselinou mravenčí a vzorek byl fixován paraformaldehydem. Flowcytometrická analýza byla provedena na přístroji Epics XL (Beckman Coulter, Florida, USA), kde byla metodou třibarevné imunofluorescence sledována současná leukocytární exprese výše uvedených znaků charakterizujících daný podtyp dendritických buněk.

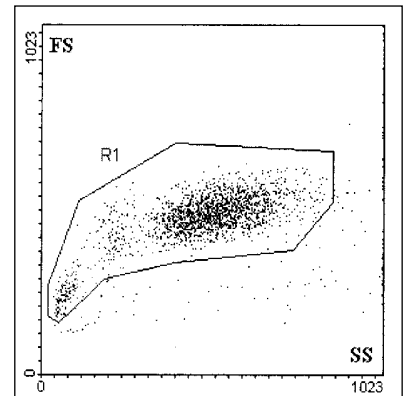
Statistika: Cílem analýzy bylo srovnání hodnot vybraných znaků dendritických buněk u zdravých jedinců a u pacientů s mnohočetným myelomem, u pacientů byly dále analyzovány časové změny v hodnotách povrchových markerů v průběhu léčby. Pro deskriptivní účely byly v analýze použity základní statistické grafy (Box-Whisker ploty, kategorizované sloupcové a korelační diagramy) a statistické tabulky. U spojitých parametrů byly vypočteny základní statistické ukazatele (průměr, medián, SD a příslušné kvantily). Při analýze korelačních vztahů byl využit neparametrický Spearmanův korelační koeficient RS, při srovnání kontrolní skupiny a vstupních hodnot pacientů byl aplikován Mann-Whitney U test a při srovnání hodnot markerů v průběhu léčby Wilcoxonův párový test. Statistické testy byly hodnoceny na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky

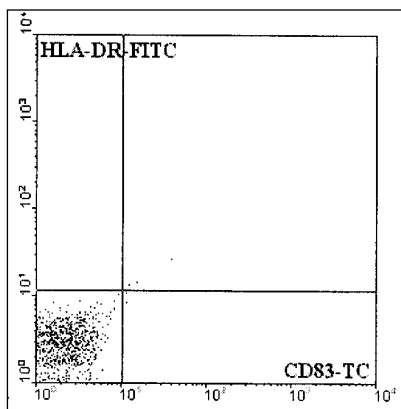
Jako hlavní antigen charakterizující dendritické buňky byl zvolen aktivační povrchový znak CD83, který společně s podskupinou hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) – HLA-DR slouží k identifikaci dendritických buněk (Fearnley, Blood 1999). Stanovení procenta DB jednotlivých subpopulací z leukocytů plné periferní krve (obr. A) bylo provedeno po nastavení parametrů přístroje dle negativní izotypové kontroly (obr. B). Analyzována byla populace předpokládaných dendritických buněk CD83+HLA-DR+ (obr. C), na kterých

Obr. A, B, C, D:

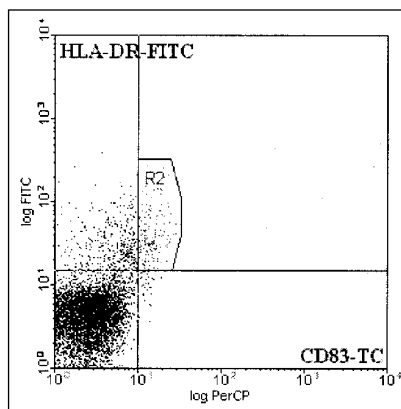
Flowcytometrická analýza: (A) leukocytární gate R1 = side scatter vs. forward scatter, (B) negativní izotypová kontrola (C) exprese CD83-TC/HLA DR-FITC - předpokládané dendritické buňky se nacházejí v gate R2, (D) exprese znaku CD11c-PE na populaci CD83+HLA DR+



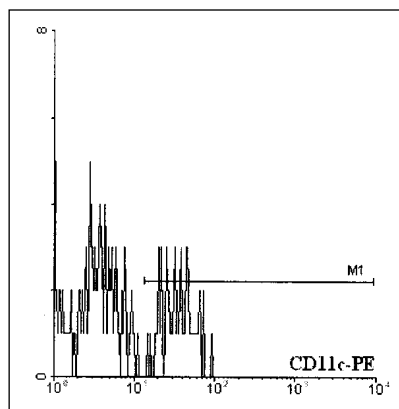
B



C



D



Tab. 1: Zastoupení srovnávaných markerů u kontrolní skupiny zdravých osob (n=15) a kontrolní skupiny pacientů před léčbou (n=15) – (A) - procenta, (B) - absolutní počty.

Tab. 1A

hodnocené znaky	kontrolní skupiny - rel. počty [průměr±SD] - %		p-value
	zdraví (n=15)	pacienti (n=15)	
DB1	0,25±0,12	0,26±0,11	0,468
DB2	0,10±0,05	0,12±0,10	0,885
DB1/DB2	2,50	2,17	
CD 83+	0,62±0,06	0,59±0,13	0,191
DR+	11,01±2,15	10,34±4,01	0,983
11c	1,84±0,33	1,93±0,74	0,206
123	1,70±0,33	1,41±0,61	0,290

Tab. 1B

hodnocené znaky	kontrolní skupiny - abs. počty [průměr±SD] - (x10 ⁹ /l)		p-value
	zdraví (n=15)	pacienti (n=15)	
DB1	1,23±0,56	1,35±0,49	0,395
DB2	0,54±0,23	0,52±0,31	0,663
DB1/DB2	2,28	2,60	
CD 83+	3,26±0,57	3,22±1,15	0,724
DR+	58,21±18,03	54,41±29,03	0,254
11c	9,59±2,12	9,92±4,21	0,724
123	8,93±2,55	7,44±3,71	0,178

Tab. 2: Četnost markerů (%) u skupiny pacientů (n=10) v průběhu léčby, znak CD123 hodnocen u 7 osob, rozdílne apostrofy v rámci řádku značí statisticky významnou odlišnost (A se liší od B, ale neliší od AB apod.)

hodnocené znaky	časový průběh léčby - rel. počty [průměr±SD] - %				
	po indukci	po G-CSF	štěp	po GM-CSF	6 M po T
DB1	0,46±0,39 A	0,52±0,68 A	0,19±0,15 A	0,46±0,47 A	0,47±0,67 A
DB2	0,29±0,27 A	0,14±0,16 AB	0,04±0,06 B	0,29±0,32 A	0,12±0,11 AB
DB1/DB2	1,59	3,71	4,75	1,59	3,92
CD 83+	0,84±0,4 A	0,66±0,6 AB	0,36±0,2 B	0,56±0,3 AB	0,83±0,6 A
HLA DR+	8,45±4,15 A	3,42±2,16 B	6,03±5,29 ABC	14,19±12,66 AC	12,57±7,63 AC
CD11c+	3,42±1,99 A	0,96±0,48 B	2,19±3,89 AB	5,46±12,60 AB	2,19±1,10 A
CD123+	2,53±4,02 A	0,71±0,60 BC	0,43±0,22 C	3,72±5,04 A	1,43±0,29 AB

byl dále sledován výskyt antigenu CD11c nebo CD123 (obr. D). Sledování znaku CD123 bylo započato až v průběhu této studie, jeho hodnocení bylo provedeno u 7 pacientů. Absolutní hodnoty DB byly přepočteny dle množství leukocytů. Hodnocení exprese znaku CD83 na leukocytech se ukázalo jako komplikované, neboť hranice mezi autofluorescencí negativních buněk a specifickou fluorescencí pozitivních buněk byla často nezřetelná.

Referenční vzorky 15 zdravých jedinců se pohybovaly v rozmezí 0,41-0,83 % CD83+ buněk (průměrně 0,62%) - (absolutní počty v rozmezí 2,10-5,04x10⁹/l) a nelišily se statisticky významně od kontrolních vstupních dat 15 pacientů 0,37-0,94 % CD83+ buněk (průměrně 0,59%) - (1,62-7,52x10⁹/l) (tab. 1A, 1B). Počty DB v rámci jednotlivců vykazovaly velké intraindividuelní rozdíly, což může být způsobeno jednak fluktuacemi v širším rozmezí normálních hodnot či cyklickými variacemi DB periferní krve (Fearley, Blood 1999).

U léčených pacientů po indukční léčbě VAD vzrostl počet DB na 0,84% CD83+ (DB1 = 0,46%; DB2 = 0,29%), aplikace G-CSF způsobila snížení počtu CD83 pozitivních buněk na 0,66%, ale současně zvýšení počtu DB1 (DB1 = 0,52%; DB2 = 0,14%). V autologním štěpu jsme zaznamenali nejnižší množství DB (0,36% CD83+; DB1 = 0,19%; DB2 = 0,04%), jednalo se pravděpodobně o relativní snížení způsobené převahou PBSC. Po podání GM-CSF se počty DB opět zvyšovaly (0,56% CD83+, DB1 = 0,46%; DB2 = 0,29%), s převahou podtypu D1 nad D2. V době okolo 6. měsíce po transplantaci došlo k dalšímu vzestupu počtu DB (0,83% CD83+, DB1 = 0,47%; DB2 = 0,12%), pravděpodobně byla obnovena hladina odpovídající období před léčbou (viz tab. 2).

Bylo zjištěno vyšší zastoupení dendritických buněk podtypu DB1 (83+HLA-DR+11c+) ve srovnání s DB2 (83+HLA-DR+123+), a to u kontrolních vzorků (vstupní DB1/DB2 = 2,5) i nemocných (vstupní DB1/DB2 = 2,17; po indukci DB1/DB2 = 1,59; po G-CSF DB1/DB2 = 3,71; ve štěpu DB1/DB2 = 4,75; po GM-CSF DB1/DB2 = 1,59; 6M po trans-

plantaci DB1/DB2 = 3,92). Vzhledem k tomu, že skupina pacientů se vstupním hodnocením před léčbou není totožná se skupinou hodnocenou v průběhu léčby, nebyly tyto dvě skupiny směřovány pro určení statistické významnosti rozdílu počtu DB.

Diskuse

Identifikace DB periferní krve je ztížena absencí specifického povrchového markeru, který by umožnil jejich jednoznačné stanovení. Jelikož neaktivované DB periferní krve neexprimují ve vysoké míře žádné další leukocytární markery, v praxi se tedy využívá silné exprese HLA-DR molekul v kombinaci s negativitou na znaky buněčných linií (Hart, Blood 1997). Je však prokázáno, že populace lin⁺HLA-DR⁺ je velmi heterogenní a dává vzniknout rozdílným buněčným populacím – mezi jinými také non-DB fibrocytům (Chesney, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1997), tudíž se takovéto hodnocení počtu DB může stát zdrojem chyb (Fearnley, Blood 1999). Množství lin⁺HLA-DR⁺ buněk je také zvýšeno u některých nemocí, zejména při vyplavování hematopoetických prekurzorů do periferní krve, což opět svědčí proti použití této metodiky stanovení DB (Reid, J Immunol 1992).

Také námi zvolený povrchový znak CD83 se vyskytuje ve vyšší míře až na aktivovaných či diferencovaných dendritických buňkách (Hart, Blood 1997). Buňky nesoucí tento znak byly zaznamenány teprve po několikeré izolaci a krátké kultivaci mononukleárních buněk (MNC) periferní krve (Markowicz, Arch Immunol Ther Exp 2001; Luft, J Immunol 1998). Je tedy zřejmé, že hodnocení exprese aktivačního znaku CD83 na leukocytech periferní krve je zatíženo vysokou chybou. Nelze však předpokládat, že se DB exprimující tento znak v periferní krvi nevyskytují, neboť proces maturace a s ním spojená exprese znaku CD83 by měly být zahájeny bezprostředně po setkání antigenem. Při svém putování z periferní krve do sekundárních lymfatických orgánů by takovéto dendritické buňky měly být odhaleny navzdory svému nízkému počtu. Určitou možnost skýtá hodnocení pouze přes populaci MNC či opakovaně odečtené exprese znaků. Zmínit lze také zvýšení koncentrace MNC prostřednictvím separátorů, kdy - po odstranění lymfocytů z odseparovaných mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) a následné kultivaci s vhodnými cytokiny - lze získat buňky vykazující morfologii DB (Rouard, ASH 2001). Hart provedl další purifikaci PBMC na základě magnetické separace prostřednictvím specifických protilátek CMRF-44, CMRF-56 a získal populaci DB v dostatečném množství a kvalitě pro imunoterapeutické účely (Hart, ASH 2001). Separace MNC by tedy mohla usnadnit hodnocení DB periferní krve v důsledku relativního zvýšení počtu buněk exprimujících hodnocený marker CD83.

V současné době se objevilo také několik nových monoklonálních protilátek k hodnocení zastoupení DB i jejich podtypů. Jsou to např. protilátka vůči znaku ILT3 exprimovanému všemi DB na různých úrovních maturace (Immunotech, Coulter Company) a protilátka proti BDCA2 antigenu specifickému pro DB2 (Miltenyi Biotec). Je zřejmé, že nalezení dalších specifických protilátek proti znakům exprimovaným dendritickými buňkami může velmi usnadnit jejich hodnocení, které bylo prozatím zatíženo chybami.

O kinetice dendritických buněk periferní krve prozatím není příliš mnoho známo. Naše výsledky však ukazují, že indukční léčba VAD vyvolala zvýšení počtu DB (DB1 i DB2) vzhledem k neléčeným pacientům a zdravým kontrolám. Nutno

podotknout, že jsou zde srovnávány odlišné skupiny pacientů, je tedy možné, že mezi těmito existuje posun v hodnocení exprese povrchových znaků.

Po aplikaci G-CSF jsme našli, při současném poklesu exprese CD83, snížení počtu DB2, zatímco počty DB1 vzrostly. Naopak Hart zjistil, že stimulace zdravých dárců pomocí G-CSF neměnila počet CD11+ DB, přičemž počty CD123+ DB se zvýšily a korelovaly se snížením CD62L-selektinu (ASH 2001). Také Bolwell popisuje zvýšený výskyt DB2 u G-CSF stimulovaných dárců ve srovnání se stimulací pomocí kombinace G-CSF + VP-16 (Etoposid) (ASH 2001). Je možné, že mobilizace PBSC způsobuje nižší stimulaci buněčných prekurzorů a tedy pozastavení tvorby DB, případně G-CSF přímo či nepřímo ovlivňuje produkci DB. Tomu by také odpovídalo postupné obnovování jejich počtu po transplantaci (Fearnley, Blood 1999), G-CSF pravděpodobně mění adhezní fenotyp a migrační schopnosti DB periferní krve (Hart, ASH 2001).

Nejnižší počty DB byly nalezeny ve štěpu PBSC, což odpovídá relativní převaze kmenových buněk přednostně exprimujících znak CD34. Tyto kmenové sice buňky patří, spolu s monocytů, mezi zdrojové buňky pro expanzi DB *in vitro*, ale je zřejmé, že znaky DB vykazují až po kultivaci s určitými cytokiny. Nicméně tyto CD34+ buňky napomáhají obnově DB linie. Tzolas provedl studii s dárcovskými DB a zjistil, že vyšší počet DB1 v allogenním PBSC transplantátu je spojen s akutnější GvHD (ASH 2001). Reddy sledoval množství DB a jejich podtypů v době allogenní transplantace, kdy vyšší % cirkulujících DB bylo spojeno s pozdějším relapsem a tedy prodlouženým přežíváním (ASH 2001). Je tedy možné, že monitorováním počtu DB periferní krve po transplantaci a srovnáním s jejich předtransplantačními hodnotami, lze předpovědět relaps pacientů.

Stimulace prostřednictvím GM-CSF napomáhající obnově krevetvorby po transplantaci se projevila na vzrůstu počtu DB na přibližně normální hodnotu málo odlišnou od vstupních měření. Následné hodnocení v 6. měsíci po transplantaci se statisticky významně nelišilo od předchozího, pouze se zvýšil počet CD83+ buněk. Předpokládáme, že počty DB se vracejí k normálním předléčebným hodnotám již v několika dnech po aplikaci GM-CSF, což je v soulase se studií Fearnleye (Blood 1999).

Závěr

Hodnocení počtu dendritických buněk cirkulujících v periferní krvi bylo komplikováno nízkou expresí znaku CD83 na leukocytech. Buňky s pozitivní expresí tvoří menšinou špatně hodnotitelnou populaci, proto by bylo vhodné provést srovnání hodnocení DB s některou z nových komerčně dostupných protilátek. Přesto se nám podařilo zhodnotit relativní počty obou podtypů dendritických buněk a prokázat změny v jejich poměru DB1/DB2 u pacientů s mnohočetným myelomem v průběhu léčby. Kontrolní vzorky zdravých jedinců nevykazovaly při srovnání se vstupním hodnocením nemocných statisticky významný rozdíl v žádném ze sledovaných parametrů. Nejvyšší procento CD83+ buněk bylo odečteno v periferní krvi pacientů po indukční léčbě VAD a v 6. měsíci po transplantaci, nejvyšší poměr DB1/DB2 byl nalezen v autologním štěpu a v periferní krvi v 6. měsíci po transplantaci.

Tato práce je podpořena grantem GAČR 301/00/0405 a výzkumným záměrem MZČR 00065269705.

Literatura:

1. Hart DNJ: Dendritic cells: Unique leucocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997, **90**: 3245-3587
2. Kwak LW, Thielemans K, Massaia M: Idiotypic vaccination as therapy for multiple myeloma. *Semin Hematol.* 1999, **36**: 34-7
3. Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNJ: Monitoring

human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation, *Blood* 1999, **93**: 728-36

4. Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhn C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A: The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells, *J Exp Med.* 2001, **194**:1813-21

5. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products, *J Exp Med*. 1995, **182**:389-400
6. Banchereau J, Steinmann RM: Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 1998, **392**: 245-52
7. Hájek R, Butch AW: Dendritic cell biology and the application of dendritic cells to immunotherapy of multiple myeloma, *Med Oncol*. 2000, **17**: 2-15
8. McCarthy DA, Macey MG, Bedford PA, Knight SC, Dumonde DC, Brown KA: Adhesion molecules are upregulated on dendritic cells isolated from human blood, *Immunology* 1997, **92**: 244-51
9. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L: Dendritic cells in cancer vaccines, *Exp Hematol*. 2001, **29**:1247-55
10. Suss G, Shortman K: A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis, *J Exp Med*. 1996, **183**:1789-96
11. Maldonado-Lopez R, De Smedt T, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Maliszewski CR, Moser M: Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo, *J Leukoc Biol*. 1999, **66**: 242-6
12. Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL: Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor, *Science* 2000, **290**: 2152-4
13. Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C: Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells, *Blood* 2000, **95**: 2484-90
14. Böck SH, Pihusch M, Heller T, Schoch C, Haferlach T, Diem H, Rolf B, Pihusch R, Hiller E, Hiddemann W, Kolb HJ: Chimerism of Peripheral Blood Dendritic Cells in Patients after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation, *American Society of Hematology* 2001, abstract **789**
15. Pullarkat VA, Scotland R, Schultz WE, Chakrabarti D, Weber JS: Lymphoid Dendritic Cells Mobilized with Progenipoin Induce Th1 and Peptide-Specific Cytotoxic T Cell Responses, *American Society of Hematology* 2001, abstract **1254**
16. Arpinati M, Chirumbolo G, Bandini M, Stanzani S, Falcioni B, Urbini V, Martelli FR, Bacarani M, Tura S, Rondelli D: Graft versus host disease affect DC-2 recovery after allogeneic transplantation, *EBMT* 2002, poster **661**
17. Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R: The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94**: 6307-12.
18. Reid CD, Stackpole A, Meager A, Tikerpa J: Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow, *J Immunol*. 1992, **149**: 2681-8
19. Markowicz S, Skurzak HM, Walewski J: A method for directly determining the number of dendritic cells and for evaluation of their function in small amounts of human peripheral blood, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001, **49**: 51-7
20. Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J: Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells, *J Immunol*. 1998, **161**: 1947-53.
21. Rouard H, Reys S, Taylor L, Beaujean F, Marquet J, Andreu G, Delfau-Larue MH, Farcet JP, Leon A: Highly Purified Monocytes for Dendritic Cells Differentiation Using the Closed Single Use Cobe Spectra CPS System, *American Society of Hematology* 2001, abstract **5127**
22. Hart DN, Bioley G, Ho CH, Turtle CJ, Vuckovic S, Crossbie GV, Munster D, Wright S, Taylor K, Rodwell R, Lopez JA: A Human Dendritic Cell Purification Platform for Clinical Applications, *American Society of Hematology* 2001, abstract **1575**
23. Bolwell BJ, Sobecks R, Pohlman B, Andresen S, Bell K, Bernhard L, Koennecke J, Serafino S, Ostendorf H, Kuczkowski E, Rybicki L, Jarvis J, Kalaycio M: Etoposide (VP-16) + G-CSF Mobilizes Different Dendritic Cells Subsets Than Does G-CSF Alone, *American Society of Hematology* 2001, abstract **756**
24. Tzolas AC, Devidas M, Iturraspe J, Boyette R, Sugrue M, Wingard JR, Reddy V: Type 1 Dendritic Cells (DC1) in Allogeneic Donor Peripheral Blood Stem Cell Product Are Associated with an Increase in Acute Graft-Versus-Host Disease, *American Society of Hematology* 2001, abstract **849**
25. Reddy V, Tzolas AC, Devidas M, Iturraspe J, Boyette R, Wingard JR: Circulating Dendritic Cells (DC1 and DC2) at Engraftment Correlate with Relapse and Survival after Allogeneic Stem Cell Transplantation, *American Society of Hematology* 2001, abstract **1742**

knihy

Recenze na monografii prof. MUDr. P. Klenera, DrSc. KLINICKÁ ONKOLOGIE

September 30th, 2002
To the publishers:

There has been a major revolution in oncology in the last 5-10 years. It has gone largely unnoticed by the general population but even more so by doctors including oncologists themselves. Our standard textbooks of oncology had been too descriptive and had become largely outdated.

First, the progress in our understanding of the basic biological process and regulations, which has been explosive, has finally brought fruit in provision of much more specific („design“) drugs for treatments of a specific disorder in the way not envisaged at the time when we treated cancer by non-specific cytoreduction. Second, a gradual recognition that cancer is a chronic condition rather than a one-time event in a person's life resulted in our treating cancer repeatedly using 2nd and 3rd and subsequent lines of therapy. The concomitant progress in the management of side effects of chemotherapy has resulted in patients actually getting better with each chemotherapy delivered. All that has resulted in the current emphasis on clinical trials aiming to improve quality of life rather and perhaps in addition to the improvement of survival.

Treatment of cancer is now thus open to an ever-increasing number of patients as their numbers increase with the increase in the median age of the general population. The cancer treatments are successful. The patients often live long enough to get 2nd or 3rd cancer and the survival in each cancer category is slowly but surely improving every year.

It was thus a great pleasure to receive a truly modern text book of oncology „Klinická Onkologie“ written by Professor Pavel Klener and his team from institutions in Prague and Brno, Czech Republic.

The book encompasses all-important areas of cancer biology, diagnosis, therapy, though not all of them are treated equally. The chapter on epidemiology in particular is quite brief and should be made more exhaustive in future editions of the book.

The chapters on regulation and biology of cancer are modern, well written, with great illustrations and will be very useful to every reader of the book. The chapters, which deal with general effects of radiation and chemotherapy, are particularly useful and quite sufficient for understanding of cancer in general. Palliative care, on the other hand, which now plays a greater role in cancer care, could be enlarged (though there are a number of specific publications in this area and they can be referred to).

The review of individual tumour categories is complete, brief but sufficient as reference material. The medical oncologist will have, of course, supplemented it by reading current literature, specifically in the area of clinical trials.

In general the book is very well written and, with the exception of the above-mentioned areas, well balanced. It should be a basic reference book for every medical oncologist and radio-oncologist. It will be particularly useful to the surgical oncologists. I can highly recommend this book to all internal medicine specialists who will find the book very handy in quick orientation in cancer care area when they encounter patients with cancer in their practice. The book will should also be used by general practitioners at large and since it is so clearly written, nurses interested in oncology will find the book helpful as well.

Congratulations to the author for writing such an informative, clear and up-to-date textbook. I could only wish that such a practical modern book was available in English language as well. We would all use it.

J. F. Prchal, MF, FRCP (C),
Chief Department of Oncology, St. Mary's Hospital,
McGill University, Montreal, Quebec, Canada

CHEMORADIOTERAPIE V NEOADJUVANTNÍ LÉČBĚ KARCINOMU ŽALUDKU

CHEMORADIOTHERAPY IN NEOADJUVANT TREATMENT OF GASTRIC CANCER

PETERA J.¹, DVOŘÁK J.¹, MELICHAR B.¹, KABELÁČ K.², ZOUL Z.¹, VOBOŘIL Z.², HAZUKOVÁ R.³

¹ KLINIKA ONKOLOGIE A RADIOTERAPIE FN HRADEC KRÁLOVÉ

² CHIRURGICKÁ KLINIKA FN HRADEC KRÁLOVÉ

³ UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn: Východiska a cíl: Neuspokojivé výsledky samostatné chirurgické léčby karcinomu žaludku vedou k testování možnosti neoadjuvantní terapie s cílem dosáhnout radikální resekce s mikroskopicky negativními okraji (R0 resekce). Cílem naší retrospektivní studie bylo testovat toleranci neoadjuvantního režimu založeného na chemoterapii s 5-fluorouracilem, cisplatinou a paclitaxelem v kombinaci s radioterapií a jeho efekt na dosažení R0 resekce. **Pacienti a metody:** Od dubna 1999 do listopadu 2001 bylo léčeno 16 pacientů s lokálně pokročilým karcinomem žaludku. Neoadjuvantní chemoradioterapie se skládala ze dvou třítydenních cyklů: 5 fluorouracil 200 mg/m² den 1–21, cisplatina 25 mg/m² den 1, 8, a 15. U 8 pacientů byl připojen paclitaxel 60 mg/m² dny 1, 8 a 15. 7 pacientů obdrželo ještě calcium folicum 45 mg denně dny 1–21. Souběžně s druhým cyklem chemoterapie byla provedena radioterapie dávkou 15 x 2 Gy na oblast žaludku a regionálních lymfatických uzlin. U 5 pacientů byla kombinována s ultrazvukovou hypertermií. Operace následovala do 14 dnů. **Výsledky:** R0 resekce byla dosažena u 12 pacientů (75%). Neoadjuvantní léčba nezvýšila mortalitu ani morbiditu chirurgického výkonu. Neoadjuvantní režim absolvovalo v plánovaném rozsahu 7 pacientů (43%). U zbývajících pacientů musela být intenzita chemoterapie redukována v důsledku hematologické a gastrointestinální toxicity. **Závěr:** Neoadjuvantní chemoradioterapie může vést k dosažení vysokého procenta R0 resekcí, jsou nutné další studie k nalezení optimálního režimu.

Klíčová slova: karcinom žaludku, předoperační chemoradioterapie, tolerance, R0 resekce

Summary: Background and Purpose: Unsatisfactory results of surgery alone lead to testing of neoadjuvant therapy aimed to achieve radical resection with microscopically negative margins (R0 resection). The aim of our study was testing of the tolerance of neoadjuvant regime consisting of 5-fluorouracil, cisplatin and paclitaxel in combination with radiotherapy and its effect on achievement of R0 resection. **Patients and Methods:** From April 1999 to November 2001 16 patients with locally advanced gastric cancer were treated. Neoadjuvant chemoradiotherapy consisted of two 3-week cycles: 5 fluorouracil 200 mg/m² days 1–21, cisplatin 25 mg/m² days 1,8 and 15. Paclitaxel 60 mg/m² days 1, 8 and 15 was added in 8 patients. Calcium folinat 45 mg per day was administered in 7 patients. Radiotherapy of stomach and regional nodes 15 x 2 Gy was applied concomitantly with the second course of chemotherapy. Radiotherapy was combined with ultrasound hyperthermia in 5 cases. The surgery was performed during 14 days after the end of chemoradiotherapy. **Results:** R0 resection was achieved in 12 patients (75%). Neoadjuvant treatment did not increase surgical mortality or morbidity. Neoadjuvant regime was completed in planned extension in 7 patients (43%). In the rest of patients the intensity of chemotherapy has to be reduced due to hematological and gastrointestinal toxicity. **Conclusions:** Neoadjuvant chemoradiotherapy can lead to achievement of high rate of R0 resections. An optimal regime has to be found in new studies.

Key words: gastric cancer, preoperative chemoradiotherapy, tolerance, R0 resections

Úvod

Incidence karcinomu žaludku v České republice představovala podle údajů Národního onkologického registru z roku 1997 2020 nových případů. V témže roce zemřelo na tento nádor 1728 pacientů (1). Tato vysoká mortalita je způsobena nedostatečnými výsledky samotné chirurgické léčby. Pětileté přežití po kurativní resekcí je 52% u stadia T2N0M0, 47% u T3N0M0, 15% u T4N0M0. Uzlinové postižení představuje výrazný negativní prognostický faktor, s pětiletým přežitím 20% u N1 postižení a 10% u N2 postižení. Při pitvách se naleznou v 67% lokoregionální relapsy, v 41% peritoneální relapsy a v 22% se prokážou vzdálené metastázy (2). Dosažení lokoregionální kontroly je důležitým předpokladem úspěchu léčby. Úplné chirurgické odstranění nádoru s mikroskopicky negativními okraji resekce (R0 resekce) je rozhodující pro prognózu pacienta. Z toho vyplývá účelnost neoadjuvantní léčby, jejímž cílem je umožnění resekcí původně inoperabilního tumoru nebo docílení R0 resekce u lokálně pokročilého, ale resekabilního onemocnění.

Předoperační radioterapii u karcinomu žaludku testovaly 4 prospektivní randomizované studie, 3 ruské a jedna čínská. Všechny prokázaly zlepšené přežití u pacientů s předoperační radioterapií (3,4,5,6). Nicméně pro metodologické problémy nejsou tyto studie jednoznačně přijímány v USA a západní Evropě. Slibné výsledky a akceptovatelná toxicita neoadjuvantní chemoradioterapie u karcinomu oesophagu a rekta a chemoradioterapie u neresekabilního či residuálního karcinomu žaludku (7,8,9,10) zvýšily zájem o neoadjuvantní chemoradioterapii karcinomu žaludku.

Na Klinice onkologie a radioterapie FN Hradec Králové je předoperační chemoradioterapie u karcinomu žaludku používána od dubna 1999. V této práci chceme referovat o její toleranci a o efektu na dosažení R0 resekce.

Pacienti a metoda

Od dubna 1999 do listopadu 2001 jsme léčili neoadjuvantní chemoradioterapií celkem 16 pacientů. Z toho bylo 6 žen a 10 mužů. Medián věku byl 54,5 roku (27-70). Ve všech

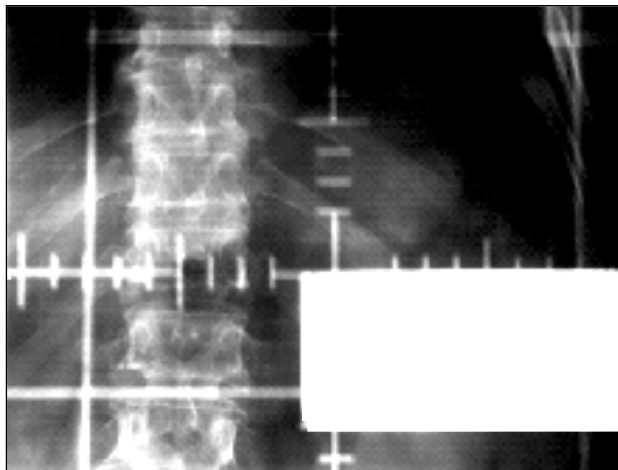
případech se jednalo o adenokarcinom. Jeden pacient byl ve stadiu T2N0, 6 ve stadiu T2N1, 6 pacientů bylo klasifikováno jako T3N1, jeden T4N0, jeden T4N1 a jeden T4N2.

Soubor byl vyhodnocen k 30.11.2001 s medianem sledování u žijících pacientů 5,5 měsíce (3 - 20).

Vstupní vyšetření zahrnovala anamnézu, fyzikální vyšetření, krevní obraz, biochemické vyšetření krve a moče, rentgen plic, ultrazvuk břicha, gastrokopii, spirální CT břicha s kontrastem, endosonografii a endobiopsii.

Neoadjuvantní léčba spočívala u 8 pacientů ze dvou třítydenních bezprostředně na sebe navazujících cyklů chemoterapie: 5 fluorouracil 200 mg/m²/den v kontinuální infuzi den 1-21 a cisplatina 25 mg/m² dny 1,8, a 15. U 8 pacientů byl přidán ještě paclitaxel v dávkách 60 mg/m² dny 1, 8, a 15. Sedm pacientů dostávalo perorálně calcium folicum 3x denně 15 mg dny 1 - 21. Souběžně s druhým cyklem chemoterapie byla provedena radioterapie. Byla ozářována oblast žaludku a regionálních lymfatických uzlin ze dvou protilehlých individuálně tvarovaných polí izocentrickou technikou na lineárním akceleratoru 6 MV nebo 15 MV. Bylo aplikováno 15 frakcí po 2 Gy do izocentra (obr. č. 1). U 5 pacientů byla použita v kombinaci s radioterapií ultrazvuková hypertermie, aplikovaná do 3 hodin po ozáření, s teplotou 42 st C pod povrchem aplikátoru (Sonotherm 1000, Laphthermics Technologies Ing, USA). Byly aplikovány 1 - 4 ohřevy. Operace následovala do 14 dnů po ukončení chemoradioterapie. Sestávala z gastrektomie s lymfadenektomií, laparoskopie a laváže dutiny břišní. Resekát s lymfatickým blokem a cíleně odstraněné lymfatické uzliny byly histologicky vyšetřeny. Pacienti byli po ukončení léčby kontrolováni v 3 měsíčních intervalech, vyšetření zahrnovala anamnézu, fyzikální vyšetření, krevní obraz, biochemické vyšetření krve. Rentgen plic, ultrazvuk břicha, gastrokopie, spirální CT břicha, endosonografie a endobiopsie byly prováděny v šestiměsíčních intervalech.

Obr. č. 1: Ozářovací pole použitá v neoadjuvantní chemoradioterapii karcinomu žaludku



Výsledky

Neoadjuvantní chemoradioterapie proběhla zcela bez komplikací u 7 pacientů (43%).

Radioterapii jen s 5 FU dokončili 3 pacienti a radioterapii bez konkomitantní chemoterapie 4 pacienti. Plánovanou radioterapii nedokončil 1 pacient. 1 pacient byl přerušen na 3 týdny.

Nejčastější komplikace byly hematologické a gastrointestinální. Leukopenie 2. stupně byla pozorována u 5 pacientů, 3. stupně u 2 a 4. stupně u 1 pacienta. Anemie 2. stupně se vyskytla u 6 pacientů.

Průjem 2. a 3. stupně se vyskytl u 3 pacientů, nevolnost a vomitus 2. stupně u 4 pacientů, stomatitis 3. a 4. stupně u 3 pacientů a nechutenství 3. stupně u 2 pacientů. Febrie 2. st se vyskytly u 5 pacientů.

Neoadjuvantní léčba nebyla spojena se zvýšeným výskytem operační morbiditivy.

RO resekce bylo dosaženo u 12 pacientů (75%). Čtyři pacienti byli inoperabilní. U žádného pacienta nedošlo k dosažení patologické kompletní odpovědi.

V době zhodnocení zemřeli 4 pacienti po 3,6, 15 a 12 měsících od diagnózy. 9 pacientů bylo bez známek tumoru, 3 pacienti byli naživu s tumorem.

Diskuse

Špatné výsledky samostatné chirurgické léčby u karcinomu žaludku vedou k zájmu o adjuvantní i neoadjuvantní léčebné postupy. Adjuvantní chemoterapie neprokázala zřetelný benefit ve studiích u pacientů s radikálně operovaným karcinomem žaludku (11). Slibnější se jeví neoadjuvantní postup. Předoperační samostatná radioterapie se osvědčila ve 4 randomizovaných studiích (3,4,5,6), které nicméně nejsou zcela akceptovány a dávky radioterapie nejsou ze současného pohledu dostatečně vysoké. Byla publikována řada studií fáze II se samostatnou předoperační chemoterapií (12,13,14,15,16). Bylo prokázáno, že předoperační chemoterapie může být podána bezpečně bez vzestupu operační morbiditivy a mortality. Množství R0 resekcí po předoperační chemoterapii se pohybuje od 60 do 80%. Nicméně role předoperační chemoterapie není u karcinomu žaludku stále vyjasněna (17) a probíhá hledání nových chemoterapeutických režimů s nižší toxicitou a výraznějším efektem ve srovnání s konvenčními režimy založenými na etoposidu, doxorubicinu, 5 fluorouracilu, cisplatině či mitomycinu C.

Kombinovaná chemoradioterapie má řadu teoretických výhod oproti každé z těchto metod použitých samostatně. Je dosaženo synergního účinku v ozářeném objemu a chemoterapie má šanci postihnout mikrometastázy i v oblastech mimo ozářovaná pole. Chemoradioterapie se s úspěchem uplatnila u některých některých gastrointestinálních tumorů, jako je karcinom rekta, anu, jícnu, pankreatu a v paliativní léčbě karcinomu žaludku. V současné době vypadají velmi nadějně předběžné výsledky studie INT 116, která randomizuje pacienty po kurativní resekci žaludku do ramene s adjuvantní konkomitantní chemoradioterapií a do ramene pouze sledovaného (18). V naší studii s předoperační chemoradioterapií jsme využili kombinace kontinuálně podávaného 5-fluorouracilu, cisplatinu a paclitaxelu. 5 fluorouracil a cisplatina jsou rutinně využívány pro své radiopotenciační vlastnosti (19). Paclitaxel prokázal radiosenzibilizující účinky ve studiích in vitro i in vivo (20,21,22) a byl s úspěchem použit v konkomitantním podání s radioterapií i u karcinomu žaludku (23). Do našeho multimodálního protokolu pro neoadjuvantní léčbu karcinomu žaludku jsme začlenili v některých případech i hypertermii, která potencuje efekt radioterapie zejména v hypoxických oblastech tumoru a byla již u karcinomu žaludku použita (3).

Je předčasně hodnotit přežití u našeho souboru. Bylo však prokázáno, že odpověď na neoadjuvantní léčbu umožňující radikální chirurgickou resekci koreluje s délkou přežití (13). Relativně vysoké procento R0 resekcí v našem souboru se zdá být slibným faktorem z hlediska celkové prognózy.

Režim používaný v našem souboru je však limitován hematologickou a gastrointestinální toxicitou. Za její příčinu považujeme jeho celkovou délku. Na základě zhodnocení předběžných výsledků jsme přistoupili k jeho modifikaci. Nadále používáme režim sestávající z kontinuálního 5 - fluorouracilu v dávkách 200 mg/m² dny 1 -

28, ciplatiny 25 mg/m² dny 1,8,15,22 a paclitaxelu v dávce 60 mg/m² dny 1,8,15,22. Konkomitantně je prováděna aktinoterapie s dávkou 20 x 2 Gy. Vzhledem k nejistotě o teplotě dosahované hypertermií v oblasti tumoru jsme ustoupili od této modality.

Závěr:

Neoadjuvantní konkomitantní chemoradioterapie u pacientů s karcinomem žaludku vede k vysokému procentu R0 resekcí. Je nutné nalézt optimální schéma ke zvýšení efektivity tohoto režimu.

Literatura

1. Mazanova V: Cancer Incidence 1997 in the Czech Republic. ÚZIS ČR, NOR ČR, Prague, 2000, 46.
2. Gunderson LL, Donohue JH, Bruch DA: Stomach. In: Abeloff MD, Armitage JO, Lichter AS, Niederhuber JE(eds): Clinical oncology. Philadelphia, Churchill Livingstone, 2000, 1545 - 1585.
3. Shchepotin IB, Evans SRT, Chorny V: Intensive preoperative radiotherapy with local hyperthermia for the treatment of gastric carcinoma. Surg, Oncol.1994, 3: 37
4. Talaev M, Starinskij VV, Kovalev BN: Results of combined treatment of cancer of the gastric antrum and gastric body. Vopr Onkol 1990, 36: 1485
5. Kosse VA: Combined treatment of gastric cancer using hypoxic radiotherapy. Vopr Onkol 1990, 36: 1349
6. Zhang ZX, Gu XZ, Yin WB: Randomized clinical trial combination on the preoperative irradiation and surgery in the treatment of adenocarcinoma of the gastric cardia (AGC) - report on 370 patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998, 42: 929
7. Moertel CG, Childs DS Jr, Reitemeier RJ: Combined 5- fluorouracil and supervoltage radiation therapy of locally unresectable gastrointestinal cancer. Lancet 1969, 2: 865
8. Holbrook MA: Radiation therapy. Current concepts in cancer. Gastric cancer: treatment principles. JAMA 1974, 228: 1289
9. Schein PS, Novak J (for GITSG): Combined modality therapy (XRT - chemo) versus chemotherapy alone for locally unresectable gastric cancer. Cancer 1982, 49: 1771
10. Chevalier TL, Smith FP, Harter WK, Schein PC: Chemotherapy and combined modality therapy for locally advanced and metastatic gastric carcinoma. Semin Oncol 1985, 12: 46
11. Earte CC, Mazoun JA: Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients. Revisiting a metaanalysis of randomised trials. Eur J Cancer 1999, 35: 1059
12. Ajani JA, Mayer RJ, Ora DM: Preoperative and postoperative combination chemotherapy for potentially resectable gastric carcinoma. J Natl Cancer Inst 1993, 85:1839.
13. Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, et al.: Response to neoadjuvant chemotherapy best predicts survival after curative resection of gastric cancer. Ann Surg 1999, 229: 303.
14. Leichman L, Silberman H, Leichman CG: Preoperative systemic chemotherapy followed by adjuvant postoperative intraperitoneal therapy for gastric cancer: a University of Southern California pilot program. J Clin Oncol 1992,10: 1933.
15. Kelsen D, Karpeh M, Schwartz G: Neoadjuvant therapy of high-risk gastric cancer: a phase II trial of preoperative FAMTX and postoperative intraperitoneal fluorouracil-cisplatin plus intravenous fluorouracil. J Clin Oncol 1996,14: 1818.
16. Kang YK, Choi DW, Im YH: A phase III randomized comparison of neoadjuvant chemotherapy followed by surgery versus surgery for locally advanced stomach cancer. Proc ASCO 1996,15: 215.
17. Sendler A, Stein HJ, Fink V, Siewert JR: New therapy approaches in tumors of the upper gastrointestinal tract (oesophagus, stomach). Chirurg 2000, 71: 1447 - 1457.
18. Karpeh MS, Kelsen DP, Tepper JF: Cancer of the Stomach. In: De Vita V T Jr, Hellman SC, Rosenberg SA (eds): Cancer. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001,1092 - 1121
19. Štampa P: Konkomitantní radiochemoterapie solidních nádoru. KAP CZ, Brno, 2000,67.
20. Tishler RB, Schiff PB, Gerard CR, Hall EJ: A novel radiation sensitizer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992, 22: 613 - 617
21. Gerard CR, Jones JM, Schiff PB: Taxol and radiation. Monogr Natl Cancer Inst 1993, 15: 89 - 94
22. Choy H, Akerly W, Safran H, Clark J, Rege V, Papa A, Glantz M, Puthawala Y, Soderberg C, Leone L.: Phase I trial of outpatient weekly paclitaxel and concurrent radiation therapy for advanced non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 1994,12: 2682 - 2686
23. Safran H, Wanebo HJ, Hesketh PJ, Akerman P: Paclitaxel and concurrent radiation for gastric cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000, 46: 889 - 894

knihy

PEDIATRIC HEMATOLOGY/ONCOLOGY SECRETS

WEINER, M. A., CAIRO, M. S. (EDS.)
Hanley and Belfus, Inc., Philadelphia 2002
243 str., 7 obr., 1 tab., cena 44,95 USD, ISBN 1-56053-444-3

Tato kniha, do níž přispělo 20 autorů z renomovaných pracovišť převážně v New Yorku, přibližuje aktuální hematologickou a onkologickou problematiku dětského věku. Publikace patří do série „skrytých medicínských tajemství“ vydávané nakladatelstvím pro různé obory, jež jsou postupně „odhalována“ formou otázek a odpovědí. Otázky jsou stručně formulovány tak, jak se často vyskytovaly v diskusích u kulatého stolu, v klinické praxi a při ústních zkouškách v rámci postgraduálního vzdělávání. Odpovědi vynikají mimořádnou výstižností a odbornou kvalitou. Četná temata poskytují informace o postavení diagnózy a současně o léčbě analyzované nemoci i o ošetřování nemocných.

Text je rozdělen na dvě části: hematologickou zahrnující 18 kapitol a onkologickou s 27 kapitoly. Dále jsou uvedeny některé nozologické jednotky: diagnostický přístup k anémii v dětství, sickle cell syndromy, thalasemie, Cooleyova anemie, anemie z nedostatku enzymů, sekundární anemie typu sférocytózy, dětské imunologické poruchy, poruchy granulocytů, metabolické odchylky, syndrom selhávající kostní dře-

ně aj. Onkologická část se soustřeďuje převážně na maligní nádorová onemocnění dětského věku, porovnává společné i rozdílné charakteristiky tumorů od novorozeneckého věku k adolescenci. Lze konstatovat, že díky intenzivní práci a využíváním výsledků studií speciálních center s multidisciplinární účastí se přežívání nemocných postupně zlepšuje. Vysvětluje se stručně genetika zhubných onemocnění, principy chemoterapie, je uveden seznam nejobvyklejších antikancerogenních léků v pediatrii. Postupně jsou probírány principy pediatrické chirurgické onkologie a některé jednotky jako akutní lymfoblastická leukemie, akutní myeloidní leukemie, myeloproliferativní poruchy, lymfoproliferativní poruchy, histiocytóza, tumory CNS, retinoblastom, tumory jater a ledvin, neuroblastom, rabdomyosarkom, kostní sarkomy, akutní stavy u dětských nádorů, transplantace kostní dřeně, podpůrná a paliativní léčba a psychosociální otázky.

Kniha o relativně malém stránkovém rozsahu přináší dobře zpracovanou aktuální tematiku. Může napomoci ke zlepšení péče o děti postižené hematologickými a nádorovými afekcemi. Představuje výbornou pomůcku pro účastníky postgraduálního studia při přípravě ke zkouškám.

Adresa nakladatelství: Hanley and Belfus, Inc, Medical Publishers, 210 South 13th Street, Philadelphia, PA 19107, USA.

V. R., V. H.

STANDARDNÍ KLASIFIKACE KOLOREKTÁLNÍCH KARCINOMŮ – REALITA, NEBO ILUZE?

CORRECT STAGING OF COLORECTAL CANCER – REALITY OR ILLUSION?

COUFAL O.¹, ŽALOUDEK J.¹, SVOBODNÍK A.², ŠEFR R.¹, PENKA I.¹, KAPLAN Z.¹, TOMÁŠEK J.³, FAIT V.¹

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV A UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

² CENTRUM BIostatistiky A ANALÝZ MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

³ ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Souhrn: Úvod: Nejdůležitějším prognostickým a prediktivním faktorem u kolorektálního karcinomu po kurativní resekci je stav regionálních mizních uzlin. Pro jeho určení podle pravidel TNM klasifikace má histologické vyšetření vzorků z regionální lymfadenektomie standardně zahrnovat 12 a více uzlin. Kromě toho mají být vyšetřovány i některé další faktory s prokázaným prognostickým významem. **Cíl a metodika:** Na dvou tuzemských pracovištích jsme z údajů v operačních protokolech a ve zprávách o histopatologickém vyšetření resekátů kolorektálních karcinomů retrospektivně zjišťovali, jak jsou vyšetřovány regionální mizní uzliny a jaké další prognostické faktory má klinik k dispozici při rozhodování o adjuvantní léčbě a dispenzarizačním plánu. **Výsledky:** Na pracovišti A nebyly ve 43,8 % ze 121 případů uzliny vyšetřeny dostatečně, na pracovišti B dokonce ani jedenkrát ze 162 případů nebylo vyšetřeno alespoň 12 uzlin. Dále často nebyly k dispozici údaje o mikroskopickém vyšetření resekčního okraje, gradingu či angioinvasi. **Závěr:** Úroveň určování nejdůležitějších prognostických faktorů u kolorektálního karcinomu v praxi je nedostatečná. Je třeba zaměřit se na zlepšení této situace a na hledání nových charakteristik nádoru, které by jednoduchým způsobem umožnily stratifikovat pacienty pro individuálně optimální léčebně-dispenzarizační postup.

Klíčová slova: kolorektální karcinom – lymfatické uzliny – sentinelová uzlina – staging – pN – TNM klasifikace – prognostické faktory – prediktivní faktory

Summary: Background: Lymph node status is the most important prognostic and predictive factor in curatively resected colorectal cancer. According to TNM staging system, a minimum number of 12 regional lymph nodes is to be examined for the correct staging. In addition to the status of lymph nodes other important prognostic factors should be reported by the pathologist. **Methods:** A retrospective study was performed to analyze how many of regional lymph nodes were examined in colorectal cancer specimens in two hospitals (Czech Republic) during the last few years. Availability of other prognostic factors important for the management of the disease after surgery was always investigated. **Results:** In the hospital „A“, the examination of lymph nodes were not sufficient in 43,8% of 121 cases analyzed, in the hospital „B“, the number of examined lymph nodes was less than a minimum of 12 in all 162 cases. There were often no data available regarding to a histological examination of resection margins, grading and angioinvasion. **Conclusion:** Reporting of the standard and most important prognostic factors in colorectal cancer was not sufficient in two selected hospitals and it may not be much better in others. Search for the new prognostic and predictive factors, that would help us to stratify the patients for the optimal tailored therapy is surely needed, but the standard staging parameters, as are the lymph node involvement, resection margins, grading and angioinvasion, must not be forgotten as occurred to be in many cases of our study.

Key words: colorectal cancer – lymph nodes – sentinel node – staging – pN – TNM system – prognostic factors – predictive factors

ÚVOD

Kolorektální karcinom není z molekulárně-genetického a ani z klinického hlediska jednotným onemocněním. Nezávisle na jeho heterogenitě je však hlavní a nepochybnou léčebnou metodou u nemetastatických forem chirurgická resekce, alespoň podle dnešních poznatků. Naproti tomu adjuvantní léčba či algoritmus dispenzarizačních vyšetření není u všech pacientů stejný. Klinická rozvaha vychází z individuálních charakteristik onemocnění označovaných jako prediktivní a prognostické faktory. Pod vlivem narůstajícího množství informací o rozdílných vlastnostech karcinomů na molekulární úrovni se zdá, že není daleko doba, kdy budeme charakteristiku nádoru určovat především molekulárně-genetickými testy. V současné době je však klinická významnost molekulárních parametrů stále ve fázi ověřování. A tak nám zatím nezbyvá, než spoléhat se na základní, především klinicko-histopatologické znaky, jejichž prognostická významnost byla prokázána.

V prvních dvou tabulkách jsou shrnuty dosavadní literární poznatky o významnosti nejčastěji diskutovaných prognostických a prediktivních faktorů (PF) po kurativní resekci kolorektálního karcinomu (tab. 1 [1] a tab. 2 [2]).

V praxi bychom měli mít vždy k dispozici alespoň základní údaje jako je pT, pN, R, angioinvasi, případně další. Za vůbec nejvýznamnější prognostický faktor je již od dob Dukesových považován stav regionálních lymfatických uzlin. Je současně i nejvýznamnějším prediktivním faktorem, protože identifikuje pacienty potenciálně profitující z adjuvantní chemoterapie. Záchyt metastáz v regionálních mizních uzlinách (pN1 nebo pN2) vymezuje stadium III (Dukes C). U tohoto stadia je, na rozdíl od některých případů stadia II, indikace adjuvantní

Tab. 1: Nezávislé prognostické faktory u kolorektálního karcinomu podle Hermaneka et al.

	PF spojené s nádorem	PF spojené s pacientem	PF spojené s léčbou
<i>Jisté</i>	pTNM, grading, venózní invaze	–	operující chirurg
<i>Pravděpodobné</i>	lokalizace, obstrukce či perforace, lymfatická a perineurální invaze, histologický obraz okraje nádoru, lymfocyty nebo lymfoidní agregáty v okolí nádoru	pohlaví, hladina CEA v séru	technika operace

Tab. 2: Prognostické faktory u kolorektálního karcinomu podle Compton et al.

<i>PF definitivně ověřené ve velkých studiích</i>	pT, pN, invaze do krevních či lymfatických cév, R (případně nádorové reziduum po resekci), hladina CEA před operací
<i>PF s opakovaně ověřenou platností, které mají být rutinně vyšetřovány, ale jejich význam musí být ještě ověřen v robustních studiích</i>	grading, případná infiltrace „radiálního“ resekčního okraje (u neperitonealizovaných tkání), ypTNM stadium (u předlécených nádorů)
<i>PF slibné, není však k dispozici dostatek dat pro zařazení do předchozích skupin</i>	histologický typ nádoru, histologické vlastnosti spojené s mikrosatelitovou instabilitou (MSI) (lymfatická odpověď hostitele, medulární nebo mucinózní typ), vysoký stupeň MSI, ztráta heterozygoty na 18q, konfigurace okraje nádoru
<i>PF zatím nedostatečně studované, aby mohl být kvantifikován jejich význam</i>	všechny molekulární markery kromě shora uvedených, obsah DNA, perineurální invaze, hustota kapilár, proteiny nebo sacharidy asociované s nádorovými buňkami, fibróza v okolí nádoru, zánětlivá odpověď v okolí nádoru, fokální neuroendokrinní diferenciace, centra organizující nukleoly (NOR), proliferace
<i>PF dobře prozkoumané, o nichž bylo zjištěno, že nemají žádnou prognostickou hodnotu</i>	velikost a makroskopická konfigurace nádoru

terapie po kurativní resekci všeobecně akceptována a doporučována.

Z hlediska validity určení pN byl opakovaně ověřován význam počtu patologem vyšetřených uzlin. Vyšetření šesti nebo méně uzlin je naprosto nedostatečné [3] a bylo prokázáno, že pacienti ve stadiu II (pN0, Dukes B) diagnostikovaném na základě vyšetření tak malého počtu uzlin mají horší prognózu, než pacienti ve stejném stadiu, u nichž bylo vyšetřeno uzlin více [4]. Četné práce se zabývají minimálním počtem uzlin, které je nutno vyšetřit, aby posouzení pN bylo validní. Předpokládá se, že s vyšetřením dalších uzlin nad tento počet se již zachytí metastatického uzlinového postižení nezvyšuje. „Minimální“ počet se podle různých pramenů liší a pohybuje se od 7 uzlin [5] výše. Některé práce však podporují názor, že žádný takový „minimální“ počet uzlin neexistuje a je vždy nutno vyšetřit všechny uzliny, včetně malých o velikosti 1 – 2 mm [6]. Malé uzliny však často při běžném histopatologickém vyšetření zůstávají přehlédnuty. Podle platné TNM klasifikace má histologické vyšetření vzorků z regionální lymfadenektomie standardně zahrnovat 12 a více mízních uzlin [7]. K možnosti posouzení správnosti histopatologického vyšetření má být počet vyšetřených uzlin vždy uveden.

CÍL PRÁCE A METODIKA

Cílem naší práce bylo zjistit, můžeme-li tuzemské postupy klasifikace kolorektálních karcinomů považovat za standardní. Na dvou pracovištích jsme retrospektivně provedli analýzu případů kolorektálních karcinomů stadia cM0, kurativně resekovaných během několika posledních let. Zajímalo nás, jaké údaje jsou k dispozici pro pooperační stratifikaci dalšího léčebně-dispenzarizačního postupu ve vztahu k údajům, které by „*lege artis*“ k dispozici měly být. Data jsme čerpali z operačních protokolů a ze zpráv o výsledku histopatologického vyšetření. Protože během sledovaného období došlo ke změně v pravidlech pN klasifikace (zrušení statutu perivaskulárních a peritumorálních uzlin a zrušení kategorie pN3), zaměřili jsme se zejména na základní rozlišení pN0 (regionální lymfatické uzliny nepostížené) a pN+ (minimálně 1 regionální lymfatická uzlina postižená).

Vzhledem k retrospektivnímu charakteru sběru údajů byla analýza dat studie provedena především za deskriptivním účelem. Cílem prezentovaných grafů je vizualizace základních dat, ve studii nebyla provedena žádná analýza srovnávající údaje z obou pracovišť. Srovnání počtu vyšetřených uzlin podle lokalizace nádoru a podle provedení neoadjuvantní terapie u nádorů konečníku bylo provedeno Mann-Whitney U testem. Data byla hodnocena na hladině významnosti $\alpha = 5\%$.

VÝSLEDKY

PRACOVISŤE A

Celkem jsme analyzovali 123 případů z období let 1998 – 2001.

Určování stadia pT

pT bylo výslovně uvedeno ve 119 případech. U 3 případů nebylo pT výslovně uvedeno, ale z popisů mikroskopického vyšetření bylo možné stadium určit. Jednou (tj. v 0,8 %) nebylo stadium pT určeno vůbec.

Určování stadia pN a počet vyšetřených uzlin

Stadium pN bylo určeno ve všech případech.

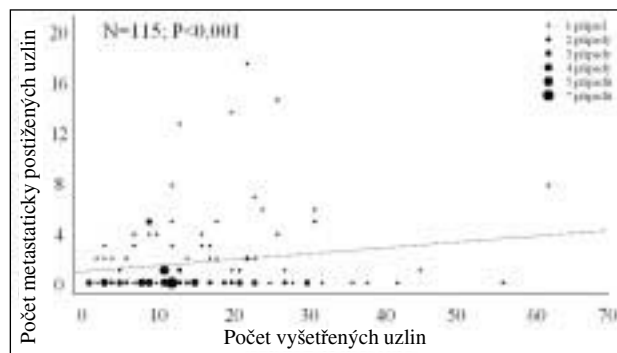
Z analýzy počtu vyšetřených uzlin byly vyjmuty dva resekáty totálních kolektomií se 61 (pN0) a 97 (pN+) vyšetřeny uzlinami. Celkem jsme tedy hodnotili 121 případů (73 případy pN0 a 48 případů pN+). Výsledky jsou shrnuty v tabulce (tab. 3). V 6 případech nebyl počet vyšetřených uzlin uveden, ale z popisu bylo evidentní, že uzliny byly vyšetřovány. V případech s uvedeným počtem vyšetřených uzlin bylo vyšetřeno 1 – 62 uzlin, typicky 13 uzlin (medián), průměrně 15,8 uzliny. Vztah mezi počtem vyšetřených uzlin a počtem metastaticky

Tab. 3: Analýza počtu vyšetřených uzlin (pracoviště A)

Počet vyšetřených uzlin	Počet případů	Počet případů pN+	Metastatická incidence ¹
Neuveden	6	1 (16,7 %)	–
1–5	18	5 (27,8 %)	17,5 %
6–10	20	8 (40,0 %)	19,6 %
11–15	31	12 (38,7 %)	9,8 %
16–20	14	8 (57,1 %)	13,4 %
21–25	14	7 (50,0 %)	12,1 %
26–30	9	3 (33,3 %)	8,0 %
31–35	3	2 (66,7 %)	11,7 %
36–40	2	0 (0,0 %)	0,0 %
41–45	2	1 (50,0 %)	1,1 %
46–50	–	–	–
51–55	–	–	–
56–60	1	0 (0,0 %)	0,0 %
61–65	1	1 (100,0 %)	12,9 %
Celkem	121	48 (39,7 %)	10,7 %

¹ Metastatická incidence: počet metastaticky postižených uzlin / počet vyšetřených uzlin

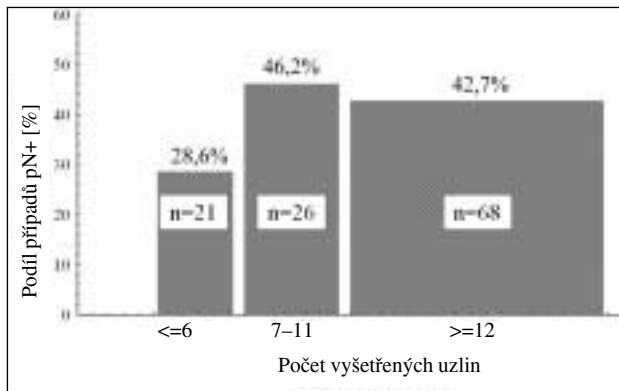
Obr. 1: Vztah mezi počtem vyšetřených uzlin a počtem metastaticky postižených uzlin u jednotlivých případů (pracoviště A)



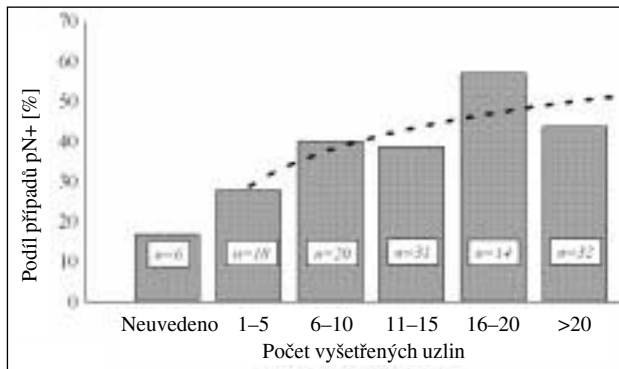
postižených uzlin u jednotlivých případů je zakreslen na obrázku (obr. 1).

Na dalších obrázcích je graficky znázorněn vztah mezi podílem pN+ případů a počtem vyšetřených uzlin (obr. 2a, obr. 2b). Z obrázku 2a vidíme, že v 68 případech (56,2%) bylo vyšetřeno alespoň 12 uzlin. V ostatních 53 případech (tj. 43,8 %) bylo vyšetřeno méně než 12 uzlin, anebo počet vyšetřených uzlin nebyl uveden. To znamená, že téměř polovina resekátů nebyla standardně vyšetřena! Dále je patrné výrazné navýšení pravděpodobnosti záchytu metastatického postižení při vyšetření minimálně 7 uzlin, toto naše pozorování je ve shodě s publikovanými výsledky [4].

Obr. 2a: Podíl případů pN+ podle počtu vyšetřených uzlin (pracoviště A)



Obr. 2b: Podíl případů pN+ podle počtu vyšetřených uzlin (pracoviště A)



Otázka regresního vztahu mezi celkovým počtem vyšetřených uzlin a pravděpodobností záchytu metastaticky postižené uzliny, především pak mezní hranice počtu vyšetřených uzlin, od které již pravděpodobnost záchytu metastatického postižení roste jen nevýznamně, je i v současnosti předmětem diskusí v odborném tisku, jak jsme již zmínili v úvodu. Naše výsledky naznačují trend existence této hranice přibližně při počtu 11 – 20 vyšetřených uzlin (obr. 2b).

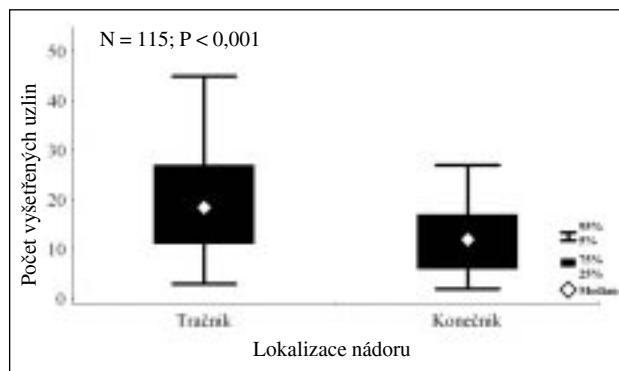
Analýza rozdílů mezi počtem vyšetřených uzlin u nádorů tračnicku a konečnicku prokázala trend vyššího počtu vyšetřených uzlin u nádorů tračnicku, rozdíl je hodnocen jako statisticky signifikantní (tab. 4, obr. 3).

Potenciální rozdíl mezi počtem vyšetřených uzlin u pacientů s radioterapií (RT) a u pacientů bez radioterapie v neoadjuvanci byl hodnocen u celkem 69 případů nádoru konečnicku

Tab. 4: Rozdíly v počtu vyšetřených uzlin u karcinomů tračnicku a konečnicku (pracoviště A)

Lokalizace nádoru	Počet případů	Počet vyšetřených uzlin				P-hodnota
		Průměr (SD)	Medián	Min/Max		
Tračník	46	20,4 (13,1)	18,5	3/62	0,001	
Konečník	69	12,5 (7,7)	12,0	1/32		

Obr. 3: Počet vyšetřených uzlin podle lokalizace nádoru (pracoviště A)



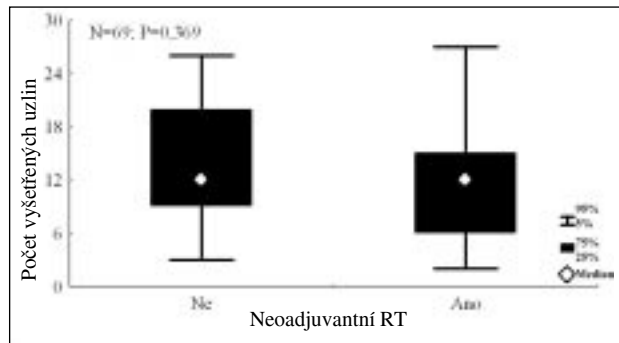
s uvedeným počtem vyšetřených uzlin v dokumentaci. Rozdíl v počtu vyšetřených uzlin mezi uvedenými skupinami pacientů nebyl signifikantní (tab. 5, obr. 4).

Pokud jde o závislost pN na pT, zjistili jsme v našem souboru, že u dvou případů pTis nebyly regionální lymfatické uzliny postiženy, ale již u karcinomů stadia pT1 k lymfatickému postižení docházelo.

Tab. 5: Rozdíly v počtu vyšetřených uzlin u předozářených a nepředozářených nádorů konečnicku (pracoviště A)

Neoadjuvantní RT	Počet vyšetřených uzlin				
	Počet případů	Průměr (SD)	Medián	Min/Max	P-hodnota
Ne (nebo nezjištěno)	25	13,6 (7,8)	12,0	1/31	0,369
Ano	44	11,8 (7,7)	12,0	1/32	

Obr. 4: Počet vyšetřených uzlin podle aplikace neoadjuvantní radioterapie (pracoviště A)



Určování ostatních prognostických faktorů

Grading nebyl stanoven u 44 případů karcinomů resekovaných po neoadjuvantní terapii. U karcinomů bez neoadjuvantní léčby (79 případů) byl grading popisován převážně slovními formulacemi, číselný parametr G byl uveden pouze ve 28 případech (35,5 %). Ve 2 ze zmíněných 79 případů (2,5 %) údaje o gradingu zcela chyběly.

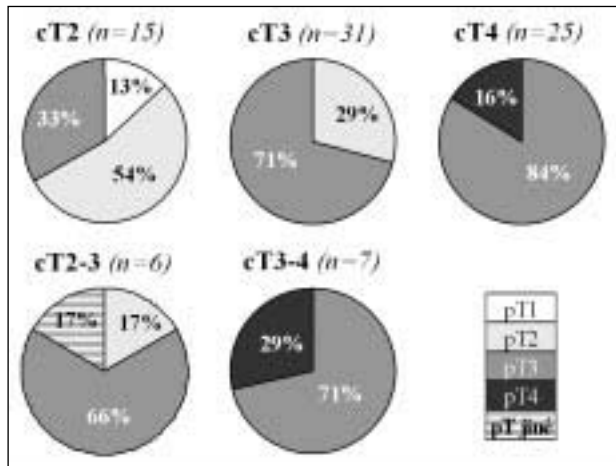
Angioinvasze či propagace nádorových buněk. Z analyzovaných 123 případů byla zmínka o angioinvasi 5x, lymfangioinvasi 3x, angioinvasi i lymfangioinvasi 1x, perivaskulární propagaci 5x, lymfogenní propagaci 1x, perineurální propagaci 3x, perivaskulární a perineurální propagaci 4x.

Mikroskopické vyšetření resekčních linií. Údaje o mikroskopickém vyšetření alespoň jednoho (distálního či proximálního) resekčního okraje byly přítomny v 68 případech. V 55 případech (tj. 44,7 %) nebyla mikroskopie resekčního okraje zmíněna. Výsledek mikroskopického vyšetření „radiálního“ resekčního okraje nebyl uveden nikdy.

Soulad klinické a histopatologické klasifikace T (cT / pT)

Hodnotili jsme jen případy, kdy operátor do operačního protokolu nebo do žádanky k histopatologickému vyšetření uvedl cT klasifikaci nádoru. Výsledky jsou patrné z obrázku (obr. 5).

Obr. 5: Soulad klinické a histopatologické klasifikace (pracoviště A)



PRACOVISTĚ B

Celkem jsme analyzovali 162 případů z období let 1995 – 2000.

Určování stadia pT

pT bylo výslovně uvedeno ve 155 případech. U 2 případů nebylo pT výslovně uvedeno, ale z popisu mikroskopického vyšetření bylo možné stadium určit. Ve 4 případech byl nádor popsán jako „malignizovaný polyp s invazí do spodiny“. Jednou (tj. 0,6 %) nebylo pT stadium určeno vůbec s odvoláním na nepřehledný preparát.

Určování stadia pN a počet vyšetřených uzlin

Stadium pN bylo výslovně uvedeno ve 145 případech. V 17 případech nebylo uvedeno výslovně, ale z popisu mikroskopického vyšetření bylo zřejmé, že 9× šlo o případy N0. 8× nebyla v popisu zmínka o mikroskopickém vyšetření uzlin, tedy pN nebylo určeno v 8 případech (4,9%).

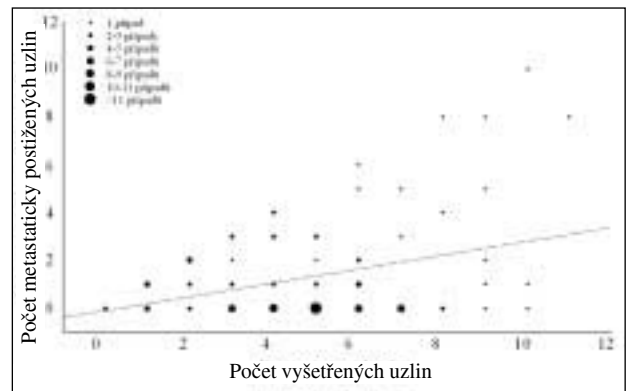
Z dalších analýz počtu vyšetřených uzlin byly vyjmuty dva resekáty totálních kolektomií. U těchto dvou případů nebyla v popisu histopatologického vyšetření resekátu zmínka o mikroskopickém vyšetření uzlin – jeden případ byl označen jako pN0 a u druhého nebyla klasifikace pN udána. Celkem jsme tedy hodnotili 160 případů (94 případů pN0, 59 případů pN+ a 7 případů pNX). Výsledky jsou shrnuty v tabulce (tab. 6). Ve 104 případech s udaným počtem vyšetřených uzlin bylo vyšetřeno 0 – 11 uzlin, typicky 5 uzlin (medián), průměrně 4,8 uzliny. Vztah mezi počtem vyšetřených uzlin a počtem metastaticky postižených uzlin u jednotlivých případů na pracovišti B je zakreslen na obrázku 6 (obr. 6).

Tab. 6: Analýza počtu vyšetřených uzlin (pracoviště B)

Počet vyšetřených uzlin	Počet případů	Počet případů pN+	Metastatická incidence ¹
0	2	0 (0,0 %)	–
Neuveden	56	11 (19,6 %)	–
1–5	65	29 (44,6 %)	25,6 %
6–10	36	18 (50,0 %)	25,3 %
11	1	1 (100,0 %)	72,7 %
Celkem	160	59 (36,9 %)	26,5 %

¹ Metastatická incidence: počet metastaticky postižených uzlin / počet vyšetřených uzlin

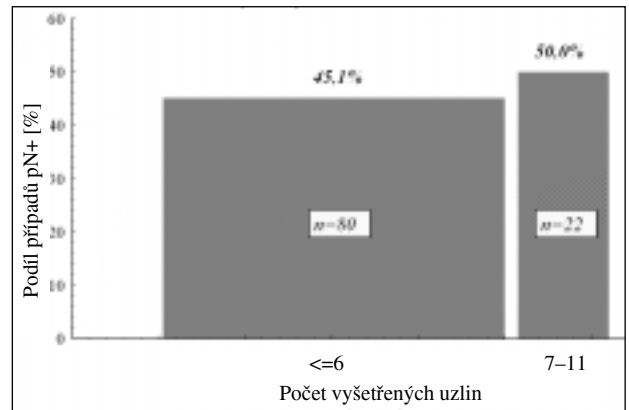
Obr. 6: Vztah mezi počtem vyšetřených uzlin a počtem metastaticky postižených uzlin u jednotlivých případů (pracoviště B)



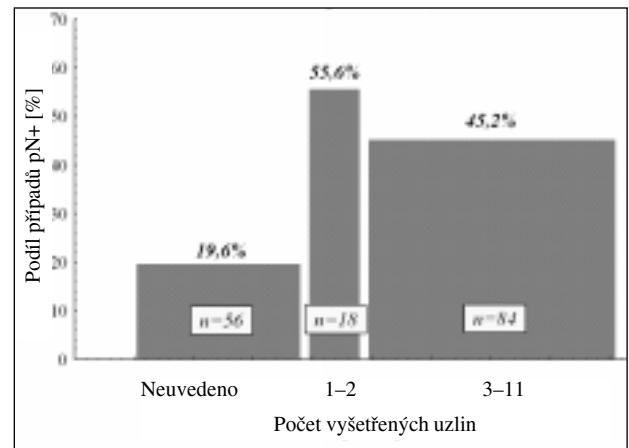
Na dalších obrázcích je graficky znázorněn vztah mezi podílem pN+ případů a počtem vyšetřených uzlin (obr. 7a, obr. 7b). Ze 104 případů s udaným počtem vyšetřených uzlin nebylo nikdy vyšetřeno alespoň 12 uzlin (obr. 7a). To znamená, že žádný resekát nebyl vyšetřen standardním způsobem!

Vzhledem k extrémnímu počtu případů s neuvedeným počtem vyšetřených uzlin v dokumentaci (56 případů) a maximálnímu počtu 11 vyšetřených uzlin nebylo z údajů na pracovišti B možné podrobněji analyzovat vztah mezi počtem vyšetřených uzlin a pravděpodobností nálezu alespoň jedné metastaticky postižené uzliny. Z obrázku 7b je patrný poměrně vysoký podíl pN+ případů při vyšetření 1 – 2 uzlin. Možné důvody tohoto jevu zmíníme v diskuzi.

Obr. 7a: Podíl případů pN+ podle počtu vyšetřených uzlin (pracoviště B)



Obr. 7b: Podíl případů pN+ podle počtu vyšetřených uzlin (pracoviště B)



Podrobněji jsme se zaměřili na případy s neuvedeným počtem vyšetřených uzlin klasifikované patologem jako pN0. Ve 32 případech nebyly podle popisu regionální uzliny patrně vůbec mikroskopicky vyšetřeny, a tedy měly být případy označeny pNX. Přičítáme-li k tomu ještě 7 případů patologem věcně správně označených jako pNX a dva výše zmíněné případy totální kolektomie, nebyly ve 41 případech ze 162, tedy více než v 1/4 případů regionální lymfatické uzliny vůbec mikroskopicky vyšetřeny!

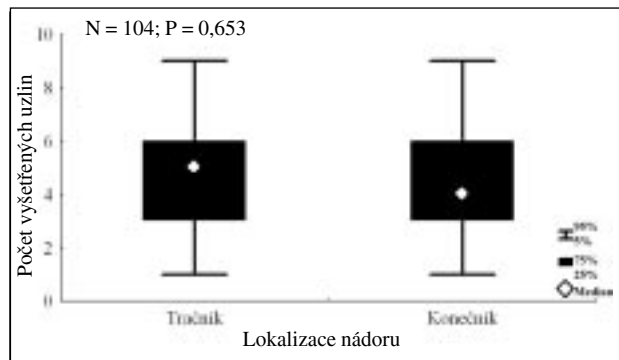
Z popisu vyšetření preparátů vyplynula řada nepřesností. Například jednou bylo místo regionálních lymfatických uzlin v mezokolon vyšetřeno pouze několik nepostížených uzlin z omenta, nebo bylo mikroskopicky vyšetřeno méně uzlin než bylo makroskopicky nalezeno, anebo byly některé případy klasifikovány jako pN2 (tzn. 4 a více postižených uzlin), ačkoli bylo popsáno vyšetření jen 3 nebo méně uzlin.

V resekátech karcinomů tračnicku bylo vyšetřeno relativně více uzlin než v resekátech karcinomů konečníku, rozdíl však nebyl statisticky významný (tab. 7, obr. 8).

Tab. 7: Rozdíly v počtu vyšetřených uzlin u karcinomů tračnicku a konečníku (pracoviště B)

Lokalizace nádoru	Počet případů	Počet vyšetřených uzlin			
		Průměr (SD)	Medián	Min/Max	P-hodnota
Tračník	63	4,8 (2,4)	5,0	0/10	0,653
Konečník	41	4,7 (2,6)	4,0	1/11	

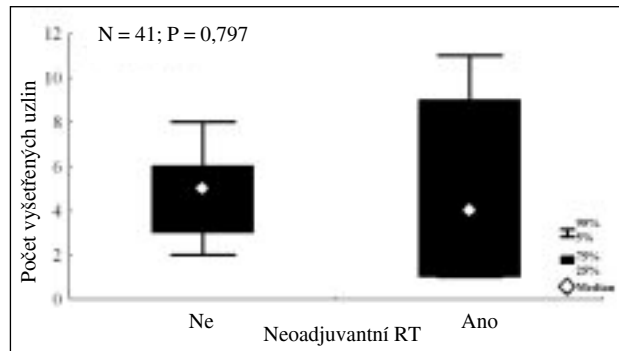
Obr. 8: Počet vyšetřených uzlin podle lokalizace nádoru (pracoviště B)



Tab. 8: Rozdíly v počtu vyšetřených uzlin u předozářených a nepředozářených nádorů konečníku (pracoviště B)

Neoadjuvantní RT	Počet vyšetřených uzlin				
	Počet případů	Průměr (SD)	Medián	Min/Max	P-hodnota
Ne (nebo nezjištěno)	26	4,6 (1,9)	5,0	1/9	0,797
Ano	15	4,9 (3,5)	4,0	1/11	

Obr. 9: Počet vyšetřených uzlin podle aplikace neoadjuvantní radio-terapie (pracoviště B)



Ani analýza na pracovišti B neprokázala rozdíl v počtu vyšetřených uzlin v resekátech po neoadjuvantní terapii v porovnání s resekátů, kde nádory nebyly před resekci ozářeny (tab. 8, obr. 9).

Určování ostatních prognostických faktorů

Grading byl popisován převážně slovními formulacemi. U karcinomů po neoadjuvantní radioterapii byl grading ve většině ze 31 případů uveden, pouze v 5 případech (tj. 16,1 %) uveden nebyl. U karcinomů bez předchozí neoadjuvantní léčby nebyl grading uveden v 5 ze 131 případů (tj. 3,8 %), z toho 4× byl nádor popsán jako malignizovaný adenomatózní polyp. Číselný parametr G však byl uveden celkově pouze v 8 případech (4,9 %).

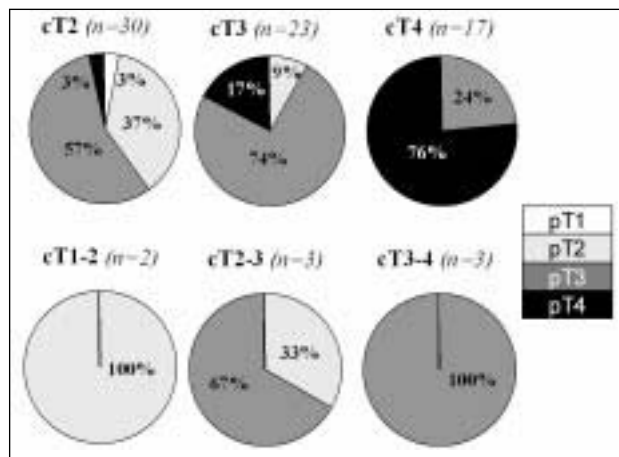
Angioinvasze či propagace nádorových buněk. Z analyzovaných 162 případů byla zmínka o angioinvasi 8×, lymfatické propagaci 1×, perineurální a lymfatické propagaci 1×.

Mikroskopické vyšetření resekčních linií. Údaje o mikroskopickém vyšetření alespoň jednoho (distálního či proximálního) resekčního okraje byly přítomny v 69 případech. V 93 případech (tj. 57,4 %) nebyla mikroskopie resekčního okraje zmíněna. Výsledek mikroskopického vyšetření „radiálního“ resekčního nebyl uveden nikdy.

Soulad klinické a histopatologické klasifikace T (cT / pT)

Hodnotili jsme jen případy, kdy operátor do operačního protokolu nebo do žádanky k histopatologickému vyšetření uvedl cT klasifikaci nádoru. Výsledky jsou patrné z obrázku (obr. 10).

Obr. 10: Soulad klinické a histopatologické klasifikace (pracoviště B)



DISKUSE

Riziko malého počtu vyšetřených uzlin tkví především v možnosti falešně negativního posouzení uzlinových metastáz (tzv. „understaging“). Protože postižení regionálních mízních uzlin je hlavním indikačním kritériem pro adjuvantní léčbu, nejsou v takovém případě léčeni někteří pacienti, kteří by z léčby mohli mít prospěch. Je tedy žádoucí, aby zejména u případů pN0 bylo histopatologicky vyšetřováno alespoň 12 uzlin, jak doporučují pravidla TNM klasifikace. I z našich výsledků z pracoviště A vyplývá, že procentuální podíl případů pN+ stoupá s počtem vyšetřených uzlin (obr. 2b).

Počet vyšetřených uzlin závisí na třech hlavních faktorech. Chirurg jej může ovlivnit objemem resekovaného mezokolon (mezorekta), konstituční faktory pacienta ovlivňují skutečný počet uzlin vyskytujících se v tomto objemu. Rozhodující význam má pak způsob vyšetření resekátu patologem. Sahá od prosté „manuální metody“ vyhledávání uzlin v nativním či běžným způsobem fixovaném preparátu, přes fixaci po napnutí středního závěsu na korkovou podložku až po používání speciálních projasňovacích fixačních metod, které usnadní vyhle-

dání zvláště menších uzlin [8] a vedou k vyššímu záchytu uzlinových metastáz [8, 9].

Principiálně poněkud odlišným přístupem je snaha o zvýšení záchytu uzlinových metastáz nikoli na podkladě vyšetření co nejlépe uzlin, ale na podkladě citlivějších metod schopných detekovat mikrometastázy. Běžně se z každé makroskopicky nalezené uzliny mikroskopicky vyšetřuje jeden či dva řezy přehledně barvené hematoxylinem a eozinem. Citlivější metody spočívají buď v prohlédnutí více řezů z jedné uzliny, přehledně barvení je možno doplnit imunohistochemickým vyšetřením, případně lze detekovat nádorové nukleové kyseliny metodou PCR. Je časově i finančně náročné provádět tyto metody na všech nalezených uzlinách, proto se v posledních letech věnuje úsilí aplikaci těchto metod jen na sentinelovou uzlinu. Nález mikrometastáz u případů, které by při běžném vyšetření byly hodnoceny jako pN0, je označován jako „upstaging“. Podle literatury k němu dochází s různou četností, dle výsledků Sahy a spol. přibližně v 15 % případů (14 %) [10]. Na případy s pouhými mikrometastázami však není možno nahlížet stejně jako na případy s metastázami detekovanými běžnou metodou. Klinický význam mikrometastáz totiž není zcela jasný. Přehledový článek Lina a kol. [11] shrnul dosavadní literární poznatky. Vyplývá z něj, že v některých sestavách byla frekvence rekurencí během pěti let statisticky významně vyšší u pacientů s mikrometastázami oproti pacientům bez mikrometastáz, řada prací ale prognostický význam mikrometastáz nepotvrdila. Stejně tak není jasný jejich prediktivní význam, tzn. jestli pacientům s mikrometastázami přináší prospěch adjuvantní chemoterapie.

Možnost redukovat vyšetření uzlin u kolorektálního karcinomu na pouhou sentinelovou uzlinu je sice lákavá, ale naráží na problém falešné negativity. V minulých letech se vyskyt „skip metastáz“ udával jen do 3 %, ale nově pomocí PCR byly detekovány až u téměř 20 % pacientů [12]. V souboru Joostena byla falešná negativita sentinelové uzliny dokonce 60 % [13]. Nepostižená sentinelová uzlina u kolorektálního karcinomu tedy nemůže sloužit jako indikátor negativity spádových uzlin a vždy musejí být resekovány a vyšetřeny i ostatní regionální mízní uzliny.

Z obrázku 7b je vidět, že na pracovišti B byl poměrně vysoký procentuální podíl záchytu případů pN+ (55,6 %) při vyšetření pouhé 1 nebo 2 uzlin. Můžeme se jen domnívat, že šlo převážně o případy s makroskopicky patrnými metastázami, při kterých se patolog spokojil s odběrem jen jedné až dvou evidentně metastatických uzlin. Takový postup však nelze obhajovat už proto, že v literatuře je dobře dokumentován rozdílný prognostický význam stadií pN1 (maximálně 3 postižené uzliny) a pN2 (4 a více postižených uzlin) [14]. V případě vyšetření méně než 4 uzlin tak ani teoreticky nemůže být diagnostikováno prognosticky horší stadium pN2.

Omluvou pro nedostatečné vyšetřování uzlin nemohou být ani časné případy karcinomu (pT1). Jakmile nádor penetruje do submukózy obsahující lymfatické cévy, mohou být uzlinové metastázy přítomny [15], což se potvrdilo i v naší analýze. Musíme upozornit i na směrodatnost mikroskopického vyšetřování uzlin. Makroskopicky popisované uzliny nemohou být brány v úvahu, dokladem budiž i námi pozorovaný poznatek, že ne všechny struktury považované makroskopicky za lymfatickou uzlinu skutečně uzlinou jsou.

Nemáme jednoznačné vysvětlení pro malý rozdíl v celkovém podílu případů pN+ mezi oběma pracovišti (39,8 % respektive 36,4 %), než jaký by odpovídal značně rozdílným počtům vyšetřených uzlin (na pracovišti A bylo popisováno výrazně více vyšetřených uzlin – medián 13 – než na pracovišti B – medián 5). Odpovědi by mohl být rozdíl spíše v pečlivosti popisu než rozdíl v pečlivosti vyšetřování, ale důkazy chybí.

Na našich pracovištích (A a B) byl tedy celkový podíl případů pN+ ze všech kurativně resekovaných kolorektálních karcinomů 39,8 % resp. 36,4 %. Srovnávali jsme tento podíl s údaji ve světové literatuře. Ve velkých souborech při pou-

žití standardní manuální metody detekce uzlin se podíl pN+ případů pohybuje většinou v rozmezí 30 – 50 % [8,15-17], ale při pečlivějším vyšetření s použitím projasňovacích technik, nebo při selekci případů s vysokým počtem vyšetřených uzlin se podíl zvyšuje až na cca 60 % [8] či dokonce 85 % (u pT3 stadií) [6]. Vezmeme-li dále v úvahu mikrometastázy nedetekované při běžném mikroskopickém vyšetření, nabízí se odvážná domněnka, že u podstatné většiny (ne-li u všech) případů kolorektálního karcinomu jsou regionální uzliny nádorovými buňkami v různé míře infiltrovány a záleží jen na podrobnosti vyšetření, kolik z těchto případů diagnostikujeme. Potom by současná kategorická klasifikace pN0 / pN+ (pN1, pN2) neodpovídala skutečnému stavu: uzliny nepostiženy / postiženy, ale pouze rozdělovala kontinuum postižení uzlin od ojedinělých karcinomových buněk, přes mikrometastázy, až po makroskopicky patrné uzlinové metastázy, přičemž hranice mezi jednotlivými kategoriemi pN by závisely na podrobnosti vyšetření uzlin v tom kterém případě. Obecně přijatelné kritérium indikace adjuvantní terapie by tak bylo možné stanovit jen na podkladě velmi přesné kvantitativní a vysoce reprodukovatelné metody. Spíše však lze vyvodit, že cesta zpřesňování indikací adjuvantní terapie jen na základě stavu regionálních mízních uzlin je v podstatě slepou uličkou a je třeba hledat a ověřovat význam dalších prediktorů biologické agresivity (prognostické faktory) a odpovědi na jednotlivé způsoby protinádorové léčby (prediktivní faktory).

Námi zjištěný vyšší počet vyšetřovaných uzlin u karcinomu tračnicku než u karcinomu konečnicku se může odvíjet od anatomických faktorů objemově většího mezokolon v porovnání s mezorektem. Snad hraje roli i fakt chirurgem ne vždy důsledně dodržované zásady totální mezorektální excize. Navíc hranice mezi tračnickem a konečnickem bývá pojímána nejednotně.

Předoperační ozáření mezorekta by teoreticky mohlo vést k fibroze některých uzlin, což může jejich vyhledávání znesnadnit. Naše výsledky však nepodporují domněnku, že by radioterapie negativně ovlivňovala úspěšnost detekce uzlin při histopatologickém vyšetření.

Pro klasifikaci R by se údaje o mikroskopickém vyšetření resekční linie v některých jednoznačných případech mohly zdát jako postradatelné. Všeobecně je totiž známo, že mikroskopická infiltrace střevní stěny kolorektálním karcinomem nesahá dále než několik málo milimetrů za makroskopicky patrný okraj nádoru. Ovšem mimo střevní stěnu – zejména v mezorektu – se někdy vyskytují nádorové satelity, které mohou přesahovat hranici vlastního nádoru až o několik centimetrů aborální směrem a zejména se šíří radiálně. Z toho důvodu je přijímaným chirurgickým standardem totální mezorektální excize. Z často citované analýzy 190 resekovaných karcinomů rekta vyšlo najevo, že u 25 % domnělých kurativních resekcí byl radiální resekční okraj postižen nádorem. Nádorová infiltrace okraje byla významně spojena s četností lokálních recidiv (78 % oproti 10 % při R0 resekcí) a s přežitím. [18] I z toho důvodu je mikroskopické vyšetření resekčních okrajů naprosto nezbytné pro správnou klasifikaci R a naše analýza odhaluje v tomto směru poměrně zásadní nedostatky na pracovištích A i B.

Soulad, respektive nesoulad cT a pT klasifikace v některých případech má být jen dokladem obtížného odhadu rozsahu nádoru pouze na základě klinického, paraklinického a peroperačně-chirurgického vyšetření. Klinické hodnocení úrovně penetrace střevní stěnou má význam hlavně u karcinomu konečnicku (transrektální ultrasonografie, CT), ať už z hlediska indikace neoadjuvantních postupů, nebo eventuality šetrných zadních či transrektálních resekčních přístupů.

Náročnost sběru dat ve studii formou podrobného prohledávání chorobopisů pacientů hodnocených pracovišť poukázala na jeden další nepříznivý trend a to celkově nevyhovující formu zdravotnické dokumentace pro vedení parametrického záz-

namu pacientů. Dohledávání dat pro retrospektivní hodnocení je časově extrémně náročné a v podstatě neumožňuje kompletaci údajů ve formě vyhovující požadavkům na kvalitní retrospektivní studie.

ZÁVĚR

Na některých tuzemských pracovištích jsou resekáty kolorektálních karcinomů vyšetřovány zcela nedostatečně. Na jednom ze dvou sledovaných pracovišť dokonce ani v jednom ze 162 případů nebylo vyšetřeno standardně doporučených 12 uzlin a přibližně v jedné čtvrtině případů patrně nebyla mikroskopicky vyšetřena ani jedna lymfatická uzlina. Tak nikdy nebyl splněn základní předpoklad pro správné určení stadia pN považovaného za nejvýznamnější prognostický a prediktivní faktor po kurativní resekci kolorektálního karcinomu. Důvody je nutno hledat v nedostatečné radikalitě chirurgických výkonů a v nedůkladnosti histopatologického vyšetření. Závažné nedostatky jsme zaznamenali i při určování ostatních prognostických faktorů jako je grading, angioinvasivita nebo mikroskopické vyšetření resekčních okrajů nezbytné pro stanovení R. Z toho vyplývá, že nedostatečnost individualizace onkolo-

gické léčby solidních nádorů u dospělých pramení nejen z málo teoreticky objasněných vztahů mezi molekulárně genetickými vlastnostmi nádoru a fenotypovými projevy, ale také z nedostatečného praktického využívání již prokázaných souvislostí.

Do budoucna je našim přáním stratifikovat pacienty podle individuálních charakteristik nádoru a odtud pak stanovit individuální léčebně-dispenzarizační plán. Nezbyvá než věřit, že zavedení rutinního vyšetřování dosud běžně nestanovených, především molekulárních prognostických a prediktivních faktorů na sebe nenechá dlouho čekat a bude našim vodítkem pro volbu optimální strategie.

Jakkoli nadějně však může působit odhodlání posouvat diagnostiku k zatím nestandardním postupům (např. detekce cirkulujících nádorových buněk, individuální predikce chemorezistence, úroveň exprese enzymů fluoropyrimidinového metabolismu), vždy si musíme klást otázku, zda správně klasifikujeme nádory podle zásad dlouhodobě známých a již opakovaně prokázaných. Možná by nebylo marné zaměřit se občas právě na tento aspekt, abychom se při úvahách o „*lege artis*“ či „*standardnosti*“ nemuseli červenat.

Literatura

1. Hermanek P, Sobin LH. Colorectal carcinoma. In: Hermanek P, Gospodarowicz MK, Henson DE, Hutter RVP, Sobin LH, eds. Prognostic Factors in Cancer. New York, NY, Springer-Verlag NY Inc; 1995
2. Compton CC et al. Prognostic Factors in Colorectal Cancer – College of American Pathologists Consensus Statement 1999. Arch Pathol Lab Med, Vol 124, July 2000, p. 979 – 994
3. Cserni G et al. Nodal Staging of Colorectal Carcinomas from Quantitative and Qualitative Aspects. Can Lymphatic Mapping Help Staging? Pathology Oncology Research, Vol 5, No 4, 1999, p 291-296
4. Caplin S et al. For Patients with Dukes B (TNM Stage II) Colorectal Carcinoma, Examination of Six or Fewer Lymph Nodes Is Related to Poor Prognosis. Cancer, August 15, 1998 /Volume 83/ Number 4, p. 666-672
5. Cserni G. The influence of nodal size on the staging of colorectal carcinomas. J Clin Pathol 2002 May;55(5):386-90
6. Goldstein NS. Lymph node recoveries from 2427 pT3 colorectal resection specimens spanning 45 years: recommendations for a minimum number of recovered lymph nodes based on predictive probabilities. Am J Surg Pathol 2002 Feb;26(2):179-89
7. Sobin LH, Wittekind CH. TNM klasifikace zhoubných nádorů, 8. vydání 1997 (český překlad). Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, Praha, 2000
8. Jin-ichi Hida et al. Metastases From Carcinoma of the Colon and Rectum Detected in Small Lymph Nodes by the Clearing Method. Journal of the American College of Surgeons. March 1994, Volume 178, p. 223-228
9. Koren et al. Lymph Node-Revealing Solution: Simple New Method for Detecting Minute Lymph Nodes in colon Carcinoma Dis Colon Rectum, Volume 40(4). April 1997.407-410

10. Saha S, Bilchik A, Wiese D, Espinosa M, Badin J, Ganatra BK, Desai D, Kaushal S, Singh T, Arora M. Ultrastaging of colorectal cancer by sentinel lymph node mapping technique—a multicenter trial. Ann Surg Oncol 2001 Oct;8(9 Suppl):94S-98S
11. Lin KM, Rodriguez F, Ota DM. The sentinel node in colorectal carcinoma. Mapping technique, pathologic assessment, and clinical relevance. Oncology (Huntingt) 2002 May;16(5):567-75, 580; discussion 580, 582, 585
12. Merrie AE, Phillips LV, Yun K, McCall JL. Skip metastases in colon cancer: assessment by lymph node mapping using molecular detection. Surgery 2001 Jun;129(6):684-91
13. Joosten JJ, Strobbe LJ, Wauters CA, Pruszczynski M, Wobbes T, Ruers TJ. Intraoperative lymphatic mapping and the sentinel node concept in colorectal carcinoma. Br J Surg 1999 Apr;86(4):482-6
14. Hermanek P. Long-term results of a German prospective multicenter study on colo-rectal cancer. In: Recent Advances in Management of Digestive Cancer (Takahashi T, ed.). Tokyo: Springer-Verlag, 1993.
15. Hermanek P. Pathology of colorectal cancer. In: *Colorectal Cancer – A clinical guide to therapy*. (Bleiberg H, Kemeny N, Rougier P, Wilke W, eds.). Martin Dunitz Ltd, London 2002, p. 55 – 72.
16. Ratto C, Sofo L, Ippoliti M, Merico M, Bossola M, Vecchio FM, Doglietto GB, Crucitti F. Accurate lymph-node detection in colorectal specimens resected for cancer is of prognostic significance. Dis Colon Rectum. 1999 Feb;42(2):143-54; discussion 154-8.
17. Poller DN. Method of specimen fixation and pathological dissection of colorectal cancer influences retrieval of lymph nodes and tumour nodal stage. Eur J Surg Oncol. 2000 Dec;26(8):758-62.
18. Adam JJ, Mohamdee MO, Martin IG, Scott N, Finan PJ, Johnston D, Dixon MF, Quirke P. Role of circumferential margin involvement in the local recurrence of rectal cancer. Lancet 1994 Sep 10;344(8924):707-11

HODNOCENÍ SLIZNIČNÍ TOXICITY POMOCÍ NEINVAZIVNÍHO TESTU STŘEVNÍ PROPUSTNOSTI S ⁵¹Cr- EDTA

EVALUATION OF MUCOSAL TOXICITY USING INTESTINAL PERMEABILITY ⁵¹Cr- EDTA

ŠACHLOVÁ M., BENEŠ M., ILIEVOVÁ M., PAPIRKOVA D., STANIČEK J.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Slizniční toxicita patří mezi nejčastější nežádoucí reakce onkologické léčby. Svými důsledky a projevy přesahuje lokální postižení a nejednou ovlivní celkový průběh protinádorové léčby. Výsledky mohou být ovlivněny použitou metodou, výběrem pacientů a v neposlední řadě záleží i na dobré spolupráci pacienta. Naše modifikace testu opustila volumetrickou přípravu ⁵¹Cr EDTA a nahradila ho metodou řádově tisíckrát přesnější odvažováním na analytických vahách. Vyšetřili jsme 59 pacientů léčených chemoterapií a/nebo radioterapií. Neprokázali jsme statisticky významné změny střevní propustnosti (SP) hodnocené Studentovým T testem po radioterapii malé pánve pro rektální karcinom, po radioterapii pro spinocelulární karcinom anu, po radioterapii malé pánve pro gynekologické malignity, změny jsme neprokázali u souboru pacientů s chemoterapií fluorouracilem v režimu dle de Gramonta, ani při konkomitantní chemoradioterapii pro nádor žlučových cest. Prokázali jsme statisticky významné změny střevní propustnosti metodou s ⁵¹Cr EDTA po léčbě s fluorouracilem v režimu dle Mayo na 5% hladině významnosti ($p = 0,0372$) a potvrdili jsme známou klinickou zkušenost se slizniční toxicitou fluorouracilu. Prokázali jsme statisticky významné změny na 5% hladině významnosti ($p = 0,0293$) střevní propustnosti po léčbě pro pokročilý lymfom režimem kombinované chemoterapie s cyklofosfamidem. Výsledky jsou zatíženy chybou malých čísel, ale je velmi pravděpodobné, že rozhoduje o změně střevní propustnosti nejen podaná chemoterapie, ale i celkový stav pacienta. Výhodou testu ⁵¹Cr EDTA je výborná snášenlivost a příznivá cena. Nevýhodou testu je však 24hodinový sběr moče, což komplikuje výběr ambulantních pacientů. Nevýhodou je použití radionuklidu a tomu odpovídající vybavení pracoviště.

Klíčová slova: střevní propustnost, bariérová funkce střeva, chemoterapie, radioterapie

Summary: Mucosal toxicity is one of the most frequent adverse effect in oncology. The consequences of mucosal toxicity are systemic and often have influence on the course of antitumor therapy. The results could be influenced by the method, selection of patients and their collaboration not at least. In our modification of the ⁵¹Cr EDTA test, we abandoned volumetric treatment, which was replaced by a more sensitive method. We investigated 59 patients with various oncological therapy. We did not detect any changes in intestinal permeability after the radiotherapy of patients with rectal carcinomas, nor in patients with spinocellular carcinomas or gynecological malignancies. Similarly, we could not detect significant differences in a group of patients treated with fluorouracil according to de Gramont, neither after concomitant radiotherapy in patients with biliary tumors. We detected significant changes of intestinal permeability during the course of treatment of fluorouracil according to Mayo using the ⁵¹Cr EDTA test and confirmed the well-known mucosal toxicity of fluorouracil. We also found statistically significant changes in intestinal permeability in patients treated for advanced lymphomas using combined regimens and cyclophosphamide. However, the numbers are too small for conclusive proof whether the general patient's status or just chemotherapy is the main reason for detected changes in intestinal permeability. The advantages of the ⁵¹Cr EDTA test are excellent tolerance and acceptable costs. The disadvantage of the test is a 24-hour collection of urine and the use of a radioisotope.

Key words: intestinal permeability, intestine barrier function, chemotherapy, radiotherapy

ÚVOD

Péče o onkologického pacienta má multidisciplinární charakter. Naší snahou je podat maximálně účinnou onkologickou léčbu s minimem nežádoucích účinků. Největším problémem, se kterým se však onkologové setkávají, jsou toxické projevy chemoterapie a radioterapie, které se stávají limitujícím faktorem pro další léčbu. K monitoraci slizničního poškození lze užít ukazatele klinické, biochemické i histologické. Specifika onkologické populace nás nutí k hledání optimálně tolerovaných a interpretovaných testů a testování jejich vzájemných korelací. V následující práci se autoři soustřeďují na jednu z možných variant, která může přispět k řešení tohoto problému.

STŘEVNÍ PROPUSTNOST

Bariérová funkce je jednou z hlavních charakteristik střevní sliznice. Tuto bariéru lze rozdělit na část vnější (extrinsic- kte-

rá se skládá z vodní vrstvy, mucinu se sekrečním IgA) a vnitřní (intrinsic- vlastní intestinální epitel). Vnější část má spíše protektivní funkci (tzv. fyzikální bariéra), hlavním předpokladem nepropustnosti střevní bariéry je její vnitřní část. Vnitřní část střevní bariéry tvoří enterocyty, které jsou spojeny v blízkosti lumen spojovacím komplexem, který se skládá ze zonulae occludentes (těsná spojení nebo tight junctions), zonulae adherentes a maculae adherentes (desmosomy). Těsná spojení se nacházejí v blízkosti základny mikrovláček, jsou relativně nepropustná pro vodu a ve vodě rozpustné látky. Předpokládá se však, že v těsných spojeních jsou póry, které jsou jednou z oblastí, kterou mohou procházet makromolekulární látky.

Látky se mohou ze střevního prostoru vstřebávat dvěma způsoby - buď proniknutím přes buněčnou membránu a cytoplazmu enterocytu (transcelulárně) nebo mezibuněčným prostorem (paracelulárně). Měření střevní propustnosti (SP) jako parametru vyžaduje určité zjednodušení resp. je možné za

předpokladu, že bariérová funkce je tvořena pouze enterocyty a jejich spojení v „tight junctions“ a ostatní mechanismy je možné ignorovat. Absorpci testovací látky však ovlivňují nejen tyto faktory, ale i další faktory premukozální, mukozální a postmukozální. Tyto faktory je možné minimalizovat použitím více testovacích látek. O stavu střevní sliznice je možné se přesvědčit i invazivními metodami (vážením hmoty střevní sliznice, opakovanými biopsiemi či odběrem tenkého střeva a jeho histologickým rozbořením), které se však mohou použít jen v laboratorních podmínkách v pokusech na zvířatech (6).

K vyšetření střevní propustnosti (SP) se používaly a používají samostatně podávané testovací látky - laktulóza, D-xylóza, mannitol, polymery polyethylenglykolu (PEG) o různé molekulové hmotnosti, etylendiaminopentaoctová kyselina značená techniciem (^{99m}Tc -DTPA), etylendiaminotetraoctová kyselina značená izotopem chromu (^{51}Cr EDTA), polyvinylpyrolidon značený izotopem uhlíku (^{14}C -PVP), ale výsledky mohou být ovlivněny premukozálními nebo postmukozálními faktory. Každá z výše uvedených látek zobrazuje jinou cestu absorpce. Z těchto důvodů byly do praxe zavedeny testy se sacharidy o různé molekulové velikosti. V moči je sledován poměr vyloučeného množství jednotlivých sacharidů, nikoliv jejich absolutní hodnota (6).

METODA

Provedení testu

K sledování střevní propustnosti byla zvolena technika využívající komplexu ^{51}Cr -EDTA, stabilního hydrofilního chelátu edetanu chromitého, výrobce CIS International. Léčivo je dodáváno ve formě sterilního roztoku s rozmezím pH 3,5-6,5 a radiochemickou čistotou 95%. Objemová aktivita roztoku je 3,7 MBq/1 ml. Léčivo je používáno na základě souhlasu MZ ČR s použitím neregistrovaného léčiva a souhlasu SÚJB a etické komise MOU s použitím k výzkumným účelům.

Perorálně aplikovaný roztok ^{51}Cr -EDTA se při neporušené střevní stěně vylučuje stolicí. V případě poškození střevní stěny a zvýšení její propustnosti se komplex vstřebává střevní stěnou do krve a následně se vylučuje ledvinami. U zdravého jedince je maximum fyziologického nálezu ^{51}Cr -EDTA v moči za 24 hodin po p.o. aplikaci do 2,5% z celkového podaného množství. Obsah ^{51}Cr -EDTA v moči se stanovuje ve studnovém detektoru porovnáním přesně stanovené části ze 24 hodinového sběru moči se standardem, který je připraven v poměru 1:100 vůči dávce aplikované pacientovi. Doporučená dávka pro jednoho pacienta činí 1,5 MBq.

Metodika používaná na našem pracovišti spočívá v opuštění volumetrické přípravy, tzn. odměřování velmi zředěných velkých objemů roztoku záříče pomocí odměrných válců, a v přechodu na techniku řádově tisíckrát přesnější, tj. odvažování dávek pro jednotlivé pacienty a vzorku moči pro vyhodnocení na přesných analytických vahách.

Příprava vzorků k perorální aplikaci pacientům

Příprava je prováděna podle platného standardního operačního postupu, za dodržení podmínek pro práci s otevřenými zdroji ionizujícího záření. K přípravě jednotlivých vzorků i standardu se používá injekční stříkačka s jehlou, s přesně stanovenou hmotností - tárou. Stříkačkou s tárou se ze zásobní lahvičky odebere množství roztoku ^{51}Cr -EDTA s aktivitou $1,5 \times n$ (n = počet pacientů+standard). Roztok se doplní destilovanou vodou do objemové aktivity cca $1,5\text{MBq}\cdot\text{ml}^{-1}$. Změří se celková aktivita vzorku ve stříkačce a stanoví hmotnost stříkačky s navážkou (na 3 desetinná místa v g). Z těchto hodnot se stanoví hmotnostní aktivita vzorku a hmotnost jednotlivé dávky, tj. $1,5\text{MBq} = x$ g.

Dávky pro aplikaci jednotlivým pacientům se přichystají do označených polystyrenových uzavíratelných kelímků ($V = 250\text{ml}$) se stanovenou tárou. Roztok ^{51}Cr -EDTA se v množství odpovídající jednotlivé dávce aplikuje do kelím-

ku, po přesném stanovení navážky se doplní destilovanou vodou do cca 200g. Injekční stříkačka, ze které se odebírají jednotlivé dávky, se vždy před a po odebrání dávky zvaží. Po přípravě poslední dávky pro pacienta se znovu určí přesná hmotnost a orientačně aktivita rezidua ve stříkačce.

Během přípravy se všechny zjištěné hodnoty, tj. hmotnost používaných pomůcek, celková aktivita vzorku, hmotnost vzorku, orientační navážka odpovídající jednotlivé dávce a další zapisují do protokolu. Záznam těchto hodnot umožňuje přesnější vyhodnocení dávky podané pacientovi. Do průvodky k aplikaci se zaznamená vedle identifikace kelímků přesná aktivita každého vzorku (na 3 desetinná místa v MBq).

Příprava standardu pro měření výsledků

Probíhá stejně jako příprava vzorků pro pacienty, odlišnost spočívá ve výsledné celkové aktivitě. Pro přípravu standardního vzorku 1:100 se čistou injekční stříkačkou odebere část odpovídající jedné setině aktivity jednotlivé dávky, tj. 0,015 MBq a přenesení se do kelímku o známé hmotnosti. Vodou se doplní na celkovou hmotnost 200,0g.

Zpracování 24 hodinového sběru moči

Pacienti jsou vybaveni zachytanou nádobou (s tárou) pro sběr moči, jsou předem poučeni o technice a důležitosti správného sběru moči a dalších souvislostech s IZ. Sběr je ukončen 24 hodin po aplikaci ^{51}Cr -EDTA. Na přesných vahách je stanovena celková hmotnost 24h sběru a odebrán vzorek cca 200 g. U vzorku je po stanovení hmotnosti a četnosti impulsů srovnáním se standardem. Z těchto údajů je stanovena propustnost střevní stěny.

SOUBOR

Vyšetřili jsme touto metodou 59 pacientů po zahájení chemoterapie nebo radioterapie. Kontrolní skupinu tvoří 8 pacientů, kteří dosud nebyli léčeni, průměrný věk 54 let. Hodnoty do 2,4 jsme považovali za normální. Průměrný věk a onkologická léčba je uvedena u každé skupiny.

Pacienti s onkologickou léčbou

1. skupina- chemoterapie FU/FA

1A/ Pacienti s onkologickým onemocněním za týden po aplikaci FU/FA režimem dle De Gramonta. Režim: fluorouracil 400mg/m² bolus, pak 600mg/m² na 22 hodin, leukovorin 200mg/m² D1 a D2. Interval 14 dní. Průměrný věk 54 let.

1B/ Pacienti za týden po aplikaci FU/FA režimem dle Mayo. Režim: fluorouracil 425mg/m² bolus i.v., D1-5, leukovorin 20mg/m² i.v.D1-5. Interval 28 dnů. Průměrný věk 53 let.

2. Skupina- radioterapie pro karcinom rekta

A/ Pacienti za týden po zahájení pooperačního ozařování malé pánve pro karcinom rekta. Průměrný věk 64 let.

B/ Pacienti s radioterapií na lokální recidivu rekta (46 Gy). Průměrný věk 66 let.

C/ Pacienti s chemoterapií FU/FA režimem dle Mayo (režim-výše), pak radioterapie ze 3 polí v poloze na břicho celkem 45Gy, vyšetřeni za týden po zahájení RT, malý soubor. Průměrný věk 60 let.

3. skupina

Pacienti s konkomitantní chemo a radioterapií pro adenokarcinome žlučových cest.(Radioterapie 45Gy v 25 frakcích, potenciace radioterapie fluorouracilem v 1. a 5. týdnu). Vyšetřeni 14. den od zahájení léčby. Průměrný věk 60 let.

4. skupina

Pacienti a konkomitantní chemo a radioterapií pro spinocelulární karcinom análního kanálu.(Radioterapie 36Gy na

oblast pánve-velké pole včetně třísel, horní okraj L4/5, boost cíleně 23Gy, fluorouracil a mitomycin konkomitantně 1. a 5.tyden radioterapie. Vyšetření 14.den. Průměrný věk 63 let.

5. skupina

Pacienti s radioterapií paraortálních uzlin (25Gy), bez radioterapie malé pánve. Průměrný věk 43 let.

6. skupina- gynekologické malignity

A/ Patientky s radioterapií malé pánve pro karcinom děložního těla (20 Gy plné pole, 20 Gy split, 2x 10 Gy brachyterapie). Průměrný věk 64 let.

B/ Patientky se zevní radioterapií 40Gy, 3x brachyterapie 20 + 20 + 16 Gy pro spinocelulární karcinom čípku děložního, malý soubor. Průměrný věk 46 let.

7. skupina- hematologické malignity

Pacienti s chemoterapií- kombinace s cyklofosfamidem pro diagnózu ne Hodgkinský lymfom . Průměrný věk 50 let.

Režimy:

CHOP:cyklofosfamid 750mg/m² D1, vinkristin 1,4mg/m² (do 2mg) D1, doxorubicin 50mg/m² D1, prednison 50mg/m² D1-5,intervaly 21 dní.

CHOP: cyklofosfamid a vinkristin a prednison jako v režimu CHOP, místo doxorubicinu je mitoxantron (menší riziko kardiotoxicity)

CVP: cyklofosfamid 400mg/m² D1-5, vinkristin 1,4mg/m² (nebo vinblastin při riziku polyneuropathie) D1-5, prednison 100mg D1-5.

VÝSLEDKY

Tab. I. Množství ⁵¹Cr EDTA v moči (%)

Pacient/ skupina	Kontrol.	1A sk.	1B sk.	2A sk.	2B sk.	2C sk.
1.	1,8	1,7	4,9	3,8	1,5	3,3
2.	1,9	1,6	5,8	2,5	5,7	1,53
3.	2,0	1,4	3,0	2,4	3,22	
4.	1,7	2,4	5,5	2,5		
5.	2,4	2,9	3,6	2,5		
6.	1,9	2,1	2,0	0,8		
7.	2,2	6,8		2,2		
8.	2,0					

1A-2C skupiny vyšetřovaných pacientů
kontrol. kontrolní skupina před zahájením léčby

Tab. II. Množství ⁵¹Cr EDTA v moči (%)

Pac./ skup.	3. sk.	4. sk.	5. sk.	6A sk.	6B sk.	7. sk.	Kontrol. sk.
1.	5,6	3,3	1,7	3,0	0,8	3,9	1,8
2.	0,9	0,7	1,5	2,0	2,0	5,0	1,9
3.	1,3	2,9	5,4	2,0		1,5	2,0
4.	2,0	4,4	4,7	3,8		4,0	1,7
5.		1,7	6,6	2,4		4,7	2,4
6.		1,3	2,7	5,5		1,6	1,9
7.				3,0		4,7	2,2
8.						3,8	2,0
9.						2,8	

HODNOCENÍ

Tab. III.

Skupina	Počet	Průměr	Směrodatná odchylka	Min.	Max.	P> /t/
1.A	7	2,7	1,879716	1,4	6,8	0,6875
1.B	6	4,13333	1,506873	2	5,8	0,0372
2.A	7	2,36667	0,9563821	0,8	3,8	0,9353
2.B	3	3,4733	2,111429	1,5	5,7	0,4715
2C	2	20415	1025158	1,53	3,3	0,9892
3.	4	2,45	2,148643	0,9	5,6	0,9658
4.	6	2,38333	1,389124	0,7	4,4	0,9777
5.	6	3,766667	2,103014	1,5	6,6	0,1723
6.A	7	3,1	1,236932	2	5,5	0,1850
6.B	2	1,4	0,8485281	0,8	2	0,3440
7.	9	3,55	1,31	1,5	5,0	0,0293

Zvýšené hodnoty střevní propustnosti jsme prokázali ve skupině pacientů s chemoterapií FU/FA režimem dle Mayo na 5% statistické hladině významnosti (p = 0,0372). Hodnocení provedeno Studentovým T testem. Zvýšené hodnoty střevní propustnosti na 5% hladině významnosti jsme prokázali i ve skupině pacientů po aplikaci chemoterapeutických režimů s cyklofosfamidem (p = 0,0293). Ostatní skupiny nejsou statisticky významné.

Tab. IV. Rozložení pacientů ve vztahu k výživě

Počet pacientů	BMI do 18,5	BMI 18,5-25	BMI 25-30	BMI nad 30
33 s patologickými hodnotami střevní propustnosti	3	18	6	5
26 s normálními hodnotami střevní propustnosti	0	7	12	7

V souboru s patologickými hodnotami střevní propustnosti jsou podle BMI (tělesný hmotnostní index) zjištěny u 3 pacientů známky podvýživy (BMI do 18,5), 18 pacientů je s normální výživou (BMI 18,5-25), 6 s nadváhou (25-30) a 5 s obezitou (BMI nad 30).

U 8 pacientů je hypoalbuminémie, 8 pacientů má zvýšené CRP nebo mukoproteiny, leukopenie Gr 3-4 je přítomna u 10 pacientů. 3x byly přítomny afy v dutině ústní, 1x soor, 2x průjmy (více než 10 stolic denně), 1x sepse.

Ve skupině pacientů s normálními hodnotami střevní propustnosti není žádný pacient se známkami podvýživy (BMI do 18,5), normální výživa je u 7 pacientů (BMI 18,5-25), nadměrná výživa je u 12 pacientů (BMI 25-30), nadměrná výživa je u 7 pacientů (BMI nad 30).

U 3 pacientů je zjištěna hypoalbuminémie, 2 pacienti měli zvýšené CRP, 4 pacienti měli leukopenii gr. 3/4. 2 pacienti měli afy v dutině ústní, 1x byla zjištěna sepse.

Tab. V. Některé sledované laboratorní hodnoty a symptomy

počet pac.	hypoalbuminémie	zvýš.CRP/ MKP	Leukopenie	afy/soor	průjmy	sepse
33	8	8	10	4	2	1
26	3	2	4	2	0	1

DISKUSE

Fluorouracil redukuje absorpční a enzymatickou aktivitu ve sliznici tenkého střeva v pokusu na krysách. Incidence muko-

zitivity a myelosuprese je z klinické praxe známá a vrcholí 9.-14. podání. Klinickým projevem je zvýšení střevní permeability tenkého střeva, které je spojeno s průjmy a někdy se zvýšeným rizikem bakteriémie a endotoxemie. Je známo, že toxicitu fluorouracilu je možné ovlivnit dávkou a režimem. V našem souboru jsme prokázali změnu střevní propustnosti po léčbě fluorouracilem režimem dle Mayo a neprokázali jsme změny SP po léčbě režimem dle de Gramonta. Fata et al (5) popisuje toxicitu fluorouracilu, která vedla k ulceracím a ischemii tenkého střeva. Mechanismy poškození jsou podle něj multifaktoriální (přímá toxicita na enterocyty, průtok krve sliznicí nebo trombogenní a angiospastický efekt na vaskulární endotel).

Načasování vyšetření vycházelo z předchozích studií Siber a spol. (11), kdy největší změny střevní propustnosti byly hodnoceny mezi 3. a 7. dnem, resp. D10-12 od zahájení chemoterapie.

Cyklofosamid nepatří mezi chemoterapeutika s výraznou slizniční toxicitou. Po výše uvedených režimech CHOP, CNOP a CVP bývá nauzea, často leukopenie, někdy je pozorovaná kardiotoxicita. V našem souboru jsme prokázali statisticky významné změny střevní propustnosti, které jsou patrně více než chemoterapeutickým režimem způsobeny celkovým stavem pacientů v této skupině. Všichni pacienti léčení pro pokročilý lymfom měli leukopenii, 4 pacienti leukopenii gr 3-4, Karnofského index 70-80%. Jako součást základního onemocnění je nízká hladina albuminu a vysoké CRP, rozpadové febrilie. V souhlase s našimi výsledky popisuje Bero (2) sníženou absorpci xylózy po režimu COP (cyklofosamid, vinkristin, prednison) u pacientů s hematologickými malignitami.

Zvýšená střevní propustnost je zvýšena u řady onemocnění jako je zánětlivé onemocnění střeva, poškození sliznice nesteroïdními antirevmatiky, při polytraumatech, po transplantaci kostní dřeně a po léčbě akutní myeloidní leukemie (4, 12). Na změně střevní propustnosti se mohou podílet i jiné vlivy např. stav výživy (13).

Signifikantní redukce absorpce mannitolu byla u dětí s nádorovým onemocněním a nízkým stavem výživy (8). Závislost celkového stavu onkologického pacienta na změně střevní propustnosti potvrzuje v souladu s našimi výsledky i další práce s pacienty s inoperabilním tumorem ledvin a maligním melanomem. Zvýšení bylo již při vstupním vyšetření (9). Pacienti s rozvojem multiorgánového postižení měli zvýšenou střevní propustnost při testu s polyetylglykolem (1).

V souboru se zvýšenou permeabilitou jsou zastoupeni častěji pacienti se známkami malnutrice a leukopenie. Avšak někteří jednotliví pacienti mají vysokou hodnotu testu střevní propustnosti a minimum potíží, naproti tomu pacient se sepsí a leukopenií má hodnoty střevní propustnosti v normě. Podobných výsledků dosáhl i Siber (11) a Beneš (3). V Benešově práci není

vzestup střevní propustnosti v korelaci s klinickými ukazateli postižení sliznic, autor nabízí vysvětlení, že zvracení a průjem jsou vyvolány ještě dalšími mechanismy jako je např. průjem z dysmikrobie a že je odlišná slizniční citlivost dutiny ústní a jejunu. Efekt přerůstání bakterií se uvažuje jako hlavní důvod zvýšené SP pro laktulózo-mannitolový test u dětí s imunodeficitem (7).

Podle literárních údajů prodloužení sběru moče zvyšuje sensitivitu testu (10). Standardně jsme použili 24 hodinový sběr moče. Z našeho vyšetření byli vyloučeni pacienti, u kterých by změna střevní propustnosti mohla být z jiných příčin. Vyloučili jsme i pacienty se zavedenou nazogastrickou sondou, s močovým katetrem a nefrostomií, aby výsledek nebyl zkreslen vychytáním radioizotopu v sondovém a katetrovém materiálu. Ze souboru byli vyloučeni pacienti, kteří nebyli schopni přesně posbírat moč. Žádný pacient nebyl na ventilátoru nebo hospitalizován na JIP, všichni pacienti byli chodící, lucidní.

ZÁVĚR

Naše modifikace testu opustila volumetrickou přípravu ⁵¹Cr EDTA a nahradila ho metodou řádově tisíckrát přesnější odvažování na analytických vahách.

Vyšetřili jsme 59 pacientů léčených chemoterapií a/nebo radioterapií malé pánve pro rektální karcinom , neprokázali jsme změny SP po radioterapii pro spinocelulární karcinom anu, neprokázali jsme změny střevní propustnosti po radioterapii malé pánve pro gynekologické malignity. Změny jsme neprokázali u souboru pacientů s chemoterapií fluorouracilem v režimu dle de Gramonta, ani při konkomitantní chemoradioterapii pro nádor žlučových cest (soubor je však zatížen chybou malých čísel).

Prokázali jsme statisticky významné změny střevní propustnosti metodou s ⁵¹Cr EDTA po léčbě s fluorouracilem v režimu dle Mayo a potvrdili jsme známou klinickou zkušenost se slizniční toxicitou fluorouracilu, která závisí i na zvoleném léčebném režimu.

Prokázali jsme statisticky významné změny střevní propustnosti po léčbě pro pokročilý lymfom režimy kombinované chemoterapie s cyklofosamidem. Výsledky jsou zatíženy chybou malých čísel, ale je velmi pravděpodobné, že rozhoduje o změně střevní propustnosti nejen podaná chemoterapie, ale i celkový stav pacienta.

Výhodou testu ⁵¹Cr EDTA je výborná snášenlivost a příznivá cena.

Nevýhodou testu je však 24 hodinový sběr moče, což komplikuje výběr ambulantních pacientů. Nevýhodou je použití radionuklidu a tomu odpovídající vybavení pracoviště. Získané zkušenosti chceme aplikovat i v dalších studiích na hodnocení slizniční toxicity a možné profylaxi slizničního postižení.

Literatura

1. AMMORI B. J., LEEDER P. C., KING R. F., BARCLAY G. R. et al: Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J. Gastrointest. Surg.*, 1999, 3(3), 252-62.
2. BENARD A., DESREUMEAUX F., HUGLO D., HOORELBEKE A., TONNEL A. B., WALLAERT B: Increased intestinal permeability in bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, 97 (6), 1173-8.
3. BENEŠ P., PYTLÍK R., KLEPETÁR J: Poškození střevní resorpce v důsledku slizniční toxicity cytostatické léčby (poster). Abstrakta XVI. kongresu SPEVIMP, Hradec Králové 2000, 57-58
4. BOW E. J., LOEWEN R., CHEANG M. S. et al: Cytotoxic therapy-induced D-xylose malabsorption and invasive infection during remission-induction therapy for acute myeloid leukemia in adults. *J. Clin. Oncol.* 1997, 15, 2254-2261
5. HOND E. D., PEETERS M., HIELE M., BULTEEL V., GHOOS Y., RUTGEERTS P. et al: Effect of glutamine on the intestinal permeability changes induced by indomethacin in humans. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1999, 13(5), 679-85.
6. KOHOUT P., BRÁTOVÁ M., ZADÁK Z.: Možnosti určení střevní permeability. *Česká a slovenská gastroenterol.*, 1995, 49 (1), 14-19.

7. PIGNATA C., BUDILLON G., MONACO G., NANI E., et al: Jejunal bacterial overgrowth and intestinal permeability in children with immunodeficiency syndromes. *Gut*, 1990, 31(8), 879-882.
8. PLEDGER J. V., PEARSON A. D., GRAFT A. W., LAKER M. F., EASTHAM E. J.: Intestinal permeability during chemotherapy for childhood tumours. *Eur. J. Pediatr.*, 1988, 147 (2), 123-7.
9. RYAN C. M., ATKINS M. B., MIER J. W., GELFAND J. A., TOMPKINS R. G.: Effects of malignancy and interleukin-2 infusion on gut macromolecular permeability. *Crit. Care Med.* 1995, 23 (11), 1801-6.
10. SELBY P. J., LOPES N., MUNDY J., CROFTS M. -aj: Cyclophosphamide priming reduces intestinal damage in man following high dose melphalan chemotherapy. *Br. J. Cancer.* 1987, 55, 531-3.
11. SIBER G. R., MAYER R. J., LEVIN M. J.: Increased gastrointestinal absorption of large molecules in patients after 5-fluorouracil therapy for metastatic colon carcinoma. *Cancer Res.*, 1980, 40, 3430-6.
12. SACHLOVÁ M.: Střevní propustnost v onkologii. *Kl. onk. č.* 1/2002, 17-21.
13. ELSH F. K., FARMERY S. M., MACLENNAN K., SHERIDAN M. B., BARCLAY G. R. et al: Gut barrier function in malnourished patients. *Gut*, 1998, 42(3), 396-401.

ZÁVAŽNÁ A NEOČEKÁVANÁ CNS TOXICITA U DÍTĚTE LÉČENÉHO HIGH DOSE METHOTREXÁTEM – OTÁZKY Z MINULOSTI ZŮSTÁVAJÍ NEZODPOVĚZENY

SIGNIFICANT AND UNEXPECTED TOXICITY IN A CHILD TREATED WITH HIGH-DOSE THERAPY WITH METHOTREXATE – PAST QUESTIONS REMAINING UNANSWERED

VALÍK D.¹, ZAPLETAL O.², DEMLOVÁ R.³

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, BRNO

² DĚTSKÁ NEMOCNICE FN BRNO, ODDĚLENÍ DĚTSKÉ ONKOLOGIE

³ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÝCH STUDIÍ, BRNO

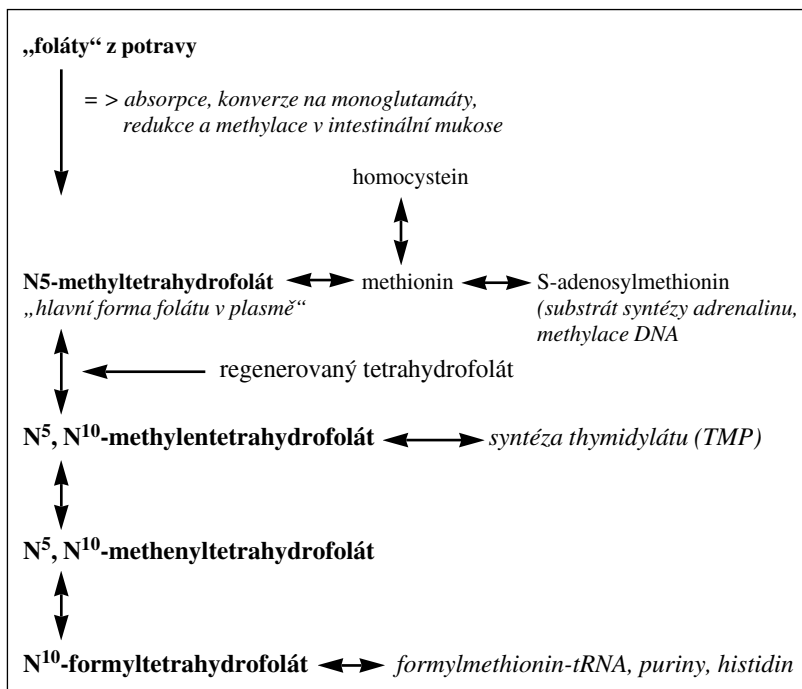
Souhrn: *Východiska:* Methotrexát je jedním z nejvíce používaných cytostatik v dětské onkologii. Rozpětí terapeuticky používaných dávek je ve srovnání s jinými cytostatiky neobvykle široké. Navzdory dlouhodobému používání MTX je dosud v klinické praxi mnoho empirie a nejasností. *Typ studie a soubor:* Autoři shrnuli současné poznatky o metabolismu MTX a pokusili se zhodnotit možnosti predikce klinické efektivity i toxicity. Uvádějí kazuistiku neočekávané a klinicky velmi závažné CNS toxicity, která se objevila v souvislosti s podáním MTX. *Metody a výsledky:* Na Oddělení dětské onkologie FN Brno je léčen devítiletý chlapec s akutní hybridní, bcr-abl pozitivní leukémií dle protokolu ALL-BFM 95 pro vysoké riziko. Jeho součástí je i blok high-dose methotrexátu v dávce 5 g/m². Čtvrtý den prvního bloku se objevila vysoce závažná neurotoxicita, křeče s kvantitativní poruchou vědomí (Glasgow coma scale 5) vyžadující resuscitační péči s umělou plicní ventilací v délce 30 hodin. Pokles hladin MTX v séru byl významně prodloužen. *Závěry:* Neočekávaná, až život ohrožující toxicita se nevyhýbá ani dlouhodobě úspěšně používaným cytostatikům. U preparátů v klinické onkologii dosud nepostradatelných, by bylo potřebné mít k dispozici spolehlivější metodické nástroje, které predikují případný – a potenciálně fatální – nežádoucí efekt podávané terapie.

Summary: *Background:* Methotrexate is one of the most frequently used cytotoxic drugs in pediatric oncology. Its dosing range used in the clinic is unusually broad comparing with other commonly used anticancer drugs. Despite the longterm use of methotrexate in treatment of selected malignancies, its clinical use is still covered with a lot of empirics and its dosage and metabolism poorly substantiated by relevant subject-oriented data. *Type of study and cohort:* Current knowledge on methotrexate metabolism was reviewed and potential of efficacy and toxicity prediction outlined. A case report of unexpected and clinically serious CNS toxicity that followed administration of high-dose methotrexate is presented. *Methods and results:* A nine year old boy is treated for acute hybrid bcr-abl positive leukemia using the protocol ALL-BFM95 containing a block of 5 g.m⁻² high-dose methotrexate. On the fourth day of the first block an episode of severe neurotoxicity occurred with convulsions and deep coma (Glasgow grade 5) requiring emergent resuscitation care with artificial ventilation for a period of 30 hours. We observed a markedly prolonged decrease of plasma methotrexate levels. *Conclusions:* Unexpected and sometimes life-threatening toxicity is a complication of treatment of even those anticancer drugs with proven efficacy record. For such drugs as of yet indispensable in clinical oncology, it is important to concentrate effort to devise methods capable of predicting potential and possibly fatal therapy-related side effect.

Úvod

Methotrexát (MTX) je v dětské onkologii jedním z nejvíce používaných cytotoxických léčiv. Jeho klinický efekt byl prokázán v léčbě ALL, NHL, histiocytóz, osteosarkomů a dalších malignit. Methotrexát je podáván řadou různých způsobů, vč. cesty orální, intratekální nebo intravenózní. Intravenózně se v současnosti podává velmi široké dávkové rozpětí od bolusu 10 mg až po dávky dosahující 33 000 mg/m². Jako „high-dose MTX therapy“ se obvykle označuje dávkový režim nad 1 g/m² povrchu těla (BSA – body surface area). Podávání high-dose MTX je spojeno s následnou selektivní „rescue“ terapií pomocí nízkých dávek leukovorinu (5-formyltetrahydrofolát), aby se zabránilo nežádoucí toxicitě při zachování klinické účinnosti (18, 21). Methotrexát je strukturním analogem kyseliny listové, která je esenciálním kofaktorem pro syntézu purinového kruhu, thymidinových nukleotidů, kofaktorem interkonverze aminokyselin serin/glycin a substrátem remethylace homocys-

teinu za vzniku methioninu (obr. 1). Methotrexát je silným inhibitorem dihydrofolátreduktázy (DHFR), enzymu, který je odpovědný za konverzi různých forem folátu na biologicky aktivní formu – tetrahydrofolát (8). Jsou-li v buňce přítomny vysoké koncentrace MTX, dojde k deplici tetrahydrofolátu, která vede k následné deplici substrátů kriticky důležitých k syntéze DNA. Determinantou cytotoxicity methotrexátu se zdá být míra inhibice syntézy thymidylové kyseliny, protože syntéza thymidylátu z uridylátu je jedinou reakcí, která oxiduje tetrahydrofolátový kofaktor na jeho inaktivní dihydrofolátovou formu (18). Jinou determinantou může být i nadbytek vazebných míst na DHFR, jelikož intracelulární hladiny tohoto cílového enzymu jsou 20-30 x vyšší než hladiny potřebné k udržení nezbytné metabolicky směřitelné hotovosti tetrahydrofolátu (9). Methotrexát sdílí membránové transportní procesy a intracelulární metabolické cesty s přirozeně se vyskytujícími formami folátu. Po vstupu do buňky je methotrexát rychle vázán na DHFR



a jeho vychytávání je jednosměrné, dokud nedojde k saturaci vazebných míst na cílovém enzymu (8). Po dosažení stavu saturace je nadbytek volného léku (jako u přirozených folátů) přeměněn na polyglutamátové formy (MTX+Glu₅₋₇), které nemohou jednoduše opustit intracelulární prostředí. Tvorba polyglutamátů přispívá jak k cytotoxickému efektu MTX tak k jeho nežádoucím účinkům (9). Metabolismus methotrexátu se liší u dospělých a dětí (16). U dětí byl např. zjištěn větší distribuční objem a dle některých studií byly plasmatické koncentrace léku nižší než u dospělých. Účinná látka byla u dětí i rychleji vylučována (21, 26). Normalizovaná clearance methotrexátu je u dětí také vyšší, a navíc věkově závislá (7). Methotrexát je primárně eliminován v nezměněné podobě ledvinami. Renální clearance methotrexátu může překročit clearance kreatininu (18). Methotrexát je také metabolizován v játrech na 7-hydroxymethotrexát (27), pravděpodobně některým z enzymových systémů genové rodiny CYP. Ačkoli jde o minoritní cestu eliminace methotrexátu, může tvorba tohoto méně cytotoxického metabolitu přispívat ke snížení protinádorové aktivity parentální látky, pravděpodobně kompeticí o buněčný transport a polyglutamylaci. Celková clearance methotrexátu však nebývá podstatněji ovlivněna jaterní dysfunkcí. Experimentálně zjištěné způsoby resistance na methotrexát jsou sniženy membránový transport, zvýšené hladiny cílového enzymu spojené s amplifikací genu pro DHFR, alterace afinity DHFR k methotrexátu, snížení polyglutamylace a snížení aktivity thymidylátsyntasy, kterou může nahrazovat tzv. „salvage pathway“ prostřednictvím zvýšené aktivity thymidinkinasy (9). Primárními toxickými účinky vysokodávkovaného methotrexátu je myelosuprese, ořintestinální mukositida, která se objevuje za 5–14 dnů po podání léku, s častým rozvojem febrilní neutropenie (24). Paušální podávání hemopoetických růstových faktorů po monoterapii vysokodávkovaným MTX nepřineslo pacientům žádnou léčebnou výhodu, v případech kombinované polychemoterapie, kde je HD MTX jedním z řady léků v bloku chemoterapie, je použití hemopoetických růstových faktorů již poněkud racionálnější (23). Vývoj toxických reakcí po podání je úměrný dávce léku a trvání expozice (3). Nejzávažnějším projevům toxicity lze většinou zabránit včasným podáním leukovorinu (12), jehož předpokladem je důsledné monitorování plasmatických hladin MTX. Hepatototoxicita po MTX

je také obvyklým jevem. Dochází především k elevaci ALT, AST, bilirubin bývá zvýšen méně často. V některých protokolech – např. protokol pro terapii osteosarkomu u dětí POG9351 – se s paušální hepatotoxicitou přímo počítá a kontraindikací k podání high-dose MTX je elevace ALT na více než 10-násobek normy. Elevace jaterních enzymů bývá však ve většině případů přechodným jevem, který odezní po vysazení léku. Přetrvávání laboratorních známek poškození jater by pak mělo být spíše důvodem k pátrání po jiných příčinách, např. virových. V průběhu high-dose terapie se může objevit i nefrototoxicita. Poškození ledvin může být způsobeno precipitací MTX nebo 7-OH-MTX v kyselé moči, nebo může být následkem přímého působení MTX na tubulární buňky (1). Navzdory klinickému úspěchu tohoto léku, který byl v předchozích dekadách dosažen, neurotoxicita nejasné etiologie je dalším problémem, který se u high-dose terapie může objevit (19, 25). Předpokládá se, že neurotoxicita MTX může být způsobena interferencí MTX s recyklací bipterinů s následkem poruchy syntézy dopaminu a serotoninu (15). Bylo dále prokázáno, že MTX způsobuje akumulaci adenosinu, látky s významnými neuromodulačními vlastnostmi (6).

V souladu s tímto nálezem bylo pozorováno, že podání methyloxanthinů, které jsou antagonisty adenosinových receptorů, snižuje akutní toxicitu způsobenou methotrexátem (2, 19). Methotrexát pohotově zvyšuje hladiny plasmatického homocysteinu (2,5,20). Důležitost tohoto pozorování tkví také ve skutečnosti, že se homocystein zdá být toxický pro vaskulární endotel; řada prací ukazuje na roli homocysteinu v indukci předčasného výskytu kardiovaskulárního onemocnění (14). Neurologické následky terapie MTX, které zahrnují fokální neurologický deficit, mineralizující mikroangiopathii a léze bílé hmoty daly vzniknout dalším spekulacím, že mikrovaskulární léze způsobené homocysteinem mohou být alespoň zčásti odpovědné za CNS toxicitu methotrexátu (17). Stručně shrnuto, navzdory více než 50 roků výzkumu a klinického používání není optimální dávkování methotrexátu doposud známo (11). Současné dávkovací schéma založené na BSA (opakuje se) zajišťuje dostatečnou přesnost, nikoli správnost dávkování, jelikož nebere v úvahu reakci jednotlivce na podaný lék. Z hlediska farmakokinetiky je výše plasmatické hladiny MTX dána hlavně mírou renální eliminace a transformace na jeho 7-hydroxyderivát enzymovým cytochromovým systémem v játrech. Jaterní cytochromové systémy jsou v poslední době předmětem zvýšeného odborného zájmu, protože se ukazuje, že genetické vlivy v expresi, resp. v aktivitě těchto enzymů mohou významně měnit individuální odpověď jedince na podaný lék. V poslední době se v klinické onkologii objevují některé nové aktivity, které se soustřeďují na hodnocení odezvy tumoru na podanou léčbu – prediktivní onkologie. Jiným novým přístupem je sledování reakce hostitele tumoru (pacienta) na podanou terapii – jde o tzv. farmakogenetiku (také se používá termín farmakogenomika). Společným jmenovatelem těchto dvou přístupů je snaha individualizovat terapii jednak vzhledem k onemocnění (tj. použít daný lék na ten či onen nádor, kde lze předpokládat efektivitu) a jednak vzhledem k pacientovi, tj. použít takový režim, kterým způsobí nejméně škod, ale bude mít pokud možno měřitelný efekt.

Kazuistika

Na Oddělení dětské onkologie DN FNB je léčen devítiletý chlapec s akutní, hybridní, bcr-abl pozitivní leukémií, s delecí chromosomu 7, s aberantní expresí CD 13, CD 66c, CD 7 a CD

Tabulka: hladiny MTX v séru v jednotlivých časových intervalech (čas T0 až T120 hod) od začátku infuze HDMTX (mikromol/l)

Hodina	24	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96	102	108	114	120
Hladiny MTX (μmol/l) 1. aplikace	> 100	9	5	3,9	1,98	1,34	0,88	0,87	0,84	0,52	0,5	0,39	0,39	0,2	0,19	0,09
Hladiny MTX 2. aplikace	17 (h 28: 4.0)	0,55	0,26	0,21	0,12											

5a hyperexpresi CD 10. Rodinná i osobní anamnéza jsou pro nyníšší onemocnění nevýznamné. Dva dny před stanovením diagnózy byl pacient vyšetřen u svého dětského lékaře pro výsev petechií. V krevním obrazu byla leukocytosa $54 \times 10^9/l$, trombocytopenie $61 \times 10^9/l$ a hemoglobin 122 g/l. Iničiální infiltrační kostní dřené blasty dosáhla 74%. Léčba byla zahájena začátkem září 2001 a je vedena dle protokolu ALL-BFM 95 pro vysoké riziko (HR). Zpočátku probíhala léčba bez komplikací. Ode dne 25 Protokolu IA pokračoval pacient v chemoterapii ambulantně. V den 31 Protokolu IA byl přijat na naše oddělení s febrilní neutropenií, která byla komplikována katetrovou sepsi s nutností extrakce centrálního venošího katetru. Stav se podařilo zvládnout kombinovanou antibiotickou a antimykotickou léčbou. Den 33 Protokolu IA nebylo dosaženo dřéňové remise onemocnění. Znovu byl zaveden tunelizovaný CVK a pacient zahájil plánovaný blok chemoterapie. Jeho součástí (blok HR 1) je i podání vysokodávkovaného methotrexátu 5 g/m^2 ve 24 hodinové kontinuální infuzi (HD MTX). Na začátku infuze HD MTX byla rovněž provedena lumbální punkce s aplikací 12 mg MTX, 30 mg Cytosinarabosidu a 10 mg Prednisolonu. V mozkomíšním moku byl normální biochemický i cytologický nále. Další dny pokračoval blok nízkodávkovaným Cyklofosfamidem. Monitorovali jsme hladiny MTX a podávali leukovorin dle protokolu ALL BFM 95. Hladiny MTX byly vysoké a klesaly jen pomalu, jak je patrné z tabulky. Proto byla hodinu 36 od začátku HD MTX zvýšena hydratace na $4500 \text{ ml/m}^2/\text{den}$ a hodinu 42 bylo zahájeno podávání leukovorinu ve zvýšených dávkách dle protokolu. Čtvrtý den bloku dopoledne, přibližně hodinu 70 od začátku infuze HD MTX, se pacient začal cítit „divně“. Somatický nále i laboratorní hodnoty byly v mezích normy. Asi po hodině došlo ke zhoršení stavu, nastoupila kvalitatívni a posléze i kvantitatívni porucha vědomí, Glasgow coma scale (GCS) kleslo na 5. Po inhalaci kyslíku se stav zlepšil, pacient se přechodně přibíral. Neurolog konstatoval hypotonický syndrom s globální š.o. hyporeflexií, bez paréz, bez meningeálních jevů a poruchu vědomí na úrovni soporu. Oční vyšetření neprokázalo patologii na očním pozadí, akutní laboratorní odběry byly v mezích normy. Pro podezření na akutní CNS toxicitu HD MTX byla aplikována infuze Syntophyllinu, 3 mg/kg/dávku, bez viditelného efektu. Objevily se záškuby obličejového svalstva a poté i toniccko-klonické křeče končetin, které nereagovaly na podání Diazepam. Pacient začal slinit a hypoventilovat. Asi 2 hodiny po začátku potíží byl zaintubován a přeložen na ARO k umělé plicní ventilaci. Kromě již zavedené terapie byla podávána antiedematozní terapie. Po 30 hodinách byl pacient odtlumen a extubován. Při překlada zpět na naše oddělení byl plně při vědomí, orientován. Akutní CT i MR vyšetření neprokázala intrakraniální ložiskovou ani difúzní patologii. Hladiny MTX poklesly pod sledovanou hranici $0,25 \text{ μmol/l}$ až hodinu 108. Vzhledem k prolougované eliminaci MTX byla i hepatotoxicita výrazně vyšší. Před blokem HR1 byly hodnoty jaterních testů v normě, postupné zvyšování nastalo od hodiny 66 a maximum hodnot jsme pozorovali 9 dní po začátku infuze HD MTX,

kdy dosáhly hodnoty ALT 40 μkat/l , AST $14,8 \text{ μkat/l}$ a GMT $11,6 \text{ μkat/l}$ i přes hepatoprotektivní léčbu. Blok chemoterapie HR1 byl při začátku potíží přerušen a nebyl již dokončen. Druhý blok chemoterapie proběhl již bez komplikací – sérové hladiny MTX viz tabulka.

Diskuse

Interindividuální (a intraindividuální) variabilita v odpovědi na podanou dávku léčiva na straně jedné a v indukované toxicitě na straně druhé jsou v klinické praxi dva zásadní problémy. Tato variabilita je v řadě případů podmíněna genetickými faktory (farmakogenetické „polymorfismy“), které vedou k alteraci metabolismu léčiva nebo k alteraci receptoru pro dané léčivo (4). Polymorfismy enzymů zajišťujících metabolismus léčiva (tj. farmakokinetický polymorfismus) se zdají být ve srovnání s receptorovými polymorfismy (tj. farmakodynamický polymorfismus) častější (10). Jedním z hlavních problémů v onkologické farmakologii je predikce účinnosti terapie, jednak v rovině odpovědi tumoru jednak v rovině toxicity pro hostitele. Farmakogeneticky podmíněná variabilita enzymů metabolizujících chemoterapeutika je jednou z hlavních determinant, která určuje benefit terapie pro pacienta. Nepředpověditelná dispozice s léčivem, k níž může in vivo docházet, může vyústit v nedostatečné dávkování léku s následným selháním kurativního záměru onkologa, nebo v excesivní toxicitě preparátu danou opožděnou eliminací léku obvykle s úzkým terapeutickým rozpětím (13,22). Současná praxe v onkologii je dávkovat chemoterapii na základě výšky a povrchu těla, což lze považovat za postup přesný („precise“ v metrologickém slova smyslu = zajistí reprodukovatelnost a srovnatelnost dávkování), nikoli správný („accurate“ = neodráží biologickou kapacitu hostitele metabolizovat podanou dávku a její frakci využít k vlastnímu protinádorovému působení). Farmakogeneticky modifikovaná dávkovací schémata mohou být novou a zajímavou alternativou tradičním a problematickým dávkovacím postupům. Paleta toxických příznaků, kterou pozorujeme po high-dose MTX terapii, je velmi široká a v některých případech progreduje až do život ohrožujícího stavu, jak plyne z prezentované kauzistiky. Syntophyllin, doporučený pro zvládnutí akutní neurotoxicity při HDMTX, neměl v případě našeho pacienta žádný okamžitý efekt. Nelze ani uspokojivě vysvětlit, proč se míra toxické odezvy u pacienta tak podstatně liší mezi jednotlivými cykly. Není v současné době způsob, kterým bychom mohli v klinické praxi zjistit, že pacient bude na jinak standardní dávku terapeutika odvozenou od platného protokolu, reagovat neadekvátní odpovědí. U léků, jako je MTX, které jsou pro chemoterapii v dětské onkologii v současnosti nepostradatelné, by bylo proto potřebné mít k dispozici spolehlivé metodické nástroje, které s nejvyšší možnou správností predikují případný – a potenciálně fatální – nežádoucí efekt.

Acknowledgement: práce byla zčásti podpořena prostředky projektů MZČR065269705 a NC7104-3/2002

Literatura

1. Allegra CJ. Antifolates. In: Chabner BA, Collins JM. Eds.: Cancer Chemotherapy Principles and Practice. Philadelphia: JB Lippincott 1990, 110.
2. Bernini JC, Fort SW, Griener JC. Et al.: Aminophylline for methotrexate-induced neurotoxicity. Lancet 345, 1995, 544-547.
3. Bleyer WA.: The Clinical Pharmacology of Methotrexate. Cancer 41, 1978, 36-42.
4. Boddy I., Idle J.: The role of pharmacogenetics in chemotherapy: modulation of tumor response and host toxicity. Cancer Sur. 1993, 17, 79-104.
5. Broxson EH., Stork LC., Allen RH et al.: Changes in plasma methionine and total homocysteine levels in patients receiving methotrexate infusion. Cancer Res 49, 1989, 5879-5883.
6. Cronstein BN., Naime D., Ostad E.: The antiinflammatory mechanism of methotrexate: Increased adenosine release at inflamed sites diminished leucocyte accumulation in and in vivo model of inflammation. J Clin Invest 92, 1992, 2675-2682.
7. Donelli MG., Zuchetti M., Robatto A., et al.: Pharmacokinetics of HD-MTX in infants, children and adolescents with non-B acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol 24, 1995, 154-159.
8. Goldman ID, Matherly LH.: The cellular pharmacology of methotrexate. Pharmacol Ther, 28, 1985, 77-81.
9. Jolivet J., Cowan KH., Curt GA.: The pharmacology and Clinical use of methotrexate. N Engl J Med 309, 1983, 1094-1104.
10. Kalow W.: Pharmacogenetics: its biological roots and the medical challenge. Clin. Pharmacol. Ther 1993, 54 235-241.
11. Keefe DA., Capizzi RL., Rudnick SA. Methotrexate cytotoxicity for L5178Y/Asn- Lymphoblasts: Relationship of dose and duration of exposure to tumor cell viability
12. Klener P.: Protinádorová chemoterapie, Galén 1996, 283-284.
13. Kobayashi K., Ratain M.: Individualizing dosing for cancer chemotherapy. Semin Oncol. 1993,20,30-42
14. Malinow MR. Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. J Intern Med 236, 1994, 603-617.
15. Millot J., Dhondt J-L., Mazingue F et al.: Changes of cerebral biopterin and biogenic amine metabolism in leukemic children receiving 5 g/m2 intravenous methotrexate. Pediat Res 37,1995, 151-154.
16. Najjar TA., Al Fawaz IM.: Pharmacokinetics in children with acute lymphoblastic leukemia. Chemotherapy 39, 1993, 242-245.
17. Phantumchida K., Intragumtorchai T., Kasantikul V.: Stroke-like syndrome, mineralizing microangiopathy and neuroaxonal dystrophy following intrathecal methotrexate therapy. Neurology 41. 1991, 1847-1848.
18. Pizzo PA., Poplack DG. Eds.: Principles and Practice of Pediatric Oncology, 3rd edition, Lippincott-Raven Publishers, 1997, 237-240.
19. Quinn CT., Griener JC., Bottiglieri T., Hyland K., Farrow A., Kamen BA.: Elevation of homocysteine and excitatory amino acid neurotransmitters in the CSF in children who receive methotrexate for the treatment of cancer. J Clin Oncol 15, 1997, 8, 2800-2806.
20. Refsum H. Wesenberg F, Ueland P.: Plasma homocysteine in children with ALL: Changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. Cancer Res. 51, 1991, 828-835.
21. Slaný J., Grundmann M., Brozmannová H., Blažek B., Štěřba J.: High-Dose Methotrexate for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma II., Harwood Acad.Publishers, ISBN 3-7186-5934-4, ISSN 1074-3944, 1997, 183-188.
22. Štěřba J., Bajciová V.: Is it necessary to develop specific therapeutic approaches for Middle East pediatric lymphomas? (Pediatric lymphomas in Kuwait Cancer Control Centre-KCCC), Medical and Pediatric Oncology, 5, 1997, 451.
23. Štěřba J, Dembická D.: Aktuální pohled na roli hemopoetických růstových faktorů granulocytární řady při standardně dávkované chemoterapii u dětí. Klinická onkologie, 3, 2000, 91-95.
24. Štěřba J., Mayer J., Kořístek Z., Krejčí M., Dembická D.: Febrilní neutropenie u dětí. Česko-slovenská pediatrie, 9, 1998, 570-575.
25. Walker RW., Allen JC., Rosen G. Et al.: Transient cerebral dysfunction secondary to high-dose methotrexate. J Clin Oncol 4, 1986, 1845-1850.
26. Wang YM., Kim PY., Latin E.: Degradation and clearance of methotrexate in children with osteosarcoma receiving high-dose infusion. Med Pediatr Oncol. 4, 1978, 221-223.
27. Wolfrom C., Hepp R., Hartmann R.: Pharmacokinetic study of methotrexate, folic acid, and their serum metabolites in children treated with high-dose methotrexate and leucovorin rescue. Eur J Clin Pharmacol. 39, 1990, 377-383.

jubileum

Doc. MUDr. VÁCLAV BEK, DrSc.

V říjnu letošního roku oslavil své 80. narozeniny. Bezespory patří mezi spoluzakladatele klinické onkologie, a proto nevzpomenout tohoto výročí na stránkách našeho časopisu by bylo nejen nesprávné, ale i nevděčné. Již jsem napsal malý článek do ČLČ (č. 21) a nechtěl jsem se znovu k tématu vracet. Dilema napsat či nenapsat mi nakonec pomohl vyřešit sám doc. Bek. Přišel za mnou s prosbou, abych písemně zdůvodnil jeho vlastní „selhání“, za které považuje nesplnění zadaného úkolu společností SROBF ČLS JEP před mezinárodní konferencí ESTRO konané letos v září v Praze. Mělo se jednat o historický přehled radioterapie či radiační onkologie v ČR. Zde jsou jeho slova.: *ihned a s vervou jsem se pustil do práce. Vypracoval jsem komplexní dotazník a počátkem prosince 2001 jsem jej rozeslal na 34 pracovišť, abych získal co nejvíce historických i současných údajů. Návratnost byla téměř stoprocentní. Vážná zdravotní krize z pře-*

lomu roku 2001 a 2002 s následnou náročnou operací a rehabilitací mi nedovolila přijatý úkol splnit, Chtěl bych upřímně poděkovat všem kolegům a kolegyním, kteří mi s ochotou a mimořádnou péčí informace o svých pracovištích zaslali.

Slova určitým způsobem vypovídají o některých povahových rysech jubilanta. O jeho nesmírné důslednosti až úpornosti, vytříbeném smyslu pro pravdivost a exaktnost. Tato práce sice nebyla dokončena, ale co ty ostatní! Monografie, skripta, učebnice (15), publikace v našem i zahraničním písemnictví (250), odborné přednášky přednesené u nás i za hranicemi našeho státu (300), vedení výzkumných projektů a grantů, udělení několika prestižních cen a uznání. Osobně si však cením nejvíce jeho výchovné činnosti, kdy dokázal mnohé přesvědčit o správnosti volby věnovat se onkologii, kdy řada z nich dnes může prohlásit - **byli jsme jeho žáky.**

MUDr. B. Konopásek, CSc.
Onkologická klinika VFN Praha 2

DLOUHODOBÁ DISPENZÁRNÍ PÉČE PO LÉČBĚ NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ V DĚTSTVÍ V RÁMCI UNIVERZITNÍHO ONKOLOGICKÉHO CENTRA BRNO (UOC)

LONG-TERM DISPENSARY CARE AFTER THE TREATMENT OF PAEDIATRIC MALIGNANCIES PROVIDED BY THE UNIVERSITY ONCOLOGICAL CENTRE BRNO (UOC)

KEPÁK T., PAVELKA Z., HRSTKOVÁ H., ŠLAMPA P., KISS I., ŽALOUDEK J., VORLÍČEK J., ŠTĚRBA J.

UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM BRNO

Moderní multimodální onkologická léčba vede v současnosti k dosažení dlouhodobé remise u 75-80% dětí, které onemocní maligním onemocněním. Ve srovnání s dospělými pacienty děti lépe tolerují akutní toxicitu léčby. Jsou však mnohem více ohroženy rozvojem pozdních následků, které v menší či větší míře negativně ovlivňují vývoj dítěte s následným snížením kvality života v dětském i dospělém věku. Snahou dětských onkologů je tedy nejen vyléčení nemocného s onkologickým onemocněním, ale i prevence, včasná diagnóza a event. terapie možných pozdních následků onkologické léčby. Díky pokroku dosaženému na poli dětské onkologie dnes stále přibývá dospělých s anamnézou dětské malignity. I pro Českou republiku se předpokládá, že každý tisící dospělý ve věku do 45 let bude mít v roce 2010 za sebou léčbu nádorového onemocnění v dětství. Kliničtí onkologové, ale i praktičtí lékaři a ambulantní specialisté, se tak s těmito dospělými budou ve svých ordinacích setkávat stále častěji a péče o ně musí být proto dobře koordinována. Spektrum pozdních následků současné antineoplastické léčby je velmi široké. Kauzálně se na rozvoji pozdních následků podílejí všechny hlavní léčebné modalities (operace, léčba zářením, chemoterapie). Pro ilustraci podáváme v následující tabulce přehled těch nejčastějších. Při Univerzitním onkologickém centru LF MU v Brně (UOC) se konstituovala pracovní skupina, která si klade za cíl následnou péči o pacienty s dětskými malignitami, kteří byli v UOC léčeni, koordinovat. Velký význam klade skupina na vymezení kompetencí jednotlivých poskytovatelů péče, mechanismus sdílení a předávání dat. Dne 14. června 2002 se uskutečnila iniciační schůzka pracovní skupiny pod záštitou prof. Vorlíčka, děkana LF MU Brno, a byl přijat návrh, který z pověření skupiny prezentujeme odborné veřejnosti. Každý pacient léčený pro dětskou malignitu bude po dvou letech od ukončení léčby vybaven jednotným průkazem, v němž budou zaznamenána všechna relevantní data (např. kumulativní dávky cytostatik). Koordinátorem systému je dětský onkolog, který bude pacienty sledovat i v průběhu třetího a čtvrtého decenia (diskutována hranice 35 let), poté pacienti přejdou do péče referenčního pracoviště UOC podle typu nádorového onemocnění (solidní nádory a hematologické malignity) event. do péče odpovídajícího onkologické-

ho pracoviště dle místa bydliště. Jednotliví specialisté (kardiolog, endokrinolog, neurolog, ortoped, radioterapeut, gynekolog a odborník pro reprodukční medicínu, rehabilitační lékař, psycholog a odborník pro oblast tělesné zdatnosti, pohybových a stravovacích návyků) budou sledovat pacienty ve stanovených intervalech, výsledky kontrol budou evidovány v průkazu pacienta. Frekvence vyšetření bude stanovena citlivě s cílem nevyčerpat ochotu pacientů ke spolupráci. Cílem je nabídnout vyléčeným pacientům komplexní následnou péči a zajistit také přísun relevantních dat o incidenci jednotlivých pozdních následků péče a jejich závažnosti.

Tabulka č. 1: Nejčastější pozdní následky protinádorové léčby u dětí

Poškozený orgán/systém či funkce	Pozdní následek
CNS	Arachnoiditida, paretické jevy, encefalopatie, epilepsie, poruchy intelektu, pokles IQ, postradiační nekróza
Ucho	Poškození sluchu
Oko	Katarakta, retinopatie, xerofthalmie, konjunktivitida
Slinné žlázy	Xerostomie
Chrup	Kazivost, poškození vývoje druhé dentice
Plíce	Pneumonitida, fibróza, respirační insuficience
Srdce	Chronická kardiomyopatie, perikarditida
Játra	Steatóza, fibróza, cirhóza
Ledviny	Chronická nefritida, tubulopatie, funkční nedostatečnost
Močový měchýř	Hemoragická cystitida, poruchy funkce sfinkteru
Gonády	Dysmenorea/amenorea, poruchy spermiogeneze, poruchy fertility
Kosti a měkké tkáně	Zkratky končetin, deformity, dysproporcionální poruchy růstu, osteoporóza, amputace
Kostní dřev	Sekundární myelodysplastický syndrom, sekundární leukémie (AML)
Kůže	Hyperpigmentace, alopecie, hypotrofie
Mízní uzliny	Lymfédém
Periferní nervy	Polyneuropatie
Endokrinní žlázy	Hypo (méně často hyper) – funkce, retardace růstu, puberty, předčasná puberta, gynekomastie
Systémová poškození	Poruchy metabolismu tuků, obezita, poruchy imunity, mutagenní, teratogenní a kancerogenní účinky (sekundární malignity)

NÁVRH SPOLUPRÁCE KLINICKÝCH GENETIKŮ A ONKOLOGŮ V OBLASTI DETEKCE A VYŠETŘOVÁNÍ HEREDITÁRNÍCH FOREM NÁDORŮ

PROPOSED COOPERATION OF CLINICAL GENETICISTS AND ONCOLOGISTS IN THE DETECTION AND EXAMINATION OF HEREDITARY FORMS OF CANCER

FORETOVÁ L.¹, GOETZ P.¹, ŽALOUĐÍK J.²

¹ SPOLEČNOST LÉKAŘSKÉ GENETIKY ČLS JEP

² ONKOLOGICKÁ SPOLEČNOST ČLS JEP

Hereditární formy nádorů mohou představovat až 10% u některých onemocnění. Je nutné, aby pacienti a jejich rodinní příslušníci byli o genetickém vyšetření informováni a aby se na základě těchto informací mohli rozhodnout pro genetickou konzultaci a testování. Následující dokument navrhuje způsob, jak zajistit možnost co nejširšího vyšetřování geneticky podmíněných nádorových onemocnění v České republice při respektování všech doporučení ve vyspělých evropských zemích.

Hlavní zásadou genetického vyšetření je dobrovolnost a rozhodování člověka na podkladě co nejlepších informací o možnostech i limitacích genetického vyšetření. Proto je důležité, aby byla dodržována určitá pravidla.

Navrhujeme tento vyšetřovací postup:

1. Klinik (onkolog i jiný specialista) by měl věnovat pozornost odběru základní onkologické rodinné anamnézy, měl by být schopen analyzovat získanou informaci a indikovat genetické poradenství v případě potřeby. Je vhodné aktualizovat údaje o RA při pravidelných kontrolách nebo při opakovaných hospitalizacích.
2. Onkolog upozorní pacienta na možnost dědičné etiologie onemocnění, na možnost genového vyšetření, proč je vyšetření navrhováno, tj. i s ohledem na možná rizika u ostatních zdravých příbuzných.
3. Pokud má o toto vyšetření pacient zájem, onkolog napíše žádanku (poukaz) s datem, razítkem, stručným důvodem ke genetické konzultaci. Na žádanku napíše i telefonní kontakt na genetické pracoviště, aby se pacient mohl sám objednat. Samoobjednání má dva důležité důvody. Jednak je splněna podmínka, že pokud pacient zájem o vyšetření z různých důvodů nemá, má možnost se sám rozhodnout. Dále při telefonickém objednání se genetická sestra nebo lékař optají klienta na důvody ke genetickému vyšetření a informují jej o tom, jaké údaje by měl zjistit pro genetickou konzultaci.
4. **Seznam pracovišť lékařské genetiky, která se zabývají genetickým poradenstvím v případě suspektních hereditárních forem nádorů je uveden níže.**
5. Tato genetická pracoviště zajistí odebrání podrobné rodinné anamnézy, ověření diagnóz z dokumentace a indikaci k možnému genetickému testování.
6. Rozhodnutí, jaké geny by se měly v daném případě testovat, **provádí** genetik.
7. Genetik informuje pacienta o možnostech i limitacích testování, o tom, jaká rizika se jich mohou týkat při pozitivním záchytu patogenní mutace, o možnostech testování zdravých příbuzných (prediktivním testování), dále o preventivních opatřeních. **Rozhodne-li se pacient pro gene-**

tické testování, podepíše na odd. lékařské genetiky informovaný souhlas.

8. Testování v rodině – hledání možné zárodečné mutace způsobující onemocnění- začíná většinou u pacienta s nádorovým onemocněním typickým pro daný syndrom, nejlépe u pacienta diagnostikovaného v nejmladším věku, pokud je to možné.
9. Pokud je nalezena mutace u něj, je možné prediktivní testování zdravých příbuzných v riziku. To se provádí od 18 let, s výjimkou FAP nebo jiných vzácných syndromů, kde je nutná prevence již od dětství.
10. Výsledek testování je sepsán genetikem do podrobné genetické zprávy a předán pacientovi i dalším testovaným nejlépe osobně s vysvětlením významu výsledku, návrhu na prevenci a doporučením k testování pro další příbuzné. **Kopii zprávy posílá genetik lékaři, který indikoval genetické vyšetření. Pacienta předává do další specializované péče indikujícímu lékaři.**
11. Výsledek genetického testování je velmi důvěrnou informací, obzvláště pokud se jedná o pozitivní výsledek u zdravé osoby. Nesmí se dostat do rukou třetích stran (zaměstnavatel, komerční pojišťovna). Doporučujeme vést tyto informace zvláště od běžné dokumentace a v počítačovém systému neuvádět, že se jedná o nosiče mutace, pouze o rizikového člověka.
12. Každé genetické pracoviště musí vybudovat úzkou spolupráci s onkologickým centrem, kam může cíleně odesílat rizikové jedince k preventivnímu sledování.
13. Je doporučeno, aby tito rizikovní lidé měli možnost být sledováni ve velmi dobře vybaveném a zkušeném onkologickém centru s nejmodernější vyšetřovací technikou.

Hlavní indikace ke genetické konzultaci:

Familiární formy:

1. Dva a více příbuzných (prvního nebo druhého stupně v linii) s určitým nádorovým onemocněním (nádory prsu a ovaria, nádory kolorekta a dělohy budou hlavními důvody, může se jednat i o kumulaci jiných nádorů - ledvin, mal. melanomu a dalších). V některých případech testování genů není možné a je nutné pouze stanovení empirických rizik a návrh prevence).
2. Kombinace různých typů nádorů u příbuzných prvního nebo druhého stupně, které jsou neobvyklé, v mladém věku, připomínající určitý syndrom (např. Li-Fraumeni syndrom-sarkomy, leukémie, prsu, CNS, adrenokortikální, Cowdenův syndrom – prsu, štítnice, kolorekta, hamartomy sliznic a kůže, VHL syndrom- ledvin, hemangioblastomy, MEN1 a 2, atd.).

Sporadické formy

1. Unilaterální nádory prsu, ovaria dg. do 35 let
2. Nádory dělohy, kolorekta do 35 let
3. Bilaterální nádory prsu, ovaria, první dg. do věku 50 let
4. Duplicita – ca prsu a ovaria, ca dělohy a kolorekta v jakémkoliv věku

Společnost lékařské genetiky zajistí, aby byli kliničtí genetici pravidelně vzdělávání v oblasti hereditárních forem nádorů, aby jimi poskytovaná péče byla na co nejvyšší úrovni.

Testování genů bude zajištěno specializovanými laboratořemi v některých genetických centrech. Tyto laboratoře by měly procházet externí kontrolou kvality, což bude SLG kontrolovat. Zprávy z laboratoře musí jasně vyjadřovat charakter mutace, její typ, patogenicitu. U neznámých variant nelze testovat zdravé příbuzné pro klinické účely, pouze pro účely výzkumné (k možnému objasnění významu mutace).

SLG se bude snažit, aby se postupně zavádělo testování pro některé vzácné syndromy, které zatím není možné v ČR testovat.

Prof. MUDr. P. Goetz, CSc.,
předseda Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP
Prim. MUDr. L. Foretová, místopředsedkyně SLG

SEZNAM GENETICKÝCH PRACOVÍŠŤ, KTERÁ MOHOU POSKYTNOUT GENETICKÉ PORADENSTVÍ PŘI PODEZŘENÍ NA HEREDITÁRNÍ FORMU NÁDORŮ

V seznamu uveden vedoucí lékař oddělení a jeho e-mailová adresa

Jižní Morava

1. Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, MUDr. Lenka Foretová, foretova@mou.cz, Tel. k objednání 5 4313 6900, 6907, 6901
2. Oddělení lékařské genetiky FN Brno - Dětská nemocnice, Černopolní 9, 662 63 Brno, MUDr. Renata Gaillyová, gaillyova@fnbrno.cz, Tel. k objednání: 5 4512 2489, 2490
3. Genetická poradna, Nemocnice Jihlava, Vrchlického 59, MUDr. Věra Hořínová, vbrys@med.muni.cz, Tel. k objednání 604415649.

Severní Morava

1. Genetická ambulance, Kafkova 8, Ostrava 1, 702 00, MUDr. Jan Všetická, jan.vseticka@worldonline.cz, Tel k objednání: 59 661 8917

2. Oddělení lékařské genetiky FN sP, 17. Listopadu 1790, Ostrava-Poruba, 708 56, MUDr. Eva Šilhánová, eva.silhánová@fnspo.cz, Tel. k objednání : 59 698 2212 (ambulace NsP Havířov, Dělnická 24, Tel: 596491464).
3. Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FN a LF UP, I.P. Pavlova 6, Olomouc, 775 20, Prof. MUDr. J. Šantavý, santavy@risc.upol.cz, Tel. k objednání: 58 585 4454, 4464

Praha

1. Oddělení lékařské genetiky, Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, V úvalu 84, Praha 5-Motol, 151 12, prof. MUDr. P. Goetz Csc., petr.goetz@lfmotol.cuni.cz, Tel. k objednání na čísle 2 2443 3564
2. Oddělení lékařské genetiky FTN, Vídeňská 800, Praha 4, 140 59, MUDr. Vladimír Gregor, vladimir.gregor@ftn.cz, Tel. k objednání: 2 61 083 760 (soukromá genetická ambulance Ohmova 271, Praha 10, Tel: 271961183)
3. Oddělení lékařské genetiky, Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN Praha, Karlovo náměstí 32, Praha 2, 121 11, prim. MUDr. Jana Židovská, jana.zidovska@vfn.cz, Tel. k objednání: 22496 7171-2
4. Gennet sro., Klimentská 20, Praha 1, 110 00, MUDr. David Stejskal, david.stejskal@gennet.cz, Tel. k objednání: 222 313 000, 118

Západní a Jižní Čechy

1. Centrum lékařské genetiky, Poliklinika Jih, ul. Matice školské 17, České Budějovice, 371 02, MUDr. Karel Čutka, cutka@medipont.cz, Tel. k objednání: 387730407
2. Ústav lékařské genetiky FN a LF UK Plzeň, E. Beneše 13, Plzeň, 305 99, prim. MUDr. Ivan Šubrt, subrt@fnplzen.cz, Tel. k objednání: 377490 534
3. Oddělení lékařské genetiky, Nemocnice Č. Budějovice, B. Němcové 54, České Budějovice, 370 87, MUDr. E. Kantorová, ekant@nemcb.cz, Tel. k objednání: 38 787 3000
4. Soukromá genetická ambulance s laboratoří, Nepomucká 259/A, Plzeň, 326 00, Doc. MUDr. František Lošan Csc., losan@post.cz, Tel k objednání : 37 7241 529, 021

Severní a Východní Čechy

1. Oddělení lékařské genetiky, Sokolská 470, Fakultní nemocnice Hradec Králové, 500 05, prim. MUDr. Věra Jüttnerová, juttnerova@fnhk.cz, Tel. k objednání: 49 583 2553
2. Oddělení lékařské genetiky Masarykovy nemocnice, Sociální péče 66, Ústí nad Labem, 401 13, prim. MUDr. Josef Kofer, josef.kofer@mnuul.cz, Tel. k objednání: 475682 473, 475

19. KONFERENCE IATMO VE VEJLE, DÁNSKO, 25.-28.9.02

ŠIMÍČKOVÁ M., UMLAUF J.
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

19th International Conference on Human Tumor Markers se konala v tomto roce 25.-29.8.02 ve Vejle, Dánsko. Kongres je v poslední době výrazně orientován nejen na sérové nádorové markery, ale i na vybrané oblasti nádorové biologie se vztahem k prediktivní onkologii. K základním tématům letošního sjezdu patřily: prognostické a prediktivní tkáňové i sérové faktory se zaměřením na změny genomu i proteomu. Úvodní plenární přednáška nositele Nobelovy ceny T. Hunta o **cyklin-dependentních kinázách**, základních efektorech buněčného cyklu, objasnila představy o regulaci buněčného cyklu ve vztahu k malignímu procesu. Zvýšená exprese pozitivních regulátorů – cyklinů – i snížená exprese negativních regulátorů, např. inhibitorů cyklin-dependentních kináz, se může projevit ovlivněním proliferace na různém stupni buněčného cyklu. Porozumění tomuto molekulárnímu mechanismu umožní nejen poznat podstatu přeměny normální buňky v maligní, ale především povede k rozvoji protinádorové strategie.

Přednáška S.Sella přinesla podle očekávání vyčerpávající **shrnutí současných představ vysvětlujících maligní proces na základě existence kmenových buněk**: potenciál nádorové buňky dělit se se liší podle různých nádorových typů, a to od totipotentních teratokarcinomů přes pluripotentní leukemie a bi-či unipotentní zhoubné nádory např. kůže a plic. Autor podporil tuto hypotézu na příkladu různých nádorových typů (existenci více histologických typů karcinomu plic odvozených z bipotentních bronchiálních kmenových buněk nebo různých forem experimentálních jaterních poškození ve vztahu ke kmenovým buňkám pod.).

Využití znalostí z projektu poznání lidského genomu již přichází díky velkému technickému pokroku do klinické praxe. Firma Sequenom prezentovala techniku DNA analýzy využívající hmotnostní spektroskopii, která se liší od konvenčních metod především vysokou rozlišovací schopností a vysokou výkonností při detekci DNA-poruch.

Novou cestu při časně detekci maligních nádorů představují markery vyšší generace – **nebuněčné DNA fragmenty v plasmě** stanovené pomocí PCR v reálném čase s vysokou analytickou senzitivitou a reprodukovatelností. V plasmě nemocných s nádory nasofarynx byly např. kvantifikovány epizomy EBV s 95% senzitivitou při 95% specificitě. Fragmenty s hypermetylací byly prokázány u ca plic, jater a prostaty, mikrosatelitové alterace u ca močového měchýře, plic a prostaty. Onkogeny (HER-2/neu, K-ras) je možno ve formě fragmentů nalézt se senzitivitou 25 – 90 %. Dalšími příklady mohou být fragmenty genu kódujícího E-cadherin u karcinomu prsu nebo prostaty nebo BRCA1 genu u karcinomu prsu. Význam detekce RNA podjednotky telomerázy v plasmě jako obecného markeru malignity není dosud uzavřen. Je možno prokazovat rovněž cirkulující mRNA (např. pro mammaglobin u karcinomu prsu, pro tyrozinázu u maligního melanomu). Výzkum je zaměřen na automatizaci, výhodou je zmíněný velice nízký detekční limit uvedených látek, který může být prospěšný tam, kde klasické sérové nádorové markery nejsou vhodné – při primární diagnostice.

Kvantitativní změny v genech kódujících CEA a vaskulární endotheliální růstový faktor (VEGF) ve tkáni primárních nádorů (stanoveno reversní transkripcí mRNA, PCR v reál-

ném čase) byly prezentovány plzeňským pracovištěm na souboru více než 100 nádorů. Obzvláště CEA vykazuje zvýšení u většiny kolorektálních karcinomů a u některých hepatomů. Pro VEGF, parametr ovlivňující angiogenezi, nebyly nalezeny v různých nádorových lokalizacích významné rozdíly. Metoda může přispět k charakterizaci nádorů nejen na úrovni primárních nádorů, ale i při detekci minimální reziduální choroby.

Pokrok v poznání genomu jde souběžně s pokrokem v poznání **proteomu**. Expresí proteinů jako vlastních efektorů regulace buněčných procesů a jejich další modifikace nejsou však závislé výhradně na genetické informaci, ale mohou se uskutečňovat na úrovni složitých interakcí mezi jednotlivými proteiny. Vlastní analýza této velice heterogenní skupiny látek je poměrně obtížná, proto je vývoj soustředěn na detekci nádorově-specifických proteinů detekovaných elektroforézou v dvojrozměrném gelu s následnou hmotnostní spektroskopií. Proteomika umožňuje v současnosti detekci více než 18 000 proteinů na dvojrozměrné mapě. Má však svoje úskalí – příprava reprodukovatelného vzorku, zachování úrovně posttranslačních modifikací i vlastní elektroforéza a vizualizace proteinů. Kvantitativní srovnání mRNA a proteinové exprese nevede vždy k přesné shodě na obou vyšetřovaných úrovních, tento jev však může mít dosud nepoznaný význam pro regulaci buněčné aktivity. Je třeba si rovněž uvědomit, že data získaná na živočišných modelech nelze mnohdy extrapolovat na oblast humánní medicíny. Aplikace proteomiky byla prezentována na příkladu proteinů nukleární matrix studovaných v současnosti pouze imunoanalytickými metodami. Již delší dobu je doporučován NMP 22 pro detekci karcinomu močového měchýře v moči, jsou známy proteiny nukleární matrix specifické pro ca prsu, plic, tlustého střeva a děložního čípku. Využitím proteomiky lze identifikovat tyto proteiny s vyšší analytickou senzitivitou i s významnou prognostickou hodnotou.

Molekulární **regulace angiogeneze** souvisí s rovnováhou mezi **aktivátory** tohoto procesu (VEGF, bFGF, TGFbeta, matrixmetaloaproteinázami i dalšími faktory) a jeho **inhibitory** (VEGFR, TIMP, angiotatin, VE-cadherin apod). Významným nově sledovaným faktorem je hypoxie-inducibilní faktor (HIF-1) ovlivňující zvýšení angiogeneze.

Skupina matrix-metaloaproteináz, jejichž prognostický význam v primárních nádorech dosud není zhodnocen, je regulována skupinou inhibitorů. Jejich volná i vázaná forma je detekovatelná nově publikovanou metodou ELISA v plasmě (**tkáňový inhibitor metaloproteináz 1=TIMP1**) s prognostickým významem u kolorektálního karcinomu, se senzitivitou 72 % při 98% specificitě, což je výrazně víc než pro stanovení CEA.

Na konferenci se opět objevily výsledky srovnání senzitivity klasických markerů s **laktátdehydrogenázou (LD)** (včetně vyšetření izoenzymů), a potvrzují naše závěry: pro jisté lokalizace je LD markerem doplňujícím klasické markery (prezentováno využití LD pro monitorování metastatického postižení mozku u karcinomu prsu, LD je vhodné začlenit i do algoritmu testování rizika u testikulárních nádorů).

Oblast **klasických nádorových markerů** byla zastoupena několika bloky. Vedle novinek (komplexovaný cPSA, Čyfra 21-1 v moči, HER-2/neu v séru, S-100, chromogranin A) byly prezentovány studie zabývající se kontrolou kvality, algoritmy pro monitorování návratu choroby i sledování odpovědi na terapii pomocí sérových nádorových markerů.

Pro maligní melanom jsou vhodné sérové markery stále předmětem výzkumu. Ze všech skupin studovaných látek (antigeny typu S-100, melanoma inhibiting activity, NSE, dále cytokiny, adhezivní molekuly, enzymy a metabolity syntézy melaninu) se jeví nejvíce doložená prognostická hodnota **S-100B**, která bude zřejmě brzy dostupná na trhu od více výrobců.

Stanovení **chromograninu A** v plasmě nemocných s neuroendokrinními tumory včetně těch typů, které neprodukují známé hormony, se v poslední době díky vyvíjející se technice stanovení tohoto kyselého glykoproteinu stává důležitým pomocníkem v diagnostické fázi neuroendokrinních nádorů. Využití pro dlouhodobé monitorování těchto tumorů i odraz efektu terapie vyžadují další studie. Jeho hladiny však zřejmě reflektují nejenom masu nádoru, ale i jeho biologickou aktivitu.

CYFRA21-1 v moči se zdá být parametrem vhodným pro karcinom močového měchýře, v kombinaci s cytologií zlepšuje senzitivitu záchytu tohoto karcinomu.

cPSA (v komplexu-vázaný PSA) je sérový podíl tohoto antigenu vázaný na inhibitory proteináz (především alfa1-anti-chymotrypsin), který je (na rozdíl od volného a celkového PSA) podle prvních studií stanovován s vyšší citlivostí. Zdá se, že by to mohl být marker vhodnější pro screening než celkový PSA. Jeho velkou výhodou je i vyšší stabilita v séru, navíc zlepšuje diagnostické možnosti i v oblasti fyziologických hodnot PSA (2,4 - 4 µg/l), kde odkryje další díl z asi 25 % nezachycených karcinomů. Dlouhodobý prognostický rys tohoto markeru (zvýšení bylo prokázáno až 20 let před diagnózou karcinomu prostaty) však dosud nemá bezprostřední individuální klinický dopad.

Tématu **Her-2/neu** byl věnován celý blok zaměřený především na zhodnocení významu jeho sérových hodnot. Mechanismus odštěpení extracelulární domény HER-2/neu není dosud vyjasněn, nicméně již existují studie dokazující, že nejenom tkáňově, ale i sérové hodnoty mají prognostický charakter. Zvýšený HER-2/neu v séru predikuje odpověď na terapii (resistenci k hormonoterapii, možnou senzitivitu k antracyklinové léčbě), umožňuje potvrdit výběr nemocných vhodných pro Herceptinovou terapii. Bylo zjištěno, že až 30 % nemocných s primárním nádorem původně negativním je v aktuálním čase progresu zvýšená hladina tohoto onkoproteinu. Vzhledem k ekonomické náročnosti stanovení soupravou Bayer (má být i u nás na trhu) však není doporučováno monitorování od okamžiku diagnózy, snahou skupiny významných pracovníků (dr. Schwartz, USA a další) je vyvinout tlak na snížení ceny u výrobce. Metoda použitá v námi prezentované studii (poloset firmy Bender-MedSystems s výrazně nižšími náklady na stanovení) může být další variantou řešení tohoto problému. Firma Dako připravila FISH-komerční set, a dále doporučuje přesný algoritmus pro zhodnocení pozitivitu HER-2/neu v primárním nádoru. Začíná se již (vzhledem k tlaku na rozvoj tkáňových bank) uvažovat i o metodách kvantitativní analýzy HER-2/neu v extraktu primárního nádoru.

Matematické modelování monitorování signifikantních změn ve hladinách sérových nádorových markerů má již svoje ustálená pravidla – je třeba kalkulovat především s analytickou nepřesností, s normální intra-individuální biologickou variabilitou pro daný marker, v neposlední řadě s definovanou cut-off hladinou. Skupina dánských statistiků prezentovala model využívající pro detekci progresu nemocných s karcinomem prsu změny v hladinách CEA a CA15-3. Podobné výsledky publikovali již pro karcinom ovárií, kde rozhodujícím krokem bylo navíc zvýšení CA 125 z hladiny pod detekčním limitem na minimálně 2,5násobek.

Přestože konference patřila počtem účastníků (asi 150) k méně rozsáhlým akcím, přinesla podle očekávání nové pohledy na vysoce aktuální tematiku v oblasti prognostické i prediktivní onkologie.

ZPRÁVA ZE SEMINÁŘE „APOPTÓZA 2002“ V PRAZE, 15. ŘÍJNA 2002

BOUDNÝ V.
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Dne 15. října 2002 se konal v Praze seminář firmy Genetica s názvem „APOPTÓZA 2002“. Samotný program byl rozdělen do tří částí, které se postupně věnovaly buněčnému cyklu, apoptóze, buněčné signalizaci, inhibitorům CDK, fosfoproteomice, inhibitorům apoptózy a účinku steroidních hormonů na aktivitu telomerázy.

Seminář byl zahájen velice zajímavou přednáškou Prof. Strnada z Laboratoře růstových regulátorů Palackého univerzity v Olomouci o molekulárních mechanismech regulace buněčného cyklu. Výklad byl zaměřen na distribuci jednotlivých typů cyklin-dependentních kináz (CDK) a cyklinů během buněčného cyklu. Rovněž byly uvedeni jednotliví zástupci inhibitorů CDK (např. olomoucín, bohemín a další). Další přednáška se věnovala nukleolám a programované smrti – apoptóze (Prof. Smetana, Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha).

V nejdelším dopoledním bloku následoval příspěvek Dr. Tuháčkové z ÚMG AV ČR Praha na téma „Buněčná signalizace v jednotlivých fázích života buňky“, který byl zaměřen na vzájemné ovlivňování jednotlivých signálních drah (tzv. „cross-talking“). Důraz byl kladen na proteinkinázu B (PKB, Akt), dále na Ras, PI-3 kinázu, Bcl-2, Bax, Fas L a Fas receptor. Poté Dr. Fišerová z Mikrobiologického ústavu AV ČR Praha hovořila o apoptóze sledované v průběhu léčby experimentálních nádorů. V úvodu uvedla přehled nejdůležitějších onkoproteinů (Ras, Raf, Myc) a receptorů smrti (TNFR, APO 1/Fas, APO 2/TRAIL). Zabývala se jak extracelulárními (APO 1/CD 95, APO 2/TRAIL) tak i intracelulárními apoptickými mechanismy (Bcl-2). Rovněž zmínila přehled proapoptických (Bax, Bak, Bad) a antiapoptických onkoproteinů (Bcl-2). Na samotný závěr se zaměřila na mechanizmy nádorové rezistence k apoptóze. Zajímavý byl příspěvek Dr. Kryštofa z Palackého univerzity v Olomouci na téma „Purinové inhibitory cyklin-dependentních kináz“. Z celé škály těchto látek byly zmíněny především cytokiny (přirozené rostlinné hormony) olomoucín a roscovitín, dále nejsilnější inhibitor CDK purvalanol a některé deriváty indirubinu. Nakonec jsme byli seznámeni s mechanismy působení těchto inhibitorů. Dr. Kovářová z pracoviště Akademie věd v Liběchově se zabývala problematikou možnosti analýzy fosforylace proteinů - fosfoproteomikou. Zde zazněl význam proteinkináz a proteinfosfatáz během fosforylace a defosforylace některých vybraných proteinů. Byly rovněž zmíněny metody klasické (především dvourozměrná elektroforéza a hmotnostní spektroskopie) i nové proteomiky (vesměs neelektroforetické metody, tzv. „microarrays“). Taktéž byl uveden výčet různých protilátek, ať již nespecifických nebo velmi specifických pouze pro určitá místa fosforylovaných aminokyselin. Na závěr dopoledního bloku vystoupil Dr. Frank Neumann z firmy Alexis, který prezentoval novinky v nabídce pro výzkum apoptózy.

Odpolední program byl zahájen přednáškou Dr. Buckiové na téma „Apoptóza jako mechanismus buněčné signalizace při diferenciaci gonád zárodku kuřete“. Následoval příspěvek Dr. Vavrušové z Olomouce, která hovořila o apoptóze u buněk lidských gliálních nádorů ovlivněných syntetickými ligandy PPAR a o nádorovém supresoru PTEN. Rovněž zaujalo sdělení Dr. Kořínka, který se zabýval problematikou „Wnt-1 jako účinného inhibitoru apoptózy u pre-B buněk“. Na samotný závěr následovala prezentace Mgr. Bouchala z Olomouce, který referoval o účinku steroidních hormonů na aktivitu telomerázy u buněčných linií karcinomu prostaty. Zajímavá byla poznámka, že u 95 % nádorů došlo k aktivaci telomerázy. Nakonec byl seminář oficiálně zakončen.

Jmenný rejstřík

- Adam, Z. 211/6, 47/2, 86/3, S/21, S/31, S/48
 Babušíková, 207/6
 Bačovský, J. S/7, S/15, S/21, S/31
 Bělohávek, O. 189/5
 Benčíková, V. S/21
 Beneš, M. 226/6
 Benešová, K. 161/5
 Boudný, V. 126/4, 155/4
 Breza, J. 107/3
 Brychta, M. 142/4
 Büchler, T. 211/6, S/31, S/38, S/44
 Buchtová, I. 102/3
 P. 107/3
 Burgerzová, D. 102/3
 Burkoň, P. 176/5
 Bustová, I. 145/4
 Cahová, S. S/21
 Čihal, K. S/7, S/15
 Číhalová, V. 30/1
 Coufal, O. 41/2, 72/2, 203/6, 219/6
 Dastych, M. S/21
 Demlová, R. 230/6
 Dománská, O. 72/2
 Doubek, M. 102/3
 Dvořák, J. 216/6
 Faber, E. S/21
 Fait, V. 219/6
 Farbiaková, V. S/7, S/15
 Feltl, D. 198/5
 Foldyna, D. S/42
 Foretová, L. 235/6
 Fraňková, H. S/21
 Fuchs, O. 7/1
 Geryk, E. 101/3
 Goetz, P. 235/6
 Goncalves, F. 64/2
 Gregova, E. S/42
 Gumulec, J. S/21
 Gumulec, J. S/7, S/15
 Gutl, I. 161/5
 Hájek, R. 211/6, S/5, S/21, S/31, S/36, S/38, S/42, S/44
 Hajtman, A. 28/1
 Hajtmanová, E. 28/1
 Hanáková, M. 119/3
 Hartl, R. 183/5
 Hausdorf, P. S/21
 Hazuková, R. 216/6
 Heincová, V. S/7, S/15, S/21
 Hladík, M. 64/2
 Hofmanová, L. 30/1
 Holoubek, I. 125/4
 Horák, D. 192/5
 Hornák, M. 64/2
 Hovorková, K. 166/5
 Hrstková, H. 234/6
 Ilievová, M. 226/6
 Jankovičová, K. 2/1
 Jankovská, M. S/42
 Jebavý, L. S/28
 Jurášková, V. 30/1
 Kabeláč, K. 216/6
 Kadečka, D. 58/2
 Kaislerová, J. 142/4
 Kalábová, R. 170/5
 Kamelander, J. S/42
 Kantorová, I. 189/5
 Kaplan, Z. 219/6
 Kavan, P. 93/3
 Kepák, T. 192/5, 234/6
 Kessler, P. S/21
 Kindlová, E. 142/4
 Kiss, I. 203/6, 234/6
 Klabusay, M. 211/6
 Klener, p. 111/3
 Kmoníček, M. S/28
 Kocák, I. 126/4, 153/4
 Kocáková, I. 72/2
 Korda, M. 28/1
 Košatová, K. 166/5
 Kosová, M. 157/4
 Kotala, V. 98/3
 Kovářik, J. 126/4, 142/4
 Kovářová, L. 211/6, S/44
 Koza, V. S/21, S/31
 Kozák, T. 198/5
 Krajsová, I. S/7, S/15
 Král, Z. 47/2, 86/3
 Králová, E. S/21
 Krejčí, M. 211/6, S/21, S/31, S/36
 Krejsek, J. 148/4, 2/1
 Křivanová, A. S/31, S/38
 Kubečková, M. S/7, S/15
 Kubešová, H. 67/2
 Kuča, B. S/7, S/15, S/21
 Kulhavý, M. 142/4
 Lasota, Z. S/7, S/15
 Lautnerová, E. S/7, S/15
 Lehanka, F. S/21
 Leníčková, S. S/21
 Lžičařová, E. 192/5
 Macková, D. 153/4
 Maisnar, V. 148/4, S/28
 Maláská, J. 72/2
 Malinová, B. 166/5
 Malý, J. 148/4, S/28
 Mareš, M. 166/5
 Marková, J. 198/5, 78/2
 Markuljak, I. 81/3, 121/4
 Martínek, A. S/7, S/15
 Matuška, M. S/21
 Mayer, J. 102/3, 130/4, S/21, S/31
 Melichar, B. 216/6
 Meluzinová, I. S/21
 Mičanková, M. S/7, S/15
 Mikulášková, V. 28/1
 Morávek, P. 58/2
 Müller, H. 22/1
 Musilová, R. 211/6, S/38, S/44
 Navrátil, M. 86/3
 Nekulová, M. 76/2
 Nenutil, R. 98/3
 Neuschlová, E. 28/1
 Neuwirtová, R. S/42
 Novosad, J. 2/1
 Novosadová, L. S/7, S/15, S/21
 Novotná, B. 107/3
 Novotný, V. 107/3
 Odrážka, K. 58/2
 Opichalová, V. S/7, S/15
 Ordeťalová, M. S/7, S/15
 Pačovský, Z. 41/2
 Papajík, T. S/7, S/15, S/21
 Papírková, D. 226/6
 Pavelka, Z. 192/5, 234/6
 Pavlová, S. 130/4
 Penka, I. 219/6
 Petera, J. 58/2, 216/6
 Petráková, K. 153/4
 Petýrek, P. 176/5
 Pospíšil, R. 166/5
 Pozděňová, V. S/21
 Poznarová, A. 148/4
 Pracká, P. S/21
 Procházková, D. 30/1
 Prošvic, P. 58/2
 Ráčil, Z. 102/3
 Rejthar, A. 203/6
 rešl, M. 148/4
 Rezek, Z. S/21
 Šachlová, M. 17/1, 157/4, 226/6
 Salajka, F. 67/2
 Šarmanová, J. 161/5
 Schlemmer, P. S/7, S/15
 Schutznier, J. 166/5
 Schützová, M. S/21, S/31
 Ščudla, V. S/7, S/15, S/21, S/31
 Sedláček, A. 142/4
 Šefr, R. 219/6
 Seifertová, N. S/21
 Sheard, M.A. 79/2
 Šimíčková, M. 76/2, 237/6
 Skácel, Z. 166/5
 Skovajsová, M. 115/3
 Škrabková, Z. 58/2
 Šlampa, P. 234/6
 Šlezar, J. S/7, S/15
 Šmardová, J. 130/4
 Souček, P. 161/5
 Spicha I. S/42
 Spurný, V. 176/5
 Srovnalík, K. S/7, S/15
 Staníček, J. 226/6
 Stavařová, Y. S/21
 Štecová, N. S/21
 Štefánek, I. S/21
 Stejskal, J. 58/2
 Štěpánková, H. S/21
 Štěrba, J. 234/6
 Straub, J. S/42
 Stryhal, J. 183/5
 Šumná, E. S/7, S/15, S/21
 Šusová, S. 161/5
 Svoboda, M. 41/2, 72/2
 Svobodník, A. 211/6, 219/6, S/31
 Talač, R. 41/2
 Tesařík, Z. 136/4
 Tomášek, J. 203/6, 219/6
 Tomiška, M. 47/2, 67/2, 86/3
 Tomišková, M. 67/2
 Tomová, A. 207/6
 Tóthová, E. S/21
 Třasoň, T. S/21
 Týnková, L. 161/5
 Uldrijan, S. 98/3
 Umlauf, J. 237/6
 Vaculíková, M. 58/2
 Vagunda, V. 35/1
 Vagundová, M. 35/1, 41/2
 Valík, D. 230/6
 Váľková, J. 93/3
 Vaňásek, J. 58/2
 Vaňová, P. 211/6
 Vášová, I. 47/2, 86/3
 Vepřek, K. S/21
 Vítová, V. 106/3, 135/4, 175/5, 219/6
 Vobořil, Z. 216/6
 Vodička, P. 161/5
 Vodvářka, O. 37/1
 Voglová, J. S/28
 Vojtěšek, B. 98/3
 Vorlíček, J. 47/2, 67/2, 86/3, 234/6, S/21, S/31, S/48
 Vostrejšová, S. S/21
 Vránová, M. S/7, S/15, S/21
 Vrbá, M. 30/1
 Vyřasová, M. S/7, S/15, S/21, S/31
 Vyzula, R. 72/2, 203/6
 Walterová, L. S/21
 Zapletal, O. 230/6
 Zouhar, M. 58/2
 Zoul, Z. 58/2, 216/6
 Žák, P. 148/4, S/28
 Žaloudík, J. 41/2, 72/2, 219/6, 234/6, J. 235/6
 Živná, J. S/7, S/15

Věcný rejstřík

- Aktivní vyhledávání 107/3
 Akutní toxicita 58/2
 AML 130/4
 Angiogeneze S/38, S/42
 Apoptóza 2/1
 Autologní transplantace S/21, S/28, S/31
 Bcl-2 2/1
 Biotransformační enzymy 161/5
 Cefoperazon 102/3
 Chemoradioterapie, 170/5, 216/6
 Chemoresistence 72/2
 CNS toxicita 230/6
 Cytokiny S/7, S/15
 Dendritické buňky 211/6, S/44
 Dětská onkologie 93/3, 230/6, 234/6
 Dispenzární péče 234/6
 Doporučení diagnostiky a léčby S/44
 Ex vivo expanze 121/4
 Febrilní neutropenie 102/3
 Genotypování 161/5
 Gliomatóza mozku 192/5
 Hereditální formy nádorů 235/6
 Hodgkinova choroba 186/5, 198/5
 Hrudní perfuze 22/1
 Ifosfamid 93/3
 Imunofenotypizace 207/6
 Imunomodulace S/38
 Imunoterapie S/44
 Integrovaná diagnostika 115/3
 Interferon _ 126/4, S/21
 Karcinom čípku děložního 170/5
 Karcinom ledviny 64/2
 Karcinom nosohltanu 28/1
 Karcinom ovaria 137/4
 Karcinom prostaty 58/2, 107/3
 Karcinom prsu 115/3, 142/4, 145/4, 189/5
 Karcinom žaludku 216/6
 Klasifikace 219/6
 Klinická genetika 235/6
 Klinické stážovací systémy S/15
 Kolorektální karcinom 72/2, 203/6, 219/6
 Konformní radioterapie 58/2
 Konkomitantní chemoradioterapie 170/5
 Krvetvorné kmenové buňky 81/3, 121/4
 Leukemogeneze 130/4
 Maligní transformace 2/1
 MALT lymfom 47/2, 86/3, 148/4
 Megestrol acetát 67/2
 Melanom 126/4
 Methotrexát 230/6
 Mikrometastázy 203/6
 Mini BEAM 186/5
 Minimální reziduální choroba 203/6, 207/6
 Mitoxantron 145/4
 Mnohočetný myelom 211/6, S/7, S/15, S/21, S/28, S/31, S/36, S/38, S/42, S/44, S/48
 Nádorová kachexie 67/2
 Náhrada kolenního kloubu 183/5
 Nehodgkinský lymfom 47/2, 86/3, 186/5
 Neinvazivní střeční test 226/6
 Neoadjuvantní léčba 145/4, 216/6
 NSCLC22/1
 p53 98/3, 130/4
 Podpůrná léčba 111/3
 Polymorfismus chromosomů 30/1
 Pozitronová emisní tomografie 189/5
 Primární chondrosarkom 183/5
 Prognostické faktory S/7, S/15
 Radioprotektiva 176/5
 Radiosenzibilizátory 176/5
 Radioterapie 142/6
 Randomizovaná studie S/36
 Růstové faktory 81/3
 SCLC 166/5
 Screening 107/3, 115/3
 Signální dráha 7/1
 Slizniční toxicita 226/6
 SOCS3 126/4
 Solidní nádory 41/2
 STAT1 126/4
 Střeční propustnost 171/1
 Sulbaktam 102/3
 TGF_ 7/1
 Thalidomid S/42
 Thymidinkináza S/7, S/15
 Thymidylát syntáza 72/2
 Tkáňová banka 41/2
 Udržovací léčba S/31
 Uveální melanom 30/1
 Vakcinace S/44
 Vícečetné malignity 106/3, 135/4
 Volné nádorové buňky 203/6
 Zaživací trakt 47/2, 86/3

ZÁPIS ZE SCHŮZE VÝBORU ČOS KONANÉ DNE 11. 10. 2002

Přítomni: prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., Prof. MUDr. Josef Kou-
tecký, DrSc., Prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc., doc. MUDr. Luboš Pet-
ruželka, CSc., prim. MUDr. Jan Fischer, prim. MUDr. Alena Jelínková,
as. MUDr. Olga Příbylová
Omluveni: doc. MUDr. Jan Žaloudík, CSc., prim. MUDr. Vratislav
Šmelhaus, MUDr. Josef Drbal
Hosté: doc. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc., prim. MUDr. Hana Stan-
kušová, doc. MUDr. Petera, CSc., MUDr. Wieslav Stronzdala, MUDr.
Kubecová

1. Kontrola zápisu

Dopis prof. Kodetovi odeslán. Schůzka patologů k dohodě o stano-
vení Her-2 receptorů bude 30.10.2002 v Brně ve 14.00. Doc. Vyzu-
la požádán, aby pozval zainteresované pathology. K ostatním bodům
zápisu nebyly připomínky.

2. Informace pro členy OS

a) Registrace transplantací kostní dřeně byl na základě rozhodnutí trans-
plantační sekce ustanoven při ÚHKT a I. Interní klinice 1. LF UK.
Transplantační sekce je společná pro hematologickou a onkologic-
kou společnost. Pracovníci registru navštívili zahraniční registry a při-
pravili návrh odpovídající požadavkům EBMT.

b) Návrh na změnu indikací erythropoetinu – předložen doc Petružel-
kou-výbor schválil, bude předložen pojišťovně, Zajistí doc. Petružel-
ka.

c) Firma Janssen Cilag upozorňuje na možnost vzniku aplazie čer-
vené řady po EPO jako důsledek tvorby neutralizačních protilátek,
týká se zejména nemocných po dialýze.

d) Návrh na řešení úsporných opatření pro preskripci chemoterape-
utik. OS navrhuje: kurativní terapie zůstává v kategorii „X“, pali-
ativní chemoterapie bude paušalizována. OS navrhuje vypracování
léčebných postupů s rozlišením potenciálně kurativní léčby pro růz-
né nádorové lokalizace. O návrhy byli požádáni odborníci z různých
pracovišť. Finální redakci po všechny nádorové lokality pověřen
MOÚ (odpovídá doc Vyzula).

e) MZD nevyhovělo žádosti OS o zajištění překladu 6. Klasifikace
MKNO, nejsou t. č. finanční prostředky, bude zařazena do rozpočtu
UZIS na příští rok.

f) Hodnotící komise na udělení Staškovy ceny od Nadace Paula Jans-
sena se vybrala ze 4 přihlášených prací: Holub Z., et al.: Laparoscopic
staging of endometrial cancer, publikovanou v Eur. J. Obstet.
Gynecol. Reprod. Biol. 100, 2001, p 81-86. Ceny vítězům budou pře-
dány 5. 11. 2002 v 17.00 v Karolinu.

Do března 2003 se podávají návrhy na ceny této nadace za rok 2002.
COS navrhne práci na prosincovém výboru. Návrhy mohou podá-
vat i jednotlivci.

3. Korespondence

a) Firma Janssen Cilag nabízí podporu ČOS JEP ve výši cca 500 000
Kč, bude využita na vydání standardů.

b) Firma Astra Zeneca –předala předsedovi společnosti symbolický
šek na 200.000 Kč. Výbor trozhodl věnovat tuto částku na zřízení
registru transplantací kostní dřeně. Stanovisko oznámí firmě prof.
Klener.

c) Firma Janssen Cilag oznamuje zahájení projektu „Cesta ze svě-
ta bolesti“, zaměřeného na osvětu u pacientů trpících únavou
a bolestí.

d) Liga proti rakovině zaslala informace o sjezdu UICC v Oslu, kde
byla přijata Deklarace na podporu a dodržování práv onkologických
pacientů (bude vyvěšeno na www.linkos.cz – zařídí dr. Novotný).
Prof. Dienstbier doporučuje návrh na člena výboru UICC z řad ČOS.
Liga proti rakovině svolává v návaznosti na Týden proti rakovině
(7.–13. 10. 2002).

22.10.2002 II. Sněm dobrovolných a profesních organizací. Účast
přislíbil doc. Žaloudík.

e) Seznam akcí pod záštitou ČOS v r. 2003 – BOD, JOD, Staškovy
dny, ČLS odeslal doc Petruželka pouze tyto akce. Nutno doplnit o dal-
ší akce pořádané pod záštitou OS a odeslat na adresu Vít Černý –
Marketing pro zdraví (Onkologie v gynekologii a mammologii Brno,
Podpůrná péče Ostrava, Den mladých onkologů)– seznam odešle do
konce října doc Petruželka.

f) ČLS žádá o jmenování kandidáta do předsednictva JEP a revizní
komise: výbor navrhuje Prof. Vorlíčka do předsednictva, doc.
Eckschlagera do revizní komise. Připomínky ke stanovám JEP výbor
OS nemá. ČLS oznámí prof. Klener.

g) ČLS se omlouvá za chybu v účtování v ČLS JEP-stav fondu k 30.
6. 2002 je 238 524 Kč po uvedení na správnou hodnotu. Výše pří-
spěvku na příští rok zůstává nezměněna – ČLS odpoví dr. Fischer.

h) ČLS zaslala seznam členů ČOS k 17. 7. 2002 – 526 členů, a seznam
neplatičů (99) zatím nebude vyvěšen na linkos, jen připomínka pla-
cení osobním dopisem – rozešle pí. Amirouche. ČOS má 15 zahra-
ničních čestných členů, jeden jmenován v roce 1977, 13 v roce 1988
a jeden v roce 2001. Není přehled o čestných členech z ČR – zjistí p.
Amirouche.

i) Žádosti: hejtman středoevropského kraje – žádá návrhy na odborníky
pro onkologii: návrženi: dr. Aschermannová, dr. Tobek, doc. Abra-
hámová, Hejtmani Jihomoravského a Zlínského kraje žádají též jme-
novat odborníky pro onkologii. Pro Zlínský kraj navržen dr. Kohou-
tek, pro Jihomoravský kraj doc Žaloudík, doc. Štěrba. Další návrhy
dodá doc. Vyzula. Hejtmanům odpoví prof. Klener.

j) ČLK žádá o posouzení onkologické erudice dr. Ondřeje Bláhy
(k žádosti o zřízení soukromé praxe) – vyřídí prof. Vorlíček.

k) ÚZIS zaslal výsledky statistických dat za rok 2001 a vzor nového
formuláře – posoudí dr. Jelínková.

l) VZP žádá o názor na vytvoření nového kódu pro fotoforezu v léč-
bě posttransplantační reakce. – Onkologická společnost se domnívá,
že posouzení je v kompetenci Hematologické společnosti. Odpoví
prof. Klener.

m) Dopisy firem :Pliva- Lachema žádá o vyjádření ČOS k udělení
výjimky z registrace oxaliplatinu v léčbě GIT – ČOS doporučuje stej-
nou odpověď jako pro fy Sanofi- zařídí pí Amirouche.

Firma Novartis – žádá o vyjádření k indikacím Femary : ČOS pod-
poruje indikaci pro neoadjuvantní léčbu a léčbu pacientek předléče-
ných antiestrogeny. Odpoví prof. Klener.

n) MZD požaduje návrh kandidáta na předsedu IACR v Lyonu – ČOS
navrhuje prof. dr. Bubenika Návrh a potřebné materiály zašle na MZ
prof. Klener.

o) Sekce onkochirurgie – žádá o zaplacení kolektivního členství sek-
ce v WFSOS- Výbor schválil. vyřídí dr. Fischer.

p) Dr. Neumannová - Žádost o záštitu nad onkologickým symposi-
em – výbor souhlasí.

Žádost o schválení rozesílání Lancet Oncology členům OS – K. Hyn-
ková musí požádat o rozeslání ČLS. Výbor vyslovil souhlas s pod-
mínkou, že poštovné bude účtováno vydavateli, nikoliv ČOS.

r) BOD se budou konat 22-24. 5. 2003, předběžný program je vysta-
ven na LINKOS.

4. Různé

Kurzy IPVZ – málo obsazeny, nutno informovat členy ČOS s před-
stihem, prostřednictvím linkos cz.. SROB – prim. Stankušová nav-
rhuje konsultovat koncepcce oborů na spol. schůzi. Dále informovala,
že podle statistiky UZIS indikace k RT činí 31 – 60 % podle kraje.
Chybí metodické vedení a není možnost kontroly. Zlepšení by bylo
možno očekávat od zavedení instituce krajských odborníků. Mož-
nost kontroly indikací terapie a preskripcie. Byla též podána infor-
mace o kongresu ESTRO v Praze.

Doc Vyzula – upozorňuje, že je třeba inovovat koncepci přístrojové-
ho vybavení. Tlak od společnosti nevede ke zlepšení.

Doc Žaloudík zaslal výboru materiály o spolupráci OS se spol. lék.
Genetiky. Členové výboru odešlou své připomínky přímo doc. Žalou-
díkovi.

V březnu končí funkční období výboru. Na příští schůzi nutno jme-
novat volební komisi a dohodnout organizaci voleb.

Všem členům výboru se ukládá dodat na příští schůzi materiály
k vypracování výroční zprávy za rok 2002 a výroční zprávy odst-
pujícího výboru.

5. Oznámení

Doc. MUDr. Václav Bek DrSc., čestný člen ČOS a emeritní před-
nosta Onkologické kliniky, zakladatel a vedoucí katedry klinické onko-
logie IPVZ, oslavil své 80. narozeniny.

Příští schůze výboru 19. 11. 2002.

Prof. MUDr. Pavel Klener, CSc., předseda ČOS JEP