

CYTOGENETICKÉ A MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ MARKERY V ONKOLOGII SOLIDNÍCH NÁDORŮ A HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT

CYTOGENETICS AND MOLECULAR BIOLOGICAL MARKERS IN ONCOLOGY AND HEMATOONCOLOGY

HAJDÚCH M.^{1,3}, JAROŠOVÁ M.², TROJANEC R.¹, INDRÁK K.², ŠPAČKOVÁ K.¹, PAPAŽÍK T.², CWIERTKA K.³

¹ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UP A FN OLOMOUC

² HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLOMOUC

³ ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLOMOUC

Souhrn: Cytogenetika a molekulární genetika se staly nedílnou součástí diagnostických a prognostických metod v onkologii solidních nádorů i hematologických malignit. Jejich význam, potvrzený na velkých souborech nemocných, se stal rutinní součástí klinické diagnostiky a v některých případech i klasifikačních kritérií. Nález genetických a cytogenetických změn se u leukémií a solidních nádorů pohybuje v rozmezí 60-90% a zahrnují i zcela specifické změny které lze využít při identifikaci rizikových jedinců, diagnostice, k určení prognózy, predikci odpovědi na specifickou léčbu, či monitorování aktivity procesu. Na konkrétních příkladech tří nádorů (karcinom prsu, chronická myeloidní leukémie a akutní promyelocytární leukémie) upozorňujeme na význam genetických studií pro diagnostiku, prognózu a léčbu nemocných se solidními nádory i hematologickými malignitami v kontextu medicínském a ekonomickém.

Klíčová slova: karcinom prsu, chronická myeloidní leukémie, akutní promyelocytární leukémie, ERBB2, bcr-abl, PML-RAR_α, trastuzumab, imatinib mesylát, all-trans-retinová kyselina

Abstract: Cytogenetics and molecular genetics become an essential part of diagnostics and prognostification in oncology of both the solid tumors and hematological malignancies. Their significance has been confirmed in large multicentric prospective or retrospective studies and they were successfully incorporated in routine clinical diagnostics and patient stratification. Cytogenetic and/or genetic alterations were detected in 60-90% of leukemias and solid tumors, and those involve specific changes applicable for identification of high-risk individuals, disease prognostification, prediction of therapy response or monitoring of disease activity. In this paper we underline importance of those markers in diagnostics, prognostification and prediction of therapy response in patients suffering from breast cancer, chronic myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia within the frames of medical and economical consequences.

Key words: breast cancer, chronic myeloid leukemia, acute promyelocytic leukemia, ERBB2, bcr-abl, PML-RAR_α, trastuzumab, imatinib mesylate, all-trans-retinoid acid

Klinická onkologie a onkohematologie čelí v posledních několika letech stoupajícímu počtu výsledků plynoucích z molekulárního výzkumu patogeneze maligních onemocnění. Tyto informace jsou implementovány jak v oblasti diagnostické, tak terapeutické. Objevují se nová protinádorová léčiva principiálně odlišného charakteru než klasická cytostatika. Jejich mechanismus účinku je přísně specifický pro určité typy nádorů. Paralelně se zaváděním nových léčiv na trh se do popředí zájmu dostávají biomarkery účinnosti definující s přijatelnou pravděpodobností skupinu pacientů, kteří budou z této specifické léčby profitovat, dochází k individualizaci terapie. Tato individualizace se nevztahuje jenom na daného pacienta, ale může být specifická pro daný nádor v daném čase a postihuje tak biologickou podstatu zhoubného bujení, která je zejména u solidních nádorů založena na mimořádné heterogenitě, přízpusobivosti a genetické nestabilitě nádorových populací.

1. Nádorové markery v onkologii

Obecná definice nádorového markeru je velmi obtížná, jelikož jako nádorový marker lze použít jakýkoliv znak, kterým lze s dostatečnou sensitivitou a specificitou odlišit nádorový proces od nenádorového, specifickou skupinu nádorů, specifickou vlastnost nádoru, apod. Nádorový marker by měl spolehlivě odlišit transformovanou buňku od svého nemaligního progenitoru a být přesně měřitelný v abnormálním množství v tělních tekutinách, tkáních či v nádoru samotném. Chemické

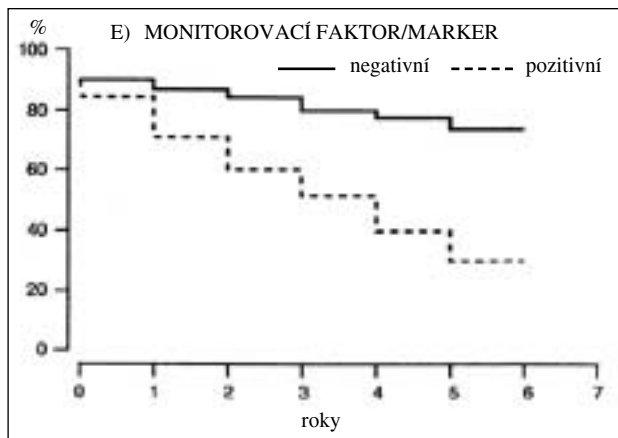
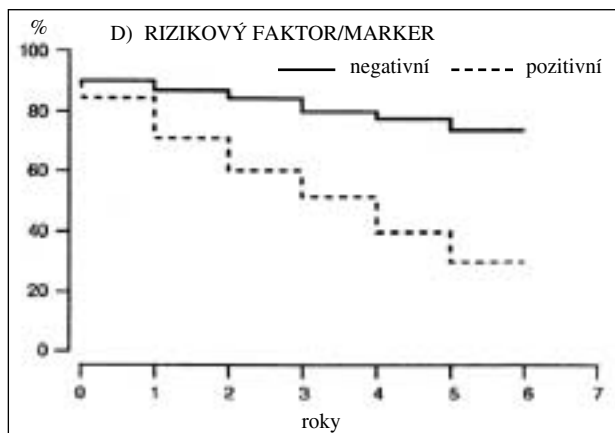
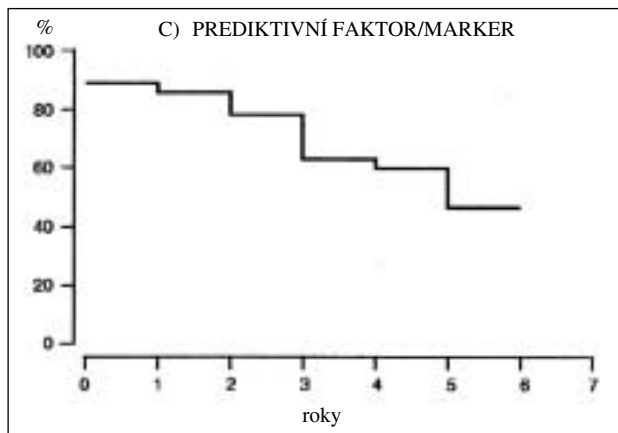
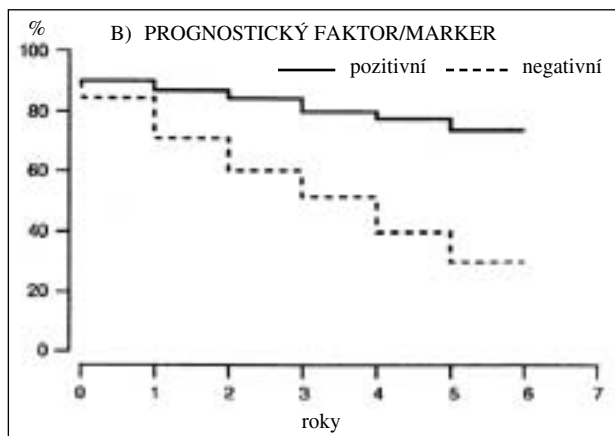
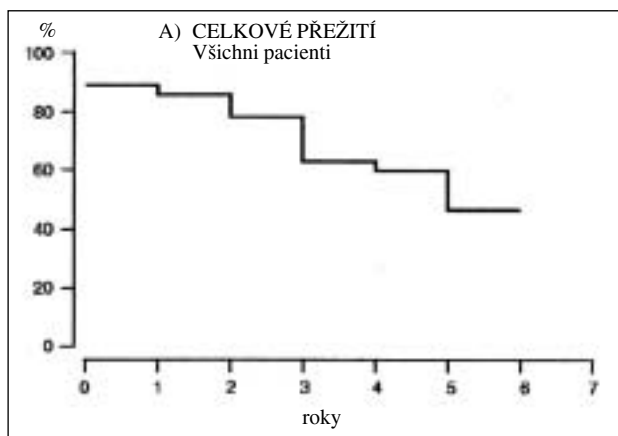
podstata nádorových markeru je také značně heterogenní, často se jedná o proteiny (např. PSA, CA-125, ERBB2), produkty nádorového metabolismu (např. katecholaminy), RNA (např. transkripty bcr-abl genu), či DNA (např. amplifikace specifických onkogenů: c-myc, ERBB2, Cyklin D1, n-myc, atd.). V širším smyslu jsou markery i klinické a histopatologické charakteristiky tumoru (např. TNM staging, grading), ale těmito znaky se s ohledem na jejich relativně rutinní zavedenost v klinické onkologii nebudeme zabývat.

Nádorové markery v současnosti používáme zejména v pěti oblastech (*Obrázek 1*): 1) screeningu, 2) diagnostice, 3) k určení prognózy, 4) predikci léčebné odpovědi a 5) k monitorování průběhu onemocnění (1).

1) Screeningové markery se uplatňují v klinické onkologii anebo preventivní medicíně zatím velmi omezeně. Jejich cílem je identifikovat rizikovou skupinu nemocných v jinak asymptomatické populaci. Většinou se zaměřujeme na populaci jedinců s vyšší pravděpodobností nádorového onemocnění (věk, rodinná zátěž, profesionální expozice, apod.). Typický příklad je vyšetření hodnot PSA, případně CA-125 (1,2). Plošný screening těchto parametrů však zatím není běžnou součástí klinické praxe a naráží na problémy medicínské, ekonomické i etické.

2) Diagnostické markery se užívají při správné a přesné diagnostice daného nádorového onemocnění. Jejich použití je do značné míry dáno klinickou zkušeností a histopatologickým charakterem nádoru.

Obrázek 1.: Příklady možného dopadu jednotlivých markerů/faktorů na celkové přežití pacientů s malignitou.



- 3) **Prognostické faktory** můžeme charakterizovat jako znaky poskytující prospektivní informaci o biologické povaze nemoci, které bereme v úvahu při rozhodování o dalším léčebném postupu.
- 4) **Prediktivní faktory** nám poskytují informaci o (ne)pravděpodobnosti klinické odpovědi nádoru na daný terapeutický postup či konkrétní léčivo.
- 5) **Markery monitorující** onemocnění používáme ke sledování aktivity nádorového procesu po proběhlé primární léčbě. Monitorování nemoci nám pomáhá zejména při včasnému zachytu rekurence maligního procesu, případně při sledování efektu léčby (např. sledování Ph¹ pozitivních klonů při léčbě CML Glivecem).

Z hlediska cílů tohoto sdělení se dále zaměříme na prognostické a prediktivní markery.

2. Prognostické a prediktivní faktory

Abychom oprávnili použití molekulárního faktoru v rutinní klinické praxi, musí být přesnější, citlivější, specifitější, reprodukovatelnější, snadněji vyšetřitelný anebo levnější než současné klinicko-laboratorní charakteristiky nemoci. Z obecného hlediska můžeme **prognostické a prediktivní faktory** rozdělit do dvou skupin:

1. **ideální** – tj. takové, které poskytují kvalitativně novou informaci, která se svým obsahem nepřekrývá s existujícími klinicko-laboratorními parametry.
2. **s překryvem** – poskytují prognostickou informaci překrývající se známými klinicko-laboratorními faktory. Většina těchto markerů může být použita pro cílení nových protinádorových léčiv, nicméně nepřináší novou informaci při určení prognózy nemoci (např. histopatologický grading u ependymomů). Některé z těchto faktorů však mohou být s výhodou použity ve specifických situacích, např. při získání rychlejších informací o nádorovém procesu ještě před kompletním stážovacím vyšetřením (např. hodnota sérového PSA u karcinomu prostaty a pravděpodobnost jeho šíření přes pozdru prostaty).

2.1. Genetické a cytogenetické prediktivní/prognostické znaky

Normální geny stimulující buněčnou proliferaci se nazývají „protoonkogeny“ a geny zajišťující inhibici buněčné proliferace se nazývají „nádorové supresorové geny“. Samotným vlastním „onkogenem“ pak rozumíme mutované protoonkogeny. Onkogeny se mohou aktivovat následujícími mechanismy:

- alterací genu, vedoucí ke strukturální změně a tím i k pozměněné funkci výsledného proteinu
- vyšší produkci či stabilizací proteinu, vedoucí k deregulaci buněčné proliferace

Tabulka 1: Základní fakta o preparátu trastuzumab, Herceptin 150 mg plv.inf.

Složení: trastuzumabum 150 mg v lahvičce s lyofilizovaným práškem pro infúzi
Indikace: metastazující karcinom prsu, jenž ve zvýšené míře expri-muje ERBB2 (Her-2/neu)
Dávkování: Nasycovací dávka: 4 mg / kg tělesné hmotnosti. Dále se podává: 2 mg/kg tělesné hmotnosti 1x týdně, trvale až do známek pro-grese onemocnění.
Balení: INF PLV SOL 1x150 mg
Maximální cena: 26 200,00 Kč (1.7.2002)
Náklady na léčbu (vycházejí z maximální ceny): Pacientka s tělesnou hmotností 60 kg:
na 1 týden (120 mg) 20 964,00 Kč
na 1. měsíc léčby 104 820,00 Kč
na 1. čtvrtletí 272 532,00 Kč
na 1. rok léčby 1 111 092,00 Kč

Pozn.: Skutečné náklady léčby jsou ještě vyšší, trastuzumab je podá-van v kombinaci s dalšími nákladnými cytostatiky, např. paclitaxel, navelbin a pod.

- expresí standardního množství normálního proteinu v neadekvátní situaci, vedoucí opět k deregulaci buněčné proliferace

V současné době se při léčbě onkologických malignit projevují snahy o determinaci faktorů, které by predikovaly způsob léčby, tj. vyloučení nevhodných či použití vhodných chemoterapeutik. Řada těchto testů je založena na monitorování odpovědi nádorových buněk na vybraná chemoterapeutika *in vitro*. Ačkoliv tyto testy mají již dnes uznávanou prediktivní hodnotu, mají také řadu nevýhod a limitací (3,4). Nelze je provádět retrospektivně, spotřebují velké množství vitálního nádorového materiálu, kultivace/izolace nádorových buněk nebývá vždy úspěšná, vyžadují přítomnost vysoce specializované laboratoře s mnoholetou erudicí. I z těchto důvodů se hledají jednodušší markery pro predikci odpovědi nemocného na chemoterapii. Mezi nejlépe charakterizované a detekovatelné alterace nádorových buněk patří genetické a cytogenetické změny. V následujícím textu na konkrétních příkladech uvádíme tři maligní onemocnění u kterých se vyšetření genetických/cytogenetických znaků stalo rutinní součástí klinické diagnostiky s rozhodováním o další specifické (a nákladné) léčbě.

2.2. ERBB2 gen jako prognostický i prediktivní marker s možností cílené léčby v onkologii solidních nádorů

Jedním z nejvíce sledovaných protoonkogenů ERBB2 (synonymum: Her-2/neu, neu, c-erbB-2) lokalizovaný na chromosomu 17q. Gen ERBB2 kóduje transmembránový protein p185^{HER2}, patřící do rodiny EGFR (receptorů epidermálního růstového faktoru), zahrnujících ERBB1 (HER1), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) a ERBB4 (HER4). ERBB2 receptor hraje důležitou úlohu v normálním buněčném růstu a diferenciaci. Ve zdravých tkáních je produkován v nízkých hladinách. Amplifikace ERBB2 genu vede k nadprodukci receptoru, což se dává do souvislosti se vznikem různých typů nádorů u člověka (například karcinomy prsu, ovária, gastrointestinálního traktu) (5,6,7). Tuto změnu můžeme často pozorovat hlavně v raných stádiích karcinomu prsu anebo u ductálního karcinomu *in situ*, kde nadprodukci ERBB2 vykazuje až 60% DCIS (8) a bývá spojována s mimořádnou agresivitou těchto nádorů (ERBB2 jako negativní prognostický faktor). Patogenetická souvislost mezi nádorovou proliferací a amplifikací ERBB2 dala podnět k přípravě blokujících humanizované protilátky proti extracelulární doméně genu ERBB2. toto léčivo bylo později vyvinuto a registrováno pro léčbu metastatického karcinomu prsu pod názvem trastuzumab (Herceptin®). Léčba trastuzumabem je mimořádně nákladná (Tabulka 1) a účinná pouze ve skupině pacientů s jednoznačnou amplifikací genu, což vede ke zvýšeným požadavkům na přesné vyšetření tohoto prognosticko-prediktivního parametru.

2.2.1. Kdy testovat stav ERBB2 (Her-2/neu) receptorů?

Podle posledních doporučení ASCO (American Society of Clinical Oncology) by měla být nadprodukce ERBB2 receptorů testována u všech pacientů s primárním karcinomem prsu, nebo v době relapsu onemocnění (9). K podobným závěrům dospěla i NCCN 2000 (National Comprehensive Cancer Network), která posledně publikovala praktické doporučení pro klinické vyšetření, na základě kterého by všichni pacienti s karcinomem prsu měli být testováni na ERBB2 a to nezávisle na stádiu onemocnění.

2.2.2. Jakou metodu testování zvolit?

Z hlediska rutinní klinické praxe je důležité mít k dispozici jednoduché, levné a spolehlivé stanovení ERBB2.

ERBB2 lze stanovit na úrovni genové, mRNA či jako protein. Ačkoliv existuje více metod (Northern Blot, Southern Blot, real-time PCR, ELISA test aj.), v praxi se ke stanovení ERBB2 nejvíce používá imunohistochemie (IHC) a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) (Obrázek 2). Tyto metody jsou navíc jako jediné doporučené i FDA (Food and Drug Administration), což zajišťuje jejich standardnost a reprodukovatelnost. Imunohistochemické vyšetření je používáno jako screeningová metoda a pozitivní případy (1+, 2+ a 3+) jsou ověřovány FISH. Principem IHC je stanovení zvýšené exprese proteinu ERBB2 na úrovni tkáňové i buněčné. Jedním z komerčně dostupných testů, založených na imunohistochemickém principu je např. HercepTest (Dako Corp., Carpinteria, CA). Tento testovací kit je jeden ze dvou doporučených FDA (10). Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je molekulárně cytogenetická metoda, která nalézá v klinické praxi stále širší uplatnění. Důvodem je mimo jiné její vysoká specifita, reprodukovatelnost a rychlost stanovení (do 24 hodin). Pomocí ní lze stanovit počet jednotlivých onkogenů v buněčném jádře. Počet kopií genu ERBB2 je stanovován současně s celkovým počtem chromosomu 17 v jádře, pomocí centromerické sondy. Stanováním počtu kopií chromosomu 17 lze rozpoznat pravou amplifikaci od změn v ploidii nádorové buňky (11,12).

2.2.3. Kde testovat?

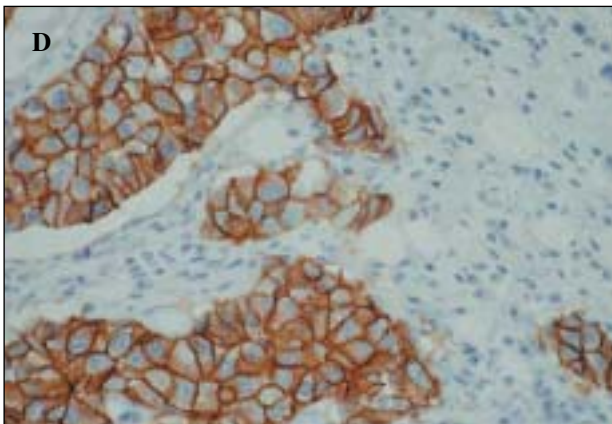
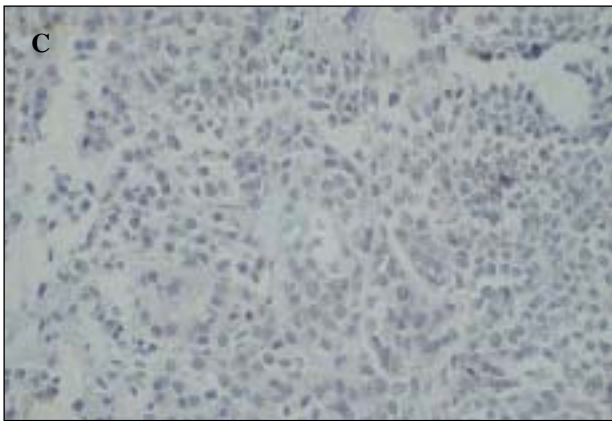
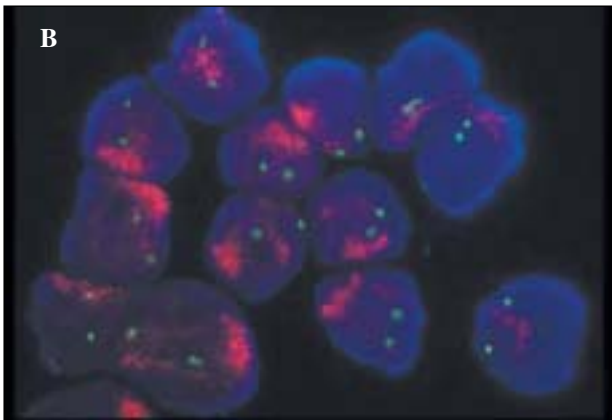
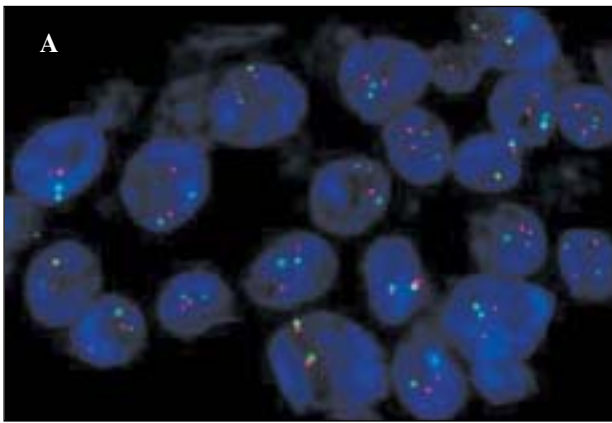
Na ECCO 11 (European Cancer Conference, Lisbon, Portugal, October 21-25, 2001) profesor Vogel (South Point Medical Center, Plantation, Florida, USA) uvedl zajímavá data. V rámci Intergroup byly v referenčních laboratořích znovu vyšetřeny vzorky, které byly před tím vyšetřeny v menších laboratořích. Až 27% vzorků z menších laboratoří bylo falešně pozitivních.

Na základě uvedených dat bylo doporučeno vyšetřovat stav ERBB2 receptorů pouze ve větších laboratořích, tj. v laboratořích, které vyšetří více než 250 vzorků ročně. Potřeba standardizovaného vyšetření ERBB2 přinesla vytvoření národních referenčních center pro stanovení tohoto genu, resp. proteinu. Ve Velké Británii (s 60 miliony obyvatel) pracují 3 takováto centra – Londýn, Nottingham a Glasgow. Využívají validované a FDA schválené testy – pro imunohistochemické stanovení HercepTest (Dako) a pro FISH PathVysion test (Vysis) (13).

Také v České republice byla z iniciativy zdravotních pojišťoven a České onkologické společnosti zřízena Referenční laboratoř pro vyšetření statusu genu ERBB2 při LF UP v Olomouci, která potvrzuje vyšetření ze spádových pracovišť ve druhém čtení.

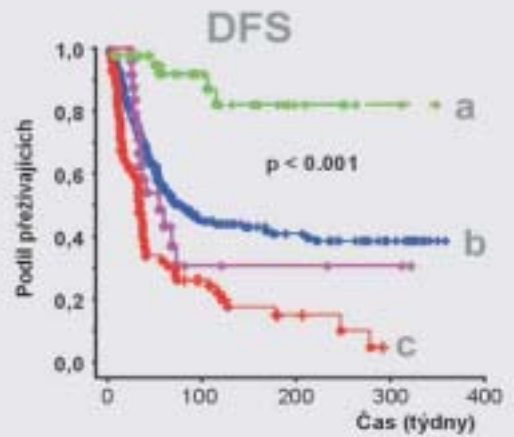
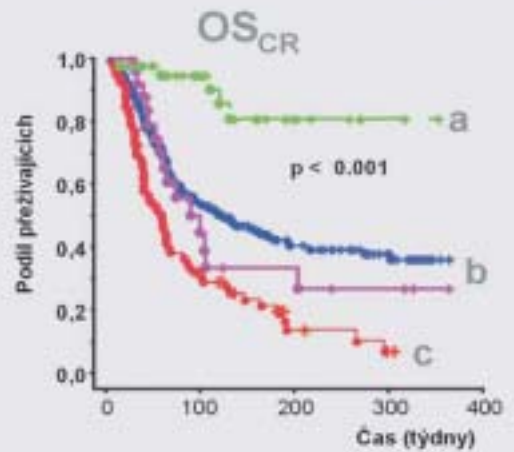
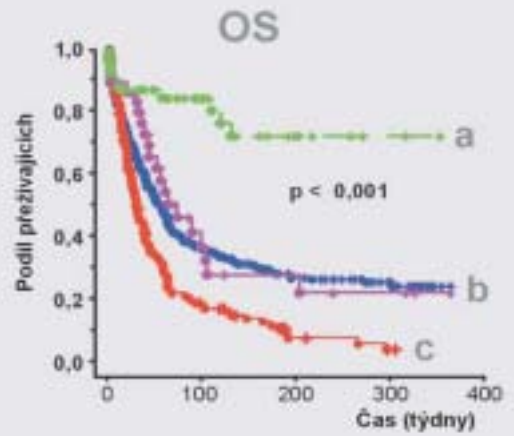
2.3. Pohled ze strany plátců zdravotní péče a opatření k racionalizaci vyšetřování ERBB2 a cílené léčby trastuzumabem – příklad pro další prediktivní/prognostické faktory?

Náklady na farmakoterapii onkologických onemocnění se stále zvyšují. Souvisí to mimo jiné s novými možnostmi léčby, které přináší intenzivní výzkum. Metastazující karcinom prsu zůstává i při současných léčebných možnostech prakticky nevléčitelným onemocněním. Medián celkového přežívání pacientů s metastazujícím karcinomem prsu je 2 roky. Asi



Obrázek 2: Vyšetření statusu genu Her-2/neu technikou IHC a FISH. A) Normální stav se dvěma kopiemi genu pro ERBB2 (FISH s použitím červeně značené sondy pro ERBB2 a zeleně fluoreskující sondy pro centromeru 17. chromosomu), B) Amplifikace genu ERBB2, C) Negativní IHC HercepTestem, D) Vysoce pozitivní IHC (3+).

Prognostické kategorie - celkové srovnání



Prognóza:
 Dobrá s M3 (n = 45)
 Dobrá bez M3 (n = 35)
 NK + střední (n = 309)
 Špatná (n = 146)

Obrázek 3: Výsledky statistického hodnocení prognostického významu chromosomových změn u 535 nemocných s AML. Na základě nalezených chromosomových změn byli nemocní rozděleni do prognostických podskupin: a = dobrá prognóza - nemocní s APL(M3) s t(15;17), AML s t(8;21), AML s inv(16), b = střední prognóza - nemocní s normálním karyotypem, trisomií chromosomu 8 a ostatními změnami, které nepatří do dobré ani špatné prognostické podskupiny, c = špatná prognóza - nemocní s komplexními přestavbami, změnami 11q23, 3q-, -5/5q-, -7/7q-, t(9;22)

v 50% případů můžeme dosáhnout krátkodobé kontroly symptomů, a tím výrazně zlepšit kvalitu života pacientů při únosné toxicitě. Je však nutné pamatovat i na to, že u malého procenta pacientek můžeme dosáhnout opakovaně dlouhodobé remise onemocnění a to i v případě organového postižení (jaterní metastázy). Kombinace imunochemoterapie (trastuzumab a chemoterapie) prokázal jako jeden z mála léčebných režimů prodloužení přežívání pacientek, u kterých byla prokázána nadprodukce ERBB2 ve srovnání s chemoterapií.

Trastuzumab (Herceptin) byl uveden v České republice do terapie rakoviny prsu v roce 2001 a patří mezi léky, jejichž potřeba může výrazně zvýšit finanční nároky na léčbu. Bylo proto žádoucí stanovit taková pravidla pro léčbu, která vyselektují potencionální skupinu pacientek, u nichž budou vynaložené náklady využity maximálně efektivně. Trastuzumab je přelomovým lékem u onkologii solidních nádorů, protože se jedná o první geneticky směřované léčivo. V důsledku toho je nutné přesně vymezit skupinu pacientů, u kterých se dá s velkou pravděpodobností očekávat léčebná odpověď. To souvisí s přesností laboratorního vyšetření v laboratoři a jeho správnou interpretací klinickým onkologem. Celý proces je výrazně efektivnější na pracovištích, která přijímají více pacientek s touto diagnózou a mají více praktických zkušeností, někdy již z fáze klinického zkoušení léku. Proto v souladu se stanoviskem odborné společnosti bylo stanoveno jedenáct center, která jsou pověřena pro touto specifickou léčbou. Jsou to: Masarykův onkologický ústav v Brně, Nemocnice v Českých Budějovicích, Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Fakultní nemocnice v Olomouci, Fakultní nemocnice s poliklinikou v Ostravě, Fakultní nemocnice v Plzni, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Fakultní nemocnice v Praze-Motole, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze, Fakultní nemocnice na Bulovce v Praze a Fakultní Thomayerova nemocnice s poliklinikou v Praze. S účinností od 1.7.2002 bylo dále rozhodnuto, že všechny léčené pacientky budou registrovány v MOÚ v Brně (koordinátorem je doc. MUDr. R. Vyzula, CSc.) a vyžaduje se pozitivní vyšetření metodou FISH z referenční laboratoře pro stanovení ERBB2 (HER2/neu) na LF UP v Olomouci. Cílem těchto opatření není byrokratizace procesu, ale je to racionální cesta k úsporám a získání dat pro odborné posouzení oprávněnosti a účinnosti této nákladné léčby. Získaná data se předávají odborným společnostem i příslušným pojišťovnám k posouzení prospěšnosti investic do této léčby. Od navrženého algoritmu založeného na vzájemné spolupráci se očekává účinná a fakty podložená výměna informací mezi pojišťovnami a klinickými pracovišti, která je ve prospěch našich nemocných. Věříme, že příklad trastuzumabu (Herceptinu) se stane modelem pro řešení dalších problémů v racionální onkologické farmakoterapii a prediktivní onkologii, které se již s nástupem dalších účinných, ale i nákladných léčiv objevují.

3. Příklady cytogenetických a molekulárních markerů v hematooknologii

3.1. Fúzní gen BCR-ABL a specifická terapie imatinib mesylátem

První specifická chromosomová změna, pozorovaná v souvislosti s lidským nádorovým onemocněním, byl nález Filadelfského chromosomu (Ph chromosom) u nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML). Tento chromosom je výsledkem reciproké translokace t(9;22)(q34;q11), která vede ke vzniku derivovaného chromosomu 9q+ a malého chromosomu 22q-, označeného jako Ph¹ chromosom (14). Vznik translokace je na molekulárně genetické úrovni charakterizován vznikem fúzního BCR/ABL genu kódujícího chimerický Bcr/Abl protein s deregulovanou konstitutivní tyrosin kinázovou aktivitou. Studie ukázaly, že Bcr/Abl exprese je nezbytná (a současně dostačující) pro transformaci kmenových buněk s konečným CML fenotypem. Tento nález byl historickým mezníkem nejen pro nádorovou cytogenetiku, ale otevřel éru

hledání specifických genetických změn, které se podílejí na vzniku a vývoji nádorů. Nálezy specifických chromosomových změn jsou dnes již nejen u hematologických malignit, ale i u solidních nádorů odrazem obrovského pokroku v technologiích molekulární biologie a cytogenetiky. Výsledkem intenzivního studia genetických změn u hematologických nádorů je potvrzení jejich diagnostického, prognostického a léčebného významu (15-17).

Molekulárně biologické studium Ph chromosomu přineslo nejen přesné určení příčiny vzniku CML na genové a následně na proteinové úrovni, ale tyto nálezy vytvořily podmínky pro vývoj nové, cílené molekulární terapie těchto nemocných. Zavedení preparátu imatinib mesylát známého také pod názvem STI571 a v Evropě distribuovaného pod firemním názvem Glivec do léčby CML, je založeno na poznání úlohy konstitutivní tyrosinkinázové aktivity na iniciaci procesu maligní transformace a je významným pokrokem v léčbě malignit.

Z uvedeného je zřetelná velká zodpovědnost genetiků při určování chromosomových změn. Zjištění chromosomových změn má dále význam pro stanovení léčby a prognózy nemocných a má i své ekonomické důsledky. Nemocný léčený preparátem imatinib mesylát se může v průběhu 1/2 roku dostat do kompletní cytogenetické remise a není nutné u nemocných s CML realizovat finančně nákladné hledání dárce kostní dřeně a následnou, rizikovou transplantaci křevetvorných buněk. Určení cytogenetické remise jako stupně odpovědi na léčbu je stejně důležité jako cytogenetická informace o klonálním vývoji v průběhu onemocnění, která může být přítomná i v Ph negativním buněčném klonu, a která může být příčinou vzniku rezistence na Glivec a důvodem ukončení neefektivní léčby a hledání jiné léčebné alternativy. Určení přítomnosti mutační nebo amplifikací BCR/ABL, které se vyskytují u nemocných s rezistencí CML na Glivec, se dnes stalo standardní součástí hodnocení léčby. Glivec dosahuje nejlepší léčebné výsledky u nově diagnostikovaných nemocných v chronické fázi CML (18,19). Odpověď na léčbu je hodnocena hematologicky a cytogeneticky. Cytogenetická odpověď ukazuje skutečné potlačení nádorového klonu a hodnotí se jako procento buněk nesoucí Ph chromosom. Hodnocení genetické odpovědi přineslo důležitá fakta. Nemocní s CML v chronické fázi, kteří dosáhli velké cytogenetické odpovědi na léčbu preparátem Glivec mají nízké riziko progresu v následujících 24 měsících ve srovnání s nemocnými, kteří velkou cytogenetickou odpověď nedosáhli (19). Příčiny nedosažení cytogenetické odpovědi jsou cílem řady studií a zatím nebyl stanoven jednoznačný závěr. Proto je nutné, do doby, než bude určena role přídatných chromosomových změn u nemocných léčených preparátem Glivec, cytogeneticky monitorovat maligní klonu a sledovat jejich možný genetický vývoj nejméně každých 6 měsíců.

3.2. Fúze genů PML/RAR α u akutní promyelocytární leukémie a léčba kyselinou trans-retinovou (ATRA)

Význam cytogenetiky hematologických malignit byl potvrzen také tím, že se cytogenetika stala součástí nové WHO klasifikace akutních myeloidních leukémií (20). Specifické chromosomové změny potvrzují klinickou diagnosu akutní leukémie a určují specifickou léčbu nemocných. Příkladem cílené a současně zatím neúčinnější léčby akutní leukémie je léčba nemocných s akutní promyelocytární leukémií (APL) preparátem kyseliny all-trans-retinové (ATRA). Až 90% nemocných dosahuje remise a 75% přežívá bez známky onemocnění více jak 5 let. To v případech správně určených genetických změn. Onemocnění je totiž spojeno s translokací t(15;17)(q22;q21), při které dochází k fúzi genů PML/RAR α (21). Velmi vzácně může u některých nemocných, s klinicky stejným obrazem APL, dojít k variantní translokaci a fúzi genu RAR α s jiným partnerem. V takových případech pouze fúze s PLZF genem jako výsledek translokace t(11;17), je léčitelná ATROU (22), ostatní přestavby musí být léčeny jiným léčebným režimem. Z tohoto pohledu má určení translokace

a fúze genů jak diagnostický, tak léčebný význam. Správná volba léčby má i u těchto nemocných své ekonomické důsledky. Komplikace, provázející „zbytečně“ intenzivní přeléčení, mohou být život ohrožující, mohou vést k sekundárním malignitám a na druhou stranu „podléčení“ nemocného vede k relapsu choroby či nedosažení remise. V obou případech je léčba spojena s vysokými finančními výdaji. Statistická analýza významu cytogenetických změn u souboru 535 nemocných s AML, kteří byli diagnostikováni a léčeni v 5 hematologických centrech ČR (Praha, Brno, Olomouc, Hradec Králové) potvrdila, že nejpříznivější prognózu mají nemocní t(15;17) (Obrázek 3). Tento výsledek je současně odrazem správné cytogenetické a molekulárně genetické diagnostiky těchto nemocných.

Tyto dva příklady významu určování genetických změn u hematologických malignit jsou jen zlomkem z desítek již dnes známých specifických chromosomových a genových změn spojených s hematologickými malignitami. Je nutné si uvědomit, že maligní transformace je mnohakrokový proces,

ve kterém dochází ke kumulaci řady genetických změn a určení jakékoliv získané genetické změny, jako markeru maligního klonu, dovoluje monitorovat přítomnost tohoto nádorového klonu a dovoluje nám sledovat nádorový proces, zbytkovou chorobu a včasné volit léčbu, dojde-li k určení molekulárně genetickému relapsu, aniž byl zjištěn relaps hematologický. Včasné zahájení léčby, před plnou manifestací relapsu onemocnění, snižuje celkové finanční náklady a dává nemocným více naděje na opětovné uzdravení. Proto musí být určování genetických změn standardní součástí diagnostiky, prognostické rozvahy i hodnocení léčby u hematologických malignit.

Poděkování

Práce na tomto projektu byla realizována díky podpoře odborných společeností a grantových agentur: Ministerstva školství mládeže a tělovýchovy ČR (J14/98: 151100001), Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR (7506-3, 7495-3, 7490-3) a z výměžku Běhu Terryho Foxe.

Literatura

1. Riley RD, Burchill SA, Abrams KR, Heney D, Lambert PC, Jones DR, Sutton AJ, Young B, Wailoo AJ, Lewis IJ. A systematic review and evaluation of the use of tumour markers in paediatric oncology: Ewing's sarcoma and neuroblastoma. Health and Technology Assessment 2003; 7, 1-159.
2. Bell R, Petticrew M, Luengo S, Sheldon TA. Screening for ovarian cancer: a systematic review. Health and Technology Assessment 1998; 2, 1-83.
3. Mihal V, Hajdúch M, Janošťáková A, Šafářová M, Nosková V, Pospíšilová D, Novák Z: Využití in vitro analýzy lékové rezistence v léčbě leukémií dětského věku. Klin Onkol 2000; 13: 39-42.
4. Talač R, Zaloudík J, Hajdúch M, Mihal V, Chumchalová J, Hanke I, Kovařík J: Hodnocení lékové rezistence in vitro a její klinické implikace. Klin Onkol 2000; 13: 2-3.
5. Hynes NE, Stern DF: The biology of erb-2/neu/HER-2 and its role in cancer. Biochem Biophys Acta Rev Cancer 1994; 1198: 165-84.
6. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al.: Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987; 235: 177-82.
7. Klapper LN, Kirschbaum MH, Selas M, Yarden Y: Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. In Klein G, Woude V (eds): Advances in Cancer Research. New York: Academic Press 2000; 25-79.
8. Barnes DM, Bartkova J, Camplejohn RS, et al.: Overexpression of the c-erbB-2 oncogene: why does it occur more frequently in ductal carcinoma in situ than in invasive mammary carcinoma and is this of prognostic significance? Eur J Cancer 1992; 28: 644-8.
9. Bast RC, Radvin P, Hayes DF, et al.: 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol 2001; 19: 1865-78.
10. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ: Specificity of Herceptin in determining Her-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring System. J Clin Oncol 1999; 17 (7): 1983.
11. Press MF, Bernstein L, Thomas PA: Her-2/neu gene amplification

- characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. J Clin Oncol 1997; 15 (8): 2894-2904.
12. Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes MJ: Comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of Her-2/neu in breast cancer. J Clin Oncol 1999; 17 (7): 1974-65.
13. Ellis IO, Dowsett M, Barlett J, et al.: Recommendations for HER2 testing in UK. J Clin Path 2000; 53(12): 890-892.
14. Rowley JD: Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature, 1973; 243: 290-293.
15. Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., et al.: The importance of diagnostic Cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients into the MRC AML 10 trial. Blood, 92, 7, 1998, 2322-2333.
16. Berger, R., Bernheim, A., Ochoa-Noguera, M.E., et al.: Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia. A study of 343 patients. Cancer Genet Cytogenet 28, 1987, 293-297.
17. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al: Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosin kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. N Engl J Med. 2001; 344: 1038-1042.
18. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al: Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. N.Engl J Med. 2002; 346: 645-652.
19. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al: Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. Blood, 2002; 99: 3530-3539.
20. Harris, L.N., Jaffe, E.S., Diebold, J., et al.: The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Ann. Oncol., 10, 1999, s. 1419-1432.
21. Grimwade, D., Gorman, P., Duprez, E., et al.: Characterization of cryptic rearrangements and variant translocations in acute promyelocytic leukemia. Blood, 90, 1997, 4876-4885.
22. Warrell RJ, Richon V, et al: Thearapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. J Natl Cancer Inst. 1998; 90: 1621-1625.