

MŮŽE CYTOGENETIK A MOLEKULÁRNÍ GENETIK POMOCI DÍTĚTI NEMOCNÉMU NÁDOREM?

MAY CYTOGENETICIST AND MOLECULAR GENETICIST BRING HELP TO CHILDREN SUFFERING FROM MALIGNANT TUMOR?

STEJSKALOVÁ E., ECKSCHLAGER T.

KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE, UNIVERZITA KARLOVA, 2. LF A FN MOTOL, PRAHA

Souhrn: V buňkách maligních nádorů se často vyskytují numerické a/nebo strukturální chromozomální aberace, které mohou být specifickými markery nádorových buněk s diagnostickým i prognostickým významem. Tyto aberace mohou být prokázány vyšetřením karyotypu a některými molekulárně genetickými metodami (FISH, PCR, RT PCR nebo CGH). V tomto sdělení demonstrujeme na příkladu neuroblastomu a nádorů ze skupiny Ewingova sarkomu (kostní i extraosální Ewingův sarkom a periferní primitivní neuroektodermální nádor) význam cytogenetického a molekulárně genetického vyšetření. Zařazení pacientů s neuroblastomem podle prognostického schématu (DNA ploidy, amplifikace genu N-myc, histologická klasifikace, věk v době stanovení diagnózy a klinické stadium) je zásadní pro výběr vhodné terapie. Detekce specifických translokací t(11;22)(q24;q12) nebo t(21;22)(q22;q12) u nádorů ze skupiny Ewingova sarkomu má význam pro přesné určení diagnózy a pokud použijeme vysoce citlivou metodu RT PCR (detekuje 1 nádorovou buňku na 10⁵⁻⁶ buněk nenádorových) i pro průkaz minimální nádorové choroby. Výše uvedená vyšetření jsou nutná nejen pro řádný výběr terapie, ale i pro účast v mezinárodních multicentrických studiích.

Abstract: Numerical and/or structural chromosome aberrations occur frequently in cancer cells. Those aberrations may be specific markers of cancer cells with diagnostic or prognostic significance and they may be detected by karyotype examination or by some molecular genetic methods (FISH, PCR, RT PCR, or CGH). The aim of this paper was to exemplify significance of cytogenetical and molecular genetical examination in neuroblastoma and Ewing's sarcoma family of tumors (skeletal and extraskeletal Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor). Classification of patients suffering from neuroblastoma into prognostic groups (DNA ploidy, N-myc amplification, histological classification, age at the time of diagnosis, and clinical stage) is fundamental for therapy selection. Detection of specific translocations t(11;22)(q24;q12) or t(21;22)(q22;q12) in Ewing's sarcoma family of tumors is helpful for diagnosis determination and if using sensitive method like RT PCR (detects 1 cancer cell in 10⁵⁻⁶ normal cells) also for minimal residual disease. The above mentioned examinations are necessary not only for selection of correct therapy but also for participation in international multicentric studies.

Jednou z disciplín klinické medicíny, ve které molekulární biologie a cytogenetika našly jedno z největších uplatnění, je onkologie. V onkologii byly učiněny nejen významné objevy teoretické, ale metody molekulární biologie se staly nedílnou součástí vyšetřovacích postupů u pacientů s leukemiemi, lymfomy i některými solidními nádory. Je to dáno tím, že nádory jsou způsobeny poruchou regulací a právě těmito buněčnými regulacemi na úrovni molekul se zabývají obory genetika a molekulární biologie. Řada chromozomálních aberací a genových mutací postihujících nádorovou buňku je specifická pro určité nádory nebo jejich formy a využívají se proto v diagnostice a klasifikaci některých nádorů. V současnosti je již neomluvitelným prohřeškem pokud není provedeno cytogenetické a/nebo molekulárně genetické vyšetření nádorových buněk u pacientů s leukemiemi nebo s lymfomy. Význam těchto vyšetření pro klinickou praxi však stoupá i u solidních nádorů.

V buňkách maligních nádorů se často vyskytují chromozomální odchylky jak počtu (ploidy), tak tvaru (struktury). Mezi strukturální aberace řadíme delecce, duplikace, inzerce a translokace. Tyto nenáhodné změny představují specifický marker nádorových buněk s významem diagnostickým i prognostickým. V místech chromozomálních zlomů a přestaveb nastává většinou změna struktury nebo genového prostředí různých genů včetně onkogenů, tumorsupresorových genů či genů zodpovědných za programovanou buněčnou smrt (apoptózu). Analýza těchto změn na úrovni DNA či RNA molekulárními technikami, může být v budoucnosti východiskem pro volbu specifické terapie s cílem navrátit tyto změny do normálu.

Cytogenetické vyšetření coby nutný předstupeň cílených vyšetření molekulárních hrálo od počátku významnou úlohu v rozvoji poznávání nádorového procesu. Vše začalo s objevem jednoduché chromozomální změny u CML, delecce 22q, popsané Nowellem a Hungerfordem v roce 1960. Tato změna se zapsala do historie nádorové cytogenetiky pod dnes již obecně známým pojmem Filadelfský chromozom (Ph¹). Přes počáteční nadšení z tohoto objevu zůstal Ph¹ chromozóm po více než 10 následujících let jedinou změnou prokázanou u nádorů. Teprve po objevu pruhovacích technik v roce 1970 Casperssonem bylo možné díky identifikaci jednotlivých chromozomů rozpoznat další nenáhodné i specifické změny. Zpočátku postupoval výzkum rychle dopředu především u leukemií a lymfomů. První prokázaná změna u solidních nádorů, delecce 22q u meningeomu, popsaná Zangem a spolupracovníky v Homburgu, rovněž zůstala po dlouhá léta jedinou objevenou změnou. Technické obtíže s in vitro kultivací buněk solidních nádorů komplikovaly až do poloviny osmdesátých let rozvoj této oblasti. Dnes, přes více než desetileté zpoždění cytogenetiky solidních nádorů za cytogenetikou hemoblastóz, je známa celá řada chromozomálních změn, charakteristických pro určité typy a podtypy solidních nádorů viz *tabulka 1*. Všechny tyto změny jsou velmi užitečné při diagnostice nádorového onemocnění, zvláště když může být klasické cytogenetické vyšetření doplněno technikami molekulární cytogenetiky (fluorescenční in situ hybridizace - FISH, mnohobarevná fluorescenční in situ hybridizace m-FISH).

Vyšetření karyotypu je založené na cytogenetickém zpracování in vitro kultivovaných živých nádorových buněk a jejich

následném obarvení pruhovacími technikami. Na preparátu jsou pak viditelná pouze jádra buněk a chromozomy v meta-fázi. Dosud nepřekonanou výhodou této techniky je, že analyzuje celý genom. Zachytí tedy všechny přítomné změny, zatímco ostatní techniky jsou již zacílené na určitou předpokládanou změnu. Nevýhodou klasické cytogenetiky je obtížné odečítání špatně rozprostřených chromozomů či karyotypů s velkým množstvím komplexních změn. Tyto nevýhody pomáhá do jisté míry překonat FISH vyšetření, které lze úspěšně provádět na interfázickém jádře buňky. Zvláště u solidních nádorů je limitujícím faktorem dostupnost vhodných sond. Další technika, m-FISH, která již vyžaduje dělicí se buňky, usnadní odečtení složitějších změn obarvením jednotlivých párů chromozomů různobarevnými sondami.

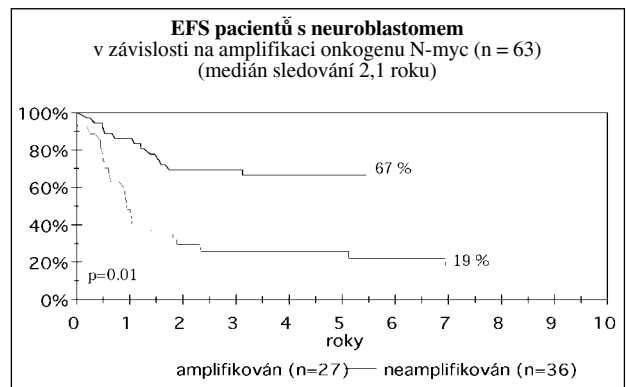
Molekulárně cytogenetická metoda komparativní genomové hybridizace (CGH) vznikla spojením klasické cytogenetiky a FISH techniky s metodami molekulární genetiky, kde se pracuje s izolovanou DNA. Její výhodou je, podobně jako u klasického karyotypování, možnost vyšetření celého genomu, ale nikdy jej nemůže nahradit. CGH prokáže sice všechny delece a amplifikace, ale povahou metody je dáno, že je zcela nepoužitelná pro balancované změny (translokace, inverze, inverze). Ve srovnání s karyotypem má vyšetření na molekulární úrovni některé výhody, ale i nedostatky. Přednosti molekulárně biologického vyšetření spatřujeme v tom, že není potřeba, na rozdíl od klasické karyologie, zachytit dělicí se buňky. Pracuje se totiž s interfázickými jádry (FISH) nebo s izolovanými nukleovými kyselinami- s DNA (PCR nebo CGH) nebo s RNA (RT PCR). K vyšetření lze dokonce někdy využít i fixovaný vzorek zalitý do parafínu. Druhou velkou výhodou těchto metod je podstatně vyšší citlivost, takže mohou odlišit i změnu, kterou lze při vyšetřování karyotypu v mikroskopu zachytit pouze obtížně. Například $t(21;22)(q22;q12)$, která se vyskytuje u asi 5 % nádorů ze skupiny Ewingova sarkomu. Tuto translokaci lze zachytit nejspolehlivěji vyšetřením FISH nebo RT PCR. V karyotypu ji lze prokázat zcela výjimečně, protože morfologické rozdíly jsou velmi malé. Rovněž lze podrobněji klasifikovat některé chromozomální aberace. Například u $t(11;22)(q24;q12)$, nejčastější aberace typická pro nádory ze skupiny Ewingova sarkomu, bylo popsáno celkem patnáct forem. Ty se liší ve zlomových místech v oblasti genů EWS na 21. chromozomu a FLI1 na 11. chromozomu. Současné údaje naznačují, že jednotlivé formy této translokace mají prognostický význam. Nelze je však odlišit v karyotypu, protože se liší pouze o desítky párů bází, ale pouze při vyšetření RT PCR.

V tomto sdělení, ve kterém se zaměříme na chromozomální aberace a mutace, přítomné v nádorových buňkách a které „zdravé“ buňky jedince s nádorem nemají, se pokusíme dokumentovat význam cytogenetického a molekulárně biologického vyšetření nádorové buňky na několika příkladech z praxe kliniky dětské onkologie.

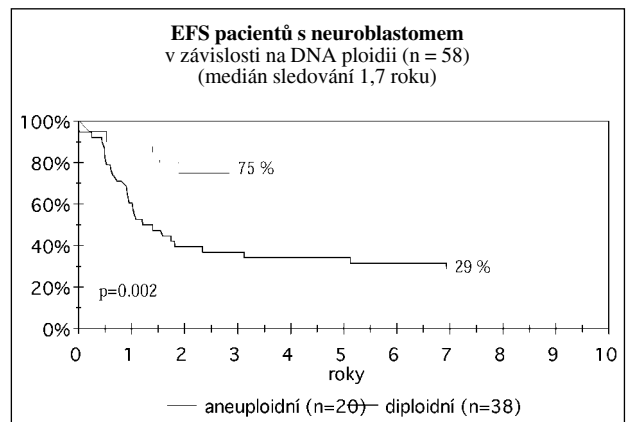
V současné době jsou vyšetření DNA ploidie průtokovým cytometrem a amplifikace genu N-myc (nejčastěji metodou FISH) u neuroblastomu významným prognostickým znakem. Tato vyšetření jsou i součástí léčebného standardu v České Republice. Podle kombinací prognostických znaků (klinické stadium, věk, histologická klasifikace, amplifikace N-myc, DNA ploidie) jsou děti s touto diagnózou řazeny do tří prognostických podskupin- nízkého, středního a vysokého rizika. Pacienti s kombinací prognosticky nepříznivých znaků jsou zařazeni do programu intenzivní chemoterapie ukončeného megachemoterapií s následnou autologní transplantací hematopoetických progenitorových buněk. Naproti tomu pacienti s nejpříznivější formou jsou mnohdy léčeni pouze extirpací nádoru.

Naše výsledky vyšetření 56 pacientů s verifikovaným neuroblastomem nebo ganglioneuroblastomem jsou ve shodě s literárními údaji o prognostickém významu DNA ploidie (cytometrická metoda) a amplifikace N-myc (vyšetřováno FISH) (viz obrázky 1 a 2).

Obrázek 1. Přežití pacientů s neuroblastomem v závislosti na amplifikaci genu N-myc.



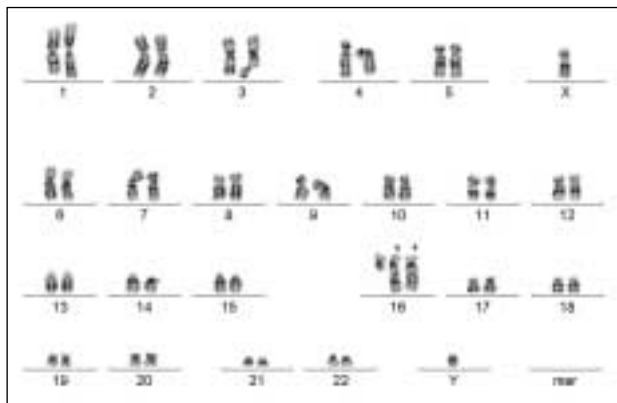
Obrázek 2. Přežití pacientů s neuroblastomem v závislosti na DNA ploidii.



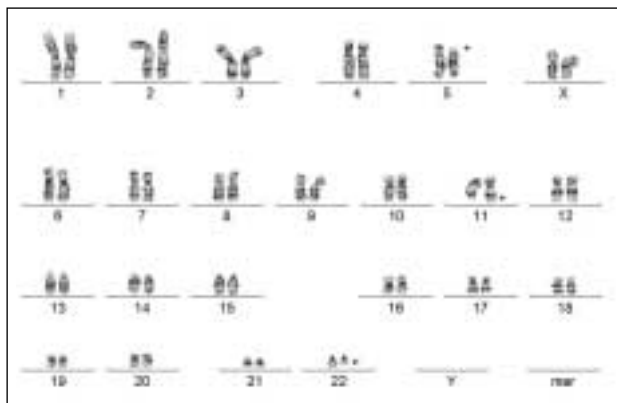
Skupinu nádorů rodiny Ewingova sarkomu tvoří agresivní nádory kostí nebo měkkých tkání zahrnující vlastní Ewingův sarkom, periferní primitivní neuroektodermální nádor -pNET a jejich atypické varianty. Tyto nádory mají morfologický obraz „nádorů z malých kulatých buněk“. Velmi podobným morfologickým obrazem se prezentují rhabdomyosarkomy, neuroblastom nebo non-Hodgkinské lymfomy. Protože je léčba každého z nich odlišná, je určení správné diagnózy zásadní pro další léčebný postup. V současné době vyšetření imunohistochemické, elektronmikroskopické, cytogenetické a molekulárně biologické umožňují přesnou diagnostiku, navíc pomáhají prokázat prognosticky významné faktory a odhalit znaky vhodné k detekci minimální nádorové nemoci. Nádory rodiny Ewingova sarkomu jsou charakterizovány přítomností specifických chromozomálních aberací zahrnujících gen EWS na 22. chromozomu. Byly identifikovány chromozomální translokace (viz tabulka 2), které jsou specifické pro Ewingovy sarkomy. Na molekulární úrovni vedou tyto translokace k přestavbám mezi geny ETS rodiny transkripčních faktorů a genem EWS na 22. chromozomu. Výsledkem je nový gen, jehož prepisem vzniká protein s funkcí transkripčního faktoru, odpovědný za maligní transformaci buňky.

Obě hlavní translokace $t(11;22)$ a $t(21;22)$ jsou nalézány u více než 95% nádorů skupiny Ewingových sarkomů, ostatní typy jsou vzácné. Na klinice dětské onkologie jsme k průkazu buněk Ewingových sarkomů zavedli metodu dvoukolové RT-PCR k detekci obou hlavních chromozomálních aberací- $t(11;22)(q24;q12)$ a $t(21;22)(q22;q12)$. Citlivost RT-PCR pro detekci buněk Ewingových tumorů přítomných v kostní dřevě jsme ověřovali pomocí dilučních pokusů (buňky linie Ewingova sarkomu ředěné normálními leukocyty). V naší modifikaci jsme dosáhli citlivosti 1 nádorová buňka na 10^5-10^6 .

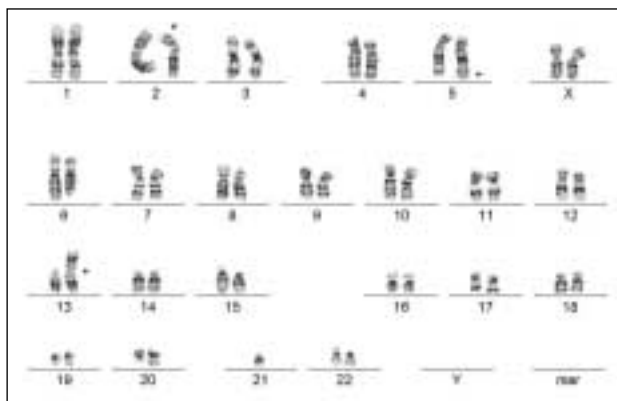
Obrázek 3. Karyotyp 47, XY, - 16, der(16)t(1;16)(q24;q23)x 2 zjištěný u chlapce s pPNETem levé lopatka s metastázami do plic a nadklíčkových uzlin. Chlapec zemřel na progresi základního onemocnění jeden rok po stanovení diagnózy. Nebalancovaná translokace t(1;16), která byla přítomna dvakrát v každé mitoze je příkladem sekundární změny, která je známkou nepříznivé prognózy.



Obrázek 4. Karyotyp 46, XX, del(5p), t(11;22)(q24;q12) zjištěný u dívky s velmi vzácnou lokalizací pPNETu v ledvině.

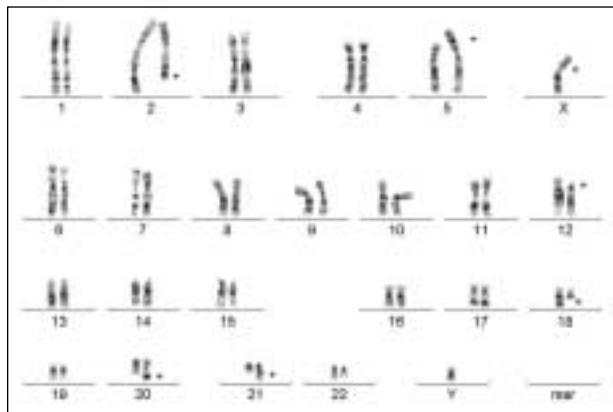


Obrázek 5. Karyotyp 46, XX,t(2;5)(q24-32;p13-14), -13,t(13;13)(cen:cen), -21 zjištěný u dívky s anaplastickým Ki-1 pozitivním velkobuněčným anaplastickým lymfomem. Průkaz typické translokace t(2;5) v malé populaci nádorových buněk v kostní dřeni přispěl ke správné diferenciální diagnóze.

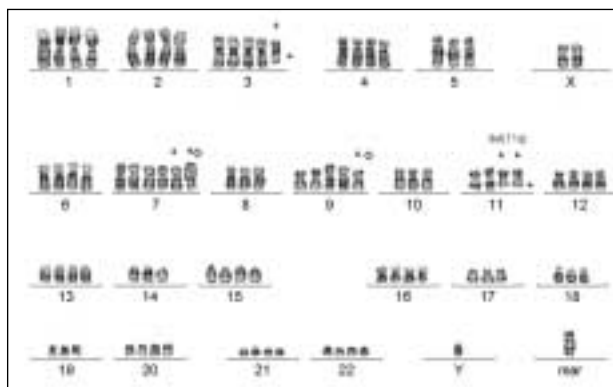


Celkem jsme na Klinice dětské onkologie vyšetřili vzorky histologicky ověřených nádorů rodiny Ewingova sarkomu od 29 pacientů. Dvakrát se jednalo o metastázy, ostatní byly získány biopsií primárního nádoru v době stanovení diagnózy, případně v době zachycení recidivy. Translokaci t(11;22) jsme prokázali ve 23 vzorcích, t(21;22) ve čtyřech. Dvakrát jsme chimerický fúzní transkript neprokázali, přestože patologické vyšetření tkáně potvrdilo přítomnost vitálních buněk nádoru ze skupiny Ewingova sarkomu. V těchto dvou vzor-

Obrázek 6. Karyotyp 46, XY, t(2;5)(q24-32;p13-14), t(12;20)(p11;q13), t(X;18;21) (p11.2;q11.2;q11.2) jako příklad vedle translokace diagnostické pro synovialosarkom. Kromě této translokace byla u tohoto pacienta přítomna ještě řada aberací. Translokace (X;18) v sobě atypicky zahrnovala chromozom 21.



Obrázek 7. Delece 11q. Delece různě dlouhého úseku 11q byla označena za změnu charakterizující skupinu pacientů s nefznívným průběhem i když se u této podskupiny nevyskytuje amplifikace N-myc.



cích nebylo úspěšné ani cytogenetické vyšetření, protože se nezdánilo získat hodnotitelné mitózy. Vysvětlení tohoto jevu je možné dvojím způsobem, buď byl přítomen jiný typ translokace, kterou námi použitá metodika neumožňuje detekovat (vzácné translokace t(2;22), t(7;22) nebo t(17;22)), nebo předchozí léčba způsobila neurální diferenciaci nádoru a podmínila absenci detekovatelného fúzního transkriptu EWS/ETS. Druhá možnost přichází v úvahu pouze u pacientky č. 13, protože u ní jsme vyšetřovali vzorek po chemoterapii. Porovnání výsledků karyotypu a vyšetření RT PCR je v tabulce č. 3. Je patrné, že RT PCR je citlivější, ale nezachytí ostatní změny, které mohou mít například prognostický význam.

Přídavné (sekundární) chromozomální změny u Ewingova sarkomu jsou v současnosti předmětem intenzivního výzkumu. Názory na jejich prognostický význam nejsou jednotné. Předpokládá se, že některé změny mohou upozorňovat na onemocnění rezistentní vůči terapii s rizikem progresu či recidivy. Řada pracovišť začala upřednostňovat pro vyšetřování typických translokací molekulární techniky hlavně RT PCR pro její vyšší citlivost. Nyní se však ukazuje, že sekundární změny počtu chromozomů, především nadbytečný chromozom č. 8 a 12, by mohly hrát důležitou úlohu v odhadu prognózy. Je tedy nutné pokračovat ve vyšetřování karyotypů klasickou cytogenetickou metodou, protože je možné, že i další sekundární změny se ukáží být důležité. Pro sledování +8 a +12, které se zdají významné pro prognózu nádorů ze skupiny Ewingova sarkomu, lze využít techniku FISH, která se obejde bez dělicích se buněk. Vzhledem k nízké četnosti výsky-

Tabulka 1. Přehled některých diagnosticky a prognosticky významných chromozomálních aberací typických pro zhoubné nádory dětského věku.

Nádor	Podtyp	Cytogenetická změna	Molekulární přestavba	Prognóza
neuroblastom		3n del(1p), 2n/4n HSR, DM's +17q del(11q)	ampl N-myc	dobrá střední špatná špatná
rabdomyosarkom	alveolární embryonální	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14) hyperdiploidie +2, 7, +11, +12, +13, +19, +20	PAX3/FKHR PAX7/FKHR LOH 11p	špatná špatná dobrá
skupina Ewingova sarkomu		translokace viz. tab 2 + 8, +12, der(16), t(1;16)		progrese
Meduloblastom		i(17q)		
Rabdoidní nádor mozku		monozomie 22		
Germinální		i(12p), add (12p)		
Anaplastický velkobuněčný lymfom		t(2;5)(p23;q35) t(1;2)(q21;p23) t(2;3)(p23;q21) kryptická inv (2)	ALK/NPM	
Synoviosarkom		t(X;18) (p11.2;q11.2)	SYT/SSX	

Tabulka 2. Přehled hlavních translokací nacházených u nádorů z rodiny Ewingova sarkomu.

translokace	chimerický fúzní gen	četnost ve skupině ES
t(11;22)(q24;q12)	EWS/FLI-1	85%
t(21;22)(q22;q12)	EWS/ERG	10%
t(17;22)(q12;q12)	EWS/E1AF	< 2 %
t(7;22)(p22;q12)	EWS/ETV-1	< 2%
t(2;22)(q33;q12)	EWS/FEV	ojedinele
komplexní translokace postihující 11q24 a 22q12	EWS/FLI-1	< 1 %

Tabulka 3. Srovnání RT PCR (průkaz t(11;22) a t(21;22)) a cytogenetického vyšetření.

*viz. tabulka 4, **pravděpodobně hodnoceny fibroblasty a ne nádorové buňky, # vyšetření KD (cytologickým vyšetřením zjištěna 80 % infiltrace KD obou lopat kostí kyčelních)

Pac. číslo*	RT-PCR	Cytogenetické vyšetření
14	EWS/FLI-1	46,XX, t(11;22)(q24;q12)
15	EWS/FLI-1	47,XX, t(11;22)(q24;q12),+8
19	EWS/FLI-1	47,XY, t(11;22)(q24;q12),+12
21	EWS/FLI-1	46,XY, t(11;22)(q24;q12)
17	EWS/FLI-1	46,XX, t(11;22)(q24;q12), der 5p
3	EWS/FLI-1	46,XY, t(11;22)(q24;q12)
25	EWS/FLI-1	48,XY, t(11;22)(q24;q12),+2 (?),+8
27	EWS/FLI-1	46,XY, t(11;22)(q24;q12)
24	EWS/FLI-1	48-51, XX, změny 1q a 1p, +7, -9, izo 9q, add(11p), add(22q), + M=?9p #
22	EWS/FLI-1	46, XY**
1	EWS/ERG	1x46,XX,+21, 2xM,1x54,XX,+5,?,+5,+4,+6,-9,+15,+20,+21,+21,-22,+2xM1
7	EWS/ERG	47,XY,der(16),t(1;16)(q12;q24)

tu Ewingova sarkomu je nutná spolupráce mezi jednotlivými centry, aby se na větších souborech pacientů prokázal klinický význam sekundárních změn. U další sekundární změny, nebalancované translokace (1;16), se předpokládá negativní vliv na přežití pacientů. Ve většině studií se uvádí, že se vyskytuje u pacientů s metastázami nebo s časným relapsem. Tato změna není vysloveně specifická pro Ewingův sarkom, častá je i u neuroblastomu, retinoblastomu, nádorů mléčné žlázy či u mnohočetných myelomů. S největší pravděpodobností představuje obecněji platný marker nádorové progresy. Její odhalení v karyotypu nádorových buněk pacienta může být v budoucnu důvodem pro intenzifikaci terapie. Rovněž polyploidie (zmožení chromozomů) je u řady, i když ne u všech nádorů, označována za indikátor horší prognózy. Také mnohočetné změny karyotypu nádorových buněk jsou považovány za prognosticky nepříznivé (obr. 3).

Přehled výsledků pátrání po minimální nádorové infiltraci u pacientů s nádorem ze skupiny Ewingova sarkomu v době stanovení diagnózy uvádí *tabulka 4*. Interpretace pozitivních nálezu nádorových buněk citlivými molekulárně biologickými technikami není u solidních nádorů dosud jednoznačná. Zatím se nedoporučuje, pouze na základě průkazu minimální infiltrace kostní dřene například metodou RT-PCR, použít intenzivnější terapie ani změnit klinické stadium. Význam průkazu infiltrace molekulárně biologickými metodami musí ozřejmit multicentrické prospektivní studie. V ČR je od letošního roku používán protokol EuroEwing 99 Evropské skupiny pro dětskou onkologii (SIOP). Tento protokol průkaz infiltrace kostní dřene metodou RT-PCR v době stanovení diagnózy nepovažuje za kritérium pro intenzifikaci terapie. Teprve nález nádorových buněk při cytologickém vyšetření řadí pacienta do skupiny nejvyššího rizika. Součástí tohoto protokolu je však průkaz minimální nádorové infiltrace kostní dřene metodou RT PCR a plánuje se vyhodnocení jejího prognostického významu.

Za významnou považujeme přítomnost nádorových buněk ve štěpech hematopoetických buněk k autologní transplantaci u pacientů s rizikovými nádory u kterých je zafazena megachemoterapie a autologní transplantace hematopoetických progenitorových buněk. Reinfuze klonogenních nádorových buněk pacientovi se štěpem je rizikem tohoto typu léčby. Sami vyšetřujeme všechny štěpy našich pacientů s Ewingovými sarkomy, ale ani citlivost námi použité metody ($1 : 10^{5-6}$) nemusí být postačující k detekci všech kontaminovaných štěpů. Výsledky vyšetření štěpů i kostních dřene v době stanovení diagnózy podává *tabulka 5*. Je patrné, že v současnosti používanými léčebnými protokoly lze dosáhnout u většiny pacientů úspěšného „in vivo purgingu“. U sedmi pacientů s přítomností nádorových buněk v kostní dřeni detekovanou RT PCR byl štěp periferních hematopoetických buněk kontaminován pouze dvakrát.

Raritní byla kasuistika devítileté dívky s pPNETem ledviny, které jsme diagnózu potvrdili jak cytogenetickým vyšetřením (karyotyp 46, XX, del(5p), t(11;22)(q24;q12)) *obr. 4* tak i průkazem t(11;22)(q24;q12) pomocí RT PCR. Nádorů ze skupiny Ewingova sarkomu postihujících ledvinu je v literatuře dosud popsáno asi dvacet, menšina z nich měla provedené cytogenetické nebo molekulárně biologické vyšetření. Jako první jsme prokázali infiltraci kostní dřene metodou RT PCR.

Naše předběžné výsledky se zavedením stratifikované léčby meduloblastomu, kdy u pacientů vysokého rizika užíváme intenzivnější terapii, se zdají nadějně. Za vysoce rizikové považujeme pacienty s pooperačním reziduem a/nebo prokázanou amplifikací genu c-myc v nádorových buňkách.

Na těchto příkladech prokazujeme zásadní prognostický význam molekulárně biologického vyšetření u neuroblastomu a pro potvrzení diagnózy i určení rozsahu onemocnění u Ewingova sarkomu. Cytogenetické vyšetření má v současnosti význam při odhalování dosud nepopsaných změn u solidních nádorů. Je take prospěšné ve všech situacích, kdy není z různých

Tabulka 4. Údaje o pacientech vyšetřených metodou RT-PCR na přítomnost nádorových buněk v KD v době stanovení diagnózy - pouze u jedné pacientky (č. 24) jsme zachytili nádorové buňky při cytomorfoloickém a cytogenetickém vyšetření buněk aspirátu kostní dřeně (vyšetřen vždy stejný vzorek KD).

EET - extraosální ES (z měkkých tkání), B - meta do skeletu, L - meta do plic, BM - meta do kostní dřeně LN - meta do lymfatických uzlin, CR 1. - 1. kompletní remise, ter- pacient je dosud léčen, * pacient ztracen z evidence

Pac. číslo	Věk / Pohlaví	Histologie	Lokalizace prim. tu.	Metastázy	RT-PCR (KD)		Přežití	
					Vzorků	MRD +	stav	měsíce
1	12/F	ES/PNET	hrudní stěna	reg. LN	1	0	CR 1	24
2	6/M	ES	k.lýtková	ne	2	2	CR 1	13
3	2/M	ES	k.lýtková	ne	2	0	CR 1	*
4	15/M	ES	k.pažní	ne	2	1	CR 1	13
5	9/M	ES	k.stehenní	ne	2	0	CR 1	11
6	12/F	PNET	EET - hlava	ne	2	0	CR 1	23
7	22/M	PNET	EET -obl. lopatky	L, B	3	2	+	12
8	12/F	ES	k.stehenní	ne	2	0	+	11
9	14/F	ES	pánev	ne	1	0	CR 1	28
10	12/F	PNET	L3-S1	L	2	0	+	1
11	10/F	ES	k.stehenní	ne	2	1	DP	27
12	15/F	ES	k.lýtková	L	2	2	CR 1	11
13	15/F	ES	EET - krk	L	2	*0	+	7
14	14/F	ES	pánev	ne	1	0	+	11
15	13/F	ES	pánev	ne	1	0	CR 1	23
16	16/F	ES	k.křížová	ne	1	0	+	7
17	9/F	PNET	ledvina	ne	2	2	+	5
18	9/F	ES	k.stehenní	ne	2	1	CR 1	12
19	15/M	ES	k.stydká	L, B	2	0	+	20
20	15/M	ES	k.pažní	reg. LN	2	1	CR 1	15
21	17/M	ES	k.stehenní	ne	2	0	CR 1	13
22	15/M	ES	k.holenní	ne	2	0	CR 1	26
23	16/M	ES	k.lýtková	ne	2	0	ter.	3
24	15/F	ES/PNET	pánev	L, B, BM	2	2	ter.	1
25	15/M	PNET	hrudní stěna	ne	2	0	ter	2
26	15/F	ES	pánev	ne	2	*0	ter.	5
27	6/M	ES	páteř L5- S2	ne	2	0	ter	6
28	15/M	ES	patní kost	ne	2	1	ter	6

ných důvodů dostupné vyšetření molekulární. Za pětileté období existence cytogenetické laboratoře Kliniky dětské onkologie byla mnohokrát ověřena užitečnost takového vyšetření u málo diferencovaných nádorů z malých tmavých buněk, kde může být histopatologická diagnostika obtížná. Mezi příklady, kde cytogenetické vyšetření přispělo k určení správné diagnózy, lze jmenovat t(2,5) u anaplastického velkobuněčného lymfomu, v době, kdy ještě nebylo zavedené vyšetření této translokace metodou FISH nebo t(X,18) u málo diferencovaného synovialosarkomu (*obr. 5, obr. 6*).

Cytogenetické vyšetření je rovněž využíváno jako referenční technika při zavádění citlivějších metod molekulárních, jak ukazuje výše uvedený příklad u Ewingova sarkomu. Dále je cytogenetika užitečná při hledání nových prognostických značek. Například u neuroblastomů jsou v posledních letech sledovány dva nové nezávislé indikátory negativní prognózy.

Podle některých studií je jejich předpovědní hodnota dokonce vyšší než amplifikace N-myc. Jsou to nadbytečný segment 17q21-qter, translokovaný většinou na některý další chromozóm a delece 11q. Relativně nedávno byla delece 11q u neuroblastomů bez N-myc amplifikace a delece 1p označena za změnu charakterizující podskupinu se zásadně odlišnou biologickou povahou. Nádory z této podskupiny mají sklon k agresivnímu metastatickému růstu, ačkoli není amplifikován N-myc (*obr. 7*). Častým indikátorem negativní prognózy jsou změny na krátkých i dlouhých raménkách prvního chromozómu. Tyto změny nejsou přímo závislé na typu nádoru, byly popsány i u leukemií a lymfomů. Jsou považovány obecně za známku klonální evoluce či progresu.

Naše výsledky potvrzují význam cytogenetického vyšetření na chromozomální i molekulární úrovni u dětských solidních nádorů. Toto vyšetření by mělo tvořit integrální součást péče

Tabulka 5. Vyšetření štěpů PBSC pacientů s nádory skupiny ES/PNET (LR- low risk group, nádory menšího rozsahu bez generalizace, IM - intermediate risk group, rozsáhlé nádory v nepříznivé lokalizaci -pánev, hrudní stěna , HR - high risk group - generalizovaná onemocnění) * vstupní infiltrace kostní dřeně vyšetřovaná metodou PCR, nd- nevyšetřeno

Pac. číslo	Věk / pohlaví	Histologie	Lokalizace prim. tu./ meta	Risk gr.	MRD dřevě*	MRD štěp	AHSCT	Přežití stav	přežití (m.)
1	12/F	ES/PNET	hrudní stěna/reg. LU	IM	ne	ne	ano (2)	CR 1	24
2	9/M	ES	pánev/ne	IM	n.d.	ne	ano	CR 1	
3	22/M	PNET	EET -obl. lopatky/skelet, plíce	HR	ano	ano	ne progrese	+	12
4	14/F	ES	pánev/ne	IM	ne	ne	ano	CR 1	28
5	10/F	ES	k.stehenní/ne	IM	ano	ne	ano	DP	27
6	15/F	ES	k.lýtková/plíce	HR	ano	ne	ano (2)	CR 1	11
7	14/F	ES	pánev/ne	IM	ne	ne	ano	+	11 TRD
8	13/F	ES	pánev/ne	IM	ne	ne	ano	CR 1	23
9	9/F	PNET	ledvina/ne	IM	ano	ne	ne , + léčebné komplikace	+	5
10	17/M	ES	k.stehenní/skelet	HR	ano	ano	ano - štěp vyšetřen po transplantaci, odběr na jiném pracovišti	DP (+)	ztracen
11	16/M	ES	pánev/ne	IM	nd	ne	ano		Ztracen
12	15/M	ES	k.pažní/LU	HR	ano	ano	ano - nový odběr PBSC negativní - podán	CR 1	15
13	10/M	ES - relaps	Stehenní k./plíce	HR	nd.	ne	ano- dvojité transplantace	DP/ 2.PR	
14	6/M	ES	L S/ne	IM	ne	ne	plánujeme 2/ 2002	ter.	/
15	15/F	ES	pánev/ne	IM	ne	ne	plánujeme 3- 4/ 2002	ter.	/
16	16/M	ES	lýtková kost/ne	LR	ne	ne	neplánujeme	ter.	/
17	15/F	ES	patní kost/ ne	LR	ano	ne	neplánujeme	ter.	/

o pacienty s nádorovým onemocněním. Nemělo by být opomíjeno při odběru tkáně na operačním sále pro rutinní histopatologické vyšetření. Je třeba myslet na nezbytnost odběru vitální tkáně. Ideální je kombinace základního cytogenetického vyšetření se všemi v současnosti dostupnými molekulárními technikami, neboť každá má své přednosti. Pro správnou

interpretaci těchto vyšetření je nezbytná těsná spolupráce i vzájemná informovanost mezi klinickým lékařem, patologem i pracovníky v specializovaných laboratořích.

Práce vznikla za podpory GAČR, grant č. 301/001394 a MŠMT výzkumné záměry č.111300005.