

VYDÁVÁ
ČESKÁ
LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
J. E. PURKYNĚ

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

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

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

Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce

F 5158 Mič 46-772
ISSN 0862-495 X

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

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLEČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO
REDAKTORA: KOZA IVAN
VŽKONNŹ REDAKTOR: FAIT VUK

REDAKTOŘI:

BEDNAŘÍK OTAKAR	SHEARD MICHAEL
MAYER JIŘÍ	KOCÁK IVO
ČOUPEK PETR	ŽALOUĐÍK JAN

REDAKČNÍ RADA

ADAM ZDENĚK, Brno	KOZA IVAN, Bratislava
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava	LAGINOVÁ VIERA, Bratislava
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno	MAYER JIŘÍ, Brno
BEŠKA FRANTIŠEK, Ostrava	MECHL ZDENĚK, Brno
BILDER JOSEF, Brno	NĚMEC JAROSLAV, Brno
ČOUPEK PETR, Brno	ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
DRBAL JOSEF, Brno	PAČOVSKŹ ZDENĚK, Brno
ECKHARDT SANDOR, Budapešć	PLEŠKO IVAN, Bratislava
FAIT VUK, Brno	PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
JURGA LUDOVIT, Trnava	REJTHAR ALEŠ, Brno
KALLAY JOZEF, Bratislava	SIRACKŹ JÁN, Bratislava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava	SPURNŹ VLADIMÍR, Brno
KLASTERSKŹ JAN, Brusel	UJHÁZY VILIAM, Bratislava
KLENER PAVEL, Praha	VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
KOCÁK IVO, Brno	VYZULA ROSTISLAV, Brno
KOUTECKŹ JOSEF, Praha	WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
KOVAŘÍK JAN, Brno	ŽALOUĐÍK JAN, Brno

Přehled

Vodvářka P. Nádorová hypoxie a vliv podpůrné léčby erythropoetinem na výsledky protinádorové léčby	39
Fišerová A., Hájek R., Doubek M., Buliková A., Bourková L., Banovská A., Vidláková P., Tůzová E., Mareschová I., Vorlíček J., Penka M. Imunomagnetická separace myelomových buněk	46

Původní práce

Šimíčková M., Pecen L., Nekulová M., Vagundová M., Vermousek I., Valík D., Vondráček V., Pačovský Z., Černocho M. Aktivita telomerázy ve tkáni benigních a maligních nádorů prsu	51
Kolek V., Grygárková I., Hajdúch M., Chmelařová A., Trojanec R., Klein J., Neoral Č., Heřman M., Král V., Míhál V. Neoadjuvantní chemoterapie u hraničně operabilních stádií IIIA nemalobuněčného karcinomu plic kombinací vinorelbin a karboplatina. Následná cílená pooperační adjuvantní chemoterapie	55
Tačev T., Ptáčková B., Strnad V., Koukalová H., Kryštof V., Rašovská O. Význam california-252 pro zlepšení radiokurability rakoviny hrdla děložního - dlouhodobé léčebné výsledky	59

Kazuistika

Gumančík J., Plank L., Doležel L., Hamžík J. Primární mediastinální veškbunkový B-lymfóm: Klinicko-patologická analýza 6 případů	65
---	----

Sdělení

Skovajsová M. Jednotky integrované mammární diagnostiky (JIMD). Návrh koncepce	70
---	----

Zprávy

Marková J. Jak dál v léčbě Hodgkinovy choroby? Zpráva ze studijní skupiny Hodgkinovy choroby v Koříně nad Rýnem a v San Francisku	73
Šeneklová Z., Šlampa P. Zpráva ze zasedání Českých a Slovenských radioterapeutů	74

Informace

– Knihy	50, 58, 69
– Rozloučení s MUDr. Zdeňkem Chodounským	75
– Cena ligy proti rakovině	75

Onkologické společnosti	76
--------------------------------	----

CONTENT**Reviews**

Vodvářka P. Tumor Hypoxia and an Impact of Supportive Care by Erythropoietin on Cancer Treatment Results	39
Fišerová A., Hájek R., Doubek M., Buliková A., Bourková L., Banovská A., Vidláková P., Tůzová E., Mareschová I., Vorlíček J., Penka M. Immunomagnetic Separation of Myeloma Cells	46

Original publication

Šimíčková M., Pecen L., Nekulová M., Vagundová M., Vermousek I., Valík D., Vondráček V., Pačovský Z., Černocho M. Telomerase Activity in Benign and Malignant Breast Tumors	51
Kolek V., Grygárková I., Hajdúch M., Chmelařová A., Trojanec R., Klein J., Neoral Č., Heřman M., Král V., Míhál V. Neoadjuvant Chemotherapy by Vinorelbin and Carboplatin in Marginally Resectable Stage IIIA of Nonsmall Cell Lung Cancer – Followed by Selective Adjuvant Chemotherapy after Surgery	55
Tačev T., Ptáčková B., Strnad V., Koukalová H., Kryštof V., Rašovská O. Importance of Californium – 252 for a Better Radio-Curability of Carcinoma of the Cervix Uteri: Long– Time Treatment Results Presented	59

Case Report

Gumančík J., Plank L., Doležel L., Hamžík J. Primary Mediastinal Large B – Cell Lymphoma: Clinico – Pathological Analysis of 6 Cases	65
---	----

Notification

Skovajsová M. Integrated Breast Diagnostic Units – Conception Suggestion	70
---	----

Report

Marková J. What to do Further in the Treatment of Hodgkin's Disease?	73
Šeneklová Z., Šlampa P. Czech and Slovak Radiotherapeutic Session Report	74

Information

– book	50, 58, 69
--------	------------

Oncological Societies	76
------------------------------	----

NADOROVA HYPOXIE A VLIV PODPURNÉ LÉEBY ERYTROPOETINEM NA VÝSLEDKY PROTINADOROVÉ LÉEBY

TUMOR HYPOXIA AND AN IMPACT OF SUPPORTIVE CARE BY ERYTHROPOIETIN ON CANCER TREATMENT RESULTS

VODVAŘKA P.

RADIOTERAPEUTICKA KLINIKA FNSP OSTRAVA

Souhrn: Výskyt hypoxických oblastí ve tkáních zhoubných nádorů je jejich obvyklou vlastností. Hypoxie - snížení parciálního tlaku kyslíku - je způsobeno větší vzdáleností některých oblastí nádoru od nově vytvořených kapilár a nedostatečností nově vytvořené kapilární sítě. K hypoxii přispívá častý výskyt anémie u nemocných se zhoubnými nádory. Nedostatek kyslíku během ozáření a těsně po jeho ukončení a snad i během podávání některých cytostatik vede ke zvýšení rezistence nádorové tkáně k uvedeným léčebným metodám. Hypoxie v nádoru vede rámcově ke třem skupinám nežádoucích jevů: 1) k tvorbě proteinů závislých na hladině kyslíku (oxygen related proteins), které usnadňují metastázování nádoru, 2) ke genetické nestabilitě a tím selekci buněk s agresivnějším chováním, což se projeví na větší agresivitě celého nádoru a 3) k angiogenezi, která umožňuje progresi nádoru. V současné době jsou k dispozici výsledky studií ukazující, že korekce anemie erythropoetinem vede ke zlepšení výsledků léčby radioterapií jak v experimentech na zvířatech tak ke zlepšení odpovědi na léčbu chemo-radioterapií u nemocných s nádory hlavy a krku. V přehledu jsou uvedeny údaje o důležitých souvislostech výskytu hypoxie, anémie, chování nádoru, vlivu hypoxie na léčbu a možnosti korekce tohoto stavu erythropoetinem. Podávání erythropoetinu jako léčby podpurné u nemocných s anemií vede při současné konzervativní onkologické léčbě ke statisticky významnému zlepšení výsledků onkologické léčby.

Klíčová slova: hypoxie, anémie, radioterapie, chemoterapie, erythropoetin

Summary: Hypoxic regions are regular finding in tissue of malignant tumors. Hypoxia -decrease of partial pressure of oxygen - is caused by longer distance of some tumor regions from newly created capillars and by insufficiency of newly created capillar network. Various kinds of anaemia in cancer patients potentiate hypoxia in those tumors. Lack of oxygen during radiotherapy and immediately after it and during administration of certain cytostatics causes increase of resistancy of cancer tissues to the treatment methods. Hypoxia in cancer causes three groups of events: 1) production of oxygen related proteins enhances a process of tumor metastazing, 2) genetic instability and selection of more aggressive tumorous cells and more aggressive behaviour of the tumor and 3) angiogenesis which enhances a tumor progression. Results of studies performed recently have shown anaemia correction by erythropoietin could improve results of radiation therapy and chemotherapy carried in both animal and human studies on head and neck cancer patients. In the review there are data given on important associations of incidence of hypoxia, anaemia, tumor behaviour, influence of hypoxia on the cancer treatment and an occassion of correction of the status by erythropoietin. Administration of erythropoietin as a supportive care in patients with anaemia during conservative oncological treatment improves results of the treatment significantly.

Key words: hypoxia, anaemia, radiotherapy, chemotherapy, erythropoietin

Přítomnost hypoxických oblastí ve tkáni solidních nádorů, tj. oblastí s nízkou hladinou kyslíku / O₂ / je jejich charakteristickou patofyziologickou vlastností, která byla prokázána u řady experimentálních i klinicky se vyskytujících zhoubných nádorů. Poprvé prokázal existenci hypoxických okrsků v nádorové tkáni Thomlinson v roce 1955(49). Thomlinson studoval histologické preparáty z bronchogenního karcinomu a zjistil, že skupiny nádorových buněk rostou v solidních provazcích, které jsou obklopeny vazivově cévním stromatem, z něhož jsou buňky nádoru vyživovány, a z něhož tedy také dostávají potřebný kyslík. Když se nádor dále postupně zvětšuje, objevují se v něm nekrotické okrsky, které jsou lokalizovány v centrech provazců ve vzdálenosti 100µm - 180µm od cév, což odpovídalo teoretickým výpočtům dosahu difúze kyslíku v respirující tkáni. Thomlinson došel k názoru, že kyslík difundující z cév je přednostně konzumován bližšími buňkami a že za vzdáleností, do níž může kyslík difundovat,

nejsou buňky schopny přežít a podléhají nekróze.

V roce 1968 publikoval Tannock názor, že skutečností odpovídá obrácený Thomlinsonův obrázek, tedy že i s ohledem na neoangiogenesu je v centru céva, která je obklopena nádorovými buňkami(47). V určité vzdálenosti od cévy dochází k nekrotickým nádorových buněk, protože výsledné zásobení nestačí potřebám rychlého růstu nádorových buněk. Již v roce 1953 publikovali Gray et al., že odpověď buněk na ozáření ionizujícím záření velmi významně na kyslíku (18). Totéž zjistili Wright et al.(58). Křivky přežití savčích buněk v suspenzi ozářených za normálních podmínek se lišily od křivek přežití stejných druhů buněk ozářených po 30minutovém ovlivnění plynným dusíkem. V normálních podmínkách oxygenace bylo přežití nižší, poměr dávek při dosažení stejného přežití buněk (tedy dosažení stejného biologického účinku, nebo endpointu) se pro danou buněčnou populaci nemění a lze jej vyjádřit jako OER (oxygen

enhancement ratio), který je pro většinu savčích buněk ozářených paprsky X roven 3,0. Později bylo zjištěno, že se OER při dávkách nižších než 3,0Gy snižuje. Tento nálezn byl důležitý, protože se týká oblasti dávek používaných v klinické praxi. Kyslík však musí být přítomen během ozáření, anebo v době několika milisekund ihned po ozáření (27,36).

Pro anoxické podmínky se OER rovná jedné. Při zvyšování parciálního tlaku kyslíku pO_2 , se OER (tedy radiosenzitivita) prudce zvyšuje. Rychlé zvýšení hodnoty OER lze zjistit při zvýšení pO_2 od 0 mmHg do 20 mmHg, při pO_2 vyšším až do normálního pO_2 v normálním vzduchu - $pO_2 = 155$ mmHg, anebo ozáření v kyslíku za normálního atmosférického tlaku 760 mmHg se již OER zvyšuje jen mírně.

Mechanismus účinku kyslíku ve tkáních ozářených nepřímo ionizujícími druhy záření (γ -paprsky izotopu ^{60}Co a ^{137}Cs , rtg -záření, brzdné záření lineárních urychlovačů) se vysvětluje kyslík-fixační teorií. Jakmile se dávka záření absorbuje ve tkáni, vznikají volné radikály, které jsou velmi reaktivní. Narušují chemické vazby důležitých molekul tkáně a působí tím změny chemické, čímž zahajují řetězec dalších událostí, které ústí do změn, jejichž výsledkem je biologické poškození tkáně (v radioterapii důvod, proč se záření užívá). Volné radikály působí dvojným způsobem - přímým, když jsou přímo poškozeny cílové molekuly (elektronem z jaderného obalu uvolněného energií fotonu dodaného ozařováním, anebo nepřímým, když je poškození molekul způsobeno právě reakcí volných radikálů vznikajících ve vodě, protože v savčích buňkách je obsaženo 70% - 80% vody. Volné radikály, označované jako R^* reagují za přítomnosti kyslíku tak, že vzniká RO_2^* , který dále reaguje a dává vzniku $ROOH$ v cílové molekule. Tím vzniká chemické poškození, které se fixuje v cílové molekule. Není-li ve tkáni kyslík, pak dochází rychle k redukci R^* na RH a tím vzniká původní sloučenina, z níž volný radikál vznikl.

Výsledná oxygenace tkáně je dána několika faktory:

- Parciálním tlakem kyslíku
- Možnostmi saturace nosiče kyslíku (koncentrace hemoglobinu, počet erytrocytů, kvalita hemoglobinu)
- Hustotou krevních kapilár ve tkáni (vzdálenostmi buněk od zásobujících cév)
- Krevním tlakem v cévách

Dostupnost kyslíku pro tkáň (normální i nádorovou) je dána třemi faktory: obsahem kyslíku v mikrocirkulaci, difúzním tlakem a nutriční perfúzí. Výsledná oxygenace je dána poměrem mezi dostupností a spotřebou kyslíku ve tkáni.

Oxygenace lidských nádorů

Přítomnost hypoxických oblastí v nádorech lidí je charakteristickou patofyziologickou vlastností solidních nádorů. Existence hypoxických oblastí ve tkáni je výsledkem nepochybně mezi zásobením a spotřebou kyslíku. V normálních tkáních je požadavek spotřeby O_2 splněn jeho dodávkou. U solidních nádorů může požadavek spotřeby O_2 převážit nad možnostmi jeho dodávky a výsledkem je vznik hypoxických oblastí s nízkou hladinou O_2 . Vaupel et al. udávají následující hlavní patogenetické mechanismy hypoxie ve zhoubných nádorech(52):

- plicní hypoxie
 - primární plicní nádory
 - metastázy na plicích
- hypoxie z omezené difúze
 - zvětšení vzdáleností mezi cévami
 - chaotická mikrocirkulace
- cirkulační hypoxie
 - ischemie
 - stagnace proudu
 - pouze průtok plazmy
- anemická hypoxie
 - funkční (Met-Hb, HbCO)
 - hematologická

Stav oxygenace u ca prsu

V mnohých karcinomech prsu jsou heterogenně rozloženy oblasti hypoxické tkáně jako výsledek zmenšené a anizotropní mikrocirkulace. Průměr a medián naměřených hodnot parciálních tlaků kyslíku (pO_2) v nádorech různých klinických stádií a histologických grádingů jsou zřetelně nižší než v normální tkáni prsu(49, 51). Průměr a medián pO_2 v normální tkáni prsu byl 65mmHg, zatímco v karcinomech stádií pT2b - 4 byl medián pO_2 28mmHg. Jedna třetina karcinomů prsu měla hodnoty pO_2 mezi 0 a 2,5mmHg, tzn., že se v nádoru prsu vyskytovaly oblasti tkáně s menší než poloviční radiosenzitivitou. Naproti tomu se v normálním prsu nevyskytly hodnoty pO_2 nižší než 12,5 mmHg. Typicky se v karcinomech prsu zjišťuje bimodální distribuce pO_2 , která může být obrazem koexistencí velkých normoxických a hypoxických oblastí v nádoru, nebo relevantním příspěvkem pO_2 v (částečně zánětlivé?) stromální složce karcinomu prsu. Oxygenace v karcinomu prsu a výskyt hypoxie a anoxie nejsou v žádném vztahu s klinickým stadiem (12, 13, 14, 50). Hodnoty pO_2 mezi 0 - 2,5 mmHg tvoří 6% u nádorů T1 a T2 a 7% u nádorů T3 a T4. Podobně nebyl zjištěn vztah mezi velikostí nádoru a krevním průtokem (19, 57). Dále existují jasné důkazy, že způsob oxygenace nekoreluje s histologickým typem nádoru, menopauzálním stavem, rozsahem nekrózy nebo fibrózy, či s dalšími klinicky závažnými parametry (stav hormonálních receptorů, hladina hemoglobinu, kuřáctví) (12, 43, 50). V nedávné studii byla nalezena korelace mezi hodnotami pO_2 , zjištěné hypoxické fraxe, stupněm diferenciací a prognostickými faktory (25).

Nádory děložního čípku

Analýza pO_2 měřeného ve tkáni normálního čípku děložního žen, které nerodily, ukázala, že oxygenace je normální, tkáně jsou přiměřeně zásobeny $pO_2 = 48$ mmHg. Průměr i medián měření hodnot pO_2 byly pravidelně významně nižší u již rodivších žen s normálním čípkem děložním (pravděpodobně následkem změn po vaginálním porodu). Medián pO_2 byl 13mmHg (přičemž 14% hodnot bylo v rozmezí $pO_2 = 0$ - 2,5mmHg). U karcinomů děložního čípku stádia FIGO I/IIb-IV byl před léčbou medián $pO_2 = 10$ mmHg. Dosud vykazalo asi 35% cervikálních karcinomů hodnoty pO_2 mezi 0 - 2,5mmHg. Relativní četnost hodnot pO_2 mezi 0 - 2,5 mmHg byla zjištěna v rozmezí 1% (u karcinomu FIGO IV) až 82% (u karcinomu FIGO III) (21).

U karcinomů FIGO I a II je medián zjištěných hodnot $pO_2 = 11$ mmHg a u stádií FIGO III a IV je medián hodnot $pO_2 = 10$ mmHg s tím, že 6% a 18% hodnot je u uvedených stádií v nejnižší třídě pO_2 (0 - 2,5mmHg). Podobně jako u karcinomu prsu, nebyla před zahájením léčby karcinomu děložního čípku zjištěna korelace mezi velikostí nádoru a výskytem hypoxie nebo anoxie, ani mezi dalšími klinickými parametry, jak byly uvedeny u karcinomu prsu, s výjimkou hladiny hemoglobinu.

Z dřívějších studií oxygenace u karcinomu děložního čípku je známo, že pacientky se závažnou anémií - hemoglobin(Hb) 110 g/l - měly tendenci mít nižší hodnoty pO_2 u karcinomu cervixu než pacientky s normální koncentrací Hb 140 g/l; $p=0,05$). Frakce „hypoxických“ pO_2 hodnot (0 - 2,5 mmHg) byla signifikantně vyšší v anemické skupině než u pacientek s normální koncentrací Hb ($p=0,004$).

Hypoxie byla zjištěna ve všech vyšetřovaných nádorech, kromě již uvedených také u rektálního karcinomu, bronchogenního karcinomu, karcinomů hlavy a krku, glioblastomu, u sarkonů měkkých tkání, u melanomu (5, 53). Stupeň hypoxie se však liší u různých nádorů s tím, že nejvyšší stupeň byl zjištěn u glioblastomu a nejnižší u karcinomu prsu a karcinomů hlavy a krku. Dále je zjištěna značná individuální heterogenita nálezů hypoxie u nádorů stejné histologie.

Rovněž byly zjištěny rozdíly v oxygenaci primárního nádoru

a jeho metastáz v lymfatických uzlinách. Původně to zjistili Becker et al. u 15 nemocných se spinocelulárními karcinomy hlavy a krku (SCCHN)(2). Pozdější výsledky získané u 22 nemocných naznačují, že stav oxygenace zjištěný v primárním nádoru je významně ($p=0,0001$) vztažen k oxygenaci sekundárního nádoru v uzlinách tak, že pro zjišťování stavu oxygenace SCCHN je dostatečné měření pouze v jedné lokalitě.

Souhrn dostupných údajů o předléčebné oxygenaci tumoru (především pro karcinom prsu a karcinom čípku děložního) - (52)

- Oxygenace nádoru, jako krevní průtok nádorem a mikrocirkulace je anizotropní a snížena ve srovnání s normálními tkáněmi.
- Nádorová oxygenace není regulována podle metabolických požadavků jako je tomu u normálních tkání.
- Mediány hodnot pO_2 v primárních nádorech jsou průměrně nižší než v normálních tkáních, z nichž nádory vyrůstají.
- Řada solidních nádorů obsahuje oblasti s deplecí O_2 .
- Variabilita v oxygenaci různých nádorů je větší než variabilita oxygenace v jednom nádoru.
- Oxygenaci nádoru nelze předpovědět na podkladě klinického stádia a histologického gradingu.
- Oxygenace nádoru není závislá na dalších známých onkologických parametrech.
- Oxygenace nádoru není závislá na demografických údajích pacienta.
- U lokálně pokročilých karcinomů krčku děložního se medián hodnot pO_2 zvyšuje se zvyšující se koncentrací hemoglobinu.
- Lokální recidivy karcinomů prsu a krčku děložního mají vyšší hypoxickou frakci než primární nádory.
- U karcinomů děložního čípku s větší hypoxickou frakcí je větší pravděpodobnost lokální recidivy.

Oxygenace zdravých tkání

Většina normálních zdravých tkání je z radiobiologického hlediska euoxická, mírná hypoxie byla zjištěna pouze v chrupavkách a v kůži. Nádorem nepostížené normální tkáně mohou být hypoxické - viz výše - po traumatizaci (čipek děložní).

Hypoxická frakce

Hypoxická frakce je termín označující frakci klonogenních nádorových buněk, jejichž radiosenzitivita je charakteristická pro hypoxické buňky. Hypoxická frakce se měří následujícím způsobem: Skupina živočichů nesoucí transplantované nádory je rozdělena řečneme do šesti podskupin, které jsou ozářeny, když dýchají vzduch a dalších šest skupin, které jsou zabity 15 minut před ozářením, a tak majících tkáň hypoxické. Dávky záření budou zvoleny v rozmezí, jímž je dosaženo horního limitu, při kterém je ještě zaznamenáno přežití buněk. Po ozářením in vivo, je přežití buněk studováno in vitro. U živočichů dýchavších vzduch bude křivka přežití bifázická, odrážející tak radiosenzitivitu směsi oxických a hypoxických buněk. U zabitych živočichů bude patrná pouze hypoxická komponenta. Skutečnost, že dvě křivky přežití jsou paralelní, potvrzuje, že jsou obě charakteristické pro hypoxické buňky. Jestliže v jakémkoli bodě křivek přežití, kde jsou již paralelní, spustíme vertikální linii (kolmici k ose x), dáva vzniknuvší poměr hodnot (přežití u vzduch dýchajících buněk ku přežití u mrtvých živočichů) hypoxickou frakci buněk nádoru u vzduch dýchajících živočichů (46).

Hypoxický subvolum HSV

Z praktického hlediska - především pro odhad lokálních recidiv - je parametrem hypoxická frakce (procentuální podíl $pO_2 < 5\text{mmHg}$, nebo $pO_2 < 2,5\text{mmHg}$) a medián pO_2 (23). Obě veličiny byly prvními parametry předznamenávajícími špatnou prognózu, když byly u karcinomu děložního čípku po-

zorovány vysoká frekvence předléčebných hodnot pO_2 ($< 5\text{mmHg}$, $p=0,01$) a nízký medián pO_2 ($p=0,03$). U sarkomů měkkých tkání se ukázalo, že špatná oxygenace předznamenává zvýšenou pravděpodobnost vzdálených metastáz (6). Brizel et al. ukázali, že předléčebná hypoxická frakce (procentuální podíl $pO_2 < 5\text{mmHg}$) u SCCHN, které recidivovaly, byla významně vyšší než u nádorů, které byly lokálně zvládnuty (7, 39, 40, 45.). Proto bylo konstatováno, že relativní hypoxický objem tumoru (=hypoxická frakce) u SCCHN je nádorový biologický parametr, který může být užít k identifikaci relativně radiorezistentních nádorů (45). Molls et al. dále vypočítali absolutní hypoxický objem tumoru (procentuální podíl $pO_2 < 5\text{mmHg}$ vynásobený celkovým objemem nádoru) a nazvali tento parametr hypoxický subvolum (HSV). Tento HSV byl v jejich studii nejlepším prognostickým faktorem pro celkové přežití ($p=0,01$ tedy statisticky silnější než hypoxická frakce, viz výše), zatímco celkový objem nádoru sám neměl žádný významný vliv na výsledky léčby nemocných se SCCHN (45).

Současné techniky hodnocení oxygenace humánních nádorů

Klasickou metodou měření oxygenace je měření radiační odpovědi. U animálních modelů, lze užít jednu ze tří metod: 1) párová křivka přežití, 2) růst nádoru při uzavřeném krevním zásobení, 3) lokální zvládnutí nádoru při uzavření krevního zásobení. Všechny tři metody využívají srovnání odpovědi při ozařování v plné vzdušné atmosféře, nebo při arteficiální plné hypoxii(26).

V tabulce č.1 jsou uvedeny potenciální metody zjišťování hypoxie v nádorech u lidí. Zřejmě jedinou dostupnou metodou, která umožňuje zhodnocení celého spektra oxygenačních hladin v nádoru jsou techniky polarografické elektrody, jimiž se určují distribuce parciálních tlaků kyslíku pO_2 .

Tyto metody byly rozsáhle použity k měření stavu oxygenace zhoubných nádorů u lidí. Ve všech těchto studiích bylo zjištěno, že lepší léčebou odpověď lze dosáhnout u dobře okysličených nádorů. Protože radioterapie byla u všech těchto nádorů

Tabulka č.1: Potenciální metody pro měření stavu oxygenace v nádorech u lidí

Nádorová vaskularizace
- interkapilární vzdálenosti
- vaskulární denzita
- vzdálenost nádorových buněk od nejbližší cévy
Saturace hemoglobinu kyslíkem
- kryospektroskopie
- téměř infračervená spektroskopie
Metabolická aktivita nádoru
- biochemická/HPLC analýza
- bioluminescence
- NMR/PET
Poškození DNA
- Comet assay
- alkalická eluce
Hypoxické markery
- Imunohistochemie (např. PIMO/EF5/NITP)
- ^{18}F - fluoromisonidazol
- ^{125}I - iodoazomycin arabinosid
Distribuce parciálního tlaku vzdušného kyslíku
- polarografické kyslíkové elektrody
- ^{19}F - NMR spektroskopie
Různé
- ESR spektroskopie
- Intersticiální tlak nádoru
- zobrazení fosforescence
- hypoxické stresové proteiny

primární léčbou, výsledek nepřekvapuje. Nedávno však bylo zjištěno, že lepších výsledků bylo dosaženo také u nádorů, které byly léčeny chirurgicky (22), což by mohlo být v souladu

Tabulka č. 2: Příčiny anémie u onkologických pacientů

Krevní ztráta	způsobená akutní nebo chronickou hemoragií
Hemolýza	autoimunní hemodialýza (např. u pacientů s CLL)
Infiltrace kostní dřeně	metastatické postižení kostní dřeně
Deficience vitamínu B12 nebo kyseliny listové	spojená s nádorovou malnutricí
Porucha utilizace železa	zvýšená vazba železa na feritin
Zpomalená proliferace a maturace prekurzorů erytrocytů	snížená citlivost prekurzorů erytrocytů k erytropoetinu
Nepříměřená syntéza erytropoetinu	Nepříměřená endogenní erytropoesa ve vztahu ke koncentraci hemoglobinu
Chemoterapie	Manifestace anémie (zvláště často u platinových derivátů, vysokodávková ne-platinová chemoterapie)
Radioterapie	Postihuje všechny rychle se dělicí buňky včetně erythropoetických buněk
Anémie při chronických a zánětlivých onemocněních	Multifaktoriální proces spuštěný některými cytokiny (IL-1, IL-6, TNF- α)

s hypoxií navozenou větší agresivitou nádoru.

Podrobný komentář k metodám uvedeným v tabulce je uveden v práci Horsman MR et al. (26)

Biologický a terapeutický význam nádorové hypoxie

Nádorová hypoxie je považována za jednu z vedoucích multifaktoriálních příčin rezistence nádorů k jejich konvenční léčbě: k řídkce ionizujícímu ozařování (X a γ -záření), k některým cytostatikům (O_2 dependentní látky jako alkyllancia, bleomycin, či bioreduktivní látky jako mitomycin C), k fotodynamické léčbě, k biologické terapii (např. TNF- α , IL-2), k lokalizované hypertermii.

Dále se zjistilo, že hypoxie je vedoucím regulátorem genové aktivity uplatňující se při progresi nádoru: exprese genů VEGF, p53, GLUT, P-glykoprotein (s vlivem na angiogenesu, nižší potenciál apoptózy, rezistenci k léčbě), mutagenesa (genetická nestabilita, klonální heterogenita), vývoj agresivního fenotypu (nádorová progresie, metastatický potenciál a potenciál invaze, angiogenesa), vliv na metabolismus energie (acidóza, hladina ATP, homeostáza pH), parametry buněčné proliferace (proliferanční kapacita, pozice buněk v cyklu, adc) (38, 52).

Závěrem této části můžeme konstatovat, že nedostatečná oxygenace nádoru (ať už je způsobena jakoukoli příčinou) vede rámcově ke třem skupinám nežádoucích jevů: 1) k tvorbě proteinů závislých na hladině kyslíku (oxygen related proteins), které usnadňují metastázování nádoru, 2) ke genetické nestabilitě a tím selekci buněk s agresivnějším chováním, což se projeví na větší agresivitě celého nádoru a 3) k angiogenezi, která umožňuje progresi nádoru.

Hemoglobin a hypoxie

Až dosud jsme se zabývali hypoxií nádorových buněk, která je způsobena nedostatečně hustou sítí nově vytvořené mikrovaskularizace v nádoru, nedostatečným průtokem krve v této nedostatečně vytvořené síti s omezenými možnostmi regulace průtoku krve (často stagnace krve), tedy hypoxií z převážně lokálních příčin. U nemocných s nádory se často vyskytují různé druhy anémií (viz Tabulka č. 3), které způsobují hypoxii systémovou, která ovšem prohlubuje hypoxii v místě nádoru.

Výsledky léčby pacientů s karcinomy hlavy a krku, krčku děložního, plic a močového měchýře byly ovlivněny hladinou hemoglobinu. Skutečnost, že jak nízký pO_2 tak anémie jsou spojovány s kratší dobou přežití naznačuje vztah mezi oběma parametry (17). Další autoři zjistili, že nemocní se závažnou anémií mají tendenci mít nižší hodnoty pO_2 (23,24) a publikovali názor, že nízké hodnoty hemoglobinu u pacientů s SCCHN jsou spojeny s nízkým mediánem pO_2 a vysokou hypoxickou frakcí nebo velkým HSV (2, 3, 45). Proto konstatují, že nízká hladina hemoglobinu přispívá k nádorové hypoxii a že korekce nízké hladiny hemoglobinu před zahájením léčby může přinést významné zlepšení oxygenace nádoru.

Anémie u nemocných se zhoubnými nádory

Anémie doprovází často zhoubné nádory, především pak nádory v pokročilých stádiích. Je zásadní rozdíl mezi (radio- a chemo-

) terapií - indukovanou anémií. V závislosti na druhu nádoru a intenzitě radio- a chemoterapie a výsledku této léčby se v jejím průběhu rozvine anémie až u 60 % pacientů. Příčiny anémie jsou různé. Až dosud však bylo jen málo z nich podrobeno pečlivému vyšetření. U zdravých lidí je koncentrace erytrocytů udržována v konstantní hladině komplexním regulačním systémem. Nejdůležitějšími proměnnými v udržování koncentrace erytrocytů jsou jejich produkce a degradace. Např. u zdravých osob je denně produkováno asi 20 ml zralých erytrocytů. Produkce je primárně řízena hormonem erytropoetinem, tj. glykoproteinem, který je přednostně produkován v ledvinách a stimuluje konverzi prekurzorů na zralé erytrocyty. Produkce erytropoetinu se zvyšuje se snižující se oxygenací tkání, tj. je nepřímo úměrná změnám koncentrace erytrocytů. U nemocných s nádory je však rovnováha mezi produkcí erytrocytů a jejich degradací často velmi vážně porušena několika způsoby - Tabulka č. 2 (34).

Anémie při nádorových onemocněních (tumor associated anemia)

Hematologicky a biochemicky připomíná anémie při nádorových onemocněních připomíná anémii při chronických a zánětlivých onemocněních (ACD). Anémie při nádorových onemocněních je typicky normochromní a normocytární a je doprovázena sníženým počtem retikulocytů, redukcí vazebnou kapacitou sérového železa v přítomnosti normální až elevované hladiny sérového feritinu a zásobního železa (8). Různé procesy mohou přispívat k projevům anémie při nádorových onemocněních: vnitřní krvácení, zkrácené přežívání erytrocytů a primárně redukcí tvorba nových erytrocytů. Na začátku 90. let publikovali Miller et al., že u nemocných s anémií při nádorových chorobách nelze zjistit inverzní vztah mezi hladinami hemoglobinu a erytropoetinu (37). Jinými slovy: v mnohých případech není hladina erytropoetinu zvýšena ve stupni, který by odpovídal stupni anémie.

Nedávné studie ukazují, že příčinným důvodem tohoto fenoménu je multifaktoriální proces spuštěný tumor-indukovanou aktivací imunologického a inflamatorního systému. In vitro studie ukazují, že cytokiny interleukin-1 (IL-1) a méně významně interleukin-6 (IL-6) stejně jako tumor necrosis faktor (TNF- α) mohou mít značný inhibiční účinky na produkci erytropoetinu (9, 41).

Další substancí, která může inhibovat produkci erytropoetinu je interferon gamma (INF- γ). Shora uvedené cytokiny mohou přímo suprimovat erytropoesu v kostní dřeni (28). Tyto výsledky jsou podpořeny preklinickými studiemi, v nichž lidský IL-6 indukoval anémii (44). Doweiko et al. zjistili, že koncentrace IL-1 a TNF jsou často zvýšeny u nemocných s nádory, ale přesnou úlohu, kterou mají ve vývoji anémie při nádorových onemocněních je nutno ještě objasnit v dalších klinických studiích (9).

Léčba anémie a (hypoxie) transfúzemi

Protože hypoxie v nádoru je považována za jednu z nejdůležitějších multifaktoriálních příčin rezistence nádorů

k jejich konvenční léčbě a hraje zásadní roli v genové regulaci při progresi nádoru a je příčinou zvýšené exprese angiogenních faktorů a potažmo angiogenese v nádoru, čili má vliv jak na lokální progresi, tak na metastázování a vznik rezistentních klonů nádorových buněk, jak jsme se podrobněji zmínili výše, je logickým léčebným krokem hypoxii překonat. Jak jsme již také uvedli, na vzniku hypoxie se nemalou měrou podílí anémie nositele nádoru.

V naší běžné klinické praxi je nemocným s anémií při nádorovém onemocnění nejčastěji aplikována transfúze allogenní erythrocytární masy, případně promytých erythrocytů. Při operačním řešení bývá anémie korigována autologní erythrocytární masou. Indikací k aplikaci transfúze během konzervativní onkologické léčby bývá anémie s klinickými projevy, anebo pokles koncentrace hemoglobinu pod 80 g/l. Konzervativní a zdrženlivý postoj lékařů při indikaci transfúzí je dán znalostí vedlejších nežádoucích účinků transfúzí, které nejsou zanedbatelné a doprovázejí až 20 % všech transfúzí erythrocytů. K nejzávažnějším vedlejším účinkům stále patří přenos závažných virových infekcí, i když je transfúzím věnována náležitá péče. Postoje lékařů k transfúzní praxi byl zkoumán Ludwigem a Pecorellim na konferenci ESMO v Aténách 1998 (33).

Dalším důvodem k určité neochotě podávat transfúze u nemocných se zhoubnými nádory jsou znalosti horších

Tabulka č.3: Předpokládané mechanismy imunosuprese způsobené krevními transfúzemi

Mechanismus
Snížení počtu lymfocytů
Snížení poměru „helper“/„supresor“
Snížení buňkami zprostředkované cytotoxicity
Snížení buněčné funkce „killerů“
Snížení funkce monocytů
Zvýšení produkce prostaglandinů
Zvýšení produkce prostaglandinu E2
Snížení produkce interleukinu 2
Snížení produkce fibronektinu
Zvýšení produkce glukokortikoidů

výsledků přežití u transfundovaných nemocných. Kratší přežití bylo zjištěno u nemocných, kteří byli operováni pro sarkomy, nebo karcinomy prsu, plic, kolorekta, či krčku děložního (4, 11, 20, 32, 35, 56). Kratší přežití je dáváno do souvislosti s imunosupresivním působením cizích proteinů nebo allogenních transfundovaných buněk. Jednoznačně ovšem není vyloučeno, že anemičtí nemocní obecně mají pokročilejší nádorové onemocnění, než ti, jejichž nádorové onemocnění anémií doprovázeno není.

Některé možnosti imunosupresivního působení transfúzí je uvedeno v tabulce č.3 a v přehledné práci (55).

Možnosti ovlivnění anémie (a hypoxie) erythropoetinem v klinické praxi

a) Studie v University of California, Los Angeles (UCLA), Lavey et al. 1993 (29).

Do studie byli zařazeni nemocní se zhoubnými nádory lokalizovanými nad bránicí, kteří byli léčeni pouze radioterapií. Pacienti se vzdálenými metastázami a Hb > 135 g/l nebyli do studie zařazeni. Studie měla dva cíle: 1) určit, zda erythropoetin může věrohodně zvyšovat hladinu Hb během radioterapie a 2) zjistit, zda lze podávání erythropoetinu realizovat v normálním provozu radioterapeutické jednotky. Pacienti byli ozařováni 5x týdně a dostávali tablety sulfátu železa 3 x 325mg denně (po dobu 5 - 8 týdnů). Experimentální skupina pacientů dostávala erythropoetin 300 U/kg s.c., a to 3krát v týdnu před zahájením radioterapie, potom 150 U/kg s.c. 3x týdně po dobu kursu radioterapie, anebo do vzestupu Hb 150 g/l. V každé

skupině bylo 20 pacientů.

Výsledky lze shrnout následovně. Ve skupině nemocných s erythropoetinem došlo k průměrnému vzestupu hladiny Hb z 119 na 151 g/l (+27 %, p < 0,001). 80% pacientů s erythropoetinem dosáhlo během léčby radioterapií hladiny Hb > 140 g/l a 65 % pacientů dosáhlo hladiny Hb > 150 g/l, přičemž průměrně docházelo u všech pacientů během týdne k vzestupu hladiny Hb o 5%. Ve skupině pacientů bez erythropoetinu nedošlo ke změnám hladin Hb. Vedlejší účinky erythropoetinu nebyly vážné, kromě jedné alergické kožní reakce patrně na albuminový protein, který se dříve vyskytoval v komerčně připravovaném erythropoetinu.

b) První randomizovanou studií o vlivu erythropoetinu na hladinu Hb během radioterapie byla studie University of Chicago a University of California, San Francisco, Vijayakumar, S et al. 1993 (54).

Do studie bylo zařazeno 26 pacientů s karcinomy plic, prsu, prostaty a děložního krčku, kteří měli v případě mužů Hb ≤ 130 g/l, v případě žen ≤ Hb 120 g/l. 25 pacientů v kontrolní skupině bylo pouze ozařováno, kromě jednoho pacienta, který měl současně chemoterapii. Pacienti v experimentální skupině dostávali erythropoetin v dávce 200 U/kg každý den od pondělka do pátku a sulfát železa v dávce 325 mg 3x denně p.o. Dávky erythropoetinu byly redukovány na 100 U/kg denně 5dní v týdnu od pondělí do pátku, jestliže se hladina Hb zvýšila u mužů nad 150 g/l a u žen nad 140 g/l. Obě skupiny byly vyváženy z hlediska zastoupení pohlaví pacientů, věku, a úvodních hladin Hb.

V kontrolní skupině nedošlo k žádné významné změně hladiny Hb. Ve skupině nemocných, kteří dostávali erythropoetin a železo, vzrůstala hladina Hb o 4 g/l týdně. Vedlejší účinky erythropoetinu nebyly zaznamenány.

c) Třetí studií hodnotící účinnost erythropoetinu a železa na hladinu Hb v průběhu radioterapie byla provedena na University of Minnesota, Dusenberget al., 1994 (10).

Do studie bylo zařazeno 14 pacientek s pokročilým karcinomem děložního čípku, které měly hladinu Hb < 125g/l. Všechny nemocné měly ozařování celou pánev včetně paraaortálních uzlin do výše prvního lumbálního obratle, tedy v ozařovaném poli byl dosti značný objem krvevorné kostní dřeně. Tyto pacientky navíc dostávaly během ozařování týdně 20 mg/m² cisplatinu. Pacientky dostávaly 200 U/kg erythropoetinu 5 dní týdně po dobu 2 týdnů a pak stejnou dávku 3 krát týdně. Všechny nemocné rovněž dostávaly suplementaci železem. 5 nemocných, které odmítly erythropoetin, dostávalo pouze železo. 61 nemocných sloužilo jako historická kontrola. Tyto nemocné byly ozařovány stejnou technikou a současně dostávaly cisplatinu ve stejných dávkách jako skupina experimentální.

Studie prokázala týdenní vzestup Hb o 4 - 5 g/l u nemocných, které byly léčeny erythropoetinem a železem. Ve skupinách bez erythropoetinu, i když některé nemocné dostávaly transfúze erythrocytů, docházelo ke statisticky nevýznamnému poklesu Hb. Ve skupině nemocných s erythropoetinem byly zaznamenány 4 případy hluboké trombózy buďto v průběhu léčby, nebo 2 týdny po ukončení léčby.

d) První evropská ukončená studie byla prezentována v květnu 1998 na kongresu ASCO, Glaser et al. (16).

Do experimentální větve studie bylo zařazeno 30 pacientů se spinocelulárními karcinomy ústní dutiny, klasifikovanými T2-4 N0-2, s hladinou Hb < 125g/l. Léčba těchto nemocných sestávala z neoadjuvantní chemoterapie 5-fluorouracilem a mitomycinem C (Mitomycin C 15 mg/m² i.v., den 1 a 5-fluorouracil 750 mg/m² v kontinuální infuzi den 1-5) a ozařováním denní frakcionací (celková dávka 50 Gy , 25 frakcí, den 1 - 33). Pacienti dostávali po dobu radioterapie erythropoetin 150 U/kg s.c. 3x týdně. Jestliže nedošlo ke zvýšení hladiny Hb alespoň o 3 g/l za týden, pak se dávka erythropoetinu zvyšovala na dvojnásobek. V 10. týdnu od zahájení léčby se prováděl operační výkon. Jako kontrolní sloužila historická

skupina 30 pacientů, kteří měli chemo-radioterapii před operací bez erytropoetinu.

Glaserova studie je první, která kromě výsledku léčby anémie hodnotí rovněž výsledky protinádorové léčby právě v návaznosti na léčbu anémie a tedy předpokládané hypoxie v nádoru. Při operaci bylo zjištěno, že 63 % pacientů má patologickou kompletní remisi ve srovnání s 27 % patologických kompletních remisí v historické kontrolní skupině. Tento rozdíl je statisticky významný ($p = 0,002$). Studie rovněž naznačila, že podpora železem není nutná a že nedošlo k významným změnám hladin feritinu i saturace transferinu.

Uvedené studie se týkaly nemocných, kteří měli před zahájením léčby anémií. Další dvě studie měly za cíl zjistit, zda se pomocí erytropoetinu podaří udržet hladina Hb během léčby u nemocných, kteří jsou léčeni chemo-radioterapií.

e) Studie z MDAH v Houstonu, Lee et al., 1998 byla prezentována na kongresu ASCO (31).

16 pacientů s neresekovatelnými nemalobuněčnými bronchogenními karcinomy stadia III bez vzdálených metastáz s Hb > 120 g/l a Karnofského indexem ≥ 70 % a hmotnostní ztrátou v posledních 3 měsících menší než 15 % bylo léčeno radioterapií (1,2 Gy 2x denně do 69,6 Gy během 6 týdnů) a současně s chemoterapií (cisplatin 50 mg/m² ve dnech 1, 8, 29, 36, a etoposid 50 mg/m² 2x denně ve dnech 1-5, 8-12, 29-33 a 36-40). Erytropoetin byl nemocným podáván v dávce 10 000 U s.c. 3x týdně po dobu 12 týdnů. Kontrolní skupinu vyváženou v diagnóze, stádiu, věku a pohlaví tvořilo 16 pacientů léčených stejným způsobem kromě podávání erytropoetinu. První 4 pacienti v experimentální skupině nedostali preparát železa, což se ukázalo jako neúčinné, a proto byl léčebný protokol změněn a pacientům experimentální skupiny byl podáván ještě sulfát železa v dávce 325mg p.o. 3x denně po dobu 12 týdnů.

Ve skupině nemocných s erytropoetinem a sulfátem železa nedošlo během léčby k tak velkému poklesu Hb (předléčebná hladina Hb 132 g/l - nadir 118 g/l) jako ve skupinách nemocných bez erytropoetinu (předléčebná hladina Hb 132 g/l - nadir 95 g/l) nebo u zmíněných 4 nemocných bez podpory železem (předléčebná hladina Hb 132 g/l - nadir 97 g/l). U prvně jmenované skupiny byl pokles Hb pod 10g/l⁻¹ zaznamenán u 8 % pacientů, zatímco u zbývajících dvou skupin to bylo u 56 % a 50 %. Výsledky jsou v obou případech statisticky významné ($p < 0,03$) stejně jako potřeba transfúzí erytrocytů pro skupinu bez léčby erytropoetinem.

V této studii je zajímavý poznatek, že samostatně podávaný erytropoetin nebyl dostatečně účinný a že k němu musela být přidána suplementace železem. To je v rozporu s nálezem Glaserovy skupiny, která dosáhla svých výsledků bez této suplementace.

f) Další studií, v níž byl použit erytropoetin současně s radiochemoterapií, byla práce u University of Chicago, jejíž výsledky publikovali Rosen et al. na kongresu ASCO v roce 1999 (42).

Autoři použili erytropoetin při radiochemiterapii pacientů s pokročilými nádory hlavy a krku. Výsledky zatím nebyly definitivně zhodnoceny.

Až dosud nebyla na lidech prokázána přímo souvislost mezi hladinou Hb a hypoxií. Studie na CH3/sed myších, kterým bylo ozáření ledvin způsobeno jejich chronické selhání a tím současně primární deficiencí erytropoetinu. Podávání exogenního erytropoetinu vedlo k postupnému zvyšování hladiny Hb. Současně se sledováním hladiny Hb bylo prováděno měření oxygenace v nádoru. Byla prokázána silná závislost mezi hematokritem a zlepšující se oxygenací (30). Další otázkou je, jak rychle má být hematokrit zvýšen

v průběhu radioterapie, aby se ovlivnily výsledky léčby nádoru. Erytropoetin nepůsobí zvýšení hematokritu bezprostředně jako transfúze, ale bylo zjištěno, že z hlediska výsledků radioterapie má daleko větší význam hladina hemoglobinu při ukončení radioterapie než při jejím začátku.

Tři multivariátní studie prokázaly, že hladina Hb před zahájením a při zahájení radioterapie nemá tak velký vliv na lokální zvládnutí nádoru jako hodnota při ukončení radioterapie. Hladina Hb během léčby radioterapií měla větší prognostický význam než hladina před jejím zahájením (15), hladina Hb při ukončení kursu radioterapie karcinomu laryngu byla ve statisticky významném vztahu s lokálním zvládnutím nádoru, a to dokonce významnějším než klasifikace T-stádií (48), hladina Hb ve 35. dnu radioterapie karcinomu glotis a supraglotis byla nezávislým prognostickým faktorem s relativním rizikem pro recidivu nemoci 1,94, jestliže je hladina Hb nižší než 135g/l (1).

Závěry pro praxi:

1. Přítomnost hypoxických oblastí v nádorech lidí je charakteristickou patofyziologickou vlastností solidních nádorů.
2. Kyslík však musí být přítomen během ozáření, anebo v době několika milisekund ihned po ozáření.
3. Oxygenace v karcinomu prsu a výskyt hypoxie a anoxie nejsou v žádném vztahu s klinickým stadiem. Dále existují jasné důkazy, že způsob oxygenace nekoreluje s histologickým typem nádoru, menopauzálním stavem, rozsahem nekrózy nebo fibrózy, či s dalšími klinicky závažnými parametry (stav hormonálních receptorů, hladina hemoglobinu, kuřáctví)
4. V nedávné studii byla nalezena korelace mezi hodnotami pO₂, zjištěné hypoxické frakce, stupněm diference a prognostickými faktory
5. Variabilita v oxygenaci různých nádorů je větší než variabilita oxygenace v jednom nádoru.
6. Nádorová hypoxie je považována za jednu z vedoucích multifaktoriálních příčin rezistence nádorů k jejich konvenční léčbě
7. Hladina hemoglobinu je ve statisticky významném vztahu k výsledkům protinádorové léčby.
8. Zdá se, že hladina hemoglobinu na konci léčebné kúry (radioterapie) je významnější než na jejím začátku
9. Anémie u nemocných léčených radioterapií, anebo radiochemoterapií může být korigována erytropoetinem a suplementací železem, anebo samotným erytropoetinem
10. Erytropoetin a suplementace železem jsou účinné v prevenci anémie způsobené radioterapií, anebo radiochemoterapií.
11. Erytropoetin zvyšuje hladinu hemoglobinu a s tím současně oxygenaci v nádoru.
12. Léčba erytropoetinem zlepšila procento i kvalitu odpovědí nádorů na léčbu zářením v experimentálním zvířecím modelu.
13. V klinickém pokusu bylo dosaženo vyššího počtu kompletních remisí při léčbě karcinomů hlavy a krku radiochemoterapií, když s touto léčbou byl současně podáván erytropoetin.

Na korekci anémie podáváním erytropoetinu při současně protinádorové léčbě chemoradioterapií se ukazuje, že podpůrná léčba může mít (a zřejmě ještě v mnoha dalších případech má) významný vliv na výsledky léčby vyjádřené v počtech kompletních a parciálních remisí. Samozřejmě, že je nutno prokázat, zda tyto se výsledky projeví v prodlouženém přežití pacientů. Aby mohly být postupy radioterapie eventuálně radiochemoterapie přijaty v každodenní praxi, bude nutno jejich výsledky prokázat ve standardně provedených randomizovaných studiích. Ale i tak nám dosud dosažené výsledky naznačují jeden z možných směrů vývoje v onkologické léčbě s cílem zlepšení jejich výsledků.

Literatura

1. Acht van MJ, Herman J, Boks DE et al (1992). The prognostic value of hemoglobin and a decrease in hemoglobin during radiotherapy in laryngeal carcinoma. *Radiother Oncol* 23: 229-35.
2. Becker A, Hänsgen G, Bloching M et al (1998). Oxygenation of squamous cell carcinoma of the head and neck: Comparison of primary tumors, neck node metastases, and normal tissue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 35-9.
3. Becker A, Stadler P, Hänsgen G et al (1998) Hemoglobin level influences the oxygenation status of squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 233.
4. Blumberg A, Agarwal MM, Chuang C et al (1985). Relations between recurrence of cancer of the colon and blood transfusions. *Br Med J* 290: 1037-9.
5. Brizel DM, Rosner GL, Prosnitz LR et al (1995). Patterns and variability of tumor oxygenation in human soft tissue sarcomas, cervical carcinomas and lymph node metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32: 1121-5.
6. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM et al (1996). Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56: 941-3.
7. Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR et al (1997). Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38: 285-9.
8. Cartwright GE (1966) The anaemia of chronic disorders. *Semin Hematol* 3: 351-75.
9. Doweiko JP, Goldberg MA (1991). Erythropoietin therapy in cancer patients. *Oncology* 5: 31-7.
10. Dusenberg KE, McGuire WA, Holt PJ et al (1994). Erythropoietin increases hemoglobin during radiation therapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29: 1079-84.
11. Eisenkop SM, Spiro NM, Montag TW (1990). The clinical significance of blood transfusion at the time of radical hysterectomy. *Obstet Gynecol* 76: 110-3.
12. Falk SJ, Ward R, Bleehan NM (1992). The influence of carbogen breathing on tumor tissue oxygenation in man evaluated by computerized pO₂ histography. *Br J Cancer* 66: 919-24.
13. Falk SJ, Ramsay JR, Ward R et al (1994). BW12C perturbs normal and tumor tissue oxygenation and blood flow in man. *Radiother Oncol* 32: 210-7.
14. Füller J, Feldmann HJ, Molls M et al (1994). Untersuchungen zum Sauerstoffpartialdruck im Tumorwege unter Radio- und Thermoradiotherapie. *Strahlenther Onkol* 170: 453-60.
15. Girinski T, Pejovic-Lenfant MH, Bourhis J et al (1989). Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by radiation therapy: Results of retrospective study of 386 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16: 37-42.
16. Glaser C, Millesi W, Gössweiner S et al (1998). r-HuErythropoietin supply increases efficacy of neoadjuvant chemotherapy in patients with oral squamous cell carcinoma. *Proc ASCO* 17: 387a.
17. Grau C, Overgaard J (1998). Significance of hemoglobin concentration for treatment outcome. In: Molls M, Vaupel P eds. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 101-12.
18. Gray LH, Conger AD, Ebert, M et al (1953). The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26: 638-48.
19. Grischke EM, Kaufmann M, Eberlein-Gonska M et al. (1994) Angiogenesis as a diagnostic factor in primary breast cancer: microvessel quantification by stereological methods and correlation with color Doppler sonography. *Onkologie* 17: 35-42.
20. Henry DH (1992). Changing patterns of care in the management of anemia. *Semin Oncol* 19: Suppl 102-3.
21. Hoeckel M, Schlenger K, Knoop C et al (1991) Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: Evaluation of computerized pO₂ tension measurements. *Cancer Res* 51: 6098-102.
22. Hoeckel M, Schlenger K, Aral B et al (1996). Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 56: 4509-15.
23. Höckel M, Vaupel P (1998) The prognostic significance of hypoxia in cervical cancer: A radiobiological or tumor biological phenomenon? In: Molls M, Vaupel P eds. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 63-72.
24. Höckel M, Vorndran B, Schlenger K et al (1993). Tumor oxygenation: a new predictive parameter in locally advanced cancer of uterine cervix. *Gynecol Oncol* 51: 141-9.
25. Hohenberger P, Felgner C, Haensch W et al (1998). Tumor oxygenation correlates with molecular growth determinants in breast cancer. *Breast Cancer Res Treatment* 48: 97-106.
26. Horsman MR, Nordmark M, Overgaard J (1998). Techniques to assess the oxygenation of human tumors. *Strahlenther Onkol* 174: Suppl IV, 2-5.
27. Howard-Flanders P, Moore D (1958). The time interval after pulsed irradiation within which injury in bacteria can be modified by dissolved oxygen. I. A search for an effect of oxygen 0.02 seconds after pulsed irradiation. *Radiat Res* 9: 422-37.
28. Jelkmann W, Fandrey J (1993). Role of inflammatory cytokines in the pathophysiology of erythropoietin response. *Erythropoiesis* 4: 10-5.
29. Lavey RS, Dempsey WH (1993). Erythropoietin increases hemoglobin in cancer patients during radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 27: 1147-52.
30. Lavey RS, McBride WH (1993). Influence of hematocrit on tumor oxygenation and sensitivity to radiation. *Eur J Cancer* 29A(S6): S216.
31. Lee JS, Komaki R, Touroutoglou A et al (1998). Erythropoietin (EPO) prevents anemia during concurrent chemoradiation therapy (RT) for locally-advanced inoperable non-small cell lung cancer. *Proc ASCO* 17: 463a.
32. Little AG, Wu HS, Ferguson MK et al (1990). Perioperative blood transfusion adversely affects prognosis of patients with stage I non-small-cell lung cancer. *Am J Surg* 160: 630-2.
33. Ludwig H, Pecorelli S (2000). Suboptimal hemoglobin levels: Do they impact patients and their therapy? Audience responses. *Semin Oncol* 27: Suppl 4, 18-9.
34. Manegold C (1998) The causes and prognostic significance of low hemoglobin levels in tumor patients. *Strahlenther Onkol* 174: Suppl IV, 17-9.
35. McClinton S, Moffat LEF, Scott S et al (1990). Blood transfusion and survival following surgery for prostatic carcinoma. *Br J Surg* 77: 140-2.
36. Michael BD, Adams GE, Hewitt HB et al. (1973). A post effect of oxygen in irradiated bacteria: a submillisecond fast mixing study. *Radiat Res* 54: 239-51.
37. Miller CB, Jones JR, Piantadosi S et al (1990). Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *A Engl J Med* 322: 1689-92.
38. Molls M, Stadler P, Becker A et al (1998) Relevance of oxygen in radiation oncology. *Strahlenther Onkol* 174: Suppl IV, 13-6.
39. Molls M, Stadler P, Feldmann HJ (1998). Oxygen-status of human tumors: Significance for radiation oncology. In Kogelnik HD, ed. *Progress in radio-oncology VI*. Bologna: Monduzzi, 525-30.
40. Nordmark M, Overgaard M, Overgaard J (1996). Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 41: 31-9.
41. Pagel H, Fandrey J, Jelkmann W (1993) The cytokines IL-1, IL-6 and TNF inhibit the production of erythropoietin. *Molecular biology of hematopoiesis*, 8th symposium Basel (Switzerland) July 9-13.
42. Rosen FR, Brockstein BE, Haraf D et al (1999). Multicenter randomized phase II study of 1 hour infusion Paclitaxel (T), Fluorouracil (5-FU) and hydroxyurea (HU) with concomitant hyperfractionated (BID) radiotherapy (XRT) with or without erythropoietin (EPO) for advanced oral, pharynx and larynx cancer - an interim analysis. *Proc ASCO* 18: 393a.
43. Runkel S, Wischnik A, Teubner J et al (1994) Oxygenation of mammary tumors as evaluated by ultrasound-guided computerized pO₂ - histography. *Adv Exp Med Biol* 345: 451-8.
44. Srinivasiah J, Jacobs PC, Rozmiarek SK et al (1993). Studies in nonhuman primates on the pathogenesis of rh-IL-6 related anaemia. *Proc ASCO* 12: abstract 348.
45. Stadler P, Becker A, Feldmann HJ (1998). Influence of the hypoxic subvolume on the prognosis of the head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42: 147.
46. Steel GG (1993). *The radiobiology of tumours* In: Steel GG ed. *Basic clinical radiobiology*. Edward Arnold Publishers, London-Boston-Melbourne-Auckland 108-19.
47. Tannock IF: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Br J Cancer* 1968; 1968: 258-78.
48. Tarnawski R, Skladowski K, Majejewski B (1997). Prognostic value of hemoglobin concentration in radiotherapy for cancer of supraglottic larynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 38: 1007-11.
49. Thimlinson RH, Gray LH: The histological structure of some human lung cancers and the possible implication for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9: 539-49.
50. Vaupel P, Schlenger K, Knoop C et al (1991). Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Res* 51: 3316-22.
51. Vaupel P (1997) Vascularization, blood flow, oxygenation, tissue pH, and bioenergetic status of human breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 411: 243-54.
52. Vaupel P, Thews O, Kelleher DK, Hoeckel M (1998). Oxygenation of human tumors: The Mainz experience. *Strahlenther Onkol* 174: Suppl IV, 6-12.
53. Vaupel P, Höckel M (1998). Oxygenation of human tumors. In: Molls M, Vaupel P eds. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Berlin-New York: Springer 63-72.
54. Vijayakumar S, Roach M, Wara W et al (1993). Effect of subcutaneous recombinant human erythropoietin in cancer patients receiving radiotherapy: preliminary results of randomized, open-labeled, phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26: 721-9.
55. Vodvářka P (1998). Kritické zhodnocení vlivu léčby anémie transfúzí u onkologicky nemocných léčených radioterapií - jaká alternativa? *Klin Onkol* 11: 2-7.
56. Walker RH (1987). Special report: Transfusion risks. *Am J Clin Pathol* 88: 374-8.
57. Wilson CB, Lamertsma AA, McKenzie CG et al. (1992). Measurements of blood flow and exchanging water space in breast tumors using positron emission tomography: a rapid and noninvasive dynamic method. *Cancer Res* 52: 1592-7.
58. Wright EA, Howard-Flanders P (1957). The influence of oxygen on the radiosensitivity of mammalian tissues. *Acta Radiol* 48: 26-32.

IMUNOMAGNETICKÁ SEPARACE MYELOMOVÝCH BUNĚK

IMMUNOMAGNETIC SEPARATION OF MYELOMA CELLS

¹FIŠEROVA A.,^{1,2}HAJEK R.,²DOUBEK M.,¹BULIKOVA A.,¹BOURKOVA L.,²BANOVSKA A.,
¹VIDLAKOVA P.,¹TUZOVA E.,¹MARESCHOVA I.,²VORLIEEK J.,¹PENKA M.

LABORATOŘ EXPERIMENTALNI HEMATOLOGIE A BUNIENÉ IMUNOTERAPIE,
¹ODDILENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, ²INTERNI HEMATOONKOLOGICKA KLINIKA, FN BRNO-BOHUNICE

Souhrn: Myelomové buňky vykazují značnou fenotypickou heterogenitu. V všechny plazmatické buňky exprimují CD38 ve vysoké denzitě (CD38⁺⁺). Syndecan-1 (CD138 antigen) byl detekován na monoklonální populaci CD38⁺CD45⁻ a CD38⁺CD45^{dim+} a byla prokázána heterogenita v jeho expresi. Cílem naší práce bylo připravit vitální buněčnou suspenzi o vysoké čistotě myelomových buněk pomocí imunomagnetické separace. Vitalita buněk není procedurou významně ovlivněna, čehož lze s výhodou využít v experimentech vyžadujících kultivaci těchto buněk. K separaci bylo použito osm vzorků aspiračních biopsií pacientů s mnohočetným myelomem. V naší laboratoři jsme zvolili dva způsoby separace myelomových buněk: pozitivní selekci CD138⁺ buněk a kombinaci deplece CD45⁺ buněk s pozitivní selekcí CD138⁺ buněk z frakce CD45⁻. Vitalita vyseparovaných buněk (medián, rozpětí) byla 98,0% (97,0%-99,0%), čistota dle flowcytometrické detekce CD138 v jedнокrokové proceduře (medián, rozpětí) byla 78,9% (74,9%-87,4%), ve dvoukrokové proceduře 84,3% (74,8%-94,5%). Morfologické hodnocení čistoty jedné jedнокrokové procedury s výsledkem 99,6% a jedné dvoukrokové procedury se 100,0% plazmatických buněk ukazuje na preferenční kontaminaci plazmatickými buňkami, které nenesou znak CD138. Pomocí imunomagnetické separace jsme ze vzorku kostní dřeně pacienta s mnohočetným myelomem připravili buněčnou suspenzi o vysokém zastoupení vitálních myelomových buněk s širokou využitelností v experimentální oblasti.

Klíčová slova: Imunomagnetická separace - Mnohočetný myelom - Syndecan-1

Summary: Myeloma cells display considerable phenotypic heterogeneity. All plasma cells express high density CD38 (CD38⁺⁺). Syndecan-1 (CD138 antigen, B-B4) was detected in monoclonal populations CD38⁺CD45⁻ and CD38⁺CD45^{dim+} and heterogeneity of its expression was proven. The work presented aimed at preparation of a high-purity vital cell suspension of myeloma cells by immunomagnetic separation. There is no significant vitality change, which may be of advantage for experiments in which cultivation of the cells is necessary. Eight samples of aspiration biopsy from patients with multiple myeloma were used. Two methods of separation were evaluated: either positive selection of CD138⁺ cells or the same method on the fraction which has been depleted of its CD45⁺ cells. Vitality of the separated cells (median, range) was 98% (97%-99%), purity, as detected flowcytometrically by CD138, was 78.9% (74.9%-87.4%) in one-step and 84.3% (74.8%-94.5%) in two-steps procedures. The purity was further assessed morphologically in one one-step procedure (99.6% of plasma cells) and in one two-steps procedure (100.0% of plasma cells). It displays a preferential contamination with plasma cells without CD138 marker. High purity vital myeloma cells suspension was prepared from bone marrow tissue samples of multiple myeloma patients. Ample application range in the experimental field is suggested.

Key words: Immunomagnetic separation - Multiple myeloma - Syndecan-1

Úvod

Mnohočetný myelom je onemocnění dosud považované za nevléčitelné [6]. Studium biologie maligního klonu plazmatických buněk má proto své opodstatnění. V naší práci jsme se zaměřili na separaci myelomových buněk z kostní dřeně pacienta s mnohočetným myelomem, která by umožňovala rozšíření experimentálních eventuálně terapeutických možností. Četné studie vyžadují buňky se zachovanou vitalitou a funkčními vlastnostmi. Proto jsme zvolili imunomagnetickou separaci (magnetic-activated cell separation, MACS) vyvinutou Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Germany). Tato metoda umožňuje selekci buněk podle jejich povrchového CD znaku pomocí monoklonální protilátky konjugované se superparamagnetickou partikulí. Vitalita buněk není procedurou významně ovlivněna, čehož lze s výhodou využít v experimentech vyžadujících kultivaci těchto buněk (stanovení labelling indexu, cytogenetické studie, produkce imunoglobulinu, produkce cytokinů aj.). Morfologický obraz buněk ve světelném mikroskopu není ovlivněn.

Maligní plazmatické buňky pacientů s mnohočetným myelomem vykazují značnou fenotypickou heterogenitu. Na

jejich imunofenotypizaci bylo již zaměřeno mnoho prací [1,21]. Všechny plazmatické buňky exprimují vysokou intenzitu CD38 (CD38⁺⁺). Jde o adhezivní molekulu, která zprostředkuje interakci s vaskulárními endoteliálními buňkami [7,9,16]. Tento znak je exprimován též na pre B buňkách, nezralých T buňkách, aktivovaných T buňkách a monocytech. Většina CD34⁺ buněk je též CD38⁺ [22]. Expresí CD45 se snižuje během vývoje plazmatických buněk. Zralé ztrácejí tento antigen [18,23].

Rozlišujeme subpopulaci zralých (CD 45⁻), nezralých (CD45⁺) a primitivních (CD45⁺⁺CD19⁺) plazmatických buněk. Ze zralých plazmatických buněk definovaných jako CD38⁺⁺CD45⁻ je méně než 4% CD19⁺, více než 86% CD38⁺⁺CD19⁺ je buď CD45⁺ nebo CD45⁺⁺ [14].

Syndecany patří mezi transmembránové proteoglykany, které mohou prostřednictvím heparansulfátového řetězce zprostředkovat vazbu růstových faktorů. Účastní se interakcí buňka a buňka: intersticiální matrix. Expresí syndecanu-1 na normálních B buňkách je podobná expresi CD38 a je závislá na stadiu vývoje. Oba markery jsou přítomny na pre-B buňkách, jsou ztraceny s diferenciací a opět exprimovány ve stadiu plazmatických buněk [22,23]. Syndecan-1 váže buňky

k různým komponentám intersticiální matrix (kolagen I, III, V, fibronectin, trombospondin, tenascin). Gen pro syndecan-1 je lokalizován na chromosomu 2p23[2,16].

Expresí syndecanu-1 byla popsána na plazmatických buňkách kostní dřeně a periferní krve pacientů s mnohočetným myelomem [4,16,23]. Syndecan-1 byl detekován na monoklonální populaci CD38+45- a CD38+45dim+ a byla prokázána heterogenita v jeho expresi. Diferenciace B buněk na plazmatické buňky je provázána ztrátou CD45 a získáním syndecanu-1. Syndecan-1 je exprimován před terminální diferenciací plazmatických buněk [23]. Myelomové buňky exprimující syndecan-1 produkují relativně nízké hladiny matrix-metaloproteinázy-9 (proteinu s možnou rolí v patogenezi mnohočetného myelomu)[11].

Imunomagnetickou separaci myelomových buněk dle znaku CD138 popisuje Borset [3], dosahuje čistoty nad 99 % (hodnoceno morfologicky), vitality nad 80 %. Ve své práci prokazuje, že B-B4 protilátka (anti-CD138) neovlivňuje proliferaci a produkci cytokinů myelomových buněčných linií. Drach [5] též separuje touto metodou s čistotou CD138+ frakce dle morfologie 99 %. Losieau [8] dosahuje mediánu čistoty dle morfologie 93 % (78 %-99 %). Depleční metodu s koktailem protilátek CD3, CD11b, CD14, CD33, CD45 a CD45RA, CD32 a anti-glycoforin A s dosažením čistoty dle morfologie nad 95 %, dle flowcytometrické detekce dvojkombinace CD38+CD45RA- nad 95%, s vitalitou 99 % a s návratností myelomových buněk nad 95 % popisuje Tai [20].

V naší laboratoři jsme zvolili dva způsoby separace myelomových buněk: pozitivní selekci CD138+ buněk a kombinaci deplece CD45+ buněk s pozitivní selekci CD138+ buněk z frakce CD45-.

Metody:

Myelomové buňky byly separovány ze vzorků aspiračních biopsií kostních dření získaných současně s rutinními diagnostickými odběry. S použitím části vzorku pro výzkumné účely vyjádřil pacient informovaný souhlas. Charakteristiky pacientů udává tabulka č. 1. Kostní dřeň o objemu většinou 20 ml,(6-30)ml byla odebrána do heparinu. Vzorky s nálezem nad 5 % plazmatických buněk v nátěru byly dále separovány. Celkem bylo provedeno 8 MACS separací, 4 jedнокrokové a 5 dvoukrokových (2 vzorky provedeny oběma způsoby). Jedna separace byla komplikována shlukováním buněk v průběhu separace. U dalších vzorků proto zavedeno užití DNase (endonukleáza štěpící DNA).

Ihned po odběru byl vzorek smíchan s IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma, I 7633, 2 ml/1ml kostní dřeně), heparinem (Léčiva, 100 U/ml kostní dřeně), DNase (Boehringer Mannheim, No: 1284 932, 100 U/ml kostní dřeně) a jemně třepán. Mononukleární buňky kostní dřeně byly získány denzitní gradientovou centrifugací na Histopaque - 1077 (Sigma, No: H-8889). Centrifugace 400g, 35 min., 4 °C (centrifuga JOUAN CR 312). Cílem gradientové centrifugace bylo též očištění vzorku o mrtvé buňky, které mají tendenci k nespecifickému značení

Tabulka č. 1: Charakteristiky pacientů.

Pacient č.	Nátěr KD, pl. bb. (%)	Stadium	Typ Ig
1	56,8	III A	IgG kappa
2	66,0	III A	IgG kappa
3	32,0	III A	IgG kappa
4	38,0	I A	IgG kappa
5	83,0	III A	IgG lambda
6	14,0	III A	IgG kappa
7	6,4	III A	IgG kappa
8	16,8	III A	IgG kappa

a záchytu v koloně. V jedнокrokové proceduře by tak mohly výrazně kontaminovat pozitivní frakci. Po dvojnásobným promytím v PBS + 2mM EDTA (centrifugace 300g, 10 min., 4 °C) bylo provedeno magnetické značení.

Jedнокroková procedura – pozitivní selekce CD138+ buněk: Mononukleární kostní dřeně jsou značeny protilátkou anti-CD138 (B-B4) v dávce 20 µl s 80 µl roztoku (PBS+2mM EDTA+0,5 % humánní albumin+azid sodný) / 10⁷ buněk (CD 138 (Syndecan-1) MicroBeads, Miltenyi Biotec, No: 513-01), inkubace 15 min., 6-12 °C. Po promytí je značená suspenze aplikována přes filtr 30 µm (NO: 414-07) do kolony CS (Miltenyi Biotec, No: 413-05) umístěné v magnetickém poli separátoru. Byl použit flow resistor 20G, separátor VarioMACS (No: 431-02) s permanentním magnetem 0,6 T. Negativní buňky projdou kolonou, pozitivní získáme po odstranění kolony z magnetu.

Dvoukroková procedura-kombinace deplece CD45+ buněk a pozitivní selekce CD138+ buněk z frakce CD 45-:

Mononukleární kostní dřeně jsou nejprve značeny protilátkou anti CD45 (CD45 MicroBeads, Miltenyi Biotec, No: 458-01), aplikovány do kolony, pozitivní buňky jsou zachyceny v koloně, negativní jsou dále značeny pomocí monoklonální protilátky B-B4 a aplikovány do kolony. Frakce buněk CD138+ je získána po odstranění kolony z magnetického pole. Veškeré manipulace byly provedeny ve sterilním laminárním flowboxu (GÉLAIRE BSB 6A).

Hodnocení kvality magnetické separace:

Za tímto účelem byly provedeny odběry ze vstupního vzorku (mononukleární buňky kostní dřeně) a dále z jednotlivých frakcí (CD138+, CD138- v jedнокrokové proceduře a CD45+, CD45-, CD45-138+, CD45-138- ve dvoukrokové proceduře).

Hodnocení vitality:

Buněčná suspenze 1 x 10⁶/ml je značena směsí barviv (ethidium bromid+acridinová oranž) a aplikována do Bürkerovy komůrky. Fluorescenčním mikroskopem (Olympus BH-2) je hodnoceno % vitálních (zelených) buněk z celkového počtu buněk.

Morfologické hodnocení:

Ze vzorků jednotlivých frakcí jsou připraveny cytospinové preparáty (1,5 x 10⁵ buněk) a barveny (May-Grünwald-Giemsa). V rámci standardní diagnostiky provedeno též hodnocení nátěru kostní dřeně. Z jednotlivých preparátů byl proveden rozpočet přítomných elementů (hodnoceno na 250 jaderných buněk) v mikroskopickém odečtu (mikroskop Olympus BH-2, zvětšení 1000 x) a vyjádřeno procentuální zastoupení myelomových buněk.

Flowcytometrická detekce povrchových CD markerů:

K detekci myelomových buněk a buněk kontaminujících byly použity následující protilátky: anti-CD3, anti-CD14, anti-CD19, anti-CD45, anti-CD38, anti-CD54, anti-CD138, pro trojbarevnou analýzu byly použity tyto kombinace protilátek: anti-CD 45/anti-CD 38/anti-CD 54, anti-CD 45/anti-CD 38/anti-CD 56 a anti-CD 45/anti-CD 38/anti-CD 138 [Immunotech (Francie) a Caltag (USA)] značených R-fycoerythrinem (R-PE), fluorescein isothiocyanátem (FITC) a R-phycoerytrin-Cy5 (TC). 50 µl vzorku bylo inkubováno s protilátkami v saturujících koncentracích. Vzorek byl po inkubaci s protilátkami (20 minut při teplotě 4 °C a 10 minut při 20 °C) a zafixován v přístroji Q-Prep (Coulter, USA). Takto zpracované vzorky byly analyzovány na průtokovém cytometru Epics XL (Coulter, USA). Metodika trojbarevné flowcytometrické analýzy byla již detailně popsána [12]. Panel vyšetřených CD znaků byl volen tak, aby stanovil procento myelomových buněk a detekoval buňky, které frakci kontaminují. Počet odebraných buněk na každý vzorek byl 1 x 10⁶.

Určování počtu buněk:

Počet buněk stanoven na ABBOTU 3500.

Stanovení návratnosti myelomových buněk TCR (Target cell recovery):

$$\text{TCR} (\%) = 100 \times \frac{\text{počet buněk v pozitivní frakci} \times \% \text{ poz. buněk v poz. frakci}}{\text{počet buněk ve vstup. vz.} \times \% \text{ poz. buněk ve vstup. vz.}}$$

Stanovení celkové návratnosti buněk OCR (Overall cell recovery):

$$\text{OCR} (\%) = 100 \times \frac{\text{poč. buněk v poz. frakci} + \text{poč. buněk v neg. frakci}}{\text{počet buněk ve vstup. vzorku}}$$

Stanovení indexu obohacení fE (Enrichment rate):

Jde o průměrný počet negativních buněk, které prošly kolonou v poměru k počtu negativních buněk zachycených nespecificky v koloně, za předpokladu, že všechny pozitivní buňky byly zachyceny v koloně.

$$fE = \frac{\% \text{ neg. buněk ve vstup. vz.} \times \% \text{ poz. buněk v poz. frakci}}{\% \text{ poz. buněk ve vstup. vz.} \times \% \text{ neg. buněk v poz. frakci}}$$

Výsledky

Výtěžnost mononukleárních buněk (medián, rozpětí) byla 2,7 (0,7-10,6) x 10⁶ / ml kostní dřeně.

Vitalita:

Vitalita vstupního vzorku (medián, rozpětí) byla 98,5 % (95,0 % -99,0 %), frakce myelomových buněk po separaci 98,0 % (97,0 % -99,0 %).

Morfologické hodnocení:

V nátěru kostní dřeně provedeném v rámci standardní diagnostiky byl nález plazmatických buněk 38,0 % (6,4% až 83,0 % (medián, rozpětí). Cytospinové preparáty jednotlivých frakcí byly hodnoceny u jedné jedнокrokové separace (pokus č.8). V nátěru plně kostní dřeně bylo 16,8 % plazmatických buněk. Vstupní vzorek (mononukleáry kostní dřeně) obsahoval 36,9 % plazmatických buněk (foto č. 1). Ve frakci CD138+ bylo 99,6 % (foto č. 2), ve frakci CD138- 28,3 %. V jedné dvoukrokové separaci byly hodnoceny nátěry (pokus č.7). V nátěru plně kostní dřeně bylo zjištěno 6,4 % plazmatických buněk. Ve vstupu bylo 11,6 %, ve frakci CD45+ 8 %, CD45-22 %, CD45-CD138+ 100 %, CD45-CD138- 5 %.

Flowcytometrické hodnocení čistoty shrnuje tabulka č. 2.

Celková návratnost buněk byla v jedнокrokových procedurách 86,1% (80,7%-89,8%), ve dvoukrokových procedurách 69,7% (59,9%-81,1%)(medián, rozpětí).

Současně s pozitivní selekcí dle znaku CD138 dochází ke změněm procentuálního zastoupení znaků jiných. Pravidelně k depleci CD3+ buněk a CD19+ buněk (data nepublikována).

Ve dvoukrokových procedurách je ve frakci CD45+ ztraceno ne bezvýznamné procento buněk nesoucích znak CD138. V jednom z pokusů dosáhla ztráta 71,9%.

Diskuse:

Cílem naší práce byla separace vitálních myelomových buněk z kostní dřeně pacientů s mnohočetným myelomem pomocí imunomagnetické separace.

Z morfologických preparátů je patrná tendence myelomových buněk ke shlukování. Populace buněk přítomných ve shluku pravděpodobně není homogenní. Znak CD138 je exprimován též v populaci pre B lymfocytů [23]. To vysvětluje možnou přítomnost mladých forem. Rozdíly ve

výsledcích čistoty zjištěné morfologicky a flowcytometricky pomocí znaku CD138 ukazují na přítomnost plazmatických buněk, které nenesou znak CD138. Příčinu této preferenční kontaminace pravděpodobně mladšími formami buněk, které nenesou znak CD138, zbývá objasnit. Mohlo by jít o interakci buňka: buňka vysvětlitelnou na molekulární úrovni. Kawano [10] ve své práci popisuje spontánní homotypickou agregaci myelomových buněk zprostředkovanou molekulami ICAM-1 a LFA-1. Při hodnocení čistoty je nutno zvážit metodu hodnocení. Většina publikovaných prací vyjařuje výsledky čistoty dle morfologického hodnocení. Z pohledu našeho dalšího využití není tato kontaminace na závadu, v některých pokusech by mohla být spíše výhodou. Další zvyšování čistoty podle znaku CD138 nutno řešit individuálně. Teoreticky by mohlo docházet ke změnám procentuálního zastoupení buněk nesoucích znak CD14 jednak z důvodu současné exprese Fc receptoru a nespecifického značení těchto buněk vazbou Fc koncem magneticky značené protilátky (blokátor Fc receptoru nebyl používán, nutnost jeho užití zbývá doložit na základě většího počtu experimentů), jednak z důvodu možné koexpresy CD14 a CD138 antigenů. Expresy myelomonocytárních antigenů (CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33) byla popsána s různou frekvencí 6-65% pacientů s mnohočetným myelomem [1].

Vzhledem k tomu, že určení počtu buněk může být zatíženo chybou a flowcytometrické vyšetření má subjektivní složku, mohou snadno pokusy se skutečnou hodnotou návratnosti myelomových buněk blížící se 100% překročit tuto hodnotu. To je ve shodě s již publikovanými daty.

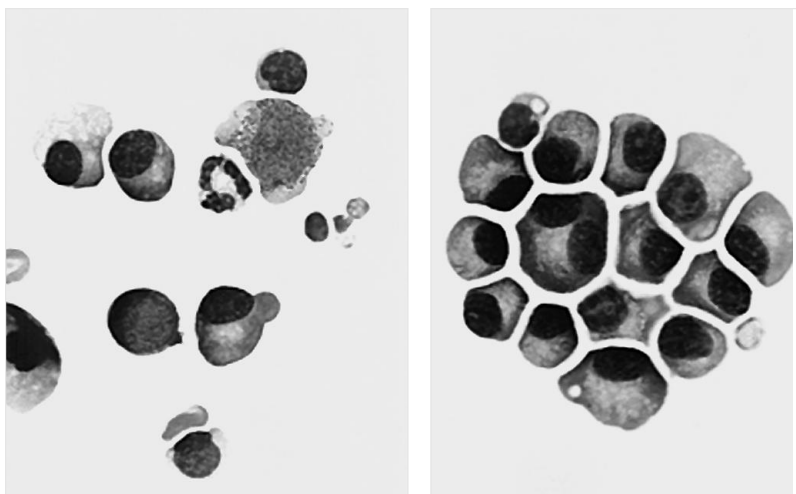
K zachytu v koloně je dostatečné magnetické značení pouze malé části povrchových receptorů. Proto buňky CD45dim+138+ mohou být v prvním kroku dvoukrokové procedury ztraceny. Syndecan-1 byl detekován na monoklonální populaci CD38+45- a CD38+45dim+ [23]. Tím je ovlivněna i návratnost myelomových buněk ve dvoukrokových procedurách. Získání buněk CD45dim+138+ by vyžadovalo další separační krok s použitím odznačujícího reagentu a nového magnetického značení CD138. Nutno však zdůraznit ekonomickou náročnost tohoto postupu.

Nižší hodnota celkové návratnosti a návratnosti myelomových buněk ve dvoukrokových procedurách odpovídá vyššímu počtu centrifugačních kroků.

Dosažené hodnoty čistoty frakce myelomových buněk dle hodnocených znaků je možno zvyšovat zavedením dalších kroků. Jde o mírné přetížení kapacity kolony u pozitivní selekce (princip kompetice), užití flow rezistoru o vyšším průtoku, zvýšení objemů promývacích pufrů, „back flush“ metoda

Obr. č. 1 a 2: Cytospinové preparáty z pokusu č. 8 (jednokroková procedura), barvení May-Grünwald-Giemsa, zvětšení 1000 x.

Foto č. 1: Mononukleární buňky kostní dřeně. Foto č. 2: Buňky frakce CD138+.



Tabulka č. 2: Flowcytometrické hodnocení čistoty.

CD znaky v % (medián, rozpětí, hodnoceno z dostupných dat provedených pokusů), TCR (Target cell recovery-návratnost myelomových buněk v %), fE (index obohacení). * vyšetření provedeno pouze v jednom pokusu.

FLOWCYTPMETRIE		CD54	CD138	CD38/45/54	CD38/45/56	CD38/45/138
1 KROK	VSTUP (BMMC)	24,1 (7,8–40,3)	37,3 (12,6–61,9)	16,0 (5,36–31,2)	30,3 (5,3–38,3)	15,7 (3,0–25,4)
	FRAKCE CD138+	49,1 (25,7–72,5)	78,9 (74,9–87,4)	49,4 (34,0–73,8)	57,8 (42,5–76,9)	68,4 (53,1–87,2)
	FRAKCE CD138–	6,8 (3,7–9,8)	6,6 (2,0–11,1)	4,4 (0,8–8,0)	5,0 (0,9–9,1)	1,2 (0,9–8,6)
	TCR (%)	69,9 (58,5–81,3)	54,7 (11,1–128,9)	135,2 (107,0–163,5)	144,8 (90,8–192,8)	152,2 (102,1–199,6)
	fE	4,0 (3,9–4,1)	25,9 (1,84–25,9)	6,2 (6,2–17,2)	5,4 (5,4–24,4)	18,5 (3,3–31,8)
2 KROKY	VSTUP (BMMC)	22,9 (7,8–55,6)	30,4 (9,1–68,3)	16,7 (5,4–45,8)	18,6 (5,3–38,3)	12,0 (2,7–44,8)
	FRAKCE CD45+	*23,1	60,8 (60,8–66,8)	8,5 (2,7–14,2)	9,8 (2,7–16,9)	2,6 (2,5–14,2)
	FRAKCE CD45–	41,6 (15,4–67,8)	16,2 (4,7–72,9)	33,8 (14,3–53,2)	38,7 (15,6–61,7)	16,7 (2,97–54,7)
	FRAKCE CD45–138+	90,4 (67,5–98,1)	84,3 (74,8–94,5)	81,7 (64,2–93,9)	80,4 (66,7–94,8)	64,2 (40,9–91,4)
	FRAKCE CD45–138–	8,0 (1,3–14,6)	9,63 (0,9–65,2)	5,2 (1,2–9,2)	6,0 (1,9–10,2)	2,4 (0,4–9,5)
	TCR (%)	57,3 (44,7–144,6)	41,1 (10,5–92,2)	81,7 (48,4–194,6)	77,2 (48,7–209,5)	79,5 (38,8–180,9)
	fE	30,0 (17,4–76,5)	15,8 (1,4–148,6)	31,6 (6,9–43,4)	32,5 (6,4–44,0)	24,0 (2,5–55,1)

Tabulka č. 3: Korelace morfoloického a flowcytometrického hodnocení čistoty. Výsledky udány v %.

Pokus/Frakce	Morfoloicky	ČISTOTA		
		Flowcytometricky		
Pokus č. 7 (2 kroky)	Nátěr	CD38	Cd138	CD38/45/138
Vstup	11,6	18,6	10,4	2,7
Frakce CD45+	8,0	18,5	14,2	2,5
Frakce CD45–	22,0	10,7	4,7	3,0
Frakce CD45– 138+	100,0	64,2	78,0	60,8
Frakce CD45– 138–	pod 5,0	4,8	0,9	0,4
Pokus č. 8 (1 krok)	Cytospin	CD38	CD138	CD38/45/138
Vstup	36,9	17,1	3,5	3,0
Frakce CD138+	99,6	96,1	87,4	87,2
Frakce CD138–	28,3	24,6	2,0	1,5

event. její opakování, aplikace pozitivní frakce do nové kolony, užití blokátoru Fc receptorů. Pokusy o zvyšování čistoty pozitivní frakce mohou být provázeny ztrátami myelomových buněk. Proto je třeba zvážit požadavek na čistotu a množství buněk pro účely daného pokusu individuálně.

Využití takto získaných vitálních buněčných suspenzí by mohlo být následující:

Stanovení telomerázové aktivity. Byla prokázána velmi silná korelace mezi aktivitou telomerázy a malignitou. Telomerázová aktivita je detekována v 90% lidských rakovinných onemocnění [17] včetně mnohočetného myelomu [13].

Byl prokázán prognostický význam chromosomálních aberací umnohočetného myelomu [19]. Jejich záchyt by mohl být úspěšnější na vysoce čisté suspenzi myelomových buněk, kde detekovaná změna se týká s velkou pravděpodobností právě buňky myelomové. U subpopulace převážně zralých myelomových buněk, které mají podstatně nižší labelling index než primitivní plazmocelulární buňky [14] by nemusel být zisk metafázových chromosomů dostatečný k hodnocení pomocí techniky G-pruhování a nemusel by umožňovat FISH s využitím celochromosomových sond, nicméně diagnostika na interfázových jádrech s využitím sond pro jedinečné genové kopie poskytuje určité spektrum možností s cílenou detekcí změn v určitých oblastech genomu.

Selekce subpopulace primitivních plazmocelulárních buněk, které jsou vhodným zdrojem k založení primokultury a k získání metafázových chromosomů, by mohla rozšířit spektrum diagnostikovatelných změn. Umožnila by vyšetření G-technikou a FISH s využitím celochromosomových sond eventuálně novějších modifikací, které umožňují v jednom hybridizačním kroku vyšetření všech chromosomů (mFISH-multicolor fluorescence in situ hybridization). Zbývá dorešit způsob selekce těchto buněk.

Založení primokultury z vyseparovaných subpopulací umožňuje určení modifikovaného labelling indexu plazmatických buněk. Jeho srovnání se standardním postupem [16] může být předmětem výzkumu.

Isolace DNA z vyselektované frakce myelomových buněk umožňuje molekulárně genetickou analýzu a archivaci materiálu pro následná vyšetření v budoucnu.

Řada imunoterapeutických protokolů nové generace zaměřených na specifickou protinádorovou terapii pracuje s nádorem asociovanými antigeny (TAA –tumor associated antigens)[24], které jsou prostřednictvím antigen prezentujících buněk téhož pacienta předkládány autologním T lymfocytům. Buněčná suspenze myelomových buněk o vysoké čistotě získaná MACS separací může být jedním z vhodných zdrojů TAA využitelných v protokolech zaměřených na specifickou protinádorovou terapii třebaže pravý antigen zůstává neznámý.

Závěr:

Pomocí imunomagnetické separace jsme ze vzorku kostní dřeně pacienta s mnohočetným myelomem připravili buněčnou suspenzi o vysokém zastoupení vitálních myelomových buněk s širokou využitelností v experimentální oblasti. S přihlédnutím k výsledkům a ekonomické náročnosti obou procedur se jeví jednokroková procedura dostačující pro naše další postupy.

Práce je podpořena granty: IGA MZ ČR 6152-3, GAČR 301/00/0405, IGF FNB 4/99, MŠMT UZ J07/98-141 100003, MŠMT J07/98-6700008 a výzkumným záměrem MZ ČR č. 000 65 2697 05.

Práce byla prezentována na XIV. Olomouckých hematologických dnech 8. 6. 2000.

Magnetická separace myelomových buněk. Magnetic separation of myeloma cells.

Literatura:

1. Adam, Z., Klabusay, M., Vorlíček, J.: Imunofenotyp buněk mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie*. 1997, 10 (6): 174-179.
2. Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L., Lose, E. J.: Biology of the Syndecans: A family of Transmembrane Heparan Sulfate Proteoglycans. *Annual Reviews Cell Biology*. 1992, 8: 365-393.
3. Borsset, M., Helseth, E., Naume, B., Waage, A.: Lack of IL-1 secretion from human myeloma cells highly purified by immunomagnetic separation. *British Journal of Haematology*. 1993, 85: 446-451.
4. Couchman, J. R., Woods, A.: Syndecans, Signaling, and Cell Adhesion. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1996, 61: 578-584.
5. Drach, J., Schuster, J., Nowotny, H., Angerler, J., Rosenthal, F., Fiegl, M., Rothermundt, Ch., Gsur, A., Jäger, U., Heinz, R., Lechner, K., Ludwig, H., Huber, H.: Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer research*. 1995, 55: 3854-3859.
6. Hájek, R., Vášová, I., Adam, Z., Mayer, J.: New approaches to management of multiple myeloma. *Acta Medica Austriaca*. 1996, 23: 91-98.
7. Harada, H., Kawano, M. M., Huang, N., Harada, Y., Iwato, K., Tanabe, O., Tanaka, H., Sakai, A., Asakura, H., Kuramoto, A.: Phenotypic Difference of Normal Plasma Cells From Mature Myeloma Cells. *Blood*. 1993, 81 (10): 2658-2663.
8. Avet-Loiseau, H., Li, J. Y., Morineau, N., Facon, T., Brigaudeau, Ch., Harsousseau, J. L., Grosbois, B., Bataille, R.: Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Blood*. 1999, 94 (8): 2583-2589.
9. Kawano, M., Huang, N., Harada, A., Harada, Y., Sakai, A., Tanaka, H., Iwato, K., Kuramoto, A.: Identification of immature and mature myeloma cells in the bone marrow of human myelomas. 1993. *Blood*, 82, 564-570.
10. Kawano, M. M., Huang, N., Tanaka, H., Ishikawa, H., Sakai, A., Tanabe, O., Nobuyoshi, M., Kuramoto, A.: Homotypic cell aggregation of human myeloma cells with ICAM-1 and LFA-1 molecules. *British Journal of Haematology*. 1991, 79: 583-588.
11. Kelly, T., Korset, M., Abe, E., Gaddy-Kurten, D., Sanderson, R. D.: Matrix metalloproteinases in multiple myeloma. *Leukemia and Lymphoma*. 2000, 37 (3-4): 273-281.
12. Klabusay, M., Doubek, M., Adam, Z., Hájek, R.: Sledování zbytkové choroby nemocných s mnohočetným myelomem průtokovou cytometrií. In Adam, Z., Hájek, R., Mayer, J., Ščudla, V., Vorlíček, J.: *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. 1. vyd., Brno, Masarykova univerzita, 1999, 372 s.
13. Nilsson, P., Mehle, C., Remes, K., Roos, G.: Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. *Oncogene*. 1994, 9 (10): 3043-3048.
14. Pope, B., Brown, R. D., Gibson, J., Petersen, A., Wiley, J., Joshua, D. E.: The Functional Phenotype of the Primitive Plasma Cell in Patients With Multiple Myeloma Correlates With the Clinical State. *Leukemia and Lymphoma*. 1997, 27: 83-91.
15. Pope, B., Brown, R., Gibson, J., Joshua, D.: The Bone Marrow Plasma Cell Labeling Index by Flow Cytometry. *Cytometry*. 1999, 38: 286-292.
16. Rawstron, A., Barrans, S., Blythe, D., Davies, F., English, A., Pratt, G., Child, A., Morgan, G., Jack, A.: Distribution of myeloma plasma cells in peripheral blood and bone marrow correlates with CD56 expression. *British Journal of Haematology*. 1999, 104: 138-143.
17. Shay, J. W., Bacchetti, S.: A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*. 1997, 33 (5): 787-791.
18. Schneider, U., van Lessen, A., Huhn, D., Serke, S.: Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen. *British Journal of Haematology*. 1997, 97: 56-64.
19. Ščudla, V., Bačovský, J.: Prognostické faktory. In Adam, Z., Hájek, R., Mayer, J., Ščudla, V., Vorlíček, J.: *Mnohočetný myelom a další monoklonální gamapatie*. 1. vyd., Brno, Masarykova univerzita, 1999, 372 s.
20. Tai, Y. T., Teoh, G., Shima, Y., Chauhan, D., Treon, S. P., Raje, N., Hideshima, T., Davies, F. E., Anderson, C. K.: Isolation and characterization of human multiple myeloma cell enriched populations. *Journal of immunological methods*. 2000, 235: 11-19.
21. Toušková, M., Maisnar, V., Krejsek, J., Kopecký, O.: Průkaz buněk mnohočetného myelomu vícebarevnou imunofluorescencí s vyhodnocením průtokovou cytometrií. *Vnitřní lékařství*. 1999, 45 (12): 708-712.
22. Wijdenes, J., Vooijs, W. C., Clement, C., Post, J., Morard, F., Vita, N., Laurent, P., Sun, R. X., Klein, B., Dore, J. M.: Aplasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *British Journal of Haematology*. 1996, 94: 318-323.
23. Witzig, T. E., Kimlinger, T., Stenson, M., Therneau, T.: Syndecan-1 Expression on Malignant Cells from the Blood and Marrow of Patients with Plasma Cell Proliferative Disorders and B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Leukemia and Lymphoma*. 1998, 31: 167-175.
24. Yang, S., Darrow, T. L., Vervaert, C. E., Seigler, H. F.: Immunotherapeutic potential of tumor antigen-pulsed and unpulsed dendritic cells generated from murine bone marrow. *Cellular Immunol*. 1997, 179: 84-95.

knihy

COLORECTAL CANCER

C.S. McArdle, D. J. Kerr, P. Boyle (Eds.)

Isis Medical Media Ltd., Oxford 2000

220 str., 56 obr., 51 tab., ISBN 1 899066 72 1, cena 59,95 GBP

Monografie s mezinárodní autorskou účastí zpracovává problematiku kolorektálního karcinomu ve 12 kapitolách. Úvodní pojednání hodnotí celosvětovou incidenci – kolorektální ca se stal třetím nejčastějším maligním onemocněním. Vysoký výskyt je zaznamenán v ekonomicky rozvinutých zemích (USA, Kanada a také ČR), naopak je nejnižší v rozvojových zemích (Indie, Alžírsko). Jsou formulovány léčebné a preventivní postupy, jež by měly redukovat jednak počty nemocných, jednak zajistit jejich včasnou a správnou léčbu. V druhé kapitole o zobrazování a stagingu se konstatuje, že nejužívanějším vyšetřením je CT zaměřené na primární nádor, na uzliny a na metastázy v játrech. Ve třetí kapitole vyhrazené patologii kolorektálního ca a premaligních lézí jsou podrobně popsány polypózní syndromy. Kolorektální karcinom je považován za genetickou poruchu; vysoké riziko je zvláště u syndromů s adenomy (4. kap.).

V páté kapitole je pojednáno o screening (digitální vyšetření rekta, testy na okultní krvácení, sigmoideoskopie, irigoskopie a kolonoskopie), jehož cílem je snížit morbiditu i mortalitu časnější detekcí karcinomu nebo rizikových prekancerózních lézí. Výsledky screeningu jsou velmi povzbudivé. Chemoprevence kolorektálního karcinomu je tematem 6. kapitoly. V 7. kap. o chirurgii kolorektálního karcinomu se diskutují všeobecné principy i specifické postupy, stručně je

zmíněna i paliativní chirurgie. Poukázáno je i na možnosti stentování endoprotézou u stenozujících procesů. 8. kap. je zaměřena na kolorektální karcinom, který se rozptýlil do jater. Zhodnocení parenchymu jater s posouzením případných metastáz je vyhrazeno zobrazovacím metodám; svým specifickým způsobem jsou využívány UZ, CT i MRI. Z biochemických testů se nejvíce používá CEA. Dále jsou formulovány zásady terapie (resekce jater do počtu tří metastáz, dostatečný lem neporušeného parenchymu okolo metastázy, ztráta tkáně nepřesahující 25 %, žádné extrahepatické postižení). Je popsána adjuvantní léčba – kryoterapie, podání etanolu, regionální chemoterapie a embolizace. Celou šíři terapeutických zásahů může nabídnout jen specializované centrum. Kolorektálnímu karcinomu, který přichází do nemocnice jako akutní stav, je věnována 9. kapitola. Akutní stav představuje obstrukce střeva, perforace nebo krvácení. Nepříznivě se uplatňuje komorbidita s patologickými stavy srdce, plic nebo CNS. Radiační léčba se uplatňuje hlavně u ca rekta. Kombinace s chemoterapií se využívá hlavně naopak u colon. Předposlední kapitola se zabývá systémovou chemoterapií (hlavním preparátem jsou sloučeniny fluorouracilu). Poslední kapitola se vrací znovu k obstrukčním formám ca.

Výtečná monografie vybavená barevnými snímky a ilustracemi (formát 276 x 189 mm) analyzuje problematiku kolorektálního karcinomu ze všech úhlů. Přináší aktuální informace, které využijí onkologové, gastroenterologové, chirurgové a radiologové. Knihu distribuje Plymbridge Distributors Limited, Estover Road, Plymouth PL6 7PY, UK.

V. R., V. H.

AKTIVITA TELOMERAZY VE TKANI BENIGNICH A MALIGNICH NADORU PRSU

TELOMERASE ACTIVITY IN BENIGN AND MALIGNANT BREAST TUMORS

ŠIMIEKOVÁ M., *PEČEN L., NEKULOVA M., VAGUNDOVA M., VERMOUSEK I., VALIK D., VONDRAEEK V., PAEOVSKÝ Z., ČERNOCH M.

MASARYKUV ONKOLOGICKÝ USTAV BRNO
*USTAV INFORMATIKY AV ČR PRAHA

Souhrn: Východiska: Zkracování telomer (specifických struktur na koncích chromozomů) na určitou délku může dát buňce signál k zastavení dělení s následnou buněčnou smrtí. Ribonukleoproteinový enzym telomeraza je klíčová složka, která je schopna udržet délku telomer a tím zaručit buňkám nesmrtnost. Cílem naší práce je zhodnotit kvantitativní metodu stanovení aktivity telomerázy (TeloTAAG Telomerase PCR-ELISA) pro odlišení benigní a maligní tkáně prsu a korelovat výsledky s tradičními prognostickými indikátory a vývojem onemocnění. Metody, výsledky: Telomeraza byla vyšetřena ve tkáních 27 fibrocystických a dysplastických lézí, 27 fibroadenomů a fylloidních nádorů a 154 karcinomů. Relativní aktivita telomerázy se v těchto tkáních významně lišila, nejvyšší aktivita byla nalezena ve tkáni karcinomů. Senzitivita tohoto stanovení u maligních mamárních nádorů je 73 % při 93 % specifitě u skupiny benigních mamárních nádorů. Ukazuje se, že telomeraza je prognostickým faktorem nezávislým na klasických prognostických faktorech pT, pN, ER a PR, protože jsme nenalezli významné korelace mezi aktivitou telomerázy a velikostí nádoru, postižením mízních uzlin a koncentrací steroidních receptorů. Vyšší aktivitu telomerázy vykazují nádory více dediferencované a nádory nemocných, u nichž ve sledovaném období došlo k progresi onemocnění. Závěr: Metoda kvantitativní analýzy aktivity telomerázy je vhodná k odlišení maligního charakteru z minimálního vzorku tkáně mléčné žlázy. Vyšší aktivita telomerázy je asociována s agresivnějším fenotypem nádoru.

Klíčová slova: telomeraza, kvantitativní analýza, karcinom prsu, benigní tkáň prsu, korelace s klinicko-patologickými údaji

Summary: Backgrounds: Shortening of telomeres (specialized structures at the ends of chromosomes) beyond a certain length may signal a cell to stop division and to enter cell death. A ribonucleoprotein enzyme, telomerase, is a key component in maintaining telomere length and is responsible for continuous cell growth. The aim of our work was to measure the levels of telomerase expression in primary breast cancers and benign breast lesions by means of a quantitative method (Telo TAAG Telomerase PCR ELISA) and correlate telomerase activities with traditional prognostic indicators and disease outcome. Methods, results: We analyzed telomerase activity in fibrocystic and dysplastic tissues (N= 27), fibroadenomas and phylloid tumors (N= 27) and breast carcinomas (N=154). Relative telomerase activity differed significantly in these tissues. The highest activity was found in breast cancer. Clinical sensitivity of telomerase activity determination for malignant tissues was 73% at 93% specificity in comparison with benign mammary tumors. The telomerase activity seems to be an independent prognostic factor in relation to pT, pN, ER, PR, because tumor size, positive axillary lymph nodes, and steroid receptor levels did not correlate with telomerase activity. The trend of higher telomerase is characteristic for less differentiated tumors and tumors of patients with disease progression. Conclusions: Quantitative determination of telomerase activity is useful for distinguishing benign and malignant tissue in minimal specimens of tumors. The higher activity is associated with more aggressive malignant phenotype.

Key words: telomerase, quantitative analysis, benign and malignant tumors, correlation with clinical and pathological data

Úvod

Stárnutí somatických buněk je způsobeno postupným zkracováním specifických zakončení chromozomů – telomer - při každém mitotickém dělení. Při určité minimální délce telomer se buňka už dále nedělí a umírá. Nádorové a zárodečné buňky nemají tento replikační limit díky ribonukleoproteinu telomeráze. Tento enzym – reverzní transkriptáza - je schopen udržovat telomery v dostatečné délce přidávkem druhově specifických sekvencí DNA (pro lidské telomery je to sled bází TTAGGG). Tím zajišťuje telomeraza nádorovým a zárodečným buňkám nesmrtnost (1-3).

Bylo prokázáno, že telomeraza je exprimována až v 90 % lidských nádorů, zatímco v normálních somatických buňkách je obvykle nedetekovatelná (4). Telomeraza se tedy zdá být nadějná jako obecný marker malignity, jehož vyšetření lze provádět z neinvazivních odběrů např. v buňkách získaných

výplachem tělních dutin, v buňkách uvolněných do moče, eventuálně v odběrech s limitovaným množstvím tkáně. Dosavadní postupy stanovení aktivity telomerázy užívají totiž PCR amplifikaci telomerázového produktu, metoda tedy vyžaduje minimální množství vzorku (5). Vývoj detekce amplifikovaného produktu vedl od metod původně kvalitativních k metodám kvantifikace aktivity telomerázy. Při těchto postupech se však v určitém procentu nádorových vzorků vyskytuje negativní interference inhibitorů Taq polymerázy při PCR (6). **Cílem naší práce** bylo vyšetřit aktivitu telomerázy za užití kvantitativní metody jejího stanovení v extraktech benigní a maligní tkáně prsu a získané výsledky zhodnotit ve vztahu k dostupným klinicko-patologickým údajům.

Pacienti, metody

V období 1998 – 2000 jsme vyšetřili průběžně tkáň nádorů

prsu operovaných v našem ústavu, a to 27 fibrocystických a dysplastických lézí, 22 fibroadenomů a benigních fyloidních nádorů a 101 karcinomů prsu. Retrospektivně bylo analyzováno 53 karcinomů a 5 fibroadenomů a fyloidních nádorů, jejichž tkáň byly uloženy od operace v r.1990-1995 při -80°C . V souboru karcinomů prsu bylo 51 % invazivních duktálních karcinomů, 16 % lobulárních karcinomů a 33 % nádorů jiného typu. Patomorfologická charakterizace nádorů byla provedena dle WHO kritérií. Nemocné byly léčeny a sledovány v našem ústavu podle standardních postupů.

Telomeráza byla vyšetřována metodou TeloTAAG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche) (5). Uvedená kvantitativní ELISA srovnává výsledný signál (=fotometricky měřenou absorbancí) produktu po působení telomerázy amplifikovaného polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) se signálem získaným amplifikací vnitřního standardu v přítomnosti nádorového extraktu. Dojde-li k výraznému snížení absorbance obou alikvótů reakcí, je to důkazem přítomnosti inhibitoru v extraktu nádoru a výsledek je nehodnotitelný. V celkovém počtu vyšetřených vzorků jsme pozorovali inhibici této reakce jen u vzorků karcinomu, a to v 6 ze celkového počtu 154 vyšetřených (tj. asi ve 4 % případů). Tyto vzorky nelze použitou metodikou analyzovat a byly ze souboru vyloučeny. Analytická charakteristika metody (7) odpovídá komplexnosti postupu molekulárně-biologických technik.

Relativní telomerázová aktivita (RTA) byla přepočtena na aktivitu standardního materiálu s definovanou koncentrací syntetického telomerázového produktu (7) a normalizována na jednotnou optimální koncentraci bílkoviny ve vzorku. Bílkovina v extraktu tkáň byla stanovena Bradfordovým činidlem v přítomnosti extrakčního pufru (8).

Stanovení steroidních receptorů bylo prováděno do roku 1998 ligand-saturační analýzou (9), diskriminační hranice byla 10 fmol/mg proteinu. Od r. 1999 používáme ELISA techniku (ER, PgR EIA Monoclonal, ABBOTT), cut-off je 15 fmol/mg proteinu.

Vzhledem k negaussovskému rozložení hodnot aktivity telomerázy byl na porovnání mezi různými skupinami dat použit neparametrický nepárový Wilcoxonův test. Analýza homogenity souborů vyšetřených bezprostředně i po delší době úschovy tkáň byla provedena také dalšími neparametrickými testy (viz tab.1). Korelace mezi aktivitou telomerázy a dalšími parametry byla hodnocena pomocí Spearmanova pořadového korelačního koeficientu. Diskriminační hranice mezi benigními a maligními nádory byla stanovena jako 90 % kvantil aktivity telomerázy ve skupině benigních fyloidních nádorů a fibroadenomů. Pravděpodobnost bezpříznakového přežití byla stanovena metodou dle Kaplan-Meiera, porovnání funkcí přežití bylo provedeno Wilcoxonovým testem. Pro statistickou analýzu dat jsme použili program S.A.S (S.A.S. Corp., verze 6.12 Carry USA).

Výsledky

Srovnáním aktivity telomerázy ve skupině invazivních duktálních karcinomů, odebraných v letech 1990-1995 a 1998-2000 jsme ověřili, že neexistuje signifikantní diference mezi oběma skupinami (tab.1). Pro další analýzu byly proto oba soubory sloučeny.

Tab.1. Srovnání aktivity telomerázy v invazivních duktálních karcinomech prsu vyšetřených retrospektivně a prospektivně

SOUBOR	N	RTA ^a			p ^d
		MEDIAN	Q1 ^b	Q3 ^c	
1990-1995	33	1,199	0,470	2,380	NS
1998-2000	46	1,327	0,716	2,005	

^a RTA: relativní aktivita telomerázy, ^b dolní kvartil (25 % kvantil), ^c horní kvartil (75 % kvantil), ^d pro hodnocení signifikance užity testy: Wilcoxon, mediánový, Kruskal-Wallis, Van der Waerden, Kolgomorov-Smirnov, Cramer-von Mises a Kniper

Tab. 2. Srovnání aktivity telomerázy v benigní a maligní tkáni prsu

TKAO	N	RTA ^a			p ^d
		MEDIAN	Q1 ^b	Q3 ^c	
Fibrocystické a dysplastické léze	27	0,007	0,000	0,075	0,0001
Fibroadenomy, fyloidní nádory	27	0,050	0,005	0,233	
Karcinomy	154	1,148	0,420	2,320	

a,b,c, viz tab.1, ^d signifikace dle Wilcoxonova testu

Tab. 3. Aktivita telomerázy ve vztahu ke stupni diferenciace karcinomů prsu

GRADING	N	RTA ^a			p ^d
		MEDIAN	Q1 ^b	Q3 ^c	
1 + 2	42	1,155	0,410	1,901	0,0316
3	35	1,769	0,810	2,457	

a,b,c,d viz tab.2

Tab. 4. Relativní telomerázová aktivita v nádorech dvou skupin nemocných ve vztahu k progresi onemocnění

PŘEŽITI	N	RTA ^a			p ^d
		MEDIAN	Q1 ^b	Q3 ^c	
bez progresie	32	0,805	0,278	2,335	NS
s progresí	20	1,454	0,376	2,288	

a,b,c,d : viz tab.2.

Tab.5. Hladiny steroidních receptorů v karcinomech prsu stanovených v našem souboru metodou ligand-vazebné analýzy (1990-1998) a ELISA technikou (1999-2000)

ANALÝZA	N	ER		PR		p ^a
		Medián	>cut-off	Medián	>cut-off	
ligand-vazebná metoda	76	11,7	53 %	7,01	41 %	0,0001
ELISA	78	43,3	64 %	35,2	60 %	

^a signifikance dle Wilcoxonova testu

Dysplastická tkáň prsu vykazuje aktivitu telomerázy na hranici detekčního limitu (tab.2). Telomerázová aktivita fibroadenomů a fyloidních tumorů je výrazně vyšší, nejvyšší aktivita byla zjištěna pro skupinu karcinomů. Wilcoxonův test prokazuje vysokou signifikanci rozdílu rozložení hodnot (tab.2, $p < 0.0001$). Diskriminační hranici mezi maligní a benigní tkání jsme stanovili jako 90 % kvantil aktivity telomerázy benigních fyloidních nádorů (RTA = 0.459). Za těchto podmínek dosahuje klinická senzitivita telomerázy pro karcinomy 73 % při specifitě 93 %, vztaženo na skupinu nemaligních tumorů. Skutečně nulovou hodnotu RTA jsme našli pouze ve 3 % maligních nádorů.

Mezi jednotlivými histologickými podtypy karcinomů jsme nezjistili signifikantní diferenci, RTA byla nevýrazně vyšší ve skupině invazivních duktálních karcinomů. Senzitivita stanovení se však lišila – pro duktální karcinomy dosahovala 79 %, pro lobulární 72 % a ostatní nádory 65 %. Průměrná aktivita telomerázy ve 3 karcinomech in situ (2 lobulární, 1 duktální) se pohybovala na hranici cut-off. Přibližně 13 % nádorů z našeho souboru (především vyšetřeno v letech 1998-2000) bylo bi- nebo multifokálního typu. RTA souboru monofokálních nádorů se nelišila od skupiny nádorů s více ložisky v jednom prsu. V nejpočetnější histologické podskupině

invazivních duktálních karcinomů jsme zhodnotili *RTA ve vztahu k diferenciacímu stupni* (tab. 3). Aktivita telomerázy vykazuje trend zvýšených hodnot s rostoucí dediferenciací nádoru. *Homogenita stanovení telomerázy* v individuálním nádoru byla ověřena opakovaným stanovením z jednoho řezu (variační koeficient se pohyboval do 30 %). Telomeráza v invazivním duktálním karcinomu T3 stanovená ve třech různých řezech vykazovala větší variační koeficient - 71 %. Tato vysoká variabilita odpovídá morfologické charakterizaci hodnocené v těsném sousedství odběru tkáně pro telomerázu a koreluje s obsahem nádorových buněk v preparátu. Podíl nádorových buněk (asi 80, 20 a 25 %) v těchto různých odběrech koreloval s aktivitou telomerázy (odpovídající RTA byla 2,630; 0,716 a 0,901).

Progresi onemocnění ve vztahu k RTA jsme hodnotili pouze v retrospektivní části souboru (tab.4). I když je ve skupině nemocných s progresí aktivita telomerázy vyšší, nedosahuje signifikantních hodnot. Významnost tohoto rozdílu bude zhodnocena ve větším souboru nemocných.

Ve skupině karcinomů prsu jsme neprokázali vzájemnou korelaci mezi *hladinou RTA a velikostí nádoru, postižením mléčných uzlin a oběma receptory steroidních hormonů*. Trend nepřímé asociace telomerázy a ER a PR byl nalezen pro skupinu nádorů vyšetřených v prospektivní části studie. Stanovení receptorů provedených v tomto období bylo provedeno ELISA technikou, výsledky tohoto stanovení se signifikantně liší od stanovení ligand-vazebnou metodou jak vlastní velikostí hladin obou receptorů, tak i procentem pozitivních nádorů (tab.5). Statisticky významných hladin dosahuje nepřímá korelace RTA s bezpříznakovým přežitím ($r_s = -0,5068$, $p < 0,0226$, $N = 20$), tentýž (statisticky neprůkazný) trend sleduje i celkové přežití ($N = 15$).

Diskuse

Expres telomerázy v přibližně 90 % maligních nádorů staví metodu jejího stanovení do popředí zájmu nejen pro možnosti diagnostiky, ale i terapie nádorů (10). S využitím PCR-amplifikace produktu telomerázové může být nyní tento ribonukleoprotein detekován s vysokou citlivostí, i když jeho hladina ve tkáni je velice nízká. Dřívější metody umožňovaly pouze kvalitativní testování aktivity telomerázy, a to za užití autoradiografie s detekcí radioaktivně značeného produktu. Kvantitativní stanovení *TeloTAAG PCR ELISA* má proti těmto metodám především přednost postupu bez radioaktivního značení vzorku. Společná amplifikace a následná specifická hybridizace vnitřního standardu v přítomnosti extraktu vzorku může upozornit na interferující látky v nádorovém extraktu, vedoucí k falešně negativním výsledkům (6). I když má tato metoda svoje omezení (nízké procento vzorků nelze stanovit vzhledem k interferenci vzorku s amplifikační PCR reakcí), umožňuje kvantitativní vyšetření s reprodukovatelností odpovídající několikastupňové analýze (7). Stabilita telomerázy po dobu minimálně 10 let byla potvrzena i v dalších studiích, které byly prováděny na souborech nádorů uložených v nádorové bance (11,12).

V našem souboru bylo zpracováno celkem 208 vzorků. Falešná negativita vlivem interference při PCR byla prokázána ve 4 % případů. Ve skupině karcinomů bylo nalezeno 27 % nádorů, jejichž aktivita telomerázy se pohybovala pod námi určenou diskriminační hranicí maligních a benigních hodnot. Naopak, 7 % případů benigních fyloidních nádorů nebo dysplastických tkání především odebraných v sousedství karcinomu vykazovalo vyšší aktivitu než byla určená cut-off. Tyto zvýšené hodnoty se však obvykle pohybovaly těsně nad diskriminační hranicí. Výsledky hodnocení našeho souboru mammárních nádorů odpovídají dosud publikovaným závěrům studií užívajících jiné kvalitativní metody průkazu telomerázy (11-18).

Příčina nízké nebo nulové aktivity telomerázy v určitém podílu nádorů prsu (5 – 20 %) je dosud neobjasněna. Jedna z možných

vysvětlení je heterogenita nádoru nebo degradace telomerázy ve vzorku. Bylo ověřeno, že při užití korekce měřené aktivity na nádorovou celularitu bylo nalezeno asi 1 % případů, kde v analyzovaném vzorku nebyla rRNA jako míra buněčnosti prokázána (11). Zjištěná heterogenita stanovení telomerázy v objemném nádoru odpovídá výsledkům vyšetření mnoha dalších parametrů, např. steroidních receptorů. Ve srovnání s vyšetřením na řezu tkáně se může jevit za určitých okolností analýza extraktu většího množství nádorového vzorku výhodou – charakterizuje spíše reprezentativní vzorek nádoru. Pečlivá histologická konfirmace nádoru a mikrodisekce pro analýzu aktivity telomerázy však mohou snížit negativitu maligních nádorů na 5 % (14).

Přes intenzivní studie zabývající se mechanismem ovlivnění exprese katalytické subjednotky telomerázy (hTERT), která je limitující determinantou telomerázové aktivity, není dosud jasné, zda některé maligní tumory nemohou mít skutečně její expresi blokovánou. Příčinou této inhibice by mohla být buď nepřítomnost pozitivně působících transkripčních faktorů, nebo naopak přítomnost aktivních represorů hTERT transkripcie (15).

Vztah telomerázy k histologickému podtypu nádoru nebyl jednoznačně prokázán, i když trend vyšších hodnot u invazivního duktálního karcinomu byl, podobně jako v našem souboru, nalezen (12). Telomeráza nevykazovala podle dřívějších studií provedených buď kvalitativní nebo semikvantitativní metodou korelaci s velikostí nádoru, postižením axilárních mizních uzlin a stupněm diferenciacie nádoru (11,16,17), i když přímý vztah ke gradingu byl také prokázán (12). V našem souboru jsme zvýšené hodnoty aktivity telomerázy s rostoucím stupněm dediferenciacie našli.

Nízká, spíše nulová aktivita telomerázy v benigních postiženích mléčné žlázy byla již dříve v malém procentu případů dokumentována (18,19). Užitou metodou jsme ověřili, že v mléčné žláze s dysplastickými změnami vykazuje telomeráza obvykle aktivitu na úrovni detekčního limitu použité metody. Přítomnost aktivní telomerázy v malém podílu vzorků koreluje pravděpodobně s přítomností drobných oblastí proliferace, což potvrzuje rovněž nálezy určitého podílu buněk této tkáně v S-fázi (19), obzvláště u mladých žen. Rovněž mammární kmenové buňky, které se diferencují buď v epiteliální nebo myoepiteliální buňky, mohou působit tuto slabou pozitivitu (19). O něco vyšší hladiny telomerázové aktivity dosahují fibroadenomy a fyloidní nádory, obzvláště maligního typu (18,20,21). Karcinomy in situ jsou poměrně často pozitivní (22).

Nedávno byly publikovány nové poznatky o vlivu estrogenu a progesteronu na regulaci telomerázy v cílové tkáni. Oba hormony se podílejí na transaktivaci vlastní katalytické podjednotky telomerázy (hTERT) (23,24). In vitro bylo prokázáno, že zatímco estrogen telomerázu aktivuje, dlouhodobý efekt progesteronu působí inhibičně proti estrogen-indukované aktivaci hTERT exprese (23,24). Ve tkáni primárních karcinomů prsu nebyla obvykle korelace telomerázy s ER a PR prokázána (16,25,26). V našem souboru jsme sice našli mezi těmito parametry (za užití ELISA techniky stanovení steroidních hormonů) náznak nepřímé korelace, podobně jako další autoři za užití ligand-vazebné analýzy (11). V obou souborech však nebyl vztah těchto parametrů statisticky výrazný. Vzájemné vztahy mezi mechanismy exprese steroidních receptorů a aktivitou telomerázy in vivo systémech je třeba ověřit na větších souborech.

Práce hodnotící prognostický význam telomerázy nejsou uzavřeny, je však zřejmé, že její vyšší aktivita koreluje s horší prognózou (11, 12), jak také naznačuje náš soubor nemocných. Přes určité omezení (PCR inhibice v malém procentu vzorků) je metoda kvantitativního stanovení aktivity telomerázy vhodná pro průkaz maligního fenotypu tkáně mléčné žlázy. Přestože je výsledný projev telomerázy ovlivněn dalšími ne přesně prostudovanými faktory (k nim patří délka telomer,

regulační proteiny, vlastní exprese katalytické podjednotky hTERT apod.), jeví se užití tohoto enzymu v některých oblastech onkologie významné. Vhodnost testování telomerázy v materiálu získaném odběrem tenkou jehlou v případech suspektního karcinomu prsu byla potvrzena mnoha studiemi (15,27-29). Význam využití stanovení telomerázy či jejích složek pro hodnocení minimálních či neinvazivních odběrů, při stanovení chemoresistence nádorů (30), při monitorování aktivity v séru (31) a při užití anti-telomerázové terapie bude pravděpodobně zhodnocen v blízké budoucnosti. Na modelu kvasinek byly nedávno popsány alternativní cesty udržování délky telomer (ALT) nezávislé na aktivitě telomerázy,

v nichž hraje roli jejich rekombinace. Přestože v procesu zachování délky telomer je v lidském nádorovém materiálu přisuzována dominantní role telomeráze (32), průběžně je studován i význam těchto i dalších mechanismů (33).

Poděkování. Autoři děkují paní L. Andřlové a H. Kvapilové za pečlivou technickou pomoc, a dalším pracovníkům MOÚ, především oddělení patologie a chirurgie, za poskytnutí definovaného klinického materiálu.

Práce byla provedena s podporou grantu MZ ČR M/17-3 a výzkumného záměru MZ 00020980501.

Literatura

1. Shay J. W., Wright W.: Telomerase activity in human cancer. *Current Opinion in Oncol.* 8, 1996, 66-71.
2. Breslow R., Shay J. W., Gazdar A. F., Srivastava S.: Telomerase and early detection of cancer: A National Cancer Institute workshop. *J. Nat. Cancer Inst.* 89, 1997, 618-623.
3. Hayflick L.: The illusion of cell immortality. *Br. J. Cancer* 83, 2000, 841-846.
4. Vasef M. A., Ross J. S., Cohen M. B.: Telomerase activity in human solid tumors. Diagnostic utility and clinical applications. *Am. J. Clin. Pathol.* 112 (Suppl.1), 1999, 68-75.
5. Kim N. W., Piatyszek M. A., Prowse K. R., Harley C. B., West M. D., Ho P. L. C., Coviello G. M., Wright W. E., Weinrich S. L., Shay J. W.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 1994, 2011-2015.
6. Wu Y. Y., Hruszkewycz A. M., Delgado R. M., Yang A., Vormeyer A. O., Moon Y. W., Weil R. J., Zhuang Z., Remaley A. T.: Limitations on the quantitative determination of telomerase activity by electrophoresis and ELISA based TRAP. *Clin. Chim. Acta* 293, 2000, 199-212.
7. Šimičková M., Pecen L., Nekulová M., Vagundová M., Pačovský Z., Černoch M.: Quantitative determination of telomerase activity in benign and malignant breast tumors. *Neoplasma*, zasláno do tisku.
8. Stoscheck Ch.: Increase uniformity in the response of the Coomassie Blue G protein assay to different proteins. *Anal. Biochem.* 184, 1990, 111-116.
9. Lang B. A., Černoch M., Vermousek I., Šimičková M., Stratil P., Rejthar A., Hlávková J., Sakalová J., Celý J.: Complex biochemical analysis of human breast tumor tissue. *Neoplasma* 36, 1989, 61-69.
10. Dome J. S., Look A. T.: Three molecular determinants of malignant conversion and their potential as therapeutic targets. *Current Opinion in Oncol.* 11, 1999, 58-67.
11. Clark G. M., Osborne C. K., Levitt D., Wu F., Kim N. W.: Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1997, 1874-1881.
12. Mokbel K., Parris C. N., Radbourne R., Ghilchik M., Newbold R. F.: Telomerase activity and prognosis in breast cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* 25, 1999, 269-272.
13. Šimičková M., Černoch M.: Význam stanovení aktivity telomerázy v onkologii. *Klin. onkologie* 12, 1999, 73-77.
14. Carey I., Hedican C. A., Henderson G. S., Umbricht C. B., Dome J. S., Varon D., Sukumar S.: Careful histological confirmation and microdissection reveal telomerase activity in otherwise telomerase-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 4, 1998, 435-440.
15. Kyo S., Takakura M., Taira T., Kanaya T., Itoh H., Yutsudo M., Ariga H., Inoue M.: Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucl. Acid Res.* 28, 2000, 669-677.
16. Bodnarek A. K., Sabin A., Brenner A. J., Johnston D. A., Aldaz C. M.: Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: Positive detection at the in situ breast carcinoma stage. *Clin. Cancer Res.* 3, 1997, 11-16.
17. Tsao J. L., Zhao Y., Lukas J., Yang X., Shah A., Press, M., Shibata D.: Telomerase activity in normal and neoplastic breast. *Clin. Cancer Res.* 3, 1997, 627-631.
18. Hiyama E., Gollahon L., Kataoka T., Kuroi K., Yokoyama T., Gazdar A. F., Hiyama K., Piatyszek M. A., Shay J. W.: Telomerase activity in human breast tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1996, 116-122.
19. Villa R., Zaffaroni N., Folini M., Martelli F. G., De Palo G., Daidone M. G., Silvestrini R.: Telomerase activity in benign and malignant breast lesions: A pilot prospective study on fine-needle aspirates. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 1998, 537-539.
20. Yashima K., Milchgrub S., Gollahon L. S., Maitra A., Saboorian M. H., Shay J. W., Gazdar A. F.: Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 4, 1998, 229-234.
21. Mokbel K., Ghilchik M., Parris C. N., Newbold R. F.: Telomerase activity in phyllodes tumors. *Europ. J. Surg. Oncol.* 25, 1999, 352-355.
22. Shpitz B., Zimlichman S., Zemer R., Bomstein Y., Zehavi T., Liverant S., Bernhim J., Kaufman Z., Klein E., Shapira Y., Klein A.: Telomerase activity in ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res. Treat.* 58, 1999, 65-69.
23. Kyo S., Takakura M., Kanaya T., Zhuo W., Fujimoto K., Nishio Y., Orimo A., Inoue M.: Estrogen activates telomerase. *Cancer Res.* 59, 1999, 5917-5922.
24. Wang Z., Kyo S., Takakura M., Tanaka M., Yatabe N., Maida Y., Fujiwara T., Hayakawa J., Ohmichi M., Koike K., Inoue M.: Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 60, 2000, 5376-5381.
25. Carey L., Kim N. W., Goodman S., Marks J., Henderson G., Umbricht C. B., Dome J. S., Dooley W., Amshey S. R., Sukumar S.: Telomerase activity and prognosis in primary breast cancers. *J. Clin. Oncol.* 17, 1999, 3075-3081.
26. Rha S. Y., Park K. H., Kim T. S., Yoo N. C., Yang W. I., Roh J. K., Min J. S., Lee K., Kim B. S., Choi J. H., Lim H. Y., Chung H. C.: Changes of telomerase and telomere lengths in paired normal and cancer tissue of breast. *Int. J. Oncol.* 15, 1999, 839-845.
27. Poremba C., Shroyer K. R., Frost M., Diallo R., Fogt F., Schafer K. L., Burger H., Shroyer A. L., Dockhorn-Dworniczak B., Boecker W.: Telomerase is a highly and specific molecular marker in fine-needle aspirates of breast lesions. *J. Clin. Oncol.* 17, 1999, 2020-2026.
28. Naritoku W. Y., Datar R., Li, P., Groshen S. J., Taylor C.R., Immam S. A.: Telomerase activity. Comparison between fine-needle aspiration and biopsy specimens for detection of tumor cells. *Cancer (Cancer Cytopathol.)* 87, 1999, 210-215.
29. Hiyama E., Saeki T., Hiyama K., Takashima S., Shay J.W., Matsuura Y., Yokoyama T.: Telomerase activity as a marker of breast carcinoma in fine-needle aspirated samples. *Cancer (Cancer Cytopathol.)* 90, 2000, 235-238.
30. Faraoni I., Graziani G., Turriziani M., Masci G., Mezzetti M., Testori A., Veronesi U., Bonmassar E.: Suppression of telomerase activity as an indicator of drug-induced cytotoxicity against cancer cells: In vitro studies with fresh human tumor samples. *Labor. Invest* 79, 1999, 993-1005.
31. Chen X. Q., Bonnefoi H., Pelte M. F., Liautey J., Lederrey C., Movarekhi S., Schaefer P., Mulcahy H. E., Stroun M., Anker P.: Telomerase RNA as a detection marker in serum of breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 6, 2000, 3823-3826.
32. Kass-Eisler A., Greider C. V.: Recombination in telomere-length maintenance. *TIMS* 25, 2000, 200-204.
33. Maláska J., Skleničková M., Krejčí K., Fajkusová L., Bajer M., Hrstková H., Fajkus J.: Telomerase activity and expression and telomerase activity in situ in the course of treatment of childhood leukemia. *Blood Cells Mo. Dis.* 20, 2000, 534-539.

NEOADJUVANTNI CHEMOTERAPIE U HRANIENI OPERABILNICH STADIÍ IIIA NEMALOBUNIEŇÉHO KARCINOMU PLIC KOMBINACI VINORELBIN A KARBOPLATINA.

NASLEDNA CILENA POOPERAENI ADJUVANTNI CHEMOTERAPIE

NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY BY VINORELBIN AND CARBOPLATIN IN marginally RESECTABLE STAGE IIIA OF NONSMALL CELL LUNG CANCER – FOLLOWED BY SELECTIVE ADJUVANT CHEMOTHERAPY AFTER SURGERY

¹KOLEK, V., ¹GRYGARKOVA, I., ²HAJDUCH, M., ²CHMELARŇOVA, A., ²TROJANEC, R., ³KLEIN, J., ³NEORAL, Ā., ⁴HERMAN, M., ³KRAL, V., ²MIHAL, V.

¹ KLINIKA PLICNICH NEMOCI, ² LABORATOŘ EXPERIMENTALNI MEDICINY DITSKÉ KLINIKY, ³ I.CHIRURGICKA KLINIKA, ⁴ ŰSTAV RADIOLOGIE LF UP A FN OLOMOUC

Souhrn: *Východiska:* Studie hodnotí neoadjuvantní léčbu vinorelbinem (30 mg/m²) a karboplatinou (AUC 6) před operací, po které následovala adjuvantní chemoterapie. *Materiál a metody:* V prospektivní studii bylo hodnoceno 20 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic stadia IIIA. *Výsledky:* Downstaging byl dosažen u 9 pacientů. Chirurgický zákrok mohl být uskutečněn u 14 pacientů. Methylthiazolyl tetrazolium blue (MTT) test, který hodnotí chemorezistenci in-vitro, byl proveden v případech, kdy to umožnilo vyšetření peroperačně získaného vzorku. Po vyhodnocení MTT testu byla podána selektivní adjuvantní chemoterapie. *Závěr:* Tolerance sledovaného režimu byla dobrá, dosažená operabilita byla srovnatelná s jinými prezentovanými soubory. Medián přežívání byl 25 měsíců u operovaných a 12,5 měsíců u jedinců, kteří nemohli být operováni. Pro posouzení vztahů mezi testy in-vitro a výsledky léčby in-vivo bude třeba provést další studie.

Klíčová slova : nemalobuněčný karcinom plic, neoadjuvantní chemoterapie, operabilita, testování chemorezistence in vitro, selektivní adjuvantní chemoterapie

Summary: *Backgrounds:* Present study evaluates the neoadjuvant treatment with vinorelbine (30 mg/m²) and carboplatin (AUC 6) before surgery, combined with adjuvant chemotherapy. *Materials and methods:* In a prospective study 20 patients with NSCLC stage IIIA were treated. *Results:* Downstaging was achieved in 9 patients. Surgery could be realised in 14 patients. Methylthiazolyl tetrazolium blue MTT test of in-vitro chemoresistance was performed when it was possible. Selective adjuvant chemotherapy was applied according to the results of MTT test. *Conclusions:* Tolerance of regimen was good, achieved operability was acceptable. Median survival was 25 month (after surgery) and 12.5 month (without surgery). Further studies on correlation between in-vitro and in-vivo results are necessary.

Key words: nonsmall cell lung cancer, neoadjuvant chemotherapy, operability, in-vitro chemoresistance, selective adjuvant chemotherapy

Úvod

Neoadjuvantní léčba hraničně operabilních stádií přinesla naději na zlepšení perspektivy života nemocných, u nichž připadala dříve v úvahu pouze chemoradioterapie, často kombinovaná s probatorní torakotomií. Po zavedení novějších cytostatik do léčby nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) se ukázalo, že chemoterapií je možné navodit snížení stadia nemoci nebo zmenšení primárního tumoru a dosáhnout provedení radikální operace (7, 10, 14). První studie byly velmi optimistické (9, 14, 15, 16) po stránce prodloužení života ve srovnání s pouhou operací. Dodnes však není jednota v názorech, u kterých nemocných a do jaké míry lze prodloužit život a jaké je riziko opačného průběhu s progresí nemoci ve fázi hraničně proveditelného výkonu. Nelze pominout diskuse o limitech neinvazivního i invazivního hodnocení stadia nemoci před operací (5) a způsobu dispenzarizace nemocných s klinicky definovanou remisi. Neoadjuvantní léčba se tak stala společným tématem především pro pneumoonkologii a chirurgii. Další otázkou je možnost predikce účinku chemoterapie

pomocí laboratorního hodnocení aktivity nádorových buněk přítomnosti onkogenů, markerů biologické aktivity nebo chemorezistence (14). Klinická aplikace uvedených laboratorních metod by znamenala nepochybně další posun v úspěšnosti chemoterapie NSCLC, která by se mohla stát efektivnější při selektivním podávání. V uvedené studii hodnotíme dosavadní zkušenosti s podáním režimu vinorelbín a karboplatina u hraničně operabilních stádií IIIA NSCLC s tím, že po laboratorním zhodnocení citlivosti nádorových buněk na cytostatika u operovaných nemocných byla následně podávána adjuvantní selektivní chemoterapie.

Metody

Jsou uváděny předběžné výsledky neoadjuvantní chemoterapie hraničně operabilních stádií IIIA NSCLC po 3 cyklech kombinace vinorelbín 30 mg/m² (den 1 a 8) a karboplatina (AUC 6 - den 1). Do studie byli zařazeni pacienti v celkově dobrém stavu (WHO 0-1) bez známek kontraindikace plánované operace a nemocní souhlasící s chemoterapií

a chirurgickým výkonem. Jako stádium IIIA byl akceptován rozsah při postižení ipsilaterálních hilových, mediastinálních a bifurkačních uzlin bez ohledu na etáž postižení a množství zvětšených uzlin. Zvětšení bylo posuzováno dle nálezu na CT s podanou kontrastní látkou. Byly aplikovány tři cykly uvedené chemoterapie a poté provedeno přehodnocení rozsahu nemoci. V případě snížení stádia nebo zmenšení tumoru byla indikována torakotomie a resekce nádoru s lymfadenektomií. Při operaci byla odebrána nádorová tkáň a vyšetřena in vitro rezistence buněk k cytostatikům pomocí MTT testu. Dle výsledku testu bylo pokračováno třemi cykly adjuvantní chemoterapie cytostatiky s nejlepšími výsledky in vitro testů. Pokud byly zjištěny histologicky pozitivní nitrohruční uzliny byla nemocným navržena radioterapie. Byla hodnocena tolerance chemoterapie, dosažená operabilita, výsledky MTT testu a přežívání nemocných.

Hodnocení rozsahu nemoci bylo prováděno pomocí rtg plic, bronchoskopie, CT plic a nadledvin, sonografie břicha, laboratorního vyšetření (KO, základní biochemie, LDH, AF, kalcium v séru), event. scintigrafie skeletu a CT mozku. Vedlejší účinky léčby byly hodnoceny dle škály ECOG. MTT test byl prováděn v Laboratoři experimentální medicíny dle metodiky popsané dříve (6). Jde o test hodnotící přežívání buněk při různých koncentracích cytostatik pomocí vitálního barviva (methylthiazolyl tetrazolium blue). Toto barvivo je v mitochondriích živých buněk redukováno na barevný formazan, jehož množství se měří fotometricky. Z procenta přežívajících buněk v různých koncentracích cytostatik se určuje dávka léčiva smrtící 50% nádorových buněk. Přežívání bylo hodnoceno po rozdělení na dva soubory: radikálně operovaní a neoperovaní.

Výsledky

Do studie bylo zařazeno 20 nemocných (17 mužů a 3 ženy). Průměrný věk byl 60,8 let (45 - 70 let). Spinocelulární karcinom byl přítomen u 15, adenokarcinom u 4 a nediferencovaný u 1 nemocného (tabulka 1).

Všichni zařazení dokončili plánovanou neoadjuvantních chemoterapii. Tolerance léčby je znázorněna v tabulce 2. Nejčastější vedlejší účinky st. 2 a 3 byly pozorovány: zvracení, anorexie a neutropenie. Minimálně se vyskytla slabost, anemie, trombocytopenie, febrilní stavy, alopecie a kožní toxicita. Podání chemoterapie muselo být odsunuto ve 4 případech.

Výsledky neoadjuvantní chemoterapie ukazuje tabulka 3. Bylo dosaženo snížení stádia u 9 nemocných, zmenšení tumoru bez změny stádia u 5, v 1 případě se rozsah tumoru nezměnil a u 5 nemocných došlo k progresi nemoci. Operováno bylo 14 pacientů. Jeden pacient se zmenšeným nádorem léčbu odmítl. U operovaných byly při lymfadenektomii zjištěny nádorově infiltrované nitrohruční uzliny u 10 nemocných. Po kontrole resekční linie byla operace pokládána za radikální u 13 pacientů. Během výkonu a v perioperačním období se nevyskytly žádné komplikace, které by mohly souviset s předchozím podáváním cytostatik. Jeden pacient zemřel 12. den po operaci na plicní embolii. Provedena byla pneumonektomie u 6, bilobektomie u 2 a lobektomie u 6 pacientů.

Při operaci byla u 10 pacientů odebrána nádorová tkáň a prováděn MTT test s maximálním počtem 12 cytostatik. Jeho vyhodnocení bylo provedeno v Laboratoři experimentální medicíny. Jako limit bylo stanoveno přežívání více než 50% buněk při dané sérové koncentraci cytostatika. Výsledky ukazuje tabulka 4. Ukázalo se, že pokud bylo možno vyhodnotit dostatečné množství cytostatik (u 6 pacientů), byla zbytková populace buněk in vitro zcela rezistentní k podávanému vinorelbinu a u 50% vzorků rezistentní ke karboplatině.

V adjuvantních režimech byly preferovány jiné léky, ty s optimálními výsledky v MTT testu. Takto byly aplikovány ve dvojkombinacích docetaxel, paklitaxel, cisplatin, gemcitabin, doxorubicin, epirubicin, vepesid, event. ifosfamid, který nebyl testován in vitro.

Selektivní adjuvantní chemoterapii trvající 3 cykly zatím dokončilo 12 pacientů. Výskyt vedlejších účinků ukazuje tabulka 5. Nejčastějšími nežádoucími účinky byla anorexie, zvracení, slabost, neutropenie, febrilní stav, myalgie, méně často anemie, parestezie a infekce. Radioterapii na oblast nitrohručních uzlin podstoupili 3 pacienti.

Výsledky přežívání hodnotí tabulka 6. Průměrné přežívání operovaných nemocných bylo 23,2 měsíců (medián 25 m) od stanovení diagnózy, což je 19,6 m od operace. Jde o předběžný údaj, neboť zatím většina z nich (12) žije.

Nemocným, kteří nebyli radikálně operováni byla navržena radioterapie a pokračování v chemoterapii (3 cykly). Přežívání u těchto nemocných bylo 10,3 měsíce (medián 12,5 m). Doposud žijí jen 3 pacienti.

Diskuse

Naše dosavadní výsledky lze porovnat s literárními údaji, které většinou ukazují benefit neoadjuvantní terapie jak po stránce dosažené operability tak po stránce přežívání. Je možno citovat práce skupin Passeho (11), Rossela (13), Rushe (17), Rotha (15) a dalších, které ukázaly výrazné zvýšení operability u stádií IIIA (někdy i IIIB) a dosažení signifikantního rozdílu v přežívání mezi nemocnými operovanými po neoadjuvanci nebo bez ní. Výsledky těchto studií ukazuje tabulka 7. Mnohé následující práce sice přinesly podobné výsledky, ale stále se jedná o poměrně malé soubory s udávaným třiletým přežíváním od 46% do 49% nemocných (2, 3, 8). Kombinace s chemoradioterapií zatím ukazují možnost dalšího zvýšení operability při větším množství komplikací (1, 19). Z našich autorů se touto problematikou zabývala Špásová (18) a Pešek (12).

Smyslem neoadjuvantní chemoterapie zůstává zničení vzdálených mikrometastáz, „sterilizace“ regionálních uzlin, cyto redukce primárního nádoru, dosažení operability, zvýšení možnosti trvalého vyléčení a prodloužení života. Zatím se málo ví o prediktivních faktorech úspěšné neoadjuvance. Může to být dosažení snížení stádia, peroperační negativita nitrohručních uzlin a provedení kompletní resekce. Může se podílet i velikost primárního tumoru a přítomnost biologických markerů (K-ras, p53 mut. apod). Málo je známo o optimálních kombinacích a dávkách chemoterapie. Zásadní zhodnocení přínosu neoadjuvance bude možné až po dokončení větších randomizovaných studií s novými cytostatiky. V praxi dnes převažují tendence nasazovat chemoterapii s potenciálním úmyslem operace s tím, že hodnocení se provádí nejčastěji po 3 cyklech.

V našem souboru bylo dosaženo vysoké operability a celou plánovanou neoadjuvantní léčbu dokončili všichni nemocní. Uvedené schéma vinorelbinu a karboplatiny se tedy jevílo před operací proveditelné a dobře tolerované. Výhodou byla možnost podávání neoadjuvantní léčby ambulantním způsobem. Výsledky byly srovnatelné s režimy užívanými dvojkombinací cisplatin, vinorelbin (8) nebo trojkombinací gemcitabin, cisplatin, vinorelbin (2). Toxicita dvojkombinace karboplatina, vinorelbin v našem režimu však byla významně menší.

Hodnocení přínosu MTT testu a významu selektivní adjuvantní léčby je obtížné z mnoha hledisek. Technicky se ne vždy podaří odebrat reprezentativní vzorek tkáňe, během odběru a testování může dojít k bakteriální kontaminaci. Iničiální výsledky ukazují, že po úspěšné neoadjuvantní léčbě přetrvávají v nádoru buňky rezistentní na podanou cytostatiku a že v další léčbě by se měly používat již jiné léky. Sledování korelace in vitro a in vivo výsledků ale vyžaduje velké homogenní soubory, dlouhodobé sledování nemocných a úzkou spolupráci pracovníků více klinických i laboratorních oborů.

Hodnocení každé adjuvantní chemoterapie je obecně obtížné především z časových důvodů a mnohé multicentrické studie ještě stále nebyly dokončeny (IALT, Anita). Smyslem by měla být především eliminace zbytkových populací nádorových buněk, především vzdálených metastáz. Otázkou zůstává mimo

jiné časové zařazení radioterapie a především výběr cytostatik. Uvedená studie nemohla odpovědět na většinu z uvedených otázek, ale ukazuje jednu z možných cest multimodální léčby bronchogenního karcinomu. Věříme, že zásadnější závěry bude možné vyvodit z většího souboru v delším časovém odstupu.

Závěr

Léčebné schéma vinorelbin a carboplatina je efektivním neoadjuvantním režimem u nemalobuněčného karcinomu plic. Lze dosáhnout vysokého procenta operability, aniž by se zhoršoval perioperační průběh onemocnění. Při použití MTT testu lze pokračovat selektivní adjuvantní chemoterapií optimální kombinací cytostatik. Vliv na přežívání nemocných bude možno zhodnotit až v delším časovém odstupu.

Práce byla podporována výzkumným záměrem MSM: 15110000/1 a grantem IGA MZ ČR 4132-5.

Tabulka 1: Hodnocený soubor nemocných

počet pacientů	20	spinocelulární ca	15
mužů	17	adenokarcinom	4
žen	3	dediferencovaný	1
prům. věk (let)	60,8		

Tabulka 2: Tolerance neoadjuvantní léčby (vinorelbin a carboplatina) (hodnoceno 60 cyklů)

příznak	gr 2	gr 3	gr 4
anorexie	9 (15,0%)	1 (1,7%)	
nausea	16 (26,7%)		
zvracení	8 (13,3%)		
leukopenie	5 (8,3%)	1 (1,7%)	
neutropenie	4 (6,7%)	2 (3,4%)	2 (3,4%)
anemie	1 (1,7%)		
trombocytopenie	1 (1,7%)		
slabost	1 (1,7%)	1 (1,7%)	
flebitida	1 (1,7%)		
infekce	1 (1,7%)		
febrilie	1 (1,7%)		
alopecie	1 (1,7%)		

Tabulka 3: Efekt neoadjuvance

snížení stadia	9 (45%)	operováno	14 (64%)
zmenšení tumoru	5 (25%)	pneumonektomie	6 (30%)
stabilizace	1 (5%)	lobektomie	6 (30%)
progrese	5 (25%)	bilobektomie	2 (10%)

Tabulka 4: Výsledky MTT testu

cytostatikum	počet vyš.	rezistence
cisplatina	6	50%
paclitaxel	5	66%
docetaxel	5	80%
etoposid	5	100%
karboplatina	4	50%
vinorelbin	4	100%
topotecan	3	66%
gemcitabin	1	100%

Tabulka 5: Tolerance selektivní adjuvantní chemoterapie (hodnoceno 38 cyklů)

příznak	gr 2	gr 3
anorexie	10 (26,3%)	
nausea	10 (26,3%)	
zvracení	7 (18,4%)	
leukopenie	6 (15,8%)	
neutropenie	5 (13,2%)	4 (10,5%)
slabost	5 (13,2%)	1 (2,6%)
febrilie	4 (10,5%)	
myalgie	3 (7,9%)	
anemie	1 (2,6%)	
trombocytopenie	1 (2,6%)	
parestezie	1 (2,6%)	
kardiotoxicita	1 (2,6%)	

Tabulka 6: Dosavadní výsledky přežívání nemocných

	průměrná délka (m)	medián přežití (m)	počet žijících
operovaní	23,2	25	12 (85%)
neoperovaní	10,3	12,5	3 (50%)

Tabulka 7: Publikované soubory neoadjuvantní chemoterapie u NSCLC

autor skupina	rok	IIIA/IIIB	režim	RR %	operability %	medián m	5 let %
Pass	1992	IIIA	PE	62	86	28	30
Rusch	1993	IIIA/B	PE	69	76	17	
Martini	1993	IIIA	MVP	77	65	27	26
Rosell	1994	IIIA	MIP	63	77	26	25
Roth	1994	IIIA	CEP	35	61	64	21

Pozn.: P- platina, E -etoposid, M- mitomycin, I- ifosfamid, C- cyklofosfamid, V-vinkristin

Literatura

- Albain, K., Rusch, V., Crowley, J., a spol.: Long-Term Survival After Concurrent Cisplatin/Etoposide (PE) Plus Chest Radiotherapy (RT) Followed By Surgery in Bulky, Stages IIIA (N2) and IIIB Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): 6-Year Outcomes from Southwest Oncology Group Study 8805. Proceedings of ASCO, 18, 1999, s. 467a.
- Cueva, J.F., Grande, C., Firvida, J.L., a spol.: A Lung Cancer Galician Group Phase II Trial: Neoadjuvant Gemcitabine, Cisplatin and Vinorelbine for Poor Risk Stage III Non Small Cell Lung Cancer. Proceedings of ASCO, 18, 1999, s. 500a.
- Depierre, A., Milleron, B., Lebeau, B., a spol.: An ongoing randomized study of neoadjuvant chemotherapy in resectable non-small cell lung

- cancer. Sem. Oncol., 21, 1994, č. 3, Suppl. 4, s. 16 – 19.
- Depierre, A., Milleron, B., Moro, D., a spol.: Phase III Trial of Neoadjuvant Chemotherapy (NCT) in Resectable Stage I (except T1NO), II, IIIa Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): The French Experience. Proceedings of ASCO, 18, 1999, s. 465a.
- Ginsberg, R.J.: Invasive and noninvasive techniques of staging potentially operable lung cancer. Semin. Surg. Oncol., 6, 1990, č. 2, s. 244 – 247.
- Hajdúch, M., Mihál, V., Minařík, J., Fáber, E., Šafářová, M., Weigel, E., Antálek, P.: Decreased in-vitro chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant diseases with a poor prognosis. Cytotechnology, 19, 1996, č. 2, s. 243 - 255.
- Chevalier, L., Arriagada, R., Baldeyrou, P., a spol.: Combined treatment

- modalities in non-small cell lung cancer: a French experience. *Lung Cancer*, 9, 1993, č. 2, s. 249 – 252.
8. Jahan, T.M., Clary-Macy, C., David, G., a spol.: A Feasibility Study of Neoadjuvant Vinorelbine and Cisplatinum for Patients with Early Stage, Resectable Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Proceedings of ASCO*, 18, 1999, s. 510a.
 9. Martini, N., Flehinger, B., Zaman, M., Beattie, E.J.: Results of resection in non-oat cell carcinoma of the lung with mediastinal lympho nodes metastases. *Ann. Surg.*, 19, 1983, č. 3, s. 386 – 397.
 10. Martini, N., Kris, M.G., Flehinger, B.J., a spol.: Preoperative chemotherapy for stage IIIa (N2) lung cancer: the Sloan-Kettering experience With 136 patients. *Ann. Thorac. Surg.*, 55, 1993, č. 5, s. 1365 – 1374.
 11. Pass, H.I., Pogrebniak, H.W., Steinberg, S.M., et al.: Randomized trial of neoadjuvant therapy for lung cancer: interim analysis. *Ann. Thorac. Surg.*, 53, 1992, s. 992 – 998.
 12. Pešek, M., a kolektiv : Kombinovaná léčba bronchogenního karcinomu v letech 1990 – 1998. Zkušenosti s cytostatiky III. generace. *Plzeň. Lék. Sbor. Suppl.* 73, 1999, s. 5 - 51.
 13. Rosell, R., Gomes-Codina, J., Camps, C., a spol.: A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 330, 1994, č. 3, s. 153 – 158.
 14. Rosell, R., Li, S., Skacel, Z.: Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene*, 8, 1993, č. 6, s. 2407 - 2412.
 15. Roth, J.A., Fossella, F., Komaki, R., a spol.: A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIa non-small cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86, 1994, č. 9, s. 673 – 680.
 16. Rusch, V.W., Albain, K.S., Crowley, J.J., a spol.: Neoadjuvant therapy: a novel and effective treatment for stage IIIb non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.*, 58, 1994, č. 2, s. 290 – 295.
 17. Rusch, V.W., Alvain, K.S., Crowley, J.J. a spol.: Surgical resection of stage IIIA and stage IIIB non-small-cell lung cancer after concurrent induction chemoradiation therapy: A Southwest Oncology Group Trial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1993, č. 1, s. 105 – 197.
 18. Špášová, I., Havel, L.: Indukční chemoterapie u nemalobuněčného plicního karcinomu stadia III. *Stud. Pneumol. Phtiseol.*, 57, 1997, č. 5, s. 214 – 217.
 19. Thomas, M., Rube, Ch., Semik, M., a spol.: Randomized Trial of Chemotherapy (CT) and Twice-Daily Chemoradiation (hRT/CT) versus Chemotherapy (CT) Alone Before Surgery in Stage III Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Interim Analysis of Toxicity. *Proceedings of ASCO*, 18, 1999, s. 458 a.

knihy

CLINICAL RADIATION ONCOLOGY - INDICATIONS, TECHNIQUES, AND RESULTS, SECOND EDITION

C. C. WANG (Ed.)

Wiley-Liss, New York - Chichester 2000
767 str., 206 obr. (6 barev. snímků), 165 tab.,
ISBN 0-471-23803-1, cena 139,- GBP

Za spolupráce 22 odborníků vychází ve druhém vydání kniha o klinické radiační onkologii sestávající z 15 kapitol. Prvé tři kapitoly jsou věnovány základním pojmům a disciplinám radiační onkologie - radiační biologie a radiační fyzice. Následují rozsáhlé kapitoly o zhoubných nádorech kůže, hlavy a krku, prsu, plic a jícnu, gastrointestinálního a genitourinárního traktu, gynekologických nádorech, sarkomech měkkých tkání, nádorech CNS, lymfomech a nádorech u dětí. Poslední kapitola pojednává o nových radioterapeutických postupech.

První kapitola představuje výstižný úvod do radiační onkologie, v němž se konstatuje, že moderní praxe radioterapie vyžaduje složité technické zázemí a zdůvodňování; určité zpomalení nárůstu léčitelnosti zhoubných nádorů pozorované v posledních letech by mělo být podnětem k dalšímu zdokonalování postupů a hledání jejich nejvhodnějších kombinací. Část druhé kapitoly o radiační biologii pojednává o nových přístupech k optimalizaci radioterapie - modulaci apoptózy a antiangiogenézi jako prostředků k potlačení nádorového bujení. Ve třetí kapitole je značná pozornost věnována charakteristikám používaných svazků fotonů a elektronů a dozimetrickým metodám.

Složení klinických kapitol bude blíže ilustrováno na dvou náhodně vybraných pojednáních. Názvy odstavců v kapitole o nádorech prsu: úvod, stážování, lobulární karcinom in situ, duktální karcinom in situ, invazivní nádor prsu v I. a II. stadiu, neoadjuvantní chemoterapie v časném stadiu, lokálně pokročilý nádor prsu, radioterapeutické techniky, komplikace radioterapie. Text je doprovázen množstvím tabulek shrnujících výsledky léčby chirurgickými, chemoterapeutickými a radioterapeutickými postupy nebo jejich kombinací, jež byly publikovány v odborné literatuře. Podkapitola o nádorech močového měchýře sestává z odstavců o výskytu a patologii,

klinickém hodnocení, volbě léčebných postupů a radioterapeutických metodách.

Z nových metod používaných v radioterapii je ve třetí části knihy popsána léčba svazkem protonů, alterovaná frakcionace léčby hlavy a krku, intraoperativní ozařování svazkem elektronů (IOERT) a konformní 3D radioterapie. Uvádí se, že terapie protony nepředstavuje revoluční krok v radioterapii; ve spojení s trojrozměrným plánováním léčby může být její význam srovnáván s evolučními přínosy supervoltážního rentgenového záření, afterloadingové brachyterapie a zavedení elektronových svazků. Alterovanou frakcionací při terapii nádorů hlavy a krku se rozumí hypofrakcionace (např. 4 až 5 Gy/f ve 3 až čtyřech dnech v týdnu), „split-course“ frakcionace (1,8 - 2 Gy/f/den s přestávkou dva až tři týdny), hyperfrakcionace (1,15 až 1,2 Gy dvakrát denně s přestávkou mezi frakcemi 4 hodiny a více) a urychlená frakcionace (2 Gy/2 - 3 f/den). Budoucnost IOERT je v integraci této metody do multimodálních léčebných programů při léčbě lokálně pokročilých nádorů hlavy a krku, nádorů v hrudníku, břiše a pánvi.

Text této knihy se vyznačuje především stručností a jasnými formulacemi v partiích tradičně obtížných pro výklad. Dále je pozoruhodný značný respekt k hojně citované rozsáhlé literatuře, např. za kapitolou o nádorech prsu se uvádí úctyhodný počet 628 položek. Ve srovnání s některými jinými knihami o radiační onkologii je méně místa věnováno popisu vlastních léčebných metod. Oproti prvnímu vydání bylo mnoho kapitol zcela přepracováno a doplněno, vzhledem k omezenému prostoru vyžadovanému u druhého vydání byly některé kapitoly zcela vynechány. Vzhledem k rozsahu textu by si kniha zasloužila větší počet ilustrací a k její větší přehlednosti by přispělo číslování podkapitol a odstavců. Zvláštností také je, že zde nenalezneme pracoviště editora a adresy řispijících odborníků. Celkově lze o této sympatické knize říci, v souhlase s předmluvou editora, že text obsahuje praktické myšlenky a informace užitečné pro radiační onkology v jejich denní praxi; kniha se uplatní i u onkologů, chirurgů a praktických lékařů majících v péči pacienty s maligním onemocněním.

V. H.

VÝZNAM CALIFORNIA-252 PRO ZLEPŠENÍ RADIOKURABILITY RAKOVINY HRDLA DÍLOŽNIHO - DLOUHODOBÉ LÉČEBNÉ VÝSLEDKY

IMPORTANCE OF CALIFORNIUM-252 FOR A BETTER RADIO-CURABILITY OF CARCINOMA OF THE CERVIX UTERI: LONG-TIME TREATMENT RESULTS PRESENTED

TAEV T., PTAJKOVA B., STRNAD V., KOUKALOVA H., KRYŠTOF V., RAŠOVSKA O.

MASARYKOV ONKOLOGICKÝ USTAV, BRNO

Souhrn: Východiska: Při fotonové radioterapii cervikálního karcinomu, přes výrazný pokrok v technice radioterapie a quality assurance, nedochází k výraznějšímu zlepšení léčebných výsledků v důsledku rozdílné radiosenzitivity různých nádorových populací. Použití California-252, jako zdroj gama-neutronového záření v brachyterapii, vytváří předpoklady k překonání této rezistence. Typ studie a soubor: Od ledna 1985 do prosince 1992 bylo v randomizované studii léčeno 294 nemocných s cervikálním karcinomem, z nich 184 (81 II.st. a 103 III st.) bylo intrakavitárně léčeno ²⁵²Cf a 110 (50 II.st. a 60 III st.) pouze zářením gama. Kritéria randomizace byly věk, stadium onemocnění, histologie a histopatologický grading. Metody a výsledky: U všech nemocných byla intrakavitárně aplikována stejná dávka 56 Gy- ekvivalentní, doplněna zevním ozářením dávkou 40 Gy. Souhrnná aplikovaná dávka byla v bodě A 85 Gy resp. 59 Gy v bodě B. U léčených ²⁵²Cf byly tyto zdroje aplikovány v 1. týdnu léčby za použití uvedených schémat: u 23 nemocných byla aplikována pouze dávka 9 Gy (56Gy-ekv) neutronové komponenty, u 117 a 44 nemocných byla aplikována dávka 6 Gy (40 Gy-ekv) resp. 2 Gy (16 Gy-ekv) neutronové komponenty doplněna zářením gama dávkou 16 resp. 40 Gy. RBE neutronové komponenty byla v hodnotě 6. U nemocných léčených pouze zářením gama byla intrakavitárně dávka 56 Gy aplikována ve dvou frakcích. Výsledky 5-tiletého přežití jsou u léčených ²⁵²Cf o 14,3 % (70,6 % vs. 56,3 %) ($p < 0,05$) lepší oproti konvenčnímu postupu léčby a zlepšují se s pokročilostí onemocnění, kde u IIb st. činí tento rozdíl 11,9 % (83,9 vs. 72,0 %) a u IIIb st. 16,9 % (60,2 % vs. 43,3 %) ($p < 0,05$). Lepší přežití u léčených ²⁵²Cf je důsledkem signifikantního snížení výskytu recidiv v pánvi o 16,1 % (20,7 % vs. 31,8 %), které u IIIb st. činí až 24,7 % (20,3 % vs. 45 %). Použití ²⁵²Cf v brachyterapii cervikálního karcinomu dále signifikantně snižuje výskyt časných postiradiačních proktitid a minimalizuje komplikaci léčby. Závěry: Použití ²⁵²Cf v brachyterapii cervikálního karcinomu vytváří kvalitativně nové předpoklady pro signifikantní zlepšení léčebných výsledků a snížení vedlejších reakcí a komplikace léčby.

Klíčová slova: rakovina hrdla děložního - brachyterapie - 252-Californium - léčebné výsledky

Abstract: Backgrounds: When applying photon radiotherapy at the cervical carcinoma it has been stated that, in spite of an important progress in the radiotherapy technique and quality assurance, and consequently of different radiosensitivity in various tumorous populations, a pronounced progress of curative results has not been reached. The application of ²⁵²Cf as a source of gamma-neutron radiation in brachytherapy creates certain presuppositions to overcome this resistency. Design and Subjects: Since January 1985 and till December 1992, 294 patients with a cervical carcinoma were, in a randomized study, cured out of which 184 (81 IIb. and 103 IIIb. grades) were treated intracavitarily ²⁵²Cf and 110 (50 IIb. and 60 IIIb. grades) patients were treated by gamma radiation only. As criteria of randomized choice the patients' age, progress of illness, histology and histological grading were applied. Methods and Results: In all patients an equal dosis of 56 Gy-equivalent was intracavitarily applied, supported by external radiation of 40 Gy. The total applied dosis in point A was 85 Gy, or 59 Gy in point B, resp. In patients treated by ²⁵²Cf these sources were applied in the first treatment week while using the following schemes: in 23 patients only a dosis of 9 Gy (56 Gy-eq) of the neutron component was applied, whereas in 117 and 44 patients a dosis of 6 Gy (40 Gy-eq) or 2 Gy (16 Gy-eq) of the neutron component were used, added by gamma radiation of 16 or 40 Gy, resp. RBE of the neutron component had the value 6. In patients treated by gamma radiation was the intracavitary dosis of 56 Gy applied in the two fraction. The results of 5-year survival scoring in ²⁵²Cf patients are 14,3% (70,6% vs. 56,3%; $p < 0,05$) better when compared with a conventional treatment, and they are even better than that in more progressive grades of illness where in IIb. grade this difference makes 11,9% (83,9% vs. 72,0%), and IIIb grade making 16,9% (60,2% vs. 43,3%; $p < 0,05$). A better survival scoring in ²⁵²Cf patients is the result of a significant decrease of relapse cases in the pelvis of 16,1% (20,7% vs. 31,8%), which in IIIb. gr. cases amounts to 24,7% (20,3% vs. 45,0%). The ²⁵²Cf application in the brachytherapy of cervical carcinoma significantly reduces the early postirradiation proctitides and minimizes treatment risks. Conclusions: The ²⁵²Cf application in the brachytherapy of cervical carcinoma creates totally new quality prerequisites for significantly better treatment results and a lowering of side effect and treatment complications.

Key words: carcinoma of the cervix uteri, brachytherapy, 252-Californium, treatment results

Radioterapie má u rakoviny čípku děložního dominantní postavení, protože umožňuje u nemocných s pokročilým, již inoperabilním nádorem, relativně vysoké léčebné přežití. Dosahované léčebné výsledky jsou důsledkem kombinovaného postupu radioterapie umožňující aplikaci vysoce tumorocidní dávky ozářením v oblasti primárního nádoru a spádového lymfatického řečiště.

Výrazný pokrok v technice ozáření a quality assurance za uplynulých třicet let nezpůsobil významné zlepšení léčebných výsledků. Stagnace radiokurability cervikálního karcinomu, v podmínkách konvenční fotonové terapie je nutné vidět v příčinné souvislosti s charakteristickou interakcí fotonů s buněčnými elementy nádorů. Následně biologické změny, podmiňující smrt nádorových buněk, nejsou

důsledkem přímé interakce, ale vznikají zprostředkovaně prostřednictvím četných faktorů a jevů na buněčné a tkáňové úrovni. Největší vliv má zde stav oxigenace nádorové tkáně, faktory buněčné kinetiky, včetně schopnosti reparace radiačního poškození a dalších inherentních vlivů, které ve svém souhrnu podmiňují rozdíly v radiosenzitivitě buněk různých nádorových populací (24).

Rezistenci nádorů, v podmínkách fotonové terapie, je možné překonat léčbou zářením s vysokým LET (lineární přenos energie), jako jsou např. neutrony, nebo použitím modifikátorů radiačního efektu. Použití neutronů k zevnímu ozařování je stále problematické, ekonomicky náročné s potenciálně větším nebezpečím pozdního poškození zdravých tkání.

V roce 1950 byl objeven prvek 244- Californium (36) a posléze v roce 1956 jeho nuklid 252- Californium (5), zdroj záření alfa, při jehož spontánním rozpadu dochází k emisi neutronů a doprovodného záření beta a gama. Při střední energii spektra neutronů v intervalu 2,10 - 2,37 MeV je jejich měrná emise $2,3 \cdot 10^{12} \text{ s}^{-1} \text{ g}^{-1}$, tedy dostatečně vysoká pro použití v brachyterapii nádorů.

Záhy po objevení nového zdroje vznikla představa o jeho použití v brachyterapii nádorů, která se stala podnětem k předběžným pokusným aplikacím ^{252}Cf v vybraných nádorových lokalizacích. Vzhledem k neúplnosti poznatků o fyzikální a biologické podstatě zdroje byly dosaženy značně rozpačité výsledky (1,3,25,26,38,41). Soustavný klinický výzkum byl zahájen až v sedmdesátých letech a to na Lexingtonske University v USA při léčbě pokročilého nádoru hrdla děložního a ve Výzkumném radiologickém centru v Obninsku, Rusko u nádorů dutiny ústní. Již první dlouhodobé léčebné výsledky u cervikálního karcinomu potvrdily, že v kombinované léčbě se zářením gama dochází k signifikantnímu zlepšení léčebných výsledků pouze za předpokladu aplikace gama-neutronového záření ^{252}Cf v iniciační fázi léčebného cyklu (16, 19).

Tyto výsledky se v roce 1985 staly východiskem k vybudování experimentálního pracoviště pro neutronovou brachyterapii (27) na radioterapeutickém oddělení Masarykova onkologického ústavu v Brně. Výzkumný program byl zaměřen na použití ^{252}Cf v brachyterapii rakoviny čípku děložního. Kromě klinicko-experimentální studie, zaměřené k optimalizaci léčebných postupů (29), součástí programu byla klinická studie porovnání léčebného efektu ^{252}Cf a pouze záření gama v brachyterapii cervikálního karcinomu za aplikace stejné Gy-ekvivalentní dávky. Zde uvádíme dlouholeté léčebné výsledky.

Materiál a metodiky

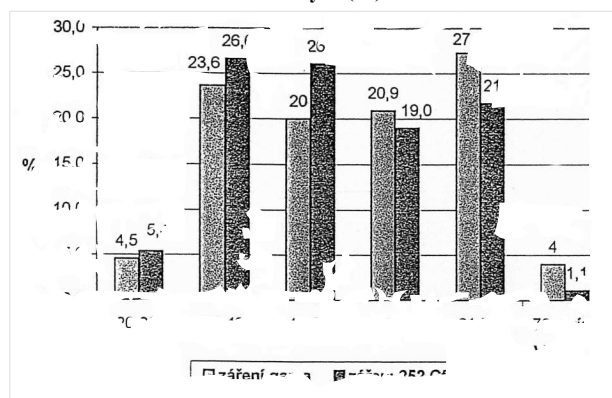
Od ledna 1985 do prosince 1992 bylo léčeno 294 nemocných s pokročilým nádorem hrdla děložního, z nich 184 (81 IIb st. a 103 IIIb st.) bylo léčeno intrakavitárně zdroji ^{252}Cf a 110 (50 IIb st. a 60 IIIb st.) pouze zdroji záření gama. Stadium pokročilosti onemocnění bylo stanovováno dle klasifikačního systému FIGO.

K vyloučení vlivu možných subjektivních chyb bylo vyšetření, léčba a dlouhodobé sledování nemocných prováděno stejným kolektivem lékařů. Kritéria randomizace nemocných do skupin byly následující: stadium pokročilosti onemocnění, věk v době zahájení léčby, histologie a histopatologický grading. Při zařazování nemocných do skupin byla uvedena kritéria zohledněna tak, aby nevznikly u porovnávaných souborů signifikantní rozdíly v zastoupení jednotlivých parametrů. Graf 1. uvádí věkové rozložení nemocných v porovnávaných souborech a tab. 1. a 2. histologickou strukturu a histopatologický grading.

Při intrakavitární léčbě zdroji ^{252}Cf jsme vycházeli z empirického zjištění Maruyamy, že pouze aplikace v iniciační fázi léčebného cyklu způsobuje zlepšení léčebných výsledků (16). Vycházeli jsme také z výsledků naší optimalizační studie (31,32,33).

K přepočtu fyzikální dávky ^{252}Cf v Gy-ekvivalentní byla použita rovnice

Graf 1. Věkové rozložení nemocných (%)



Tab. 1. Rozložení nemocných v souborech podle histologie

	ca spinocellulare	adeno-ca
léčené pouze záření gama		
stadium IIb (n=50)	48 96 %	2 4 %
stadium IIIb (n=60)	56 93 %	4 6 %
celkem (n=110)	104 94 %	6 5 %
léčené 525-Cf		
stadium IIb (n=81)	77 95 %	4 5 %
stadium IIIb (n=103)	92 89 %	11 10 %
celkem (n=184)	169 92 %	15 8 %

Tab. 2. Rozložení nemocných v souborech podle histopatologického gradingu

	G1	G2	G3	G4	nezjištěno
záření gama					
stadium IIb (n=50)	4 8,0 %	13 26,0 %	20 40,0 %	5 10,0 %	8 16,0 %
stadium IIIb (n=60)	3 5,0 %	15 25,0 %	25 41,7 %	9 15,0 %	8 13,3 %
celkem (n=110)	7 6,4 %	28 25,5 %	45 40,9 %	14 12,7 %	16 14,5 %
záření 525-Cf					
stadium IIb (n=81)	8 9,9 %	22 27,2 %	40 49,4 %	4 4,9 %	7 8,6 %
stadium IIIb (n=103)	5 4,9 %	22 21,4 %	53 51,5 %	13 12,6 %	10 9,7 %
celkem (n=184)	13 7,1 %	44 23,9 %	93 50,5 %	17 9,2 %	17 9,2 %

$$D(\text{Gy-ekv}) = D_n \cdot \text{RBE}_n + D_\gamma \cdot \text{RBE}_\gamma$$

kde

D_n - dávka neutronové komponenty ^{252}Cf

D_γ - dávka gama komponenty ^{252}Cf

RBE_n - relativní biologický efekt neutronů

RBE_γ - relativní biologický efekt záření gama

RBE neutronové komponenty ^{252}Cf pro spinocelulární karcinom byla uvažována v hodnotě 6 (6, 16, 19).

U obou porovnávaných souborů byly použity k brachyterapii zdroje LDR a byla aplikována v paracervikálním prostoru (bod A) stejná 56 Gy-eq dávka.

U nemocných léčených intrakavitárně ^{252}Cf byla použita tři

různá schémata ozáření:

- u 23 nemocných (7 st.IIb + 16 IIIb st.) byla aplikována plná dávka 9 Gy neutronové komponenty ^{252}Cf (56 Gy-ekv) v 1. týdnu léčby,
- u 117 nemocných (51 st.IIb + 66 IIIb st.) byla aplikována dávka 6 Gy neutronové komponenty ^{252}Cf (40 Gy-ekv) v 1. týdnu léčby a doplněna v 5. týdnu léčby dávkou 16 Gy záření gama,
- u 44 nemocných (23 st.IIb + 21 IIIb st.) byla aplikována dávka 2 Gy neutronové komponenty ^{252}Cf (16 Gy-ekv) v 1. týdnu léčby a doplněna ve 3. týdnu léčby dávkou 40 Gy záření gama.

V kontrolní skupině nemocných byla aplikována v paracervikálním prostoru dávka 56 Gy, rozdělena do dvou frakcí aplikovaných ve 3. a 5. týdnu. Ozáření bylo provedeno zdroji ^{226}Ra a ^{137}Cs .

K zevnímu ozáření byl použit brzdný svazek lineárního urychlovače s energií spektra fotonů 20 MeV. U nemocných s pozitivním lymfografickým nebo CT obrazem metastáz v regionálních a juxta-regionálních lymfatických uzlinách bylo pole ozáření prodlouženo až do výše Th-12. Aplikovaná dávka byla 40 Gy, rozdělena v oblasti malé pánve po 20 Gy v plném a děleném poli.

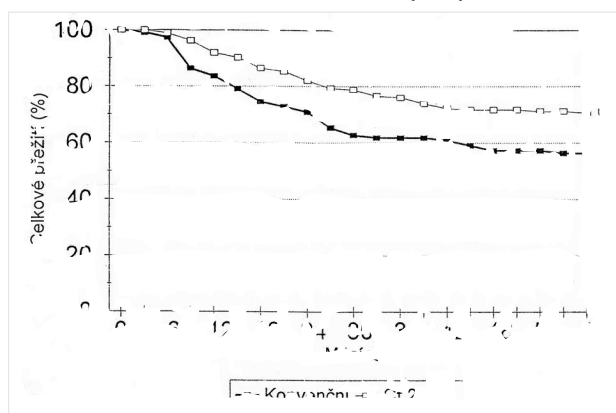
U nemocných všech skupin, byla v průběhu léčebného cyklu aplikována v bodě A souhrnná ložisková dávka 85 Gy-ekv a 59 Gy-ekv v bodě B. K statistickému porovnání výsledků byl použit Fischerův test.

Výsledky

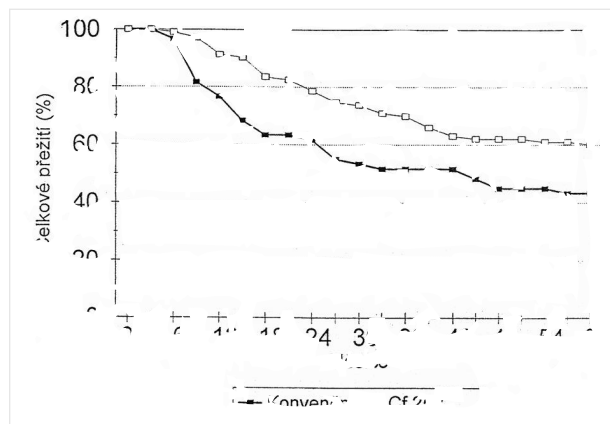
Graf 2 uvádí souhrnné porovnání léčebných výsledků. U nemocných léčených ^{252}Cf je celkové přežití vyšší o 14,3 % (70,6 % vs. 56,3 %) ($p < 0,05$) v porovnání s přežitím u nemocných léčených pouze zářením gama. Při porovnání léčebných výsledků dle stadia pokročilosti onemocnění je u IIIb stupně choroby (graf 3) přežití u nemocných léčených ^{252}Cf vyšší o 16,9 % (60,2 % vs. 43,3 %) ($p < 0,05$), přičemž u stadia IIb (graf 4), činí tento rozdíl pouze 11,9 % (83,9 % vs. 72,0 %) a není statisticky významný.

Tab. 3 uvádí příčiny neúspěchu léčby, jejichž analýza ukazuje, že dochází u nemocných léčených pouze zářením gama k prevalenci recidiv nádorového procesu v pánvi (35/110, 31,8 %), jejich počet stoupá s pokročilostí onemocnění (IIIst. 27/60, 45 %). U nemocných léčených ^{252}Cf je procentuální výskyt recidiv v pánvi 15,7 % (29/184) a je tedy o 16,1 % (15,7 % vs. 31,8 %) ($p < 0,05$) nižší proti léčeným pouze zářením gama a tento rozdíl se zvyrazňuje s pokročilostí onemocnění. U III st. onemocnění je u léčených ^{252}Cf výskyt lokálních recidiv 21/103 (20,3 %) a je tedy sníženo 24,7 % (20,3 % vs. 45 %) ($p < 0,05$) v porovnání s nemocnými léčenými konvenčním postupem. Průměrný procentuální výskyt vzdálených metastáz je u porovnávaných souborů vyrovnaný (10,8 % vs. 9,1 %), avšak jejich počet stoupá s pokročilostí onemocnění a činí u nemocných IIIb st. léčených

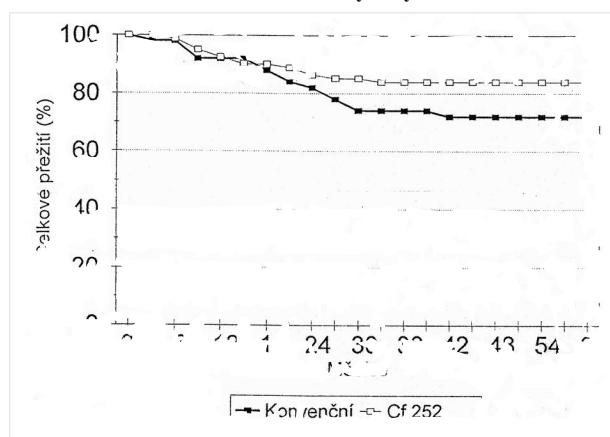
Graf 2. Stadium IIb + IIIb. Porovnání léčebných výsledků



Graf 3. Stadium IIIb. Porovnání léčebných výsledků



Graf 4. Stadium IIb. Porovnání léčebných výsledků



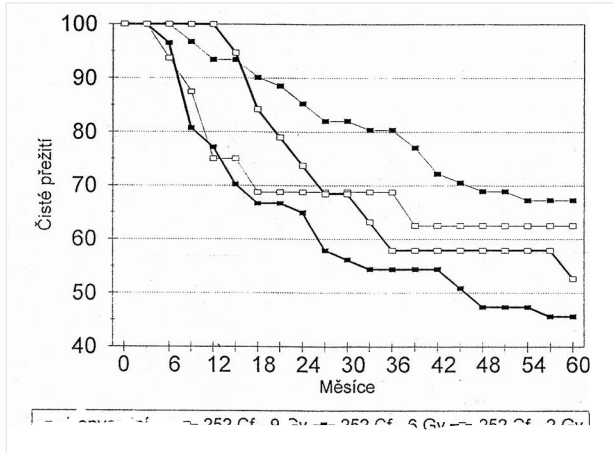
Tab. 3. Příčiny úmrtí dle způsobu léčby a pokročilosti onemocnění

	stadium IIb	stadium IIIb záření gama	celkem
	(n = 50)	(n = 60)	(n = 110)
recidivy v malé pánvi	8 16,0 %	27 45,0 %	35 31,8 %
vzdálené metastázy	6 12,0 %	4 6,7 %	10 9,1 %
jiná příčina	0 0,0 %	3 5,0 %	3 2,7 %
záření ^{252}Cf			
	(n = 81)	(n = 103)	(n = 184)
recidivy v malé pánvi	8 9,9 %	21 20,4 %	29 15,8 %
vzdálené metastázy	5 6,2 %	15 14,6 %	20 10,9 %
jiná příčina	0 0,0 %	5 4,9 %	5 2,7 %

^{252}Cf 14,5 % oproti 6,6 % u léčených pouze fotonovým zářením. U nemocných s nádorem IIb st. pokročilosti onemocnění je výskyt lokálních recidiv a metastáz u léčených ^{252}Cf procentuálně nižší v porovnání s konvenčním postupem léčby, avšak tyto rozdíly nejsou statisticky významné.

Graf 5 porovnává léčebné výsledky u nemocných IIIb st. stadia pokročilosti onemocnění v závislosti na aplikované dávce neutronové komponenty ^{252}Cf . Nejvyšší přežití je ve skupině nemocných léčených dávkou 6 Gy (67,2 %). U nemocných léčených dávkou 9 Gy přežívá 62,5 %, je tedy nižší a u léčených dávkou 2 Gy neutronové komponenty je 52,6 %. V porovnání

Graf 5. Stadium IIIb. Porovnání léčebných výsledků podle podílu dávky neutronové komponenty 252-Cf.



s konvenčním postupem léčby zářením gama jsou tyto rozdíly signifikantně lepší pouze po léčbě 6 Gy neutronové komponenty ($p < 0,05$). Příčiny neúspěchu léčby (tab. 4) ukazují, že uvedené rozdíly v léčebných výsledcích korelují s procentuálním výskytem lokálních recidiv v pánvi.

Tab. 5 porovnává reakce a komplikace zdravých tkání v závislosti na použitém léčebném postupu. U nemocných léčených ^{252}Cf je výskyt časných reakcí v gastrointestinálním traktu signifikantně snížen ($p < 0,001$). Je minimalizován výskyt vážných komplikací. Dokonce je signifikantně snížen výskyt postradiačních slizničních vředů a rektovaginálních píštěl ($p < 0,05$) oproti konvenční léčbě. Urologické reakce a komplikace v porovnání s konvenčním postupem léčby jsou

Tab. 4. Příčiny úmrtí u nemocných IIIb st. onemocnění v závislosti na dávce neutronové komponenty 252-Cf.

	^{252}Cf - 2 Gy n = 19	^{252}Cf - 6 Gy n = 61	^{252}Cf - 9 Gy n = 16
recidivy v malé pánvi	7 37 %	10 16 %	4 25 %
vzdálené metastázy	2 11 %	10 16 %	2 13 %

Tab. 5. Reakce a komplikace podle způsobu léčby

	GASTROINTESTINÁLNÍ				
	akutní proktitida	chronická proktitida	ulcus rektální	píštěl rektovaginál.	operace střeva
záření gama (n = 110)	50 45,5 %	9 8,2 %	6 5,5 %	5 4,5 %	0 0,0 %
záření ^{252}Cf (n = 184)	32 17,4 %	6 3,3 %	1 0,5 %	1 0,5 %	2 1,1 %
	UROLOGICKÉ				
	akutní cystitida	chronická cystitida	ulcus vesikální	píštěl vesikovagin.	operace ureteru
záření gama (n = 110)	9 8,2 %	7 6,4 %	4 3,6 %	0 0,0 %	0 0,0 %
záření ^{252}Cf (n = 184)	13 7,1 %	17 9,2 %	6 3,3 %	0 0,0 %	1 0,5 %

bez výraznější změny, kromě poněkud vyššího procentuálního výskytu chronických cystitid u nemocných léčených ^{252}Cf .

Diskuse

Porovnání léčebných výsledků ukazuje, že použití zdroje ^{252}Cf v brachyterapii pokročilého nádoru čípku děložního

signifikantně zlepšuje léčebné výsledky. Příčina vyšší kurability cervikálního karcinomu, jak ukazuje analýza příčin neúspěchu léčby, je důsledkem snížení lokálních recidiv v pánvi, tedy v místech bezprostřední interakce neutronů s buněčnými elementy nádoru. Je zřejmé, že neutronová komponenta ^{252}Cf vytváří předpoklady k inaktivaci té části buněčné populace nádoru, která zůstává rezistentní na záření gama. K pochopení příčinných souvislostí podmiňující efekt ozáření s rozdílným lineárním přenosem energie (LET) je nutné porovnat některé biologické děje na buněčné a tkáňové úrovni. V podmínkách brachyterapie nádorů je biologický efekt gama-neutronového záření ^{252}Cf způsoben převážně neutrony, i když jejich komponenta tvoří pouze 60 % spektra záření zdroje. Tento fenomén je podmíněn vrstvem hodnoty RBE neutronů v důsledku rychlého poklesu dávkového příkonu na vzdálenost již několika málo centimetrů. Tím dochází v souhrnném biologickém efektu k výraznému převýšení významu záření gama (10).

Vycházíme-li z podmínek námi použitého postupu intrakavitární léčby je prolongovaný charakter ozáření důležitým radio-biologickým faktorem při brachyterapii zářením gama. Při gama ozáření s nízkým dávkovým příkonem vzrůstá veličina střední letální dávky. Jde o efekt charakteristický pro buňky proliferující ve všech stadiích buněčného cyklu dělení, včetně ve stavu stacionárním, jehož základem je reparace subletálně poškozených buněk během ozáření. Při dostatečně dlouhé prolongaci ozáření s nízkým dávkovým příkonem se mění charakteristický tvar křivky „dávka-efekt“ ze tvaru S na křivku exponenciální (4, 11, 40). Dochází tedy v podmínkách prolongovaného ozáření k reparaci většinou subletálně poškozených buněk a letální buněčné efekty jsou pak důsledkem přímých zásahů při interakci (4, 13) podobně jako při záření s vysokým LET.

Základní údaje o biologickém efektu ^{252}Cf na buněčné úrovni pochází z výzkumu Pucka a Mercuse (23), na jejichž výsledky navazují práce Luckhardta a Elkinda (15). Ukazuje se, že v podmínkách záření s vysokým LET prakticky již neexistuje ta část křivky biologického efektu ozáření, která je podmíněna reparací subletálních poškození. Do popředí vystupují letální efekty způsobené jednorázovým zásahem neutronové komponenty. Výsledná křivka je ve tvaru exponenciální. Proto při léčbě nádorů zářením ^{252}Cf mizí význam prolongace pro výsledný biologický efekt. Konstantnost efektivity záření ^{252}Cf v širokém rozsahu změn dávkového příkonu je důležitá z hlediska možnosti léčby standardními dávkami (39).

Rozdílná radiosenzitivita buněk v závislosti na cyklu dělení je charakteristická v podmínkách fotonového ozáření. Nejradiorezistentnější jsou buňky v pozdní S fázi a počátku G_1 fázi a nejradiosenzitivnější v G_2 fázi a ve stavu mitozy. U záření s vysokým LET je výrazně snížena závislost radiosenzitivity buněk na fázi cyklu buněčného dělení i když zcela nevymizí (8). Důležitým fenoménem účinku záření s vysokým LET je úbytek reparačních dějů v buněčných systémech v porovnání se zářením s nízkým LET, kde dochází ke třem typům reparačních procesů na buněčné úrovni - reparace subletálních poškození, reparace potenciálně letálních poškození a reparace neobnovujících se a pomalu obnovujících se buněčných systémů (2). Zvláštní pozornost zasluhuje proces potenciálně letálních poškození, který je charakteristický pro klonogenní buňky ve stavu G_0 . Při léčbě zářením s vysokým LET, v důsledku charakteristické interakce neutronů s buněčnými elementy, kromě usmrcení nádorových buněk jednorázovými zásahy, dochází k uvolnění většího množství energie, v porovnání se zářením gama, což má za následek potlačení reparace subletálních a potenciálně letálních poškození buněk (16, 40).

Stav oxygenace tkáně během ozáření má zásadní význam pro radiosenzitivitu nádorů v podmínkách fotonové radioterapie (7). Proto je radiokurabilita nádorů výrazně ovlivňována přítomností hypoxických až anoxických ložisek buněk v nádorové tkáni, jejichž počet se zvyšuje s pokročilostí onemocnění. Vycházíme-li z podmínek zde použitého postupu

brachyterapie je nutné podotknout, že jednou se zvláštností prolongovaného ozáření je snížení veličiny kyslíkového efektu. Snížení dávkového příkonu u záření gama z 4,3 Gy/min na 0,5Gy/hod vyvolává pokles veličiny kyslíkového efektu z 3,3 na 2,0 (12). Pro rychlé neutrony v širokém spektru změny energií je hodnota kyslíkového efektu kolem 1,7. U neutronové komponenty ^{252}Cf je průměrná hodnota kyslíkového efektu 1,4, která je zatím nejnižší dosaženou hodnotou kyslíkového efektu v radioterapii.

Biologický efekt záření neutronů je obecně vyjadřován pojmem RBE (relativní biologická účinnost), který představuje hodnotu poměru dávky fotonů a neutronů potřebné k vyvolání kvantitativně stejného efektu. Pro gama-neutronové záření ^{252}Cf je hodnota RBE v rozsahu 3 - 8(9, 17). V případě prolongovaného ozáření, jak bylo použito v našem souboru, činí tato hodnota 6 (6, 16, 19).

Další zvláštností gama-neutronového záření ^{252}Cf je výraznější narušení schopnosti stromatu nádoru podporovat růst nádorových buněk. Tím vznikají lepší předpoklady k inaktivaci nádorů s větším počtem frakcí hypoxických buněk, výraznější schopnost reparace atd.

Kurativní radioterapie cervikálního karcinomu je kombinovaný proces ozáření, kde v průběhu léčebného cyklu se vzájemně doplňují prolongované intrakavitární se zevním frakcionovaným ozářením. Použitím gama-neutronového záření ^{252}Cf v intrakavitární léčbě je tento proces dále ovlivňován kvalitativně odlišným účinkem záření s vysokým LET. Složitost problému potvrdily již první klinické zkušenosti Ma-ruyamy (19). Charakteristické zde bylo, že intrakavitární aplikace zdrojů ^{252}Cf byla ve vztahu k zevnímu fotonovému ozáření ve dvou rozdílných časových sledech - v iniciální fázi resp. v konečné fázi léčby. Bylo zjištěno, že při aplikaci zdrojů ^{252}Cf v iniciální fázi léčebného cyklu jsou léčebné výsledky signifikantně lepší v porovnání s konvenčním postupem léčby, zatímco u nemocných ozářených ^{252}Cf v konečné fázi léčebného cyklu byly tyto výsledky ekvivalentní s konvenčním postupem léčby. Při interpretaci příčin rozdílných léčebných výsledků Maruyama vyslovil hypotézu o senzibilizujícím vlivu případné reoxigenace přežívající nádorové tkáně po předchozím ozáření ^{252}Cf v iniciální fázi léčby. Vycházel z předpokladu, že v důsledku interakce neutronů s nádorem již v 1. týdnu léčby je inaktivován značný počet nádorových buněk, včetně buněk hypoxických. V důsledku toho dochází k uvolnění tlaku na cévním řečišti, jeho rozvinutí a zvýšení pO_2 nádorové tkáně (14).

Maruyamova reoxigenační hypotéza se nám stala podnětem k rozvaze o možné optimalizaci terapeutického efektu intrakavitární léčby, vhodnou kombinací záření ^{252}Cf se zářením gama, které by bylo aplikováno jako boost v době maximální reoxigenace nádorové tkáně (29,31,32, 33). V klinickém experimentu, za použití speciálních metodik sledování dynamiky změn v procesech reoxigenace a regrese v průběhu léčebného cyklu se zdroji ^{252}Cf (31,32), jsme získali nové poznatky o některých patofyziologických procesech na buněčné a tkáňové úrovni (31, 32,33). Polarograficky bylo zjištěno, že v průběhu léčby pouze zářením gama nedochází k žádným signifikantním změnám v pO_2 nádorové tkáně, pokud u nádorů léčených ^{252}Cf dávkou 2, 6 a 9 Gy neutronové komponenty zdroje, vždy aplikované v iniciální fázi léčby, byly tyto změny výrazně signifikantní. Dále bylo zjištěno, že reoxigenační schopnost nádorů je nepřímo úměrná hodnotě aplikované dávky neutronů. Nejvýraznější je u nádorů ozářených malou a střední dávkou (2 a 6 Gy) neutronů, pokud po ozáření vyšší dávkou (9 Gy) je reoxigenační schopnost tkání výrazně zpomalena.

V průběhu sledování změn dynamiky regrese nádorové tkáně během léčebného cyklu bylo zjištěno, že již dávka 2 Gy neutronové komponenty ^{252}Cf způsobuje oproti záření gama signifikantní zrychlení doby nutné k 50% regresi nádorové

tkáně. Nejrychlejší je regrese nádoru po ozáření dávkou 6 Gy neutronové komponenty. U nádorů ozářených dávkou 9 Gy má regresní křivka již odlišný průběh. Po ozáření dochází k přechodnému zvětšení objemu nádoru s následnou rychlou regresi až v závěrečné fázi léčby.

Dále se ukazuje, že tyto procesy jsou ovlivňovány objemem ozařované nádorové leze. U nádorů menšího objemu jsou signifikantně rychlejší v porovnání s nádory většího objemu. Uvedené rozdíly jsou zřejmě důsledkem korelace mezi počtem nádorových buněk, tedy objemu ozařovaného nádoru, a realizovanými interakcemi s neutrony, dané hodnotou aplikované dávky neutronové komponenty zdroje. Podobnou signifikantní závislost jsme nepozorovali u nádorů léčených pouze fotonovým zářením. Musíme zde podotknout, že uvedené změny v dynamice procesů oxygenace a regrese nádorů v průběhu léčebného cyklu mohou být kromě dávky ozáření neutronové komponenty ^{252}Cf , dále ovlivňovány výchozím stavem a následným postiradiačním poškozením stromalních elementů nádoru a to především kapilárního řečiště.

Korelace mezi uvedenými fenomény, jako odraz změn v nádorové tkáni po interakci s různě velkými dávkami neutronové komponenty ^{252}Cf a léčebnými výsledky byla zjištěna již v předběžném hodnocení léčebných výsledků (33). Zde uváděné dlouhodobé léčebné výsledky (graf 5) a jejich analýza z hlediska příčiny neúspěchu léčby (tab. 4) jsou potvrzením vztahu mezi dávkou neutronové komponenty, dosaženou reoxigenací a regresi nádorové populace. Jsou důležité pro klinickou praxi z hlediska možnosti optimalizace léčebných postupů.

Maruyamou předpokládaný význam procesu reoxigenace po ozáření nádorové tkáně ^{252}Cf v iniciální fázi léčby může být jedním z faktorů ovlivňujících léčebné výsledky. Jistým důkazem je skutečnost, že již dávka 2 Gy neutronové komponenty zlepšuje léčebné výsledky o cca 8 % i když její podíl tvoří pouze 16 % z celkové aplikované dávky během léčebného cyklu.

Dnes je již potvrzeno, že kromě zonální heterogenity produkované faktory mikroprostředí jako hypoxie, vnitřní genetická heterogenita kmenové buňky nádorové populace podmiňuje rychlost jejího růstu včetně reparace subletálních a potenciálně letálních poškození buněk, tedy faktory se vztahem k determinaci odpovědi nádoru na léčbu. (43). I když tyto faktory ovlivňují radiosenzitivitu nádorových buněk v podmínkách fotonové terapie, nelze vyloučit jejich vztah k léčebným výsledkům kombinovaného postupu léčby ^{252}Cf s frakcionovaným fotonovým ozářením.

V této souvislosti se Yaest (44) pokouší na matematickém modelu vysvětlit příčiny fenoménu časně a pozdní aplikace ^{252}Cf ve vztahu k fotonovému frakcionovanému ozáření během léčebného cyklu. Vychází z předpokladu, že nádor má dva typy buněk predominantní buňky radiosenzitivní a malý počet doublu rezistentních (DR), které vznikají mutací senzitivních buněk. Jsou vysoce radiorezistentní na záření gama, protože mají schopnost reparovat subletální a potenciálně letální poškození DNA a vyznačují se krátkým generačním cyklem buněčného dělení. Na základě matematického modelu Yaest dokazuje větší efektivitu léčby při časně aplikaci neutronových zdrojů (44).

Výsledky klinického výzkumu použití ^{252}Cf v brachyterapii zhoubných novotvarů ukazují, že jde o kvalitativně novou, vysoce efektivní léčebnou metodu, s poněkud odlišnou filosofií v léčebném přístupu při kombinované léčbě se zářením gama, schopnou překonat rezistenci nádorové populace na konvenční fotonové ozáření. Důkazem toho jsou uvedené léčebné výsledky u nemocných s pokročilým nádorem hrdla děložního, které jsou ve shodě s léčebnými výsledky publikovanými jinými autory (21, 22). Zlepšení léčebných výsledků je následkem zvýšení radiokurability primární nádorové leze, tedy místa bezprostřední interakce převážně částí neutronů s buněčnými elementy nádoru. Bezprostřední interakce převážně částí neutronů s nádorem

a s přihlédnutím k rozdílným hodnotám v RBE zdravé a nádorové tkáně je také významně snížen výskyt postiradiačních změn ve zdravé tkáni.

Současný stav výzkumu a klinického využití Californium-252 v brachyterapii nádorů byl zhodnocen na workshopu „Californium-252 Isotope for 21st Century Radiotherapy“, konaného v Detroitu, USA, v roce 1996 (42). Bylo konstatováno, že jsou dosaženy fyzikálně-dozimetrické a klinické předpoklady k zavedení zdrojů ²⁵²Cf do klinické

praxe. Nedořešena zůstává komerční výroba afterloadingového systému při použití zdrojů ²⁵²Cf střední a vyšší aktivity. Jeho výroba s přihlédnutím k charakteru interakce neutronů vyžaduje kvalitativně odlišný přístup při zajištění ochrany a bezpečnosti práce personálu a nemocných v průběhu léčby. V současné době je z našeho podnětu realizován koncepční návrh výroby afterloadingového systému léčby zdroji ²⁵²Cf, čímž budou vytvořeny požadované předpoklady k zpřístupnění brachyterapie nádorů Californiem-252 v širší klinické praxi.

Literatura

1. Berry, R. J., Pain, Ch., Wiernik, G., Stedeford, J. B. H., Baker, C., Weatherburn, H., Young C. M. A.: Clinical experience with californium-252: Brachytherapy at aoxford, in: Californium-252: radiobiology and medical applications, Proceedings of the Brussels symposium on californium-252 utilisation, April 1976, Mewissen, D. J.(ed.), El Dupont - de Nemours and Co: aiken, South Carolina, 1979, 65-75.
2. Bedford, J. S., Hall, E. G.: Survival of He-La cells cultured in vitro and exposed to protracted gamma radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 7, 1963, 377-380.
3. Castro, J. R., Oliver, G. D., Withers, H. R., Almond, P. R.: Experience with Californium-252 in clinical radiotherapy. *Amer. J. Roenthenol.*, 117, 1973, 182-194.
4. Elkind, M. M., Whitmore, G. F.: The radiobiology of cultured mammalian cells. Gordon and Beach Sci. publ., New York - London, 1967.
5. Fields, P. R.: Transplutonium elements in thermonuclear test debris. *Phys.Rev.*, 102, 1956, 180.
6. Feola, J. M., Nava, C. A., Maruyama, Y.: Biological effects of ²⁵²Cf neutrons at low dose rate. *Int. J. Radiat. Biol.*, 41, 1982, 33-46.
7. Gray, L. H., Conger, A. D., Ebert, M., Hornsey, B., Scott, O. C. A.: The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Brit. J. Radiol.*, 25, 1953, 638-648.
8. Gragg, R. L., Huphrey, P. M., Thames, H. D. Jr., Meyn, R. E.: The response of Chinese hamster ovary cells to fast neutron radiotherapy beams. III. Variation in relative biological effectiveness with position in the cell cycle. *Radiat. Res.* 76, 1978, 283-289.
9. Hall, E. J., Rossi, H. H., Roizin, L.: Low-dose-irradiation of mammalian cells with radium and californium-252. *Radiology*, 102, 1971, 445-451.
10. Hall, E. J.: A comparison of radium and californium-252 using cultured mammalian cells. *Radiology*, 102, 1972, 173-179.
11. Hall, E. J.: Radiobiology for the radiologist (2 Ed.). N.Y.-Evanson-San Francisco-London: Med. Dept. Harper a. Row. Publ. Hagerstown, 1982.
12. Hall, E. J., Roizin-Towle, L. A., Colvett, R. D.: RBE and OER determination for radium and californium-252. *Radiology*, 110, 1974, 699-701.
13. Jarmonenko, S. P., Vajinson, A. A., Kalendo, G. S., et al.: Biologičeskije osnovy lučevoj terapii opucholey. Moskva, Medicina, 1976.
14. Kallman, R. F.: The phenomenon of reoxygenation and its implication for fractionated radiotherapy. *Radiology*, 105, 1972, 135-142.
15. Lockhard, R. Z., Elkind, M. M., Moses, W. B.: Radiation response of mammalian cells grown in culture: II. Survival and recovery characteristics of several subcultures of He-La S cells after X-irradiation. *JNCI*, 27, 1961, 1392-1404.
16. Maruyama, Y., Beach, J. L., Feola, J.: Scheduling of hypoxic tumor therapy using neutron brachytherapy. *Radiology*, 137, 1980, 775-778.
17. Maruyama, Y., Feola, J., Beach, J. L.: A tumor/normal tissue advantage for low dose rate neutron brachytherapy. In *t.J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 9, 1983, 1715-1721.
18. Maruyama, Y., Kryscio, R., Van Nagel, J. R., Yoneda, J., Donaldson, E., Hanson, M., Beach, J. L., Feola, J., Martin, A., Parker, C.: Clinical trial of ²⁵²Cf neutron brachytherapy for advanced cervical cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 11, 1985, 1475-1482.
19. Maruyama, Y., Yoneda, J., Krolkiewicz, H., Mendiondo, O., Beach, J. L., Coffey, C. W., Thomson, D., Wilson, L. C., Feola, J., Van Nagel, J. R., Donaldson, E. S., Powell, D.: A clinical trial for advanced cervico-vaginal pelvis carcinomas using californium-252 fast neutron therapy: report of early responses. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 6, 1980, 1629-1637.
20. Maruyama, Y., Muir, W.: Human cervical cancer clearance after ²⁵²Cf neutron brachytherapy versus conventional photon brachytherapy. *Amer. J. Clin. Oncol.*, 7, 1984, 347-352.
21. Maruyama, Y., Van Nagel, J. R., Yoneda, J., Donaldson, E. S., Gallion, H. H., Powell, D., Kryscio, R. J.: A review of Californium-252 neutron brachytherapy for cervical cancer. *Cancer*, 68, 1991, 1189-1197.
22. Marjina, L. A., Kiseleva, V. N., Nechushkin, M. I., Cherhonadsky, V. N., Elisyutin, G. P.: The results of treatment of patients with endometrial cancer and carcinoma cervix using californium-252 HDR. In: J.G. Wierzbicki (ed.), Californium-252. Isotope for 21st Century radiotherapy. NATO ASI series. High technology vol. 29, 1997, 105-114. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
23. Puck, T. T., Marcus, P. I.: Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.*, 103, 1959, 653-666.
24. Steel, G. G., Peacock, J. H.: Why are some human tumours more radiosensitive than others? *Radiother. and Oncol.*, 15, 1989, 63-72.
25. Seydel, G.: The clinical use of californium-252 sources in the United States, in: Californium-252: radiobiology and medical applications, Proceedings of the Brussels symposium on californium-252 utilisation, April 1976, 77-82. Mewissen, D. J.(ed.), El Dupont-de Nemours and Co(Inc): Aiken, South Carolina, 1979.
26. Schlea, C. S., Stoddard, D. H.: Californium isotopes proposed for intra-cavitary and interstitial radiation therapy with neutrons. *Nature*, 206, 1965, 1058-1059.
27. Tačev, T., Kryštof, V., Ott, O., Rašovská, O., Strnad, V.: A technical equipment for workroom with Californium-252 used for the gamma-neutron brachytherapy. *Strahlenther. Oncol.* 164, 1988, 296-299.
28. Tačev, T., Prokeš, B., Strnad, V., Rašovská, O., Kryštof, V., Nikodemová, D.: Effect of small doses of ²⁵²Cf on the tumour regression in cervix uteri during combined radiotherapy. *Strahlenther. Oncol.*, 165, 1989, 837-843.
29. Tačev, T., Kryštof, V., Rašovská, O., Strnad, V.: Studium intrakavitární aplikace kalifornia-252 při Ca cervicis uteri a využití plynňé hypoxie při zevním ozáření. Závěrečná zpráva výzkumného úkolu č. P12-561-817-06/07 v roce 1990.
30. Tačev, T., Strnad, V., Vacek, A.: Radiotherapy of cervix uteri carcinoma with 252-Cf and hypoxyradiotherapy in the course of external irradiation. *Radiosensitization Newsletter*, 10, 1991, 10-12.
31. Tačev, T., Strnad, V., Vacek, A., Rašovská, O., Prokeš, B., Ptáčková, B., Kryštof, V.: Radiotherapy of cervix uteri carcinoma with Cf-252 implant and external hypoxyradiotherapy. *Nuclear Science Applications*, 4, 1991, 201-212.
32. Tačev, T., Vacek, A., Prokeš, B., Rašovská, O., B. Ptáčková, Strnad, V., Kryštof, V.: The relationship of ²⁵²Cf and ²²⁶Ra radiation doses to the reoxygenation and regression of the cervix uteri tumors. Part I.: Clinical experimental study. In J.G. Wierzbicki (ed.), Californium-252. Isotope for 21st Century Radiotherapy. NATO ASI series, High technology, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands, Vol. 29, 1997, 57-75.
33. Tačev, T., Ptáčková, B., Vacek, A., Rašovská, O., Prokeš, B., Strnad, V., Kryštof, V.: The relationship of ²⁵²Cf and ²²⁶Ra radiation doses to the reoxygenation and regression of the cervix uteri tumor. Part II.: Preliminary results in advanced cervical carcinoma. In J.G. Wierzbicki (ed.), Californium-252. Isotope for 21st Century Radiotherapy, NATO ASI series, High technology, Kluwer Academic Publisher. Printed in the Netherlands, vol. 29, 1997, 77-82.
34. Tačev, T., Ptáčková, B., Vacek, A., Rašovská, O., Strnad, V.: Californium-252 and hypoxyradiotherapy in treatment of advanced carcinoma

PRIMÁRY MEDIÁSTINÁLNY VEŠKOBUNKOVÝ B-LYMFOM: KLINICKO-PATOLOGICKÁ ANALÝZA 6 PRIPADOV

PRIMARY MEDIASTINAL LARGE B-CELL LYMPHOMA: CLINICO-PATHOLOGICAL ANALYSIS OF 6 CASES

GUMANEIK J., PLANK L.*, DOLEŽEL L., HAMŽIK, J.**

PATOLOGICKO-ANATOMICKÉ ODDELENIE ÚSTAVU TUBERKULOZY, PŤUCNYCH CHOROB

A HRUDNIKOVEJ CHIRURGIE VO V. HAGOCH

* ÚSTAV PATOLOGICKEJ ANATOMIE JESSENIOVEJ LEKARSKEJ FAKULTY UNIVERZITY KOMENSKÉHO

A MARTINSKEJ FAKULTNEJ NEMOCNICE V MARTINE

KONZULTAČNÉ CENTRUM BIOPTICKEJ DIAGNOSTIKY OCHORENÍ KRVOTVORBY MFN A JLF UK

V MARTINE

** CENTRUM HRUDNIKOVEJ CHIRURGIE ÚSTAVU TUBERKULOZY, PŤUCNYCH CHOROB A HRUDNIKOVEJ

CHIRURGIE VO V. HAGOCH

Súhrn: Východiská: Primárny mediastinálny veľkobunkový B-lymfóm (PMVBL) bol nedávno identifikovaný ako samostatná klinická jednotka. Typ štúdie a súbor: Zo súboru pacientov operovaných vo Vyšných Hájoch v 7.5 ročnom intervale sme vybrali 6 prípadov PMBVL, v ktorých sme analyzovali ich klinické a morfológické parametre. Metódy a výsledky: V súbore boli 4 pacienti ženského a 2 mužského pohlavia, vo veku 17-44 rokov. Všetky prípady sa vyznačovali morfológicky difúznym rastom, rôznym stupňom fibrotizácie a bunkami vzhľadu stredne veľkých až veľkých blastov, ktoré boli imunohistochemicky B-pôvodu. V čase prezentácie dominovali známky nádoru lokálne obmedzeného s infiltráciou pľúc (n=5), s infiltráciou hrudnej steny (n=2) a pleury (n=2). Ani počas recidív u dvoch pacientov nedošlo k extratorakálnej propagácii. Štyria pacienti boli v I.-II. štádiu, dvaja v IV. štádiu. V žiadnom z prípadov nebola zistená infiltrácia kostnej drene, pečene, sleziny, periférnych uzlín a známky leukemizácie. Dvaja pacienti zomreli, u troch bola dosiahnutá kompletná a u jedného neúplná remisia nádorového ochorenia. Závěry: Aj keď REAL/SZO klasifikácia zaraďuje PMVBL spolu s morfológicky podobnými primárne nodálnymi lymfómami do spoločnej kategórie difúzných veľkobunkových B-lymfómov, PMVBL sa od nodálnych foriem odlišuje klinickou manifestáciou a črtami propagácie.

Kľúčové slová: Non-Hodgkinov lymfóm, veľkobunkový B-lymfóm, primárny lymfóm mediastína, primárny týmusový lymfóm

Summary: Backgrounds: Primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMLBL) was recently identified as a separate clinical entity. Design and Subjects: By a review of the patients operated in Vyšné Hágy during last 7.5 years, six PMLBL cases were selected to correlate their clinical and morphological data. Methods and Results: 4 female and 2 male patients were at age 17-44 years. All the cases showed morphologically diffuse growth patterns associated with different fibrosis degree. Tumor cells were represented by medium-sized up to large blasts being immunohistochemically of B-cell type. At the presentation, the features of a locally limited tumor with lung (n=5), chest wall (n=2) and pleura infiltration (n=2) dominated. The extrathoracic manifestation was not present even during recidives in 2 patients. Four patients were in stage I-II., two in stage IV. Neither infiltration of the bone marrow, liver, spleen, peripheral lymph nodes, nor leukemisation was observed in any of the cases. Two patients died, in three cases a complete and in one an incomplete remission was reached. Conclusions: Although REAL/WHO classification includes PMLBL together with morphologically similar primary nodal lymphomas into the common category of diffuse large B-cell lymphomas, in contrast to nodal cases PMLBL shows different biological manifestation and spread patterns.

Key words: Non-Hodgkin's lymphoma, large B-cell lymphoma, primary mediastinal lymphoma, primary thymic lymphoma

Úvod

Mediastínium je relatívne zriedka miestom vzniku tak primárnych nádorov, ako aj sekundárnej metastatickej manifestácie iných nádorových ochorení. Frekvencia ich výskytu sa uvádza v intervale 0.5-3% všetkých nádorov (17). Medzi najčastejšie zhubné nádory tejto lokalizácie patria lymfómy, z ktorých sa tu vyskytujú nádory klasifikované podľa SZO klasifikácie ako Hodgkinove lymfómy, non-Hodgkinove lymfómy (ďalej NHL) zo zrelých buniek a NHL z prekursorových buniek typu lymfoblastómov, resp. akútnych lymfoblastových leukémií /ďalej ALL/ (8, 9, 12, 13). Väčšinou sú súčasťou systémového ochorenia, ale od začiatku 80. rokov sú známe aj také NHL, ktoré

spĺňajú kritériá primárneho mediastinálneho (resp. týmusového) lymfómu (15). Tieto nádory majú povahu difúzných vysokomaligných (veľkobunkových) B-NHL, ktoré Kielska klasifikácia priradzovala k centroblastómom, resp. imunoblastómom (14).

Tieto lymfómy sú však odlišné od podobných primárne nodálnych sčasti morfológicky, ale najmä biologicky. Morfológia ovplyvnila aj ich názvoslovie, keď boli označované ako primárny mediastinálny veľkobunkový lymfóm z jasných buniek alebo so sklerózou, či mediastinálny veľkobunkový B-lymfóm (16, 18). Biologicky sa od izomorfných nodálnych NHL líšia nižším vekom postihnutých pacientov, prvotnou klinickou

manifestáciou v týmuse, ako aj črtami propagácie a generalizácie. Preto REAL- aj SZO klasifikácia považuje tieto nádory za variant difúzneho veľkobunkového B-lymfómu, nazvaný primárny mediastinálny veľkobunkový B-lymfóm (ďalej PMVBL - 8, 9, 12, 13). V kontraste k prevaha T-fenotypu lymfoblastových NHL týmusu tieto nádory vznikajú zrejme klonálnou proliferáciou natívnych B-buniek drene týmusu (2, 23). Tieto nádory patria medzi pomerne zriedkavé, lebo tvoria pri-bližne 6% všetkých NHL, resp. približne 2.4% všetkých difúzných veľkobunkových B-lymfómov (5, 21).

Cieľ práce

Keďže v českom a slovenskom písomníctve problematika PMVBL nebola podrobnejšie analyzovaná, pokúsili sme sa tu sumarizovať naše skúsenosti z pohľadu klinicko-patologickej korelácie zistených údajov.

Materiál a metodika

Z biotického registra pracoviška vo Vyšných Hágoch sme vybrali všetky prípady bioticky verifikovaných NHL z obdobia 1.1.1992-30.6.1999, ktoré spĺňali nasledovné kritériá:

1. biopsia v predterapeutickú fázu klinicky verifikovaného primárneho mediastinálneho lymfómu, ktorý je morfológicky veľkobunkový a
2. dostatočné množstvo formalínového-parafínového materiálu na znovuzhodnotenie vrátane možnosti imunofenotypickej analýzy.

Pre histologickú analýzu všetkých prípadov boli použité metódy štandardného panelu biotického diagnostiky NHL - farbenie hematoxylinom-eozinom, podša Giemsa, impregnácia podša Gomoriho a PAS reakcia. Pre verifikáciu fenotypu nádorových buniek v parafínových rezoch všetkých prípadov bol použitý štandardne panel primárnych protilátok, ktoré sú identifikované v tab. č. 1. Ten bol v čase aktuálnej diagnózy v niektorých prípadoch rozšírený o dôkaz vybraných epitelových a mezenchýmových markerov s ciešom vylúčenia nádorov inej histogenézy. Polyklonálne protilátky boli vyšetrené v systéme PAP-komplexu (Dakopatts, Dánsko), monoklonálne v detekčnom systéme streptavidínového-biotínového komplexu (BioGenex, USA), a to po enzymovom natrávení, prípadne po demaskovaní antigénu v mikrovlnnej peci (podša inštrukcií výrobcu protilátky). Aj keď niektoré prípady boli už v čase diagnózy konzultované s martinským centrom, všetky prípady boli v závere štúdie posúdené všetkými tromi patológmi-autor-mi tejto štúdie.

V snahe získať relevantné klinické údaje o priebehu ochorenia a osude pacientov sme vychádzali z anamnestických údajov, predoperačných vyšetrení a operačných nálezov. Biotický materiál bol vo všetkých prípadoch získaný operačnou cestou (pracovníkmi Centra hrudníkovej chirurgie vo Vyšných Hágoch). V jednom prípade išlo o limitovanú diagnostickú torakotómiu, v troch ďalších bol materiál odobraný cez parasternálnu mediastinotómiu a dvaja pacienti sa podrobili minimálnej invazívnej videotorakoskopii. Napokon sme dotazníkovou formou oslovili zainteresovaných lekárov (tab.

Tab. č. 1. Zoznam použitých primárnych protilátok

Názov	Zdroj (krajina)	Dokazovaný antigén/pozitivita
LCA	BioGenex (USA)/ Dakopatts (Dánsko)	CD45
L26	Dako	CD20
Ki-B5	ÚPA Kiel *	B-bunky
UCHL1	Dako	CD45RO
BerH2	Dako	CD30
anti-bcl-2	Dako	bcl-2-proteín
anti-kappa	BioGenex/Dako	kappa reťazec Ig
anti-lambda	BioGenex/Dako	lambda reťazec Ig

* protilátku láskavo poskytol prof. Dr.med. M. R. Parwaresch

Tab. č. 2: Otázky dotazníka o charaktere a priebehu ochorenia

- Išlo v čase diagnózy o primárny NHL mediastína?
- Aké bolo klinické štádium v čase diagnózy, prípadne počas restagingu?
- Boli prítomné známky lymfadenopatie mimo hrudníka, resp. mediastína?
- Bolo pozorované šírenie nádoru z vnútrohrodnej oblasti, akými metódami bolo verifikované a o ktoré oblasti išlo?
- Bola bioticky vyšetrená kostná dreň a s akým výsledkom?
- Boli pozorované známky leukemizácie?
- Bol/je pacient liečený, aká je odpoveď na terapiu?
- Iné údaje považované za pozoruhodné?

č. 2.). Po získaní odpovedí sme zhodnotili všetky morfológické, fenotypické a klinické parametre ochorenia.

Výsledky

V sledovanom období bolo vo Vyšných Hágoch diagnostikovaných celkovo 53 malígnych lymfómov mediastína, z toho 33 Hodgkinových a 20 NHL. Z nich požadované kritériá spĺňalo 6 prípadov, ktoré boli primárne diagnostikované ako monomorfný či polymorfný centroblastóm (2 prípady), resp. PMVBL (4 prípady).

Charakteristika pacientov súboru ukázala prevahu pacientov ženského pohlavia (n=4) nad mužským (n=2) v pomere 2:1. Priemerný vek nami sledovaných pacientov v čase diagnózy bol 28.7 rokov (pacienti vo veku od 17 do 44 rokov - vid' tab. č. 3). Morfológické črty všetkých prípadov boli podobné až totožné. Vo všetkých prípadoch sme pozorovali difúzny rast nádorového infiltrátu bez náznakov nodularity. Fibrotizácia až sklerotizácia bola prítomná v piatich prípadoch, jej intenzita bola rozdielna individuálne, aj v rôznych miestach toho istého nádoru. V zásade kolísala v spektre od nenápadného zmnoženia retikulínových vlákien cez ložiská hrubších fibróznych pruhov až po hyalinizované pruhy kolagénového väziva oddešujúce „hniezda“ nádorových buniek. Nekrózy, zväčša fokálne, boli prítomné v štyroch prípadoch. V žiadnom z prípadov sme v excíziách nádoru nepozorovali štruktúry tkaniva týmusu. Histocytologický obraz nádoru bol charakterizovaný prevahou buniek vzhľadu stredne veľkých až veľkých blastov (podobných centro- a imunoblastom), ojedinele boli primiešané disperzné veľké až obrovské blasty bizarnej morfológie. Vzhľad cytoplazmy bol rozdielny v rôznych častiach toho istého nádoru, aj individuálne. Celkovo prevládali bunky s úzkym až stredne širokým lemom tmavobazofilnej cytoplazmy a počet buniek so svetlou vodojasnou (PAS negatívnu) cytoplazmou bol individuálne rozdielny. Len v dvoch prípadoch tieto „svetlé“ bunky v histologickom obraze nádoru prevládali.

Aj fenotypické črty nádorových buniek všetkých prípadov boli vo väčšine hodnotených parametrov zhodné. Tieto boli konštantne pozitívne pri dôkaze CD45 a B-asociovaných antigénov a negatívne pri dôkaze T-asociovaného antigénu (v kontraste k primesi reaktívnych malých T-buniek) a antigénu CD30. Aj keď počet pozitívnych buniek pri dôkaze bcl-2-proteínu bol individuálne značne rozdielny, vždy presahoval hodnotu 10% nádorových buniek, takže všetky prípady boli hodnotené ako pozitívne. V piatich prípadoch sme nepozorovali expresiu cytoplazmatického Ig, len v jednom prípade bol dokázaný monotypický c-Ig typu λ šahkého reťazca v malom počte buniek nádoru.

Klinická charakteristika ochorenia jednotlivých pacientov je sumarizovaná v tab. č. 3. Vo všetkých prípadoch boli zistené požadované údaje s výnimkou nevedenia terapie u jedného pacienta. Prvými príznakmi ochorenia boli kašeš (n=4), bolesť alebo tlak v hrudníku (n=5), ktoré boli relatívne zriedka spojené so zvýšením teploty (n=2) či nočným potením (n=1). U jedného pacienta bol ďalej zistený „syndróm hornej dutej žily“

Tab. č. 3. Sumarizácia zistených údajov o štádiu, priebehu ochorenia a osude pacientov.

Pacient č.	Pohlavie/ vek	Klinické štádium	Leukemizácia	Infiltrácia kostnej drene*	Lokálna infiltrácia	Lymfadenopatia extratorakálna	Terapia	Osud pacienta
1.	Ž/24 rokov	IV A	Sine	neprítomná	pšúc, pleury, v recidíve aj myo- a perikardu	sine	CHT, RAT, autológna TKD	exitus po 13 mes.
2.	M/29 rokov	II A	Sine	neprítomná	pšúc, hilových a mediastinálnych LU	sine	CHT, RAT	1. KR, prežíva 60 mes. od diagnózy
3.	M/44 rokov	II A	Sine	neprítomná	hrudnej steny	sine	?	exitus po 8 mes.
4.	Ž/17 rokov	IV B	Sine	neprítomná	pšúc, pleury a hrudnej steny	krčná, verifikovaná CT **	CHT, RAT	1. KR, prežíva 23 mes.
5.	Ž/34 rokov	I B	Sine	neprítomná	pšúc, primárne, aj počas recidívy	sine	CHT, RAT	KR nedosiahnutá, prežíva 19 mes.
6.	Ž/24 rokov	II A	sine	neprítomná	pšúc	sine	CHT, RAT	1. KR, prežíva 17 mes.

Skratky: M = muž, Ž = žena, LU = lymfatické uzliny, CHT = chemoterapia, RAT = radioterapia, TKD = transplantácia kostnej drene, mes. = mesiace, KR = kompletná remisia

* negatívny nález infiltrácie kostnej drene bol v prípadoch č. 1 a 3-6 overený biopticky (vyšetrenia v martinskom pracovisku) a v prípade č. 2 vyšetrením dreňového aspirátu

** priame šírenie nádoru z hrudníka - vid' textová časť

a v jednom prípade išlo o „náhodný“ nález pri vyšetrení pre alergickú reakciu typu Quinckeho edému po acylpyrín. Časový interval od prvých chorobných príznakov až do stanovenia diagnózy bol krátky v intervale troch týždňov až dvoch mesiacov. Nádorové infiltráty rôznej veľkosti a rozsahu boli identifikované zobrazovacími metódami (obr. 1. a 2.) V 5/6 prípadoch bolo už v čase diagnózy zistené lokálne šírenie nádoru z mediastína do pšúcného parenchýmu, ktoré v dvoch prípadoch viedlo aj k infiltrácii pleury mimo úsekov priamej propagácie nádoru do pšúc. Lokálne šírenie nádoru v podobe infiltrácie hrudnej steny bolo primárne verifikované pri operácii dvoch pacientov (v jednom prípade bez a v druhom so súčasnou infiltráciou pšúcného parenchýmu). Vnútrohrudné hilové a mediastinové lymfatické uzliny boli zväčšené len u jedného pacienta. U dvoch pacientov došlo napriek terapii k recidíve nádorového ochorenia, ktorá mala výlučne lokálny charakter. Recidíva sa manifestovala nádorom mediastína a pšúc, v jednom z týchto prípadov došlo k extenzii nádoru do myokardu a perikardu so sprievodným výpotkom v pleurálnej a perikardiálnej dutine. V kontraste k lokálnej agresivite neboli u našich pacientov pozorované známky extratorakálneho vzdialeného šírenia nádorového ochorenia a to ani primárne, ani počas recidívy. V žiadnom prípade súboru totiž nebola zistená infiltrácia kostnej drene alebo leukemizácia, rovnako

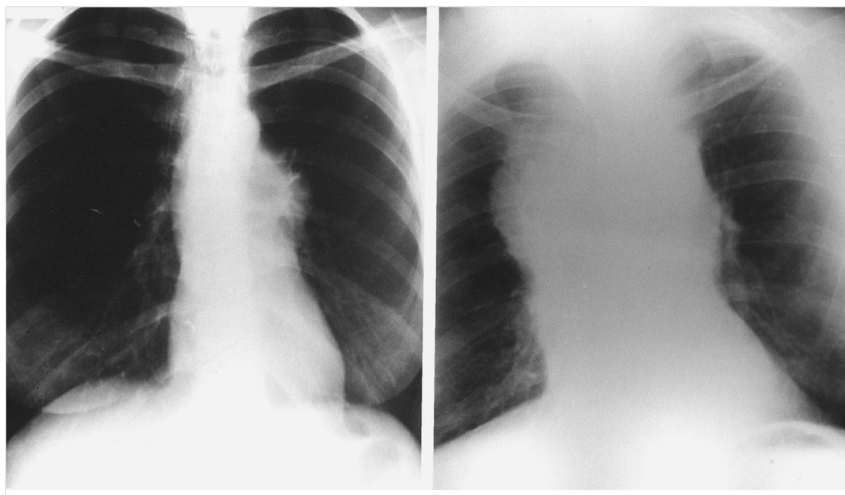
ani zväčšenie pečene a sleziny. Extratorakálna lymfadenopatia typu zväčšených krčných lymfatických uzlín bola zistená CT vyšetrením len u jedného pacienta, tu však išlo o súvislé šírenie vnútrohrudného nádoru do krčnej oblasti. Známky inej generalizácie zistené neboli.

Celkovo zo šiestich pacientov súboru dvaja exitovali, z toho jeden na respiračné zlyhanie v dôsledku progresie PMBVL, druhý nebol pitvaný. Podľa zistených údajov boli pacienti liečení kombinovanou chemo- a rádioterapiou podľa príslušných protokolov, u jedného bola urobená autológna transplantácia kostnej drene. Zo štyroch prežívajúcich pacientov u troch bola dosiahnutá kompletná a u jedného nespolupracujúceho pacienta neúplná remisia nádorového ochorenia.

Diskusia

V kontraste k častejšej sekundárnej infiltrácii mediastinálneho lymfatického tkaniva pri generalizácii nodálnych NHL je primárny vznik malígneho lymfómu v týchto štruktúrach relatívne zriedkavý. Pôvod môže mať v tkanive týmusu, alebo vnútrohrudných lymfatických uzlín. Zatiažčo v uzlinách vznikajú najmä primárne mediastinálne Hodgkinove lymfómy, tak neoplastickou transformáciou lymfoidných buniek týmusu vznikajú najčastejšie lymfoblastómy, resp. ALL (20). Tieto lymfómy s klinickou prezentáciou nádoru predného mediastína sú vzhľadom k centrálnemu postaveniu týmusu v ontogenéze T-radu obvyčajne T-fenotypu (14). Vznik NHL B-pôvodu v týmuse sa považoval za nepravdepodobný, lebo len nedávno boli v dreni týmusu identifikované (fyziologicky prítomné) bunky B-pôvodu (10). Ich klonálnou transformáciou môže vzniknúť PMVBL, ktorý tak predstavuje primárny extranodálny B-NHL týmusu s prejavmi typu nádoru predného mediastína (2, 18, 22, 23). Jeho incidencia je nízka, keď napr. v Kielskom registri pripadajú približne 2 prípady PMVBL na 1000 prípadov nodálnych NHL (14). Preto aj doterajšie skúsenosti s týmto nádorom sú zatiaľ obmedzené.

Vo väčšine štúdií PMVBL, podobne ako v našej, prevládajú pacienti ženského



Obr. č. 1.: Prehľadná RTG snímka hrudníka v predozadnej projekcii - pacient č. 5
Obr. č. 2.: Prehľadná RTG snímka hrudníka v predozadnej projekcii - pacient č. 3

pohlavia a v kontraste k morfoloicky podobným nodálnym NHL ochorením sú postihnutí pacienti nižších vekových skupín, keď až 70% pacientov býva mladších než 35 rokov (11, 21). Priemerný vek pacientov nášho súboru bol 28.7 roka, čo je v zhode so stredným vekom 25-36 rokov zisteným aj vo väčších súboroch (4, 7). Nízky vek a prevažia žien, spolu s prípadmi pozorovanými počas gravidity, vedú k úvahám o možnom vzťahu PMVBL ku involúcii týmusu a zmenám jeho bunkových populácií počas tehotenstva (7).

Z pohľadu biopptickej diagnostiky tohoto nádoru možno konštatovať, že pri dostatočných skúsenostiach a diagnosticky dostatočnom materiáli je morfológia tohoto nádoru pomerne typická a pri doplnení vhodným imunoanalytickým panelom by nemala spôsobovať problémy. Histocytologicky ide totiž o pomerne uniformný obraz stredne veľkých blastov B-fenotypu, takže diferenciálno-diagnostické odlišenie iných lymfómov (či už NHL, alebo Hodgkinových) alebo nádorov inej histogenézy by nemalo byť problémom. Terminologicky, najmä v prípade neznalosti údajov, či ide o primárny mediastinálny nádor, je najvhodnejšie použiť názov difúzny veľkobunkový B-lymfóm (8, 9). Pri dobrej spolupráci patológa a zainteresovaných klinikov a z toho vyplývajúceho dôkazu o primárnej mediastinálnej lokalizácii možno potom použiť diagnostický termín PMVBL. Keďže tak naše, ale aj literárne údaje ukazujú, že fibrotizácia či hyalinizácia strômy nádoru, ako aj svetlý vzhľad cytoplazmy jeho buniek nie sú konštantnou črtou PMVBL (7, 10, 14, 20), pridanie adjektíva „sklerotizujúci“ či „svetlobunkový“ k tejto diagnóze je len deskriptívnu informáciou. Aj keď v našom súbore boli aj videotorakoskopicky získané vzorky priekazné, niekedy pri tomto spôsobe odberu materiálu môžu vzniknúť diagnostické problémy jeho zhodnotenia. Platí to pre peroperačnú aj formolovú-parafrínovú biopsiu malých, prípadne fragmentovaných či zdrtených vzoriek, najmä v prípadoch vystupňovanej fibrotizácie a sklerotickej obliterácie nádoru a pri menšej skúsenosti operujúceho chirurga. Vtedy zásadne stúpa význam imunohistochemického dôkazu B-pôvodu nádorových buniek. Pre pochopenie klinických prejavov je dôležité zdôrazniť, že PMVBL je primárnym extranodálnym ochorením a že mnohé črty jeho manifestácie, pozorované aj v našom súbore, sú podobné skôr vlastnostiam iných extranodálnych, než primárne nodálnych NHL (2). Medzi tieto črty patrí lokálne obmedzený rast bez disseminácie, prinajmenej v počiatočných štádiách choroby (11, 19). Iničiálna prezentácia PMVBL je tak obvyčajne obmedzená na vnútrohrudnú oblasť, čo aj tu, podobne ako napr. pri NHL GIT-u, umožňuje predpokladať účasť „homing“ efektu nádorových buniek (20). Preto u väčšiny pacientov v čase diagnózy prevláda nález týmusovej nádorovej masy bez periférnej lymfadenopatie. Nádor spôsobuje obvyčajne obštrukciu dýchacích ciest, kašeš, tlak na hornú dutú žilu a bolesti na hrudníku (6, 21). Kašeš bol prvým príznakom aj u štyroch našich pacientov, ale syndróm hornej dutej žily bol vyvinutý len u jedného z nich. Aj keď rast je spočiatku lokálne obmedzený, je spojený so značným potenciálom lokálnej agresivity a deštrukcie s prerastaním nádorovej masy do perikardu, pleury, pšúc, prípadne aj do sternu a hrudnej steny (6, 22, 23). Tak tomu bolo aj v našom súbore pacientov, keď už v čase diagnózy nádor infiltroval pšúca piatich pacientov, z toho súčasne u dvoch aj ďalšie úseky pleury a u jedného aj prednú hrudnú stenu, pričom u posledného nášho pacienta nádor prerastal priamo do prednej hrudnej steny bez známok postihu pšúc. Infiltrácia pleury už v čase diagnózy sa dokonca považuje prítom za negatívny prognostický znak (20). Navyše u jedného z našich pacientov nádor z hrudníka prerastal až do krčnej oblasti a infiltroval tu lymfatickú uzlinu, čo bolo

verifikované zobrazovacími metódami. Charakteristickú lokálnu agresivitu rastu podčiarkuje aj krátkosť časového intervalu od prvých príznakov až do stanovenie diagnózy aj v našom súbore, čo poukazuje na vysokomaligne biologické vlastnosti PMVBL. Tieto črty spolu so spôsobom možnej extratorakálnej generalizácie v ďalšom priebehu ochorenia ovplyvňujú ďalší osud pacienta. Spôsob disseminácie PMVBL sa však odlišuje od rysov generalizácie morfoloicky podobných primárne nodálnych lymfómov. U žiadneho z našich pacientov sme nepozorovali známky leukemizácie, infiltrácie kostnej drene, či hepatosplenomegálie, rovnako ani známky extratorakálnej lymfadenopatie (bez priameho súvisu s nádorom). Nízka frekvencia infiltrácie kostnej drene a s ňou súvisiacich komplikácií - menej než u 2% pacientov vo väčších súboroch - je tak v protiklade k častejšie pozorovanej infiltrácii kostnej drene (až v 17% prípadov) pri iných difúzných veľkobunkových NHL (5, 21). Ak vôbec dôjde k postihu vzdialených lymfatických uzlín, tak postihnuté bývajú obvyčajne len vnútrobrušné uzliny (11), čo zrejme súvisí s ďalším možným šírením tohoto nádoru. V neskorších fázach ochorenia alebo počas relapsov môže totiž dôjsť k transdiafragmatickému prestupu nádoru a k postihu ďalších extranodálnych oblastí (6). Sem patrí možná infiltrácia obličiek a nadobličiek, prípadne GIT-u, ovárií a iných orgánov (6, 20, 21). V našom súbore sme tieto komplikácie nepozorovali, aj keď tu musíme zohľadniť obmedzenosť doterajšieho časového intervalu sledovania našich pacientov. V dvoch nami sledovaných prípadoch nádorové ochorenie recidivovalo, ale recidívy boli obmedzené na vnútrohrudnú oblasť s rozšírením nádoru až do srdového svaly v jednej z nich. V časti prípadov bola u pacientov s PMVBL niektorými autormi pozorovaná aj infiltrácia mozgu, ale v porovnaní s možným (a intratekálnu profylaxiu vyžadujúcim) postihom CNS inými mediastinálnymi NHL sú tieto prípady menej časté (1, 10).

Všetky uvedené parametre ovplyvňujú hodnotu klinického štádia ochorenia. V našom súbore boli po zohľadnení primárnej prezentácie a recidívy štyria pacienti zaradení do I.-II. štádia a u dvoch bolo zistené až IV. štádium. Aj tieto naše nálezy sú porovnateľné s literárnymi údajmi z väčších súborov, podša ktorých prvé dve klinické štádia bývajú zistené u 58-75% pacientov (1, 3, 21). Pôvodne bola prognóza pacientov s PMVBL zlá, dnes možno asi v polovici prípadov dosiahnuť dlhotrva-júcu kompletnú remisiu pri vhodnej kombinácii chemo- a rádioterapie (21). Nami analyzovaný súbor pacientov a dôzku ich sledovania nepovažujeme zatiaľ za dostatočný pre závažnejšiu výpoveď v tomto smere. Medzi všeobecne akceptované nepriaznivé prognostické znaky patrí vek pod 25 rokov, extratorakálna propagácia nádoru alebo súčasný postih viacerých extranodálnych lokalizácií už v čase diagnózy, vysoký medzi-národný prognostický index a rekurencia po terapii (1). Hoci prognosticky a úspešnosťou terapie sa PMVBL zásadne nelíši od iných difúzných veľkobunkových lymfómov B-pôvodu, jeho iničiálna klinická prezentácia a spôsob disseminácie v relapsoch či neskoršom priebehu oprávňujú považovať ho za samostatnú klinickú jednotku (5). Na túto skutočnosť sme chceli poukázať aj v predloženej štúdií, a to aj preto, že uvedený prístup je akceptovaný aj v navrhovanej klasifikácii NHL podša SZO (12, 13).

Pod'akovanie:

Autori ďakujú MUDr. Vranovskému (NOÚ v Bratislave), MUDr. Baňákovéj (HTO v Banskej Bystrici) a MUDr. Jedličkovi (POKO NsP v Liptovskom Mikuláši) za zaslanie odpovedí na uvedené dotazníky.

Literatura:

1. Abou Elella, A.A., Weisenburger, D.D., Vose, J.M., Kollath, J.P., Lynch, J.C., Bast, M.A., Bierman, P.J., Greiner, T.C., Chan, W.C., Armitage, J.O.: Primary mediastinal large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 43 patients from the Nebraska Lymphoma Study Group. *J. Clin. Oncol.*, 17, 1999, č. 3, s. 784-790.
2. Aisenberg, A.C.: Primary large cell lymphoma of the mediastinum. *Semin. Oncol.*, 26, 1999, č. 3, s. 251-258.
3. Bieri, S., Roggero, E., Zucca, E., Bertoni, F., Pianca, S., Sanna, P., Pedrinis, E., Bernier, J., Cavalli, F.: Primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMLCL): the need for prospective controlled clinical trials. *Leuk. Lymphoma*, 35, 1999, č. 1-2, s. 139-146.
4. Bishop, P.C., Wilson, W.H., Pearson, D., Janik, J., Jaffe, E.S., Elwood, P.C.: CNS involvement in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 17, 1999, č. 8, s. 2479-2485.
5. Cazals-Hatem, D., Lepage, E., Brice, P., et al.: Primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, 20, 1996, 7, s. 877-888.
6. Ferry, J.A., Harris, N.L.: Peripheral B-cell neoplasms. In: Atlas of lymphoid hyperplasia and lymphoma. Eds.: J.A. Ferry, N.L. Harris, W. B. Saunders Comp., Philadelphia 1997, s. 72-137.
7. Henry, K.: Neoplastic disorders of lymphoreticular tissue. In: Thymus, Lymph Nodes, Spleen and Lymphatics. Eds.: K. Henry, W. St. C. Symmers, Churchill Livingstone, Edinburgh 1992, s. 611 - 960.
8. Chan, J. K. C., Banks, P. M., Cleary M. L., a spol.: A proposal for classification of lymphoid neoplasms (by the International Lymphoma Study Group). *Histopathol.*, 1994, č. 25, s. 517-536.
9. Chan, J.K.C., Banks, P.M., Cleary, M.L., a spol.: A revised European-American Classification of lymphoid neoplasms proposed by the International Lymphoma Study Group. A summary version. *Am. J. Clin. Pathol.*, 103, 1995, č. 5, s.543-560
10. Isaacson, P.G., Norton, A.J., Addis, B.J.: The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *Lancet*, 1987, ii., s. 1488-1491.
11. Isaacson, P.G., Norton, A.J.: Malignant lymphoma of the thymus. In: Extranodal lymphomas. Eds.: P.G. Isaacson, A.J. Norton. Churchill Livingstone, Edinburg 1994, s. 229-240.
12. Jaffe, E.S., Harris N.L., Diebold J., Muller-Hermelink H.-K.: World Health Organization Classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. *Am. J. Clin. Pathol.*, 111, 1999, suppl., s. 8-12.
13. Jaffe, E.S.: Hematopathology: Integration of morphologic features and biologic markers for diagnosis. *Mod. Pathol.*, 12, 1999, 2, s. 109-115;
14. Lennert K., Feller A.C.: Histopathology of Non-Hodgkin's Lymphomas (Based on the updated Kiel Classification). Springer Verlag, Berlin 1992, 312 s.
15. Lichtenstein, A.K., Levine, A., Taylor, C.R., a spol.: Primary mediastinal lymphoma in adults. *Am. J. Med.*, 68, 1980, s. 509-514.
16. Menestrina, F., Chilosi, M., Bonetti, F., a spol.: Mediastinal large-cell lymphoma of B-type, with sclerosis: histopathological and immunohistochemical study of eight cases. *Histopathology*, 10, 1986, s. 589-600.
17. Mikuláš, J., Špálek, P.: Mediastinum. In: Speciální chirurgie – 3. Chirurgia hrudníka. Ed.: Černý, J. a kol., Osveta, Martin 1993, s.297-334.
18. Möller, P., Moldenhauer, G., Momburg, F., a spol.: Mediastinal lymphoma of clear cell type is a tumor corresponding to terminal steps of B cell differentiation. *Blood*, 69, 1987, s. 1087-1095.
19. Plank L., Hyrdel R., Szépe P., Michalová R.: List redakcii: K problematike diagnostiky maltómu. *Ces. a Slov. Gastroenterologie* 52, 1998, č. 3, s. 121-124.
20. Rosai, J.: Chapter 8.: Mediastinum. In: Ackerman's Surgical pathology vol. I. Ed.: J. Rosai, Mosby, St. Louis 1996, s. 435-492.
21. Stein, H., Dallenbach, Fr.: Diffuse large cell lymphomas of B and T cell type. In: Neoplastic Hematopathology. Ed.: D.M. Knowles, Williams & Wilkins, Baltimore 1992, s.675-714.
22. Suster, S., Moran, C.A.: Pleomorphic large cell lymphomas of the mediastinum. *Am. J. Surg. Pathol.*, 20, 1996, 2, s. 224-32.
23. Suster, S.: Primary large-cell lymphomas of the mediastinum. *Semin. Diagn. Pathol.*, 16, 1999, č. 1, s. 51-64.

knihy

TUMOR BONE DISEASES AND OSTEOPOROSIS IN CANCER PATIENTS – PATHOPHYSIOLOGY, DIAGNOSIS, AND THERAPY

JEAN-JACQUES BODY (Ed.)

Marcel Dekker, Inc., New York – Basel 2000

561 str., 121 obr., 51 tab., ISBN: 0-8247-6399-8,

cena 195,- USD

Tato kniha byla napsána za spolupráce 54 odborníků z USA, Austrálie a řady evropských zemí. Sestává z 25 kapitol seřazených do následujících okruhů (v závorce jsou uvedena temata kapitol): patofyziologie (základy fyziologie kostí, humorální hyperkalcemie malignit, buněčné a molekulární mechanismy vývoje metastáz kostí, patogenéze osteoblastických metastáz), klinické aspekty metastáz kostí (pouze jedna stejnojmenná kapitola), diagnostika a monitorování (klinické prostředky, scintigrafie, radiodiagnostika, markery), klasické přístupy k léčbě metastáz kostí (chemoterapie a hormony, léčba bolesti, radioterapie, radioaktivní látky ve formě otevřených zářičů, ortopedická péče), léčba metastáz kostí inhibitory osteoklastické resorpce kostní tkáně (bifosfonáty, mechanismus účinku při prevenci nádorů, klinická farmakologie bifosfonátů, léčba hyperkalcemie, léčba osteolýzy, bifosfonáty v léčbě mnohočetných myelomů, nitrát galia a meta-stázy v kostech), osteoporóza u pacientek s karcinomem prsu (příčiny a diagnostika, osteoporóza u pacientek léčených estrogény, úloha bifosfonátů).

Oblast medicíny, na níž se kniha zaměřuje, prodělala v posledních patnácti letech velký pokrok z patofyziologického, diagnostického i léčebného hlediska. Metastatické onemocnění kostí, zvláště jeho lytická komponenta, je odpovědné za

značnou morbiditu a výrazné zhoršení kvality života pacientů. Klinické trialy prokazují, že u pacientů s kostními metastázami je nižší odezva k antineoplastické terapii než u pacientů s metastázami v měkkých tkáních a útrobach, což svědčí o malé citlivosti současných metod pro hodnocení odezvy kostí. Ke zlepšení situace je tedy nutné důkladněji zkoumat hodnocení symptomů, měření nádorových markerů a biochemických parametrů kostního obratu. Pro zvládnání bolesti při metastázách v kostech má stále základní roli radioterapie, ale zatím existuje nejistota pokud se týká vztahu mezi dávkou a její frakcionací a výskytem úlevy od bolesti resp. jejím trváním. Bifosfonáty, jež jsou účinnými inhibitory resorpce kostní tkáně zprostředkované osteoklasty, otevřely cestu pro necytotoxickou léčbu kostních metastáz. Staly se standardní léčbou hyperkalcemie vyvolané nádory; iterativní bifosfonátové infuze významně zmírňují bolest u poloviny pacientů, u pětiny pacientů dochází ke skleróze osteolytických lézí. Ještě větším přínosem jsou bifosfonáty u pacientů s mnohočetným myelomem, vyznačujícím se značným vzestupem aktivity osteoklastů a proliferací. Budoucí indikací nových účinnějších bifosfonátů bude pravděpodobně prevence kostních metastáz u rizikových pacientů a prevence postmenopauzální osteoporózy. Kapitoly v knize jsou přehledně členěny, opatřeny úvodem a souhrnem a bohatou citovanou literaturou. Shrnují dosažený pokrok a naznačují směry dalšího výzkumu. Podle vyjádření editora v předmluvě je kniha psána pro široký okruh odborníků – internistů, chirurgů a radioterapeutů, kteří zde naleznou užitečné pokyny týkající se péče o onkologické pacienty, a dále pro pracovníky základního výzkumu, jež ocení komplexní aktuální přehled problematiky. Knihu distribuuje Marcel Dekker AG, Hutgasse 4, Postfach 812, CH-4001 Basel, Switzerland. V. H.

JEDNOTKY INTEGROVANÉ MAMMARNÍ DIAGNOSTIKY (JIMD). NAVRH KONCEPCE

INTEGRATED BREAST DIAGNOSTIC UNITS – CONCEPTION OF SUGGESTION

M. SKOVAJSOVA

MAMMA CENTRUM, DTC PRAHA

Karcinom prsu je nejčastější zhoubné onemocnění žen. Roční incidence se v České republice pohybuje kolem 4500 případů, několikanásobně vyšší je počet žen s abnormálními nálezy v prsu, vyžadujícími dispenzarizaci. Snižování úmrtnosti na karcinom prsu znamená podle celosvětového konsensu především vyhledávání jeho nejčasnějších či dokonce preinvazivních stadií, v nichž je terapie poměrně málo nákladná a vysoce účinná.

1. Současný stav časné diagnostiky karcinomu prsu

V České republice existují v zásadě dvě hlavní formy, které reprezentují mammární diagnostickou péči:

Mammární poradny při chirurgických, gynekologických nebo onkologických odděleních nemocnic a poliklinik, které stavějí především na vyšetření pohmatem. Teprve v případě podezřelého palpačního nálezu je pacientka odesílána k mammografickému vyšetření. Palpační diagnostika má svá omezení, kterou ovlivňuje zkušenost lékaře, velikost prsů i typ žlázy. Nejmenší palpací zjištěné nádory odpovídají nejčastěji kategorii T2. Drobná ložiska kategorií T1 a Tis obvykle pohmatem zjistit nelze.

Cílená mammární diagnostika, jejíž podstatou je radiodiagnostické vyšetřování žen, které jsou odeslány gynekologem nebo praktickým lékařem z různých důvodů. Nejčastěji jde o vyšetření prsů související s nasazením hormonální substituční terapie (HRT), významnou rodinnou onkologickou zátěží, stavy po zhmoždění prsu, s asymetrickou mastodynii, sekreční chorobou prsu a podobně. Z těchto vyšetření převážně asymptomatických žen vycházejí ponejvíce diagnózy karcinomů v prognosticky příznivých, časných a preinvazivních stadií zhoubných nádorů prsu, respektive kategorií T1 a Tis. Fungováním pracovišť cílené mammární diagnostiky lze také vysvětlit první známky proporcionálního nárůstu kategorie T1 spolu s oplošťováním křivky úmrtnosti na karcinom prsu v devadesátých letech.

V České republice neexistují standardy pro diagnostiku prsní žlázy a proto jsou spontánně uplatňovány různé přístupy:

1. *Mammární poradna* je vedena nejčastěji chirurgem, případně gynekologem který vyšetřuje prsy palpací. Náplň samotného poradenství je velmi neurčitá, v léčbě bolestivosti žlázy se podává omezené množství léků, z nichž některé si žena kupuje sama. Eventuální potřebnou hormonální terapii indikuje spíše gynekolog v rámci pravidelné gynekologické prevence. Mnohé

ženy docházejí do těchto poraden několikrát do roka ke kontrole pouze palpací. V této podobě má mammární diagnostika co do záchytu zřídka hmatných lézí kategorie T1 a Tis minimální výtěžnost. V ostatních vyspělých zemích Evropy není tento typ poraden vůbec zaveden.

2. *Mammární diagnostika prováděná v rámci radiologických oddělení*, která jsou vybavena mammografy a ultrazvukovými přístroji. Vyšetřují ženy s hmatným nálezem nebo s potížemi a v posledních letech i ženy bezpříznakové. Odesílající lékař provede u bezpříznakových pacientek necílené palpační vyšetření, u žen s hmatným nálezem jej palpačně ověří, odebere anamnézu a indikuje vyšetření zobrazovací metodou – obvykle mammografem. Na základě této indikace provede RDG oddělení vyšetření, které je zhodnoceno s časovým odstupem a výsledek sdělen původně odesílajícímu lékaři. Není – li možno diagnózu stanovit na základě jednoho druhu vyšetření, požádá rentgenolog klinika o doporučení pacientky k dalšímu diagnostickému kroku, ten může být za pomoci sonografie či biopsie. Pacientka se znovu objedná. S dalším nálezem se vrací zpět k ošetřujícímu lékaři, který se rozhoduje o dalších vyšetřeních nebo frekvenci opakování kontrol. Vyšetřující radiolog v tomto případě působí jako pasivní článek odevzdávající pouze požadované vyšetření. Časová náročnost celého postupu je pro pacientku zatěžující.

3. *Jednotky mammární diagnostiky v kompetenci specializovaných radiologů nabízející mammografii i sonografii*, nezřídka v indikovaných případech vyšetření obojím způsobem podle rozhodnutí radiologa. Podle potřeby je doplněno cílené palpační vyšetření v korelaci se sonografií, odběr anamnestických dat je normou. Tato kombinovaná diagnostika je i přes pojitku dvojího čtení mammogramů provedena v rámci jedné návštěvy. Tenkojehlová aspirační cytologie či core cut bio-psie (tru cut) zachyceného ložiska pro histologickou verifikaci je provedena v nejbližších dnech. Pacientka odchází poučena s určeným termínem dalšího diagnostického kroku. Tyto jednotky jsou schopny vydat ženě výsledek vyšetření s negativním nálezem ihned, což je velmi oceňováno nejen pro úsporu času, ale hlavně pro eliminaci napětí a strachu z možného mnohadenního i několikátýdenního čekání na závěr. V případě neurčitého výsledku si jednotky samy zvou ženu na kontroly a snaží se stanovit diagnózu co nejpřesněji kombinací všech dostupných způsobů mammární diagnostiky.

4. „*Kdo má ultrazvukovou sondu vyšetřuje*“ je bohužel další ze systémů, který se v nemalé míře prosadil na českém trhu

zdravotní péče. V privátních praxích gynekologů, chirurgů a internistů je provozováno velké množství malých ultrazvukových přístrojů nevyhovujících požadavkům na kvalitní software a UZ sondu pro vyšetřování měkkých tkání. Tyto přístroje jsou využívány k preventivním či diagnostickým vyšetřením prsu bez znalosti mammografie někdy i bez snahy o korelaci s mammografií. K tomuto stavu přispělo i zrušení kódu 17 108, kterým se do roku 1997 označovaly čisté sonografie prsu. Těžko zachytitelné počty vyšetření se ukrývají pod kódem ultrazvukového vyšetření horní poloviny břicha nebo takzvaným vyšetřením 2 orgánů. Pacientky s podezřelým nálezem jsou obvykle odesílány do mammárních poraden, kde pak lékař odesílá ženu k mammografickému vyšetření nebo dispenzarizuje pouze opakovaním palpačního vyšetření.

5. Existují jistě ještě *další menší přístup* k diagnostické péči o prsní žlázy. Pacientka je v nich zdrojem vzácných výkonových bodů. Autoři přesvědčují sebe i okolí o úrovni poskytované péče. Nejhorší ze všech modelů je ten, kdy každá část diagnostického procesu je provedena někde jinde, někým jiným. Dezinterpretace jednotlivých mezistupňů vede k tragickým diagnostickým omylům, jejichž tíži pak nese na svých bedrech postižená žena.

2. Úskalí mammární diagnostiky

Diagnostika minimálních a iniciálních prognosticky příznivých lézí má ovšem častá, mnohými netušená, úskalí.

Velmi malá ložiska jsou netypická v MG i sono obraze a jejich odhalení může být provedeno pouze specialistou, který má natrénovány určité pravděpodobné modely a obrazy ve své vizuální paměti. Jejich kombinací, a často jen tušením problému, dokáže diskretní ložisko odhalit. Ani nejlepší mammografické atlasy neposkytují vyčerpávající nabídku možných obrazů zhoubného nádoru, zejména pak v iniciálních stádiích.

Kvalita diagnostických schopností roste, vedle kontinuálního vzdělávání, zejména s počtem provedených mammografických a sonografických hodnocení. Čas hraje roli spíše podružnou. Praxí je ověřeno, že mnohaletá zkušenost s celkovým malým počtem provedených vyšetření nevede k potřebnému zvyšování erudice.

Výběr zobrazovací metody je určován typem prsní žlázy a věkem ženy. Toto sdělení nemůže s ohledem na jeho rozsah popsat podrobně celý proces, proto uvádím jen shrnující konstatování: Pro některé ženy je přínosnější mammografie, pro jiné sonografie, ostatní vyžadují kombinaci obou metod. Navštěvuje-li žena pravidelně jedno diagnostické centrum, může se podíl provedených mammografií během let významně snížit ve prospěch sonografií, které nezatěžují radiaci a jsou i ekonomicky výhodnější.

Pro tento postup platí určitá pravidla, která se opírají o vyhodnocení rizikovitosti obrazu a také o možnost neustále porovnávat mezi sebou původní i nejnovější vyšetření. Jedině tímto způsobem lze odhalit počínající formy nádorů. Z toho vyplývá rovněž nezbytná podmínka navštěvování jednoho diagnostického pracoviště. Při nespokojenosti pacientky a jejím přechodu do péče jinde je pak logickou povinností předání veškeré dokumentace zařízení, které péči přebírá. Nezbytností je pravidelnost kontrol aspoň jednou ročně, neboť delší interval je pro zachycení minimálních nádorových ložisek již nevhodný a negativně ovlivňuje efektivitu preventivních kontrol.

Je zapotřebí zdůraznit, že ve většině případů může být diagnóza karcinomu prsu dovedena až k histologické verifikaci v rámci práce jedné diagnostické jednotky. Cílené biopsie pod sonografickou nebo mammografickou kontrolou jsou jako součást předoperačních diagnostických postupů považovány ve vyspělých evropských zemích za standard. Některá pracoviště v České republice již mají předoperační biopsie zařazené ve svém diagnosticko-léčebném protokolu, mají-li vhodně indikovat třeba biopsii sentinelové uzliny nebo neoadjuvantní léčbu. Úskalím péče o nemocné s časným

karcinomem prsu je však mnohdy právě neprovázanost jednotlivých diagnostických modalit a značná míra nekompletnosti předoperačních diagnostických závěrů.

3. Jednotky integrované mammární diagnostiky

Z výše uvedené analýzy vyplývá, že nejlépe k zajištění efektivní a kvalifikované diagnostické mammologické péče i spokojenosti žen jsou diagnostická pracoviště fungující na principu jednotek integrované mammární diagnostiky (JIMD). Právě integrace všech diagnostických postupů na jednom místě a ve stejném čase je postupem, který zefektivňuje celý systém, koncentruje pozornost i zkušenost na problém spíše než na tu či onu metodu, odstraňuje časové ztráty i zbytečný stres pacientek a vytváří také podmínky pro kontinuitu dispenzární péče umožňující hodnocení dynamiky mammologických nálezů, včetně kontextu s rodinnou a osobní anamnézou.

Charakteristikou práce JIMD je právě pokrytí mezer, které standardní mammární poradny nebo rutinní radiologické služby v mammární diagnostice nenabízejí. Jejich přirozeným zájmem je provádět jen ta vyšetření a jejich kombinace, která vedou k rychlému diagnostickému závěru, včetně návaznosti na diagnostickou práci histopatologické laboratoře. Nesporně je zájmem JIMD také udržování funkčních a stálých vazeb na specializovaná chirurgická a onkologická pracoviště, která jsou nejen odběrateli produktu jejich práce, hodnotiteli kvality jejich diagnostické činnosti, ale především dokladem o cílevědomé odborné péči vůči pacientkám samotným, které přímé vazby a provázanost zdravotních služeb oceňují v prvé řadě.

Jednotky integrované mammární diagnostiky jako součást diagnosticko-terapeutických center se řídí principy, které by měly být v systému zdravotních služeb obecně uplatňovány, a to dostupnost, efektivnost, ekonomickou přičinlivost i návaznost komplexní péče o nemocné nebo ohrožené zhoubným nádorem.

Dostupnost

- každá žena by měla mít právo preventivního vyšetření prsů 1x ročně v JIMD v rámci svého zdravotního pojištění, častěji pak při abnormálním nálezů nebo klinických potížích
- každá žena má mít veškerou dokumentaci jen v jedné JIMD, což je důležité pro možnost porovnávání nálezů
- každá JIMD je povinna vydat celou dokumentaci, přeje-li si žena navštěvovat jinou JIMD.

Efektivnost

- činnost JIMD zajišťují *radiologičtí specialisté – mammodiagnostici*, kteří provádějí diagnostický rozhovor, palpační vyšetření, indikují a vyhodnotí vyšetření zobrazovacími metodami, provádějí cílené biopsie
- kvalifikovaný výběr zobrazovacích metod* je určován věkem ženy, typem její mléčné žlázy i předchozími nálezy v rámci dispenzární péče
- vysoké každodenní počty vyšetření* vedou k potřebné erudici
- práce v týmu* umožňuje dvojí čtení mammografií, okamžité konzultace i řešení urgentních případů.
- pozitivní diagnózy nádorů jsou v JIMD předoperačně dovedeny až po *histologickou verifikaci léze*, přesné diagnózy vylučují zbytečné diagnostické chirurgické exstirpace, které v současnosti činí až 60 % všech mammárních operací
- soustavnou dispenzární činností JIMD postupně při opakovaných kontrolách *narůstá počet nehmotných a preinvazivních ložisek*, čímž je naplňován hlavní cíl práce JIMD.
- při opakovaných kontrolách v jedné JIMD se *zvyšuje výtečnost diagnostiky* - značný a nezastupitelný význam má při tom porovnávání všech nálezů z předchozích návštěv, opakované kontroly dávají prostor pro snižování počtu mammografií a tím i dávek záření ve prospěch sonografické diagnostiky, která radiačně nezatěžuje a je levnější

Ekonomická průchodnost

- a) při využití stávajících diagnostických přístrojů vytváření *JIMD nemusí vyžadovat nové investice*
- b) při dlouhodobém sledování jedné pacientky se budou *náklady na jedno vyšetření postupně snižovat*, snížení se dosáhne kombinací a alternací levnější a dražší zobrazovací metody.

Návaznost péče

- a) *JIMD může být součástí komplexního zdravotnického zařízení, může však stát i samostatně, obě varianty mají své přednosti, druhou upřednostňují především samotné klientky, protože dává možnost vytvořit civilnější příjemné prostředí, které ženy lépe akceptují a s větší pravděpodobností navštěvují v rámci prevence*
- b) samostatně stojící *JIMD* musí ovšem mít vytvořeny jasné definované vazby na terapeutickou část celého programu péče o nemocné s karcinomem prsu v regionu (histopatologie, chirurgie, onkologie, radioterapie ale i psychologie, svépomocné organizace, plastická chirurgie)

Fungování JIMD

- a) vznikající jednotky nesmějí být omezovány ve své výkonnosti
- b) vyšetření by měla být hrazena pojišťovnami jako součást preventivního programu, nejsou-li v systému pojištění dostatečné finance, je třeba tento fakt veřejně deklarovat a motivovat ženy k placení z vlastních prostředků, nebo projednat možnosti jiných úhradových mechanismů, například vymezit pravidla finanční spoluúčasti ženy
- c) kvalita mammografických přístrojů se řídí ustanoveními Atomového zákona, výkonnost sonografů podle evropských norem
- d) se specializací a zvyšováním erudice lékařů se budou postupně vytvářet náročnější diagnostické standardy, které bude v praxi reálně dodržovat
- e) *JIMD může fungovat jako zařízení prvního kontaktu* - při vynechání zbytečného mezistupně, kterým je doporučení k mammologickému vyšetření, je tímto způsobem zejména šetřen čas všech zúčastněných. V opačném případě se na odesílání žen do *JIMD* a motivaci ke každoroční preventivní návštěvě jednotky může rovněž podílet praktický lékař nebo gynekolog
- f) *specializovaný radiodiagnostik – mammodiagnostik* bude zodpovědný za využití a kombinaci všech diagnostických metod, za diagnostický závěr, který musí být co nejjednodušší, bude dbát o zvyšování své kvalifikace, o vysokou úroveň spolupráce s ostatními odborníky mamárního týmu (chirurg, radioterapeut, onkolog)
- g) *kompletní diagnostický závěr v čitelné podobě dostane pacientka* do ruky a předá jej praktickému lékaři, případně gynekologovi, zejména užívá-li hormonální terapii
- h) každá *JIMD* *povede kvalifikovanou databázi* vyšetřených a dispenzarizovaných pacientek, ukládání statisticky zpracovatelných a důležitých dat v digitální podobě je základním předpokladem pro komunikaci s ostatními *JIMD* i terapeutickými odděleními a zároveň podmínkou pro kvalitní sebekontrolu i kontrolu úrovně jednotky určeným subjektem.

Systém vzdělávání v oblasti mamární diagnostiky

- a) mammodiagnostici budou atestováni v oboru radiologie a projdou postgraduálním kurzem mammodiagnostiky a onkologie
- b) problematika mamární diagnostiky bude také zařazena do postgraduálního vzdělávání praktiků a gynekologů, na němž se budou účastnit odborníci funkčních *JIMD*.

4. Účast JIMD v programech onkologické prevence

V tomto kontextu je nutno zdůraznit rozdíl mezi plošně organizovaným screeningem a systematickou nabídkou

kvalifikovaných preventivních prohlídek prsu. Screening znamená celoplošné mammografické vyšetřování žen v intervalech 12 až 24 měsíců na podkladě vyzvání žen dopisem. Počátek screeningu bývá v rozmezí 40–50let věku. Doporučení Bruselské konference ze září 2000 hovoří o věkové kategorii 50–70 let. Ze zkušeností severovýchodních zemí je jisté, že screening navštěvuje maximálně 50–60% žen, což je dolní hranice efektivity této nákladné a celoplošné akce. V jejich souborech jsou ženy ve věkové kategorii 40–70 let. Systém celoplošné organizovaného screeningu je velmi nákladný, nezbyvají v něm obvyklé prostředky na důležitá sonografická vyšetření, které je často nutno kombinovat s mammografií. Nezřídka je diagnóza časného nádoru prsu stanovena pouze sonograficky. Práce kolektivu Mamma centra uvedená na Radiologickém kongresu v Mariánských lázních v listopadu 2000 udává, že až 20% diagnóz je mammograficky nemyšlých a tento prostor často diagnosticky vyplní sonografické vyšetření.

Screening jako organizačně náročná metoda preventivní onkologie je nejen drahý, ale i dosti těžkopádný, vyžaduje rozšiřování přístrojového parku a vysoké počty personálu, mnohdy ne zcela specializovaného. Efektivita screeningu je zatížena chybami vyšetřujících lékařů – pracoviště mammografického screeningu nejsou připravena na dokončení diagnózy dalšími metodami, které jsou spíše omezovány, aby se náklady na screening nezvyšovaly. Mammografický screening vyžaduje mammografií z kontextu ostatních vyšetřovacích metod mamární diagnostiky, lékaři v něm zúčastnění jsou poměrně pasivními subjekty v diagnostickém řešení časného záchytu karcinomu prsu jako celku a vztah vyšetřujících a klientek je zcela neosobní, takže mamární péči stejně přebírá někdo jiný.

Nabídka kvalifikovaných preventivních prohlídek prsní žlázy ve specializovaných jednotkách integrované mamární diagnostiky je podrobně popsána v příloženém návrhu koncepce. Je nesporně vhodnější pro podmínky České republiky v této době zejména pro postupnost vzniku sítě *JIMD*, návazností na komplexní onkologickou péči, nesporně menší náklady a vyšší diagnostickou efektivitu. Je cestou důrazu na kvalitu s postupným nárůstem kvantitativních ukazatelů. Celoplošný screening klade od počátku důraz především na kvantitativní ukazatele preventivní akce, jejíž efektivitu pak snižuje nedostatečná kvalita diagnostických závěrů a vyhasínání v čase z důvodu nízké osobní zainteresovanosti klientek při neosobním vztahu s diagnostikem. Screening, na rozdíl od nabídkové sítě *JIMD*, sám o sobě dostatečně nepřispívá ke zvyšování provázanosti a komplexnosti onkologické péče ani zvyšování specializace a kvalifikace mamnologických odborníků a týmů. Screeningový program má tendenci se časem destabilizovat a rozvolňovat, tendence činnosti *JIMD* je s postupem času právě opačná.

5. Závěr

Současně uplatňované způsoby mamární diagnostiky směřující ke zvýšení časného záchytu zhoubných nádorů prsu a prekanceróz nejsou standardizovány, některé postrádají potřebnou kvalitu, efektivitu a provázanost.

Jednotky integrované mamární diagnostiky jako součást diagnosticko-terapeutických center a programů by se měly stát chybějícím standardem a efektivní cestou ke snížení mortality na zhoubné nádory prsu.

Výhodou *JIMP* jako standardního nástroje preventivní a kurativní onkologie je možnost postupného zavádění při využití současných přístrojů a kapacit. Investice do *JIMD* jsou rozloženy do delší doby. Optimální počet *JIMD* a jejich rozložení určí v budoucnu skutečné potřeby těchto integrovaných mammodiagnostických služeb. Bude nutné mamnologické proškolení zainteresovaných radiodiagnostiků a postupný rozvoj nové specializace mammodiagnostik.

JAK DALE V LÉEBI HODGKINOVY CHOROBY?

Zpráva ze setkání Německé studijní skupiny Hodgkinovy choroby 11/2000 v Kolíně nad Rýnem a ze sympózia Americké hematologické společnosti v San Francisku v USA (American Society of Hematology - 42 nd Annual Meeting), 12/ 2000.

MARKOVA J.

ODDILENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE FN KRALOVSKÉ VINOHRADY, PRAHA

V listopadu 2000 se konalo v Kolíně nad Rýnem jako každoročně setkání Německé studijní skupiny Hodgkinovy choroby (*Deutsche Hodgkin Lymphom Studiengruppe - DHSG*). V současné době participuje v multicentrických studiích organizovaných touto skupinou více než 450 center ze SRN, Rakouska, Švýcarska, Lucemburska a České republiky (FN Královské Vinohrady, Oddělení klinické hematologie, FN Brno Bohunice, II. interní hematologická klinika). Měsíčně je randomizováno 90, ročně 1100 pacientů. Od konce roku 1998, kdy byla zahájena randomizace do nové, 4. generace protokolů primární léčby, bylo randomizováno více než 2 200 pacientů (do studií HD 10 – počáteční stadia, HD 11 – intermediární stadia, HD 12 – pokročilá stadia).

První hodnocení studie pro intermediární stadia HD 11 (4x ABVD + 30 Gy, 4 x ABVD + 20 Gy, 4 x BEACOPP bazální + 30 Gy, 4 x BEACOPP bazální + 20 Gy) provedené **06/2000** neshledalo důvod k jejímu přerušení. Cílem této studie je zjistit efekt chemoterapie BEACOPP, používané s úspěchem k léčbě pokročilých stadií, a možnost redukce dávky radioterapie (u 20 % pacientů léčených ABVD event. COPP + ABVD léčba selhává, progresse a relapsy onemocnění mají stejně špatnou prognózu jako u pokročilých stadií, s průměrnou dobou přežití 3 roky. Redukce dávky radioterapie má snížit vznik sekundárních malignit, hlavně solidních tumorů). Hodnocení neprokázalo horší výsledky, než měla studie HD 8 (pro intermediární stadia v minulé, již skončené 3. generaci primárních protokolů terapie), která srovnávala možnost redukce velikosti ozařovacího pole (EF nebo IF) po podání chemoterapie 2 x COPP + ABVD. Mezi oběma rameny nebyl prokázán rozdíl ani v období bez selhání léčby, ani v době celkového přežití pacientů.

Poslední hodnocení studie HD 9 (06/2000) pro pokročilá stadia, 3. generace protokolů primární léčby, 1993 – 1998. Studie srovnávala novou chemoterapii BEACOPP v bazální (intenzifikace v čase) a v eskalované formě (intenzifikace v čase a dávce) s klasickou chemoterapií COPP + ABVD. Vyhodnocení bylo provedeno u 1180 pacientů (COPP+ ABVD 263, BEACOPP baz. 457, BEACOPP eskal. 460). Medián sledování je 40 měsíců. Statistické hodnocení potvrdilo významně lepší výsledky chemoterapie BEACOPP oproti klasické COPP + ABVD. Mimo období bez selhání léčby (FFTF - freedom from treatment failure) je nyní poprvé prokázáno signifikantně lepší celkové přežití (SV - survival) pro obě terapie BEACOPP oproti COPP + ABVD. Statisticky významný rozdíl SV u eskalovaného BEACOPP oproti bazální variantě není zatím prokázán. Zemřelo celkem 119 (10 %) pacientů zařazených do studie. Zatímco nejčastější příčinou úmrtí ve skupině pacientů léčených chemoterapií COPP + ABVD a BEACOPP baz. je základní onemocnění (8, 7 % a 5 %), ve skupině léčených chemoterapií BEACOPP eskal. je to pouze 1, 7 %. Na akutní toxicitu léčby u této terapie umírá 1, 7 % pacientů, což je méně než ve skupině COPP + ABVD (1, 9 %). Úmrtí na sekundární neoplazie není zatím ve skupině BEACOPP eskal. statisticky významně vyšší než u klasické léčby (1, 9 %, 0, 4 %, 1, 5 %). Výskyt sekundárních malignit je pečlivě sledován. Ve skupině léčené chemoterapií COPP + ABVD se vyskytlo 6 NHL (nehodgkinské lymfomy), 3 solidní tumory (celkem 3, 4 %), ve skupině BEACOPP baz. 4 NHL, 2 AML (akutní myeloidní

leukémie) a 6 solidních tumorů (celkem 2, 6 %), ve skupině BEACOPP eskal. 4 NHL, 8 AML (celkem 2, 6 %). Konečné vyhodnocení studie je plánováno na léto 2001.

Pacienti s **LPHD (lymphocyte predominant Hodgkin's disease) - nodulárním paraganulomem** - jejichž diagnóza je potvrzena referenčním panelem patologů a u kterých je diagnostikováno stadium IA (bez rizikových faktorů), nejsou zařazováni do studie HD 10 (pro počáteční stadia), ale jsou léčeni pouze radioterapií IF 30 Gy. Tato studie je společná s EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer).

Studijní sekretariát DHSG referoval také o právě zahájené **studii recidiv HD R2**. Jedná se o randomizovanou studii organizovanou DHSG ve spolupráci s EORTC a EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation). V této studii je testován význam vysokodávkované sekvenční chemoterapie před autologní transplantací periferních kmenových buněk. Po podání 2 cyklů chemoterapie DHAP jsou pacienti randomizováni do ramene pouze s autologní transplantací periferních kmenových buněk (přípravný režim BEAM) nebo do ramene s vysokodávkovanou sekvenční chemoterapií (HD – cyclophosphamid, HD methotrexat, HD etoposid) před podáním přípravného režimu BEAM. Pro mladé pacienty s primárně progredientním nebo opakovaně recidivujícím onemocněním je připravována studie, která bude testovat efektivitu transplantace alogenních krevetvorných buněk: **HDR – Allo**. Pacienti s recidivujícím **nodulárním paraganulomem (LPHD)** jsou léčeni ve studii testující účinnost **monoklonálních protilátek anti CD 20 (Rituximab)**.

Léčba pacientů nad 65 let: z hodnocení studie HD 9 (pacienti randomizovaní mezi COPP + ABVD a bazální BEACOPP) je patrné, že terapie BEACOPP má u těchto pacientů výrazně vyšší akutní hematologickou toxicitu a nebude proto doporučována. Koncept léčby pacientů starších než 65 let se podrobně zpracovává. V terapii Hodgkinovy choroby má stále významnější místo **gemcitabin** (v paliativní terapii progredujících forem a nyní již i v primární léčbě pacientů s pokročilými stadii, významný je rovněž v léčbě pacientů starších).

Významná část zasedání DHSG v listopadu 2000 byla věnována **radioterapii**, zvláště problematice organizačně obtížného „**Restagingpanelu**“ studie HD 12 pro pokročilá stadia nové generace. V této studii se po ukončení chemoterapie provádí restaging. Výsledky RTG a CT dokumentace se posílají do Kolína nad Rýnem, kde panel tvořený radioterapeutem, onkologem a pracovníkem biometrie posuzuje odpověď na terapii a poté rozhodne, zda je možné dodržet rameno randomizace. Studie HD 12 testuje mimo jiné i nezbytnost radioterapie u pokročilých stadií. V případě, že je pacient randomizován v rameni bez radioterapie a reziduum tumoru po léčbě je větší než 1,5 cm, je doporučena radioterapie a vyhotoven její plán. I když je celá tato akce (odesílání dokumentace, zasedání panelu atd.) velmi náročná, radioterapie musí být zahájena do 1 měsíce po ukončení chemoterapie.

Značná pozornost byla věnována **dlouhodobým následkům léčby**, především poruchám fertility a sekundárním malignitám. Podrobně byla vyhodnocena **studie týkající se poruch fertility u žen mladších 40 let**, léčených protokoly 3. generace. Bylo osloveno 605 žen. Např. po intenzivní chemoterapii studie pro pokročilá stadia HD 9 nemá 45 % žen do 30 let věku menstruaci, a 90 % žen po 30. roce věku po COPP + ABVD, 20 % do 30 let věku a 60 % po 30. roce věku po BEACOPP baz. a 60 % žen mladších 30 let a 92 % žen starších 30 let po BEACOPP eskal. Jen 2 % žen po terapii ve studii HD 9 otěhotnělo a porodilo (2 děti po léčbě BEACOPP eskal., 1 dítě po léčbě BEACOPP baz.). I po méně intenzivní terapii intermediárních stadií (studie HD 8: 2x COPP + ABVD + radioterapie) má dítě pouze 9 % pacientek a po léčbě počátečních stadií (studie HD 7: 2x ABVD + radioterapie) má děti 15 % žen, po samotné radioterapii 9 % žen. U dětí narozených po terapii nebyly zjištěny žádné malformace. Většina dotázaných pacientek však udává problémy v sexuálním životě.

Součástí prezentace DHSG byla i **retrospektivní analýza sekundárních neoplazií (akutních myeloidních leukémií/myelodysplastických syndromů a nehodgkinských lymfomů)**. Vyhodnoceno bylo **5 162 pacientů** ze všech studií DHSG (studie HD1 – 9, léčených v letech 1978 - 1998). U těchto pacientů se vyskytlo **46 sekundárních leukémií**. Po terapii ABVD 1 (2 %), po COPP + ABVD 24 (52 %), po COPP/ABV/IMEP 6 (13 %), po BEACOPP baz. 2 (4 %), po BEACOPP eskal. 9 (20 %), po samotné radioterapii 4 (9 %), po kombinované terapii 36 (78 %), po salvage terapii (+ vysokodávkované terapii následované autologní transplantací periferních kmenových buněk) 16 (25 %). Z této retrospektivní studie vyplývá, že sekundární leukémie mají poměrně nízkou incidenci, přibližně polovina pacientů nedostala žádnou terapii, léčba nevede k žádné dlouhodobé remisi. Sekundární myelodysplastické syndromy mají stejně špatnou prognózu.

V retrospektivní analýze byl vyhodnocen také vznik nehodgkinských lymfomů.

Z 5 162 pacientů vznikl **NHL u 51 pacientů (1%)**. Ze studie vyplývá: nízká incidence, nutnost referenční patologie při posuzování histologických nálezů, špatná prognóza sekundárních T – NHL, 20 % pacientů po terapii dosáhne dlouhodobé remise, většina časných sekundárních NHL jsou pravděpodobně kompozitní lymfomy.

DHSG prezentuje informace, výsledky, protokoly, různá vyhodnocení na internetové adrese www.kompetenznetz-lymphome.de

Mezinárodní spolupráce: Pro DHSG je charakteristická intenzivní spolupráce s evropskými a mimoevropskými skupinami zabývajícími se léčbou Hodgkinovy choroby. Jednáni studijní skupiny se jako každoročně zúčastnili pozorovatelé dalších velkých evropských skupin (EORTC, GELA - Groupe d'études des lym-phomas de l'adulte), kteří tento rok dostali prostor k prezentaci svých výsledků a plánovaných dalších strategií terapií, většinou ve spolupráci s DHSG (komplementární studie ke studií HD 11, HD 12). Na mítinku American Society of Hematology v San Franciscu se konala v prosinci 2000 schůzka „International Task Force on Hodgkin's Disease“, kde bylo významnou skutečností mezinárodní akceptování chemoterapie BEACOPP v léčbě intermediárních a pokročilých stadií (podrobněji viz dále), což je mimořádně významná událost v historii existence a dlouhodobé práce DHSG. Takového výsledku by patrně nemohlo být nikdy dosaženo, kdyby tuto studijní skupinu spolupracující s hematologem a onkologem mnoha zemí nepodporoval entuziasmus jejích lidí - profesora V. Diehla, profesora A. Engerta, doc. J. Wolfa, Dr. U. Paulusa a dalších.

Ve dnech 22. – 25. 9. 2001 se v Kolíně nad Rýnem bude konat „Fifth International Symposium on Hodgkin's Lymphoma“ organizovaný DHSG.

American Society of Hematology (42 nd Annual Meeting), 12/2000, San Francisco, USA

Jak je výše uvedeno, na tomto velmi významném světovém mítinku Americké hematologické společnosti se konala schůzka „International Task Force on Hodgkin's Disease“, které se účastnily všechny významné světové studijní skupiny. Ústředním tématem setkání byla **strategie léčby pokročilých stadií**. Za standardní strategii léčby je považována stále terapie ABVD. O pozici nového zlatého standardu však soupeří nové strategie léčby, používané od počátku 90. let. V **Evropě** je to chemoterapie německé skupiny BEACOPP, jejíž intenzita je nyní testována ve studii HD 12 (8x BEACOPP eskal. je srovnáván s terapií 4x BEACOPP eskal. + 4x BEACOPP baz., obě tyto terapie s radioterapií - RT nebo bez radioterapie). Komplementární studii k této strategii nyní vytvořila skupina EORTC/GELA (terapie 4 x BEACOPP eskal. + 4 x BEACOPP baz. je srovnávána se standardní léčbou 8x ABVD).

V USA je skupinou ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) testována v randomizované studii terapie Stanford V + RT s klasickou léčbou 8x ABVD + RT (ale jen pro pacienty s IPI 0 – 2, dle Hasenclevera), komplementární studii otevřela skupina SWOG (Southwest Oncology Group), která randomizuje pacienty s IPI 3 – 7 mezi terapií 8x ABVD a terapií 4x ABVD + vysokodávkovanou terapii následovanou autologní transplantací periferních kmenových buněk. Chemoterapie ABVD je podávána více než 20 let, proto až

dlouhodobé výsledky tohoto systému studií prokáží, zda intenzifikované terapie BEACOPP eskal. a Stanford V nahradí doposud uznávanou standardní terapii ABVD.

Velká pozornost byla na sympoziu ASH věnována **dlouhodobým následkům léčby** Hodgkinovy choroby, hlavně vzniku solidních tumorů. Solidní tumory se považují především za následky radioterapie (rozsah a dávka záření!). Je pro ně charakteristická dlouhá doba latence (10 a více let). Nejčastější jsou: plicní karcinomy (+ rizikový faktor kouření), karcinomy prsu (u mladých pacientek zářených ve věku do 20 let), melanomy, karcinomy štítné žlázy. Méně časté jsou ostatní druhy solidních nádorů. Trvalé sledování všech pacientů po léčbě Hodgkinovy choroby je proto nezbytné vzhledem k časně **identifikaci sekundárních tumorů**: zvýšené riziko Ca plic, nutnost pravidelných RTG vyšetření plic, nutnost screeningu karcinomu prsu – vlastní vyšetřování, mammografie u pacientek zářených v mladém věku, vyšetření štítné žlázy – karcinomy štítné žlázy, pravidelné vyšetření kůže – melanomy. Je nutné rovněž **sledovat kardiální toxicitu** (vznik kardo-myopatií po antracyklinech, po radioterapii mediastina), **plicní toxicitu** (fibrózy plic – bleomycin, postiradiační pneumonitidy, zvýšený sklon k infekcím), **funkci štítné žlázy** (hypothyreózy, hyperthyreózy), **poruchy fertility** (hormonální substituce, prevence atarapie osteoporózy u žen). Na ASH mítinku tak opět hematologové zdůraznili význam léčení pacientů s Hodgkinovou chorobou v rámci kontrolovaných multicentrických studií a soustředění péče o tyto většinou mladé pacienty do velkých center s možností komplexní onkologické péče.

ZPRAVA ZE ZASEDANI PRACOVNI SKUPINY EESKÝCH A SLOVENSKÝCH DITSKÝCH RADIOTERAPEUTU

ŠENEKLOVA Z., ŠLAMPA P.
MASARYKOV ONKOLOGICKÝ USTAV V BRNI

Dětské onkologové z České a Slovenské republiky pracují na vytvoření společných postupů léčby. Myšlenka sjednotit radioterapeutické postupy vznikla na zasedání Česko – Slovenské pediatricko onkologické sekce v listopadu 2000 v Banské Bystrici. Na toto setkání byli pozváni i radioterapeuti zabývající se dětskou radioterapií. Tak vznikla zprvu neformální pracovní skupina dětské radioterapie při pediatricko onkologické sekci onkologických společností obou republik. Na české straně byla tato skupina v rámci POS ČOS později oficiálně ustanovena.

V pondělí 29.1.2001 se na oddělení radiační onkologie Masarykova onkologického ústavu v Brně (MOÚ) uskutečnilo první setkání pracovní skupiny pro dětskou radioterapii. Setkání se zúčastnili zástupci oddělení radiačních onkologií, která se zabývají dětskou radioterapií (FN Praha Motol, MOÚ Brno, Onkologický ústav sv. Alžběty Bratislava, NFDR Banská Bystrica). Byli přítomni i zástupci pediatrických klinických onkologických pracovišť (FN Praha Motol, FDN Brno).

Na schůzce se projednaly a upřesnily indikační kritéria, cílové objemy, celkové dávky a časové rozložení dávek pro jednotlivé dětské malignity. Zejména byly ujednány shodné postupy při ozařování dětských pacientů s maligními diagnózami - neuroblastomy, lymfomy, Ewingovy sarkomy. Používané anglické verze léčebných protokolů byly rozděleny mezi jednotlivé účastníky k vypracování přesných překladů.

Cílem setkání bylo tedy vytvoření českých (slovenských) verzí radioterapeutických částí léčebných protokolů SIOP a UKCCSG pro jednotlivé dětské malignity. Protokoly stanoví postupy plánování a provádění radioterapie. Konečné verze s příslušnými úpravami, na základě předchozích diskusí nad kontroverzními otázkami, budou po vzájemných konzultacích poskytnuty všem participujícím pracovištím. Tak vzniknou doporučené jednotné léčebné protokoly platné pro Českou a Slovenskou republiku.

Na závěr byli všichni jednající seznámeni s novou koncepcí Masarykova onkologického ústavu v Brně. V neformální besedě zazněly názory na problematiku pojišťovacích systémů a financování radioterapie obou států. Setkání bylo zakončeno prohlídkou nově rekonstruovaného oddělení radiační onkologie MOÚ.

rozloučení

PRIMAŘ MUDr. ZDENĚK CHODOUNSKÝ ODEŠEL OD ROZDILANÉ PRÁCE



Dne 15.1. 2001 nás všechny zaskočila zpráva o úmrtí pana primáře Zdeňka Chodounského. Pro všechny, kteří ho znali, odešel od rozdělané práce, kterou ke smutku všech už nikdy nedokončí. Pro všechny, kteří ho znali odešel nestor české radioterapie. Všichni, kteří ho znali na něj nezapomenou. Pro něj neplatí, že každý je nahraditelný.

Zdeněk Chodounský se narodil 12. 11. 1928 v Predajně na Slovensku. Do školy chodil v Mladějovicích u Strakonice. Gymnázium absolvoval ve Strakonici a v Berouně, kde v roce 1947 maturoval. Studium na lékařské fakultě University Karlovy ukončil v prosinci 1952. Po promoci nastoupil jako sekundární lékař na rtg oddělení v Liberci, kde pracoval na radioterapeutickém úseku. Atestaci prvního stupně z radioterapie složil v roce 1956 a druhého stupně v roce 1960. V červnu 1960 nastoupil na radioterapeutické oddělení Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze. Jeden rok pobýval

na Kubě jako expert pro radioterapii a po návratu pracoval jako ordinář pro těžké zářiče ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady. Od roku 1982 zastával funkci primáře a byl jmenován do funkce krajského odborníka pro radioterapii. Dlouhá léta strávená na Vinohradech přerušil odchodem do Fakultní nemocnice Motol v roce 1997.

Zdeněk byl mimořádnou osobností české radioterapie a onkologie. Jeho nadčasová odbornost vynikala především v oblasti radioterapie nádorů dětského věku a mozkových nádorů dospělých, které byly jeho dominantním zájmem. Především jeho zásluhou vznikla samostatná Společnost radiační onkologie, biologie a fyziky ČLS JEP. Od založení společnosti byl jejím předsedou. Nikdo jiný jím ani nemohl být. Jeho zásluhou se dostala česká radioterapie do Evropy v rámci evropské společnosti ESTRO (The European Society for Therapeutic Radiology and Oncology). Česká republika byla první středoevropskou zemí, kde byly uspořádány postgraduální vzdělávací kurzy vedené touto společností. Byl spoluautorem myšlenky organizovat středoevropské konference o plícní rakovině, které si postupně vydobýly pevné místo v nabitě evropském kalendáři. V pořadí již VIII. konferenci v červnu letošního roku budou účastníci postrádat jejího prezidenta.

Doc. MUDr. L. PETRUŽELKA, CSc.

CENA LIGY PROTI RAKOVINĚ PRAHA

pro mladého vědce za nejlepší publikaci s onkologickou tematikou v roce 2000

Liga proti rakovině Praha je nevládní humanitární organizace, usilující o nádorovou prevenci, zlepšení kvality života nádorově nemocných, podporující finančně onkologický výzkum. Je členem mezinárodních organizací UICC a ECL.

Snahou Ligy je podporovat zejména mladé onkologické odborníky a vědce. Proto se Liga rozhodla založit při příležitosti oslav 10. výročí svého vzniku novou tradici a každoročně vyhlašovat soutěž pro mladé vědecké pracovníky publikující v odborných časopisech práce, přinášející nové onkologické poznatky. V tomto roce vyhlašuje 2. ročník soutěže.

Cena je dotována částkou 50 000 Kč pro nejlepší vědeckou publikaci s onkologickou tematikou.

Podmínky soutěže:

Přihlásit se může každý lékař či lékařka nebo vědecký pracovník či pracovnice ve věku do 35 let, nebo kolektiv vedený mladým výzkumníkem, specializující se na onkologickou problematiku a publikující o ní. Autorský materiál, který byl otištěn v období od 1. ledna 2000 do 31. prosince 2000 v některém z odborných časopisů v ČR nebo v zahraničí, spolu s přihláškou, je nutno zaslat na adresu sídla Ligy ve 3 výtiscích nejpozději do 30. června 2001.

Přihláška by měla obsahovat tyto základní údaje:

- jméno přihlašujícího
- datum narození
- bydliště
- adresu zaměstnavatele
- specializaci (obor), ve kterém uchazeč pracuje
- 3 (tři) kopie publikované práce (prací)

Přihlášené publikované materiály budou zaslány oponentům a vítěze vyhlásí výbor Ligy.

Cena bude vyhlášena v listopadu a vítězi případně vítěznému kolektivu bude předána na slavnostním koncertu, pořádaném Ligou.

Výsledky soutěže budou předány k publicitě v odborných i laických médiích. Autorovi vítězné práce bude slavnostně předán diplom a šek s finanční odměnou.

onkologické společnosti

Zápis z 14. zasedání výboru ČOS konaného dne 13. února 2001

Přítomni: prof. Klener Pavel, doc. Petruželka Luboš, MUDr. Drbal Josef, MUDr. Jelínková Alena, prof. Kouček Josef, as. Příbylová Olga, MUDr. Šmelhaus Vratislav, prof. Vorlíček Jiří, doc. Žaloudík Jan.
Nepřítomni: MUDr. Fischer Jan

1. Kontrola zápisu

Zápis schválen bez připomínek, úkoly splněny.

Prof. Kouček zaslal na MZD stanovisko k péči o onkologicky nemocné adolescenty, kteří musí být léčeni na specializovaných pracovištích dětské onkologie.

2. Výbor se zabýval ohlasem na tiskovou konferenci uspořádanou doc. Kavanem – předsedou pediatrické sekce ČOS. K této záležitosti přijal výbor usnesení, které bude publikováno jako příloha tohoto zápisu. Výbor doporučuje, aby se k situaci vyjádřila též členská schůze pediatrické sekce. Protože v kartotéce členů ČOS není příslušnost k sekci zvlášť zaznamenána, pověřuje výbor prim. Šmelhause, aby do příští schůze zajistil úplný seznam členů této sekce. Současně se pověřuje doc. Žaloudík pořízení seznamu členů chirurgické sekce. Výbor se rovněž usnesl, aby sekretář pediatrické společnosti dr. Štěrba byl pozván na příští schůzi výboru ČOS (zajistí pi. Schweinerová).

3. Návrhy na granty a ceny

a) Výbor projednal došlé přihlášky do soutěže o grant firmy Galena pro mladé onkology. V kategorii publikovaných prací bylo většinou hlasů navrženo první místo MUDr. L. Krásné za práci „Temporal in vitro expansion of the luminal lineage of human mammary epithelial cells achieved with 3T3 feeder layer technique“ publikované v časopise Breast Cancer Res. Treat, 60, 2000, 241-249. V kategoriích žádostí o grant doporučuje výbor udělení grantu Mgr. A. Svobodníkovi na realizaci studijního pobytu na Mayo clinic. O výsledku výběru informován zástupce Galeny dr. Kozel.

b) Výbor navrhl do hodnotící komise pro udělení Staškovy ceny z Nadace P. Janssena MUDr. Pavla Šlampu, CSc. (MOU-Brno).

c) Výbor vyzývá členy ČOS k podání návrhů na cenu ČLS a cenu ČOS za práce publikované v roce 2000.

4. Nejbližší akce pod záštitou ČOS.

Staškův den (27. března 2001 Praha)

IV. dny mladých onkologů (8. – 10. června 2001 hotel Medlov u Žďáru na Sázavou) garant za ČOS doc. Petruželka.

5. Nová verze klasifikace MNK – O (WHO – Geneva 2000). Výbor pověřuje prof. Klenera, aby požádal MZD ČR o vydání českého překladu.

6. Koncepce onkologie.

K návrhu koncepce, který byl publikován ve ZN nedošly výboru žádné připomínky. Kritické poznámky byly však publikovány v ZN (autoři doc. Zámečník a doc. Kovařík). Výbor konstatuje, že v jejich příspěvku jsou některé nepřesné a zavádějící informace, na které bude výbor reagovat. Výbor pověřil napsáním odpovědi prof. Vorlíčka a prof. Klenera. V souvislosti s konceptem proběhla též diskuse o systému dalšího vzdělávání. Výbor nemění své stanovisko v tom smyslu, že klinická onkologie nemůže být základním oborem, ale nástavbou na internu či pediatrii. V ostatních vybraných specializacích by měla existovat funkční nástavba z klinické onkologie, která by opravňovala k aplikaci chemoterapie, hormonální a biomodulační léčby.

7. Schváleno přijetí nových členů.

Byli přijati: MUDr. Hafuda Abdulbaset, FN Hr. Králové, MUDr. Mgr. Širanc Alois, Čadca SR, MUDr. Krajsová Ivana, VFN P-2, MUDr. Malinová Běla, FN Motol, MUDr. Prošvic Petr, FN Hr. Králové, MUDr. Daněk Roman, BN Zlín, MUDr. Hájek Jan, BN Zlín, MUDr. Anđel Josef, BN Zlín, MUDr. Duša Josef, BN Zlín, MUDr. Hýžd'al Vít, BN Zlín.

8. Korespondence

- Dr. Rath odpověděl na dopis předsedy ČOS žádající koordinaci doškolovacích akcí ČLK s akcemi pořádanými katedrou onkologie IPVZ a ČOS. Plán akcí na rok 2001 je již hotov, na příští rok žádá dr. Rath domluvu s dostatečným časovým předstihem.
- ČLK žádá o zprávu o aplikaci „pozitivních reverzů“ v klinické onkologii (vypracuje doc. Petruželka)
- Ředitel MUDr. Březovský požádal o stanovisko ke kontaktům s

mezinárodní homeopatickou společností. Stanovisko ČOS je zamítavé.

- MUDr. Radina žádá výbor ČOS o stanovisko k rozšíření onkologické péče v Novém Jičíně o radioterapii, resp. 2 lineární urychlovače. Výbor zaujal negativní stanovisko s odkazem na koncepci Společnosti radiační onkologie o rozmístování a využití rad. techniky.
- MUDr. Petera (FN Hradec Králové) žádá o převzetí záštity nad III. Hradeckými onkologickými dny. Výbor nedoporučil převzetí záštity jednak proto, že tematika je převážně radioterapeutická (vhodnější pro záštitu SROBF), jednak proto, že nepovažuje za účelné zavádět další „DNY“, kromě již 2 existujících celostátních akcí (jarní BOD, podzimní JOD).

9. Různé

- MUDr. Příbylová upozornila na nutnost doplnění bodového hodnocení výkonů v onkologii. Výbor souhlasí s revizí dosavadního systému a pověřuje dr. Příbylovou, aby do příští schůze připravila návrh na revizi.
- Prof. Klener navrhl, aby prof. Jean Klášterský z institutu Julie Bordeta byl jmenován čestným členem ČOS. Prof. Klášterský se pravidelně zúčastňuje sympozií pořádaných ČOS a aktivně se podílí na pregraduální i postgraduální výuce pravidelnými kurzy (4 – 5x do roka). Výbor vyslovil s návrhem jednotný souhlas.

V Praze 13. února 2001

Za ČOS: doc. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., vědecký sekretář
prof. MUDr. Pavel Klener DrSc., předseda

Vyjádření výboru Onkologické společnosti ČLS J. E. Purkyně k tiskové konferenci doc. MUDr. Petra Kavana

Dne 6. 2. 01 uspořádal doc. Kavan, jako předseda pediatrické sekce České onkologické společnosti (ČOS), a prezident „Sdružení pro rozvoj dětské onkologie“ tiskovou konferenci. O jejím konání nebyl výbor ČOS informován a nikdo z členů výboru nebyl na konferenci pozván. Vzhledem k tomu, že na konferenci byla vyslovena řada závažných námitek k úrovni onkologické péče v pediatrii, které byly ještě téhož dne mediálně zveřejněny, považuje výbor ČOS za nutné vyjádřit k celé záležitosti své stanovisko. Především proto, že pediatrická sekce je součástí ČOS a proto veřejná vystoupení konaná pod hlavičkou této sekce se nutně dotýkají celé onkologické společnosti.

Doc. Kavan, spolu se sekretářem sekce MUDr. Štěrbou zpochybnil odbornou úroveň péče o děti s nádorovým onemocněním v ČR, aniž by na tuto skutečnost dříve upozornili. Z kontextu tiskového prohlášení vyplynulo, že námítky směřovaly hlavně k pražskému pracovišti dětské onkologie, ve kterém doc. Kavan působí po řadu let jako zastupující přednosta. Z toho vyplývá:

1. Doc. Kavan měl ze svého funkčního postavení možnost nedostatky korigovat. Pokud tak neučinil, nese spoluodpovědnost za stagnaci či zhoršení úrovně onkologické péče na svém pracovišti.
 2. Doc. Kavan měl možnost obrátit se se svými negativními postřehy na výbor ČOS (což nikdy neučinil), na kontrolní orgány MZ ČR (což neučinil jak vyplynulo z televizního vystoupení mluvčího p. Černého), popřípadě na ČLK (není nám známo, že by tak učinil).
 3. Namísto toho prezentoval své výhrady před televizními kamerami TV-NOVA a uvedl tak v nejistotu stovky rodin, jejichž děti se léčí pro nádorová onemocnění. Takovýto postup považuje výbor ČOS za skandální, odporující zásadám lékařské i občanské etiky.
 4. Předseda ČOS byl doc. Kavanem o nedostacích onkologické péče na Klinice dětské onkologie osobně informován, avšak teprve dne 7. 2. 01, a to pouze na verbální úrovni, bez předložení jakéhokoliv průkazného materiálu nebo podepsaného písemného vyjádření.
- Výbor ČOS se proto od aktivit doc. Kavana a dr. Štěrby distancuje. Pokud již byla závažná obvinění vznesena a medializována, považuje výbor ČOS za nutné, aby se kontrolní orgány ČLK a MZ ČR vyslovenými námítkami doc. Kavana a dr. Štěrby zabývaly a aby komise nezávislých expertů (včetně možného přizvání expertů zahraničních) situaci prošetřila. Za stejně naléhavé považuje výbor, aby se etická komise ČLK zabývala zcela nestandardním a neetickým postupem doc. Kavana a dr. Štěrby a vyvodila z jejich jednání patřičné důsledky.

Schváleno na schůzi výboru ČOS dne 13. února 2001.

Prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., předseda Onkologické společnosti ČLS
Na vědomí: předseda ČLS prof. Blahoš
ministr zdravotnictví ČR prof. Fišer
prezident ČLK MUDr. Rath
redakce zpravodajství ČT NOVA



Činnost Masarykova onkologického ústavu v Brně na poli onkologického vzdělávání odborné i laické veřejnosti

Posláním Masarykova onkologického ústavu je poskytování specializované onkologické péče srovnatelné se světovým standardem. V souladu s tím se ústav také systematicky věnuje vzdělávání. Probíhá ve dvou základních směrech.

(1) Celoživotní kontinuální vzdělávání

Pro lékaře i ostatní pracovníky ve zdravotnictví se celoživotní kontinuální sebevzdělávání stává samozřejmou nezbytností. Protože onkologické obory v posledních letech přinášejí neobyčejné množství nové informace, tvoří zajišťování takového vzdělávání důležitý proud vzdělávacích aktivit ústavu. Cílem vzdělávacích akcí nabízených ústavem je informovat aktuálních poznatků a zkušenostech z vybraných oblastí onkologické péče a podpořit zájem odborné zdravotnické veřejnosti o celoživotní vzdělávání. Jednotlivé akce jsou připravovány odborníky v dané problematice jako „problem-oriented discussions“ a jsou koncipovány tak, aby usnadnily orientaci v praktických aspektech diskutovaného problému. Současně chce ústav v nabízených akcích získat od účastníků náměty na zlepšení vzájemné spolupráce.

Pro informaci uvádíme vzdělávací akce už probíhající, včetně těch, které ústav uskutečňuje ve spolupráci s IDV PZ v Brně. Účastníci dostávají také řadu připravených materiálů a osvětlení o absolvování školicí akce.

I. pololetí 2001: Vzdělávací akce MOÚ pro lékaře:

- Chemoterapie solidních maligních onemocnění
- Intenzivní režimy karcinomu prsu (DD, DI)
- Diagnostika a terapie urologických malignit
- Racionální léčba bolesti u onkologicky nemocných
- Chemoterapie gynekologických malignit
- Neurologické komplikace vybraných modalit (chemoterapie, radioterapie) u onkologické léčby
- Digestivní endoskopie se zaměřením na problematiku onkologie
- Psychoterapeutický přístup k onkologicky nemocným, komunikace ve vztahu lékař – pacient
- Konformní radioterapie
- Metody nukleární medicíny v léčbě onkologicky nemocných
- Školicí místo v genetice hereditárních forem nádorů
- Základní metody analýzy proteomu
- Obrazová analýza LUCIA G – využití systému v práci patologa
- Indikace a interpretace vyšetření nádorových markerů, Computer – assisted
- Chirurgie prsu pro chirurgy
- Sentinelová lymfadenektomie

I. pololetí 2001: Vzdělávací akce MOÚ pro střední zdravotnické pracovníky:

- Novinky v kardiopulmonální resuscitaci
- Výživa onkologicky nemocných
- Ošetrovatelská péče o žilní katetry
- Komunikativní dovednosti I
- Komunikativní dovednosti II
- Výuka rodinných příslušníků pečujících o nemocné v domácím prostředí
- Výuka nemocných
- Školicí místo v evidenci nádorů
- Péče o sekundárně se hojící a chronickou ránu
- Ošetrovatelská péče u pacientek ozařovaných pro gynekologický nádor
- Využití tkáňových kultur v onkologickém výzkumu
- Zásady správné klinické praxe spojené s léčbou cytostatiky (příprava, aplikace)
- Vzdělávací program pro pacienty a jejich příbuzné „Balance“
- Arteterapie u onkologicky nemocných“

Všem zájemcům jsou otevřeny také pravidelné **odpolední semináře**, které Masarykův onkologický ústav organizuje pro své pracovníky.

Ve spolupráci s dalšími institucemi (**Česká onkologická společnost, Slovenská onkologická společnost, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Česká asociace sester**) pořádá Masarykův onkologický ústav každým rokem vědeckou konferenci Brněnské onkologické dny, spojenou s konferencí SZP. Letos se tyto události uskuteční ve dnech 30. května - 1. června 2001 a budou mít tuto náplň:

XXV. Brněnské onkologické dny: „Medicína založená na důkazech“

- Národní onkologický registr - využití v medicínské praxi
- Onkopatologie - základna pro diagnostiku avýzkum nádorů
- Onkologie založená na průkaznosti - klinické studie v České republice
- Minimální invazivní chirurgické metody v léčbě zhoubných nádorů
- Intervenční radiologie v onkologii - edukační seminář IDVPZ

XV. konference SZP: „Ošetrovatelská péče založená na potřebách onkologicky nemocných“

- Vzdělávání onkologicky nemocných
- Řízená péče v onkologii

Intonová dysbalance u onkologicky nemocných

O XXV. Brněnských onkologických dnech a XV. konferenci SZP informuje stránka www.mou.cz/bod. pí Eva Čechmanová, telefon: 05/4313 2450, 05/4313 6803, e-mail: cechmanova@mou.cz, p. Hana Chaloupková tel.: 05/4313 4103, fax: 05/4321 1169, e-mail: direct@mou.cz.

(2) Zdravotní výchova a osvěta v oblasti prevence

První úroveň je osvěta a zdravotní výchova laické veřejnosti (zdravé i nemocné). Další úroveň je „školení školitelů“ - zdravotníků-odborníků. Školitelé onkologové potom na další úrovni vzdělávají tyto zdravotnické pracovníky, kteří přicházejí do styku s laiky (praktičtí lékaři, ambulantní gynekologové a přísluš. sestry). Školitelé hygienici nebo učitelé zdravotnických škol provádějí na další úrovni osvětu přímo mezi laiky. Ústav v tomto směru spolupracuje s jinými subjekty, převážně v rámci ucelených programů. V současnosti je ústav zapojen do programu **Prevence nádorových onemocnění ve 21. století**, řešeného ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem v rámci **Národního programu zdraví**.

Dále v tomto programu MOÚ vydal r. 2000 dvojici osvětových brožur pro širokou veřejnost, „**Prevence nádorových onemocnění pro muže po čtyřicítce**“ a „**Prevence nádorových onemocnění pro ženy po čtyřicítce**“. V rámci projektu „**Naděje pro život**“ MOÚ vydal osvětové brožurky „**Co by měly ženy vědět o prevenci karcinomu prsu**“ a „**Zhoubné nádory prsu - základní informace pro nemocné**“.

Pro budoucnost se připravuje systematictější spolupráce s různými sdělovacími prostředky, propojení dosavadních aktivit se soustavou vzdělávání lékařů i středních a nižších zdravotnických pracovníků, systematická spolupráce s Ligou proti rakovině, svépomocnými organizacemi pacientů a občanskými sdruženími.

Masarykův onkologický ústav sídlí v Brně, Žlutý kopec 7, PS Č 656 53, tel.: 05/4313 1111, fax: 05/4321 1169. MOÚ na adrese www.mou.cz. Další informace o vzdělávání naleznete na adresách www.mou.cz/nabidka (nabídka vzdělávacích akcí) resp. www.mou.cz/aktuality/akce/seminare (ústavní semináře). Kontaktní pracovník pí Blanka Dvořáčková, tel.: 05/4313 4108, e-mail: bdvorack@mou.cz.

Informaci o aktivitách ústavu na poli zdravotní výchovy a osvěty v oblasti prevence podává internetová stránka www.mou.cz/odd/edukace nebo Ing. Zchoval, tel.: 05/4313 4108, e-mail: zchoval@mou.cz. Na Internetu jsou k dispozici i brožurky „**Prevence nádorových onemocnění pro muže / ženy po čtyřicítce**“ (www.mou.cz/odd/edukace/broz_muz.htm, resp. www.mou.cz/odd/edukace/broz_zen.htm).