

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 SPOLOČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK  
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO  
REDAKTORA: KOZA IVAN  
VÝKONNÝ REDAKTOR: FAIT VUK

#### REDAKTORĚ:

BEDNAŘÍK OTAKAR HÁJEK ROMAN  
MAYER JIŘÍ KOCÁK IVO  
ČOUPEK PETR ŽALOUĐÍK JAN

#### REDAKČNÍ RADA

ADAM ZDENĚK, Brno  
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava  
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno  
BEŠKA FRANTIŠEK, Ostrava  
BILDER JOSEF, Brno  
ČOUPEK PETR, Brno  
DRBAL JOSEF, Brno  
ECKHARDT SANDOR, Budapešť  
FAIT VUK, Brno  
HÁJEK ROMAN, Brno  
JURGA LUDOVIT, Trnava  
KALLAY JOZEF, Bratislava  
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava  
KLASTERSKÝ JAN, Brusel  
KLENER PAVEL, Praha  
KOCÁK IVO, Brno  
KOUTECKÝ JOSEF, Praha  
KOVARÍK JAN, Brno  
KOZA IVAN, Bratislava  
LAGINOVÁ VIERA, Bratislava  
MAYER JIŘÍ, Brno  
MECHL ZDENĚK, Brno  
NĚMEC JAROSLAV, Brno  
ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava  
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno  
PLEŠKO IVAN, Bratislava  
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha  
REJTHAR ALEŠ, Brno  
SIRACKÝ JÁN, Bratislava  
SPURNÝ VLADIMÍR, Brno  
UJHÁZY VILIAM, Bratislava  
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno  
VYZULA ROSTISLAV, Brno  
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice  
ŽALOUĐÍK JAN, Brno

## OBSAH

### Přehled

Hatina J., Reischig J. Molekulární biologie buněčné imortalizace a její vztah ke karcinogenezi .....	145
Lauerová L., Kocák I. Regulace protinádorové imunity pomocných CD4+ Th1/Th2 lymfocyty .....	154

### Původní práce

Hermanová M., Nenutil R., Kroupová I., Brázdil J., Lukášová E., Kozubek S. Amplifikace a overexprese HER-2/neu v invazivních karcinomech prsu: srovnávací analýza metod imunohistochemických a fluorescenční in situ hybridizace .....	157
Válková V., Trněný M., Slabý J., Matějčková Š., Vodvářková Š., Gašová Z., Marinov I., Jelínek J., Apltauerová M., Procházka B., Karban J., Klener P. Význam selekce CD 34+ progenitorů u nemocných s non-Hodgkinským lymfomem léčených vysokodávkovanou chemoterapií s následnou autologní transplantací krvetvorných buněk .....	163
Klein J., Bohanes T., Král V., Neoral Č., Tichý T., Škarda J., Hajdúch M. Technika biopsie sentinelové uzliny při resekci plic pro karcinom .....	170

### Sdělení

Magdolna V. Dank, Miklós Szücs, Magdolna Csepreghy, Béla Pikó, Ernő K. Makó Naše první výsledky léčby metastatického karcinomu prsu ifosfamidem a paclitaxelem při relapsu po antracyclinech .....	174
---	-----

### Zprávy

Fait V. Zpráva ze setkání OECI, Milan 9-10.6.2001 .....	177
Hájek R., Mayer J. Zpráva z mezinárodního symposia, Kanada 4-8.5.2001 .....	178
Fait V. Zpráva ze symposia St. Veit-Rakousko 13-15.9.2001 .....	179

### Informace

– knihy .....	169, 176
<b>Onkologické společnosti</b> .....	180

## CONTENTS

### Reviews

Hatina J., Reischig J. Molecular biology of cellular immortalization and its relationship to carcinogenesis .....	145
Lauerová L., Kocák I. Regulation of anticancer immunity by T helper CD4+ Th1/Th2 subsets .....	154

### Original Publication

Hermanová M., Nenutil R., Kroupová I., Brázdil J., Lukášová E., Kozubek S. Amplification and overexpression of HER-2/neu in invasive breast carcinomas: comparative analysis of immunohistochemical methods and fluorescence in situ hybridisation .....	157
Válková V., Trněný M., Slabý J., Matějčková Š., Vodvářková Š., Gašová Z., Marinov I., Jelínek J., Apltauerová M., Procházka B., Karban J., Klener P. The significance of CD 34+ progenitors selection for patients with non-Hodgkin's lymphoma treated with autologous stem cells transplantation .....	163
Klein J., Bohanes T., Král V., Neoral Č., Tichý T., Škarda J., Hajdúch M. Technical details of the sentinel lymph node biopsy during lung cancer resection .....	170

### Communication

Magdolna V. Dank, Miklós Szücs, Magdolna Csepreghy, Béla Pikó, Ernő K. Makó Ifosfamide and paclitaxel treatment in metastatic breast cancer, relapsed after antracycline treatment: our first results .....	174
--	-----

### Report

Fait V. OEI Scientific Meeting and General Assembly, Instituto Europeo di Oncologia, Milan, June 9-10,2001 .....	177
Hájek R., Mayer J. Reports of multiple myeloma meetings in 2001 .....	178
Fait V. Reports of ACO, AMDO, CAO, SAKK in St. Veit- Österreich, September 13-15,2001.. ..	179

### Notification

– book .....	169, 176
<b>Oncological Association</b> .....	180

## MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE BUNĚČNÉ IMORTALIZACE A JEJÍ VZTAH KE KARCINOGENEZI

### MOLECULAR BIOLOGY OF CELLULAR IMMORTALIZATION AND ITS RELATIONSHIP TO CARCINOGENESIS

HATINA J., REISCHIG J.

UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI, ÚSTAV BIOLOGIE

**Souhrn:** Buněčná immortalizace představuje multistupňový proces, při němž buňky získávají neomezený proliferativní potenciál. Immortalizovaný fenotyp je vlastní nádorovým buňkám a nádorovým buněčnými liniemi, zatímco normální somatické buňky, primární buněčné kultury či dočasné buněčné linie vstupují po určité době aktivní proliferace do proliferativně inaktivního stádia – senescence. Senescence je charakterizována aktivací tumorových supresorových proteinů p53 a p16<sup>INK4a</sup>, inhibicí aktivace kináz buněčného cyklu, hypofosforylací pRb a trvalou inhibicí E2F-transkripčních faktorů, v důsledku čehož nejsou exprimovány geny, jejichž proteinové produkty jsou nutné pro vstup do S-fáze. Okamžik senescence je pravděpodobně determinován dvěma souběžnými procesy – postupným zkracováním telomer s každým buněčným dělením a postupnou demethylací genomu. Senescence může být překonána mutagenézí, genovou manipulací či infekcí DNA-tumorovými viry, během následující proliferativní vlny pokračuje ovšem dále zkracování telomer a proliferace končí rozsáhlou smrtí buněk – krizí. Část buněčné populace je ovšem schopna aktivovat telomery udržující enzymatickou mašinerii (nejčastěji ve formě enzymu telomerázy), krizi spontánně překonat a nabýt immortalizovaného fenotypu. Immortalizace představuje recesivní fenotyp, vzniklý postupným vyřazením obou kopií genů pro mediátory senescence a krize. Vedle této tzv. replikativní senescence může totožný fenotyp vzniknout i před proděláním daného počtu buněčných dělení, např. aktivací *ras*-onkogenu na normálním genetickém pozadí. Existuje dostatek důkazů, že tato tzv. předčasná senescence, jakož i řádná replikativní senescence, představují přirozené protitumorové bariéry. Aktivovaný *ras* je ovšem schopen obejít tuto senescentní bariéru kooperací s dalším buněčným onkogenem – *myc*. Aktivace *myc*-onkogenu ovšem nadto vede i k překonání krize aktivací exprese genu pro katalytickou podjednotku telomerázy, jakož i k řadě dalších důsledků ve prospěch nádorového fenotypu. Telomeráza sama představuje slibný terč protinádorové terapie, její řízená aktivace by naproti tomu mohla být důležitá v případech buněčné terapie.

**Klíčová slova:** primární buněčná kultura, replikativní senescence, immortalizace, telomery, telomeráza, p53, p16<sup>INK4a</sup>, *ras*, *myc*

**Summary:** Cellular immortalization represents a multistep process, during which cells acquire indefinite proliferation potential. The immortalized phenotype is typical to tumour cells and tumour-derived cell lines, whereas normal somatic cells, primary cultures and finite cell lines enter after a period of active proliferation into a state of proliferation arrest termed senescence. The senescence is characterized by activation of tumour suppressor proteins p53 and p16<sup>INK4a</sup>, inhibition of cyclin-dependent kinases activation, by pRb hypophosphorylation and constant inactivation of E2F transcription factors. Consequently, genes encoding for proteins, which are crucial for entry into S-phase, are not expressed. The point of senescence seems to be determined by two parallel processes – a gradual shortening of telomeres upon each cell division and a progressive demethylation of the genome. Mutagenesis, infection by DNA-tumour viruses or transfection with their oncogenes entail a bypass of senescence and allow for additional proliferation beyond the senescence point. Shortening of telomeres continues during this prolonged proliferation period, however, and proliferation terminates in culture crisis, which is typified by extensive cell death. A part of the cellular population might, nevertheless, activate a telomere maintenance mechanism (most frequently telomerase) and those cells spontaneously recover from crisis and become immortal. Immortality represents a recessive phenotype, which is conditioned by a gradual assembly of mutation hits targeting both copies of senescence- or crisis-mediating genes. Besides this replicative senescence, essentially the same phenotype could be induced prematurely (i.e. before passing the number of cell divisions, which would trigger the replicative senescence), e.g. by dominant gain-of-function activating mutations in the *ras*-oncogene on an otherwise normal genetic background. This premature senescence, as well as the replicative senescence for its own sake, could be this viewed as natural tumour suppressor barriers. Activated *ras* is able to bypass this proliferation block by cooperating with additional cellular oncogene – *myc*. However, the activation of *myc* leads in addition to the bypass of crisis, by means of activating transcription of the gene encoding the telomerase catalytic subunit, as well as to multiple additional consequences along the tumour progression pathway. The telomerase is often regarded as a promising target of anti-tumour therapy, its regulated expression on the other side represents a possibly important point in cell-based therapeutic applications.

**Key words:** primary cell culture, replicative senescence, immortalization, telomeres, telomerase, p53, p16<sup>INK4a</sup>, *ras*, *myc*

Normální lidské somatické buňky jsou schopny prodělat jen omezený, předem daný počet buněčných dělení, zatímco buňky nádorů jsou schopné nekonečné proliferace. Existuje řada důkazů, svědčících ve prospěch tvrzení, že buněčná immortalizace tvoří důležitý stupeň v kaskádě multistupňové karcino-

geneze. Například schopnost odvodit immortalizovanou buněčnou linii byla negativně korelována s prognózou v případě nemalobuněčné rakoviny plic (1), byla nalezena dobrá korelace mezi tumorigení a immortalizační schopností jednotlivých kmenů lidského papiloma viru (2, 3) a na modelu kolorektál-

ní karcinogeneze se podařilo prokázat, že buněčné linie odvozené od malých adenomů (průměr menší než 1 cm) mají zpravidla dočasný charakter, zatímco u velkých adenomů (průměr větší než 2 cm) je daleko větší pravděpodobnost ustavení imortalizované buněčné linie (4, 5). Existují sice buněčné linie, které jsou imortalizované, ale nikoli tumorigenní; klasickým příkladem je slavná linie NIH 3T3 embryonálních myších fibroblastů, ale v tomto případě jediná další genetická změna, t.j. transfekce jediným aktivovaným onkogenem, vede k plně tumorigennímu fenotypu. Této schopnosti NIH 3T3-fibroblastů bylo ostatně hojně využito ke klonování aktivovaných onkogenů z klinických nádorů. Imortalizovaná kultura, není-li přímo tumorigenní, tedy stojí podstatně blíže plně tumorigennímu fenotypu než normální buňka (6, 7).

Buněčná imortalizace je sama o sobě dosti komplexním procesem a mezi imortalizovanou a normální buňkou stojí několik proliferačních bariér, které se musí postupně zhroutit, aby buňka získala neomezený proliferační potenciál. Toto téma představuje v současnosti velice živou oblast nádorové biologie a jeho jednotlivé dílčí aspekty již byly na stránkách tohoto časopisu shrnuty - samostatně byla např. shrnuta úloha mdm2-onkoproteinu v regulaci aktivity tumorového supresorového proteinu p53 (8), úloha telomerázy (9) jakož i funkce inhibitoru buněčného cyklu p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> (10). Záměrem tohoto článku je načrtnout jakýsi obecný rámec biologie buněčné imortalizace, se zvláštním důrazem na první a zdá se i základní proliferační bariéru, kterou musí nádorová buňka na cestě k imortalizaci překonat, t.j. senescenci.

### Senescence a krize - dvě základní proliferační bariéry

Již před více než 35 lety Hayflick zjistil, že dočasně buněčné linie lidských fetálních fibroblastů jsou i v optimálních podmínkách kultivace *in vitro* schopny prodělat jen omezený, předem daný počet dělení (počet buněčných dělení se udává aproximativně jako počet zdvojení populace buněčné kultury - population doubling, zkráceně PD, a na uvedeném modelu fetálních fibroblastů činí tento proliferační strop 60 PD) a poté proliferace neodvratně končí procesem zvaným senescence (též známá jako M1-stádium, což je odvozeno od mortality-1) (11, 12, 13). Při kultivaci normálních lidských buněk postihuje senescence celou kulturu a v podstatě není možno zaznamenat, že by se určitá, byť nepatrná část buněk tomuto procesu spontánně vyhnula. Senescence nemá co do činění s buněčnou smrtí - naopak (je třeba se nenechat zmást trochu nešťastným označením mortality-1). Buňky zůstávají živé a jejich buněčný cyklus se ireverzibilně zablokuje v G1-fázi - buňky nejsou schopny vstoupit do S-fáze ani v odpověď na mitogeny, např. sérum, což je možno kvantifikovat v podobě velmi nízké inkorporace bromdeoxyuridinu (BrdU). Buňky nabývají typické rozpláclé morfologie, dochází zde ke změně expresního profilu genů - některé geny jsou trvale reprimovány, jiné aktivovány, a buňky nabývají rezistenci vůči programované buněčné smrti - apoptóze. Byl objeven rovněž typický marker senescentních buněk -  $\beta$ -galaktosidáza aktivní při pH 6 (tzv. SA- $\beta$ -gal - senescence-associated  $\beta$ -galaktosidáza). Hodinami, které buňkám vymezí okamžik vstupu do senescence, je přitom skutečně počet buněčných dělení, nikoli reálná doba kultivace. Rovněž kryoprezervace nijak nemění tyto vnitřní buněčné hodiny a buňky po rozmrazení začínají přesně v tom okamžiku, v jakém byly zamrazeny. Buňky jsou tedy vybaveny určitými vnitřními hodinami, které, odbije-li konečný, předem vyměřený počet PD, trvale a ireverzibilně zablokují další proliferaci (13, 14, 15).

Již v polovině 60. let se přišlo na způsob, jak lze senescenci obejít - totiž infekcí některými DNA-nádorovými viry, jako je SV40, lidské papilomaviry (HPV), nebo, v případě B-lymfocytů, virus Epsteinova a Baarové (EBV). Později, s rozvinutím metodiky transfekce se přišlo na to, že postačí buňky transfektovat onkogeny uvedených virů, t.j. tzv. velkými T antigenem viru SV40 či E6 a E7 onkogeny lidského papilomaviru 16 (14, 16, 17). Uve-

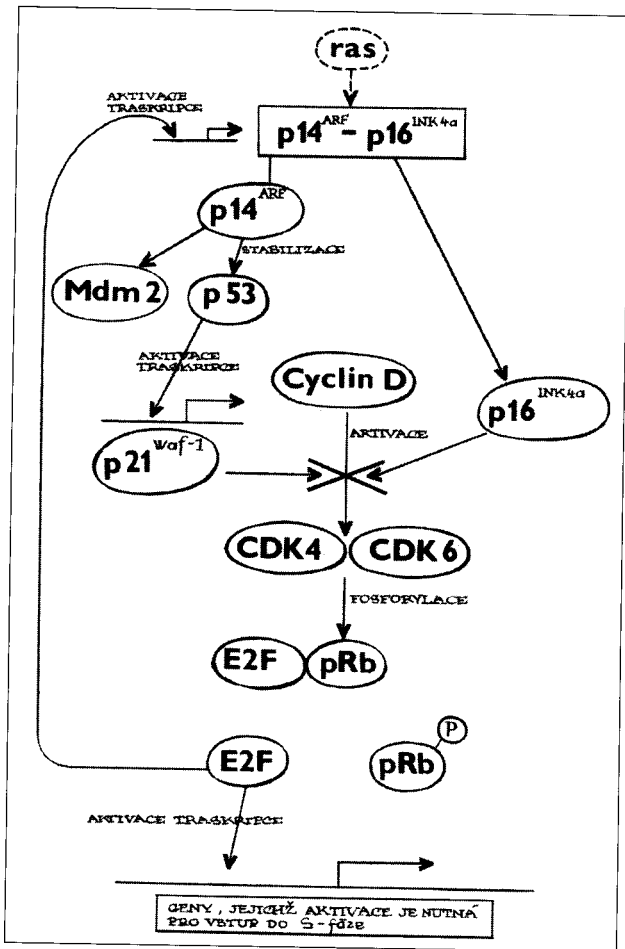
dená infence či transfekce má za následek další vlnu buněčné proliferace v rozsahu 20 - 60 PD (podle buněčného typu a použitého viru) a poté buňky vstupují do nové fáze proliferační zástavy, která je známá jako krize či M2 (mortality-2). Krize je provázána rozsáhlou smrtí buněk, pravděpodobně apoptotického charakteru, ovšem při vysoké úrovni mitotické aktivity (vysoká úroveň inkorporace BrdU). Buňky v krizi rovněž exprimují SA- $\beta$ -gal (18, 19). Krize ovšem není z hlediska osudu buněčné kultury natolik fatálním stádiem jako senescence, poněvadž určité části buněčné populace se může podařit krizi překonat, po určité době proliferačního klidu znovu začít aktivně proliferovat a tentokrát už provždy. Překonání krize má tedy charakter imortalizace a buněčná kultura, která překonala krizi, nabývá schopnosti nekonečné proliferace. Frekvence této spontánní imortalizace není u lidských fibroblastů (jakožto klasického modelu) příliš velká a pohybuje se v rozmezí  $10^{-5}$  až  $10^{-9}$  (14), u jiných buněčných typů, např. epitelálních buněk, může být ovšem o hodně vyšší či dokonce i tak vysoká, že krize nemusí být vůbec patrná a hlavní proliferační bariérou zůstává senescence. Ta je ovšem u epitelálních buněk dvoufázová: jednotlivé stupně se označují jako M0 - selekce a M1 - vlastní senescence, přičemž každý z nich má jiný molekulární základ (20). Karyotyp imortalizované kultury má všechny znaky transformované kultury, t.j. je aneuploidní a heteroploidní, imortalizovaná kultura ovšem ještě nemusí být tumorigenní (6).

### Molekulární biologie replikativní senescence

Jak je již uvedeno výše, senescence představuje trvalé zablokování buněčného cyklu v G1-fázi; buňky nejsou schopny replikovat DNA ani v odpověď na mitogenní stimulační například sérum. Vstup do S-fáze buněčného cyklu je podmíněn expresí specifických genů, kódujících enzymatické aktivity nutné pro replikaci DNA včetně DNA-polymeráz, a exprese těchto genů je kontrolována na úrovni jejich transkripce rodinou transkripčních faktorů E2F. V G1-fázi je exprese těchto genů nezávislá a E2F faktory jsou v souladu s tím inaktivovány interakcí s proteiny retinoblastomové rodiny (pRb); tato interakce je podmíněna hypofosforylovaným stavem pRb. V normálním průběhu buněčného cyklu je v pozdní G1-fázi pRb fosforylován kinázami buněčného cyklu CDK-4 a CDK-6 aktivovanými cyklinem D, popř. CDK-2 aktivovanou cyklinem E - fosforylovaný pRb ztrácí schopnost interakce s E2F, ten je uvolněn a spouští transkripci genů, jejichž proteinové produkty jsou nutné pro vstup do S-fáze (21). Senescentní buňky ovšem tuto fosforylační reakci nejsou schopny provést, pRb je tudíž trvale hypofosforylován a v trvalé interakci s E2F. Tohoto bloku je dosaženo aktivací syntézy dvou inhibitorů kináz buněčného cyklu - p16<sup>INK4a</sup> (specifita pro CDK4 a CDK6) a p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> (široké spektrum inaktivovaných CDK); p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>-gen je přímo aktivován tumorovým supresorovým proteinem p53 (22). p53 protein je v senescentních buňkách stabilizován a vykazuje zvýšenou transkripčně-aktivaci aktivitu (15). Ke stabilizaci p53 dochází působením proteinu p14<sup>ARF</sup> (myší homolog nese označení p19<sup>ARF</sup>), jehož gen sdílí část kódující sekvence - 2. a 3. exon - s p16<sup>INK4a</sup>-genem, má ovšem svůj vlastní promotor a 1. exon a vzhledem k použití jiného čtecího rámce (ARF v označení znamená alternativní reading frame) neexistuje na aminokyselinové úrovni žádná podobnost mezi p14<sup>ARF</sup> a p16<sup>INK4a</sup> (23). p14<sup>ARF</sup> stabilizuje p53 protein vstupem do přirozené negativní regulace p53 prostřednictvím onkoproteinu mdm2. Mdm2 interaguje s p53 a výsledkem této interakce je zřejmý export komplexu mdm2-p53 z jádra do cytoplazmy a zde proteolytická degradace; mdm2-gen je přitom rovněž přímo transkripčně aktivován p53-proteinem. p14<sup>ARF</sup> je schopen současné interakce s mdm2 i p53 a ruší destabilizační funkci mdm2 (8, 24). p16<sup>INK4a</sup>-lokus obsahuje ještě jeden gen, a to p15<sup>INK4b</sup>, blíže homologní p16<sup>INK4a</sup>, jehož proteinový produkt je i funkčně analogický a tedy rovněž schopný inhibovat aktivaci CDK4 a CDK6 cyklinem D; nezdá se ovšem, že by p15<sup>INK4b</sup> byl aktivován v průběhu řad-

né replikativní senescence (23). p53 zřejmě reguluje senescenci ještě dalšími cestami nezávislými na p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>. Jedním z kandidátů je vazebný protein inzulinu-podobných růstových faktorů - 3 (IGFBP-3), který inaktivuje přímou vazbou tyto růstové faktory a tím blokuje jejich mitogenní působení (24). Samotný p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> je schopen kontroly buněčné proliferace ještě dalším mechanismem, a to inhibiční interakcí s proteinem PCNA (proliferating cell nuclear antigen), který působí jako kofaktor DNA-polymerázy - důsledkem uvedené interakce je přímá inhibice replikace DNA (25). Obě funkce p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>, tj. inhibice cyklin-dependentních kináz a inhibice PCNA, jsou přitom nesený různými doménami p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>-proteinu. Inhibice CDK přísluší N-terminální části, zatímco vazba PCNA je vlastní C-terminální doméně. V experimentálním systému jsou obě domény schopny nezávisle inhibovat buněčnou proliferaci, inhibiční účinek N-terminální domény zaměřené proti CDK se ukazuje jako výraznější (26,27).

Toto je tedy obecné schéma proliferativního bloku replikativní senescence (obr. 1) a odtud je na bíle dni, jak mohou onko-



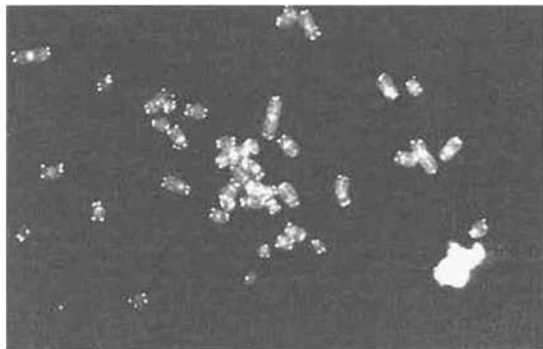
**Obr. 1. Schéma replikativního bloku uplatňujícího se v senescenci.** Senescence je spuštěna aktivací tumorových supresorových proteinů p53 a p16<sup>INK4a</sup>. Alternativní produkt p16<sup>INK4a</sup>-lokusu - p14<sup>ARF</sup> - přitom stabilizuje p53-protein zrušením destabilizační funkce mdm2-onkoproteinu. Aktivovaný p53 spouští transkripci p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>-genu, p16<sup>INK4a</sup> a p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> - proteiny inhibují aktivaci cyklin-dependentních kináz. Ty v důsledku toho nejsou schopny fosforylovat tumorové supresorové proteiny rodiny pRb. pRb zůstává v trvalém komplexu s transkripčními faktory E2F-rodiny, které tudíž nejsou k dispozici pro transkripci genů, kódujících proteiny nezbytné pro vstup do S-fáze buněčného cyklu. Konečným efektem je tedy zablokování buněčného cyklu v G1-fázi. Tento replikativní blok je sám aktivován jako následek vyčerpání povolené replikační kapacity dané buňky, nebo rovněž před dovršením povoleného počtu buněčných dělení - v tomto případě může být senescence spuštěna aktivací některých onkogenů, například *ras*.

proteiny DNA-tumorových virů tento blok prorazit. Podstatou jejich onkogenního účinku je totiž vyvážení buněčných tumorových supresorových proteinů do nefunkčních komplexů a jejich směřování k degradaci - T-antigen SV40 přitom současně váže p53 a pRb. E6-onkoprotein HPV16 inaktivuje p53 a E7 podobně inaktivuje pRb (14, 15).

Zbývá odpovědět na otázku, jak je tento proliferativní blok aktivován po prodělání určitého předem naprogramovaného počtu buněčných dělení. Zdá se, že zde současně působí dva mechanismy - postupující eroze telomer s každým buněčným dělením a postupující demethylace genomu (28). Zkrácením telomer je zřejmě výsledkem dvou procesů - neschopnosti DNA-polymerázy opožďujícího se řetězce úplně replikovat templát (tzv. end-replication problem) - proces, který byl poprvé hypoteticky načrtnut ruským genetikem Olovnikovem na začátku 70.let bez jediného experimentu, jak na to vzpomíná sám Hayflick (13), a k tomu dále přistupuje předpokládané působení 5'-3' - exonukleázy (29, 30). Délka telomer individuálních lidských chromozomů může být kvantifikována metodikou *in situ* hybridizace, za použití fluorescenčně značené sondy odpovídající multiplikované telomerové repetici (obr. 2). Úbytek DNA připadající na jedno buněčné dělení byl takto v době velmi nedávné poměrně přesně změřen a dosahuje délky 50 - 200 párů bází (pb), přičemž různé hodnoty v tomto rozmezí byly získány pro různé individuální chromozomy (31). Zkrácení telomer na určitou kritickou úroveň zřejmě působí jako určitý signál poškození DNA, který aktivuje p53; jaká je ovšem podoba tohoto signálu zůstává zatím nejasná - zda to je přímo zkrácení telomer nebo neschopnost zkrácených telomer zaujmout typickou sekundární strukturu (tzv. t-loop) apod. (32). Rovněž je jasné, že neexistuje naprosto jednoznačný vztah mezi délkou telomery jednotlivých individuálních chromozomů a spuštěním senescence - u některých chromozomů může být tolerován i větší úbytek telomer, u jiných ne - není to tedy rozhodně tak, že by první krátká telomera spouštěla senescenci (31). Ničemné postavení p53 jakožto senzora destrukce telomer lze pokládat za prokázané - byla vytvořena mutantní linie myši, u nichž je vyřazena telomerázová enzymatická aktivita cílenou mutací v genu kódujícím telomerázovou RNA; tyto myši vykazují patologické poškození u tkání vyžadujících vysokou úroveň proliferace buněk, které je ovšem výrazně zmírněno překřížením této mutace na pozadí bez funkčního p53-genu (33). Ať už je mechanismus aktivace p53 jakýkoli, další průběh se zdá být jasný. Aktivovaný p53 spouští transkripci genu p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>, jehož proteinový produkt zablokuje buněčný cyklus inhibicí G1-kináz a PCNA, popř. genu pro IGFBP-3, který zablokuje mitogenní aktivitu okolí buňky. p53 je přitom stabilizován p14<sup>ARF</sup> a jeho transkripční aktivita může být zvýšena transkripčním kofaktorem p33<sup>ING1</sup> (24).

Demethylace genomu postupuje možná jako nezávislý souběžný proces registrace proliferativní historie a jeho cílem je pravděpodobně p16<sup>INK4a</sup>, jehož promotor je velmi citlivý ke změnám v metylaci DNA (34). Názorný příklad této citlivosti poskytuje kultivace epiteliálních buněk mléčné žlázy, u nichž na rozdíl od shora uvedeného fibroblastového modelu, probíhá senescence dvoufázově - první fáze (po 10 - 20 PD) se označuje jako selekce čili M0, za ní pak následuje (po dalších 10 - 20 PD) vlastní senescence čili M1. Selekcí může být překonána buď transfekcí HPV E7-onkogenem (ale nikoli E6) nebo spontánně - buňky, které spontánně překonaly selekci hypermetylovaly p16<sup>INK4a</sup>-promotor a úplně utlumily expresi genu. Senescence (M1) je pak závislá výlučně na p53 a je překonána transfekcí HPV E6-onkogenem (20).

Postupující demethylace genomu má efekt přesně opačný, t.zn. dochází k aktivaci (derepresi) p16<sup>INK4a</sup>; navíc se zjistilo, že tento protein i jeho mRNA jsou velmi stabilní a mohou se tak "pasivně" hromadit v buňce s postupující proliferací. Pointa je totožná jako u aktivace p53, tj. inaktivace CDK4 a CDK6 inhibice fosforylace pRb a zablokování buněčného cyklu

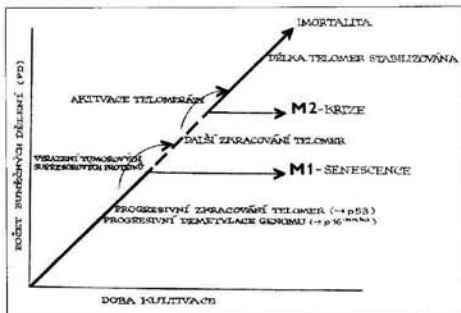


**Obr. 2.** Preparát metafázických chromozomů buněk kostní dřeně člověka hybridizovaných *in situ* oligonukleotidem odpovídajícím jedné kopii telomerní repetice. Vlastní chromozomy jsou barveny propidiumjodidem, telomery jsou vizualizovány prostřednictvím FITC. Mikroskop Olympus Fluoview, zvětšení 1450 x.

v G1-fázi (14). Sled jednotlivých procesů *in vitro* imortalizace schematicky zachycuje obrázek 3.

Je velmi obtížné, ne-li nemožné, z dílčích experimentů kategorizovat jednotlivé molekulární mediátory senescence podle důležitosti. Například byla popsána kultivace dospělých fibroblastů od dárců postiženého Li-Fraumeni syndromem (germinální mutace v *p53*-genu), která končí normálním senescenčním blokem po asi 40 PD, ten však může být spontánně překonán mutací v jediné funkční kopii *p53*-genu doprovázené ztrátou heterozygotnosti (loss of heterozygosity – LOH), aby posléze umožnil další proliferaci vlnu o délce 32–35 PD, která ovšem opět končí ve stavu připomínajícím senescenci (35). Pokud během této dodatečné proliferace dochází i k vyřazení *p16<sup>INK4a</sup>* děleci obou kopií genu, prodlužuje se tato dodatečná proliferací perioda přibližně na 55 PD a končí krizí,

**Obr. 3.** *In vitro* imortalizace primární buněčné kultury. Během kultivace primární buněčné kultury dochází k postupnému zkracování telomer s každým buněčným dělením a k postupující demethylaci buněčného genomu. Výsledkem obou těchto procesů je vstup buněčné kultury do stádia senescence, při němž se zastavuje veškerá další proliferace. Senescenci lze ovšem obejít vyřazením jejích molekulárních mediátorů – tumorových supresorových proteinů, například transkripcí onkogenu DNA-tumorových virů. Důsledkem této manipulace je další pokračování buněčné proliferace, během níž ovšem rovněž pokračuje postupné zkracování telomer, a to až do stádia, kdy zkrácené telomery již nejsou schopny plnit svoji vlastní biologickou funkci ochrany chromozomových konců. Dostává se krize kultury, jejíž charakteristickým znakem je rozsáhlá vlna buněčné smrti. Nezbytnou podmínkou další proliferace je stabilizace telomer aktivací speciální enzymatické mašinerie, nejčastěji telomerázy. Výsledná kultura je imortalizovaná a je schopna časově neomezené proliferace.



shodně s kultivací Li-Fraumeni fibroblastů, který ovšem končí přímo krizí, a to při perzistentně zvýšené expresi hladiny *p16<sup>INK4a</sup>* (18, 37). Tento výsledek je možné interpretovat tak, že primární úlohu zablokování buněčného cyklu v senescenci hraje *p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>*, proti tomu ovšem stojí pozorování, že *p16<sup>INK4a</sup>* je mutován v celé řadě nádorů, zatímco mutagenéze u *p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>* genu prakticky zaznamenána nebyla – přijmeme-li model senescence jako tumorové supresorové bariéry (viz dále), ukazuje toto srovnání na primární úlohu *p16<sup>INK4a</sup>* (34, 38). Závěrem je proto možno shrnout, že senescence je výsledkem jakéhosi vyváženého systému blokujícího buněčný cyklus, přičemž každá ze složek plní svou úlohu a lze těžko některou z nich vyřaditova na úkor druhé. Rovněž lze jen obtížně kvantitativně (tj. co do rozsahu poskytnutého dodatečného proliferacího prostoru) porovnávat různé nezávislé studie, které na různých konkrétních buněčných liniích manipulují s jednotlivými mediátory senescence.

Podání-li se buněce mutagenézi, virovou infekcí či genovou manipulací překonat senescenční bariéru, pokračuje po celou dobu dodatečné proliferace dále destrukce telomer (28) (kterou lze ovšem buňka nemůže zaznamenat a adekvátně na ni reagovat), až do okamžiku, kdy telomery nejsou dále schopny zastávat svou vlastní biologickou funkci – tj. ochranu konců chromozomu a jejich stabilizaci; výsledná chromozomální nestabilita v podobě chromozomálních fúzí a přestavb je pravděpodobně vlastní příčinou vlny buněčné smrti charakterizující krizi. Buňky, kterým se podaří překonat a dosáhnout imortalizace, aktivují během krize mechanismus stabilizace telomer, asi v 85% případů v podobě aktivace enzymu telomerázy (14, 15, 30). Tento scénář zároveň poskytuje vysvětlení pro pozorování, že většina imortalizovaných nádorových buněčných linií má telomery podstatně kratší než odpovídající normální buňky. U určitých buněčných typů, jako jsou epitelální buňky mléčné žlázy a keratinocyty, vede infekce HPV 16 či transfekce E6- a E7-onkogenu nejen k překonání senescence, ale krize u nich vůbec nemusí být patrná a překonání senescence má charakter imortalizace (20). Bylo zjištěno, že v těchto buněčných typech také nikoli například ve fibroblastech) je E6-onkogen, kromě inaktivace *p53*-proteinu, rovněž schopen aktivovat telomerázu. Toto pozorování může být klinicky významné u HPV-indukovaných nádorů, jako je karcinom děložního krčku (39).

#### Genetika buněčné imortalizace

Důležitým prvkem na cestě dešifrování molekulární podstaty imortalizace bylo poznání, že imortalizovaný fenotyp vstu-

puje jako recesivní v experimentech typu somatické hybridizace - produkt buněčné fúze mezi dočasnou a immortalizovanou buněčnou kulturou přejímá smrtelný fenotyp dočasné kultury a podléhá senescenci a krizi (40, 41). Rovněž produkt buněčné fúze mezi dvěma immortalizovanými lidskými buněčnými liniemi je ovšem často schopen pouze dočasné proliferace a poté vstupuje do senescence. Systematickou somatickou hybridizací vybraných lidských immortalizovaných buněčných linií byly definovány čtyři tzv. komplementační skupiny immortalizace, označené jako A, B, C a D; pouze produkt fúze linií náležejících do téže komplementační skupiny přejímá rodičovský immortalizovaný charakter, což prokazuje, že buněčné linie téže komplementační skupiny mutovaly v procesu immortalizace totožnou sadu genů (42, 43). Rovněž produkt fúze immortalizované telomerázy exprimující buněčné linie s dočasnou buněčnou linií ztrácí telomerázovou aktivitu (44). Immortalizovaný fenotyp je podle všeho výsledkem multistupňové mutagenese typu ztráty funkce (loss-of-function). Jinými slovy, existují dominantní senescenci a krizi spouštějící geny a alely a k překonání těchto dvou proliferčních bariér je nutné vyřazení obou kopií příslušných genů na obou homologních chromozomech. Část produktů těchto genů působí jako negativní regulátory buněčného cyklu, jiná část působí jako represory telomerázy (45, 46).

Ztráta funkce příslušných negativních regulátorů immortalizace je přitom zapotřebí konstitutivně, t.j. po celou dobu proliferace immortalizované kultury - zanesení funkčních kopií *p53* a *p16<sup>INK4a</sup>* genů do immortalizovaných fibroblastů (původu Li-Fraumeni rodin) vrací tyto buněčné linie na samý počátek a znovu nastartuje replikativní senescenci. Podobně použití teplotně senzitivní mutanty SV40 velkého T-antigenu umožňuje při permissivní teplotě immortalizovat lidské fibroblasty (t.j. obejít senescenci a selektovat buňky překonávající krizi), při zvýšení teploty kultivace takto immortalizované linie velmi rychle opět vstupují do senescence (14, 28). Jednou z příčin tohoto chování může být skutečnost, že immortalizované buněčné kultury mají zpravidla kratší (byť stabilizované) telomery, a tudíž je u nich trvale přítomen signál poškození DNA spouštějící senescenci - je-li do těchto buněk ještě dodatečně vnesen i příjemce tohoto signálu (*p53*), objevuje se pak senescence jako logický důsledek. Možnou praktickou aplikací je pak genová terapie nádorů transferem genů kódujících molekulární mediátory senescence, jako je *p16<sup>INK4a</sup>* (47).

Uvedený princip, t.j. že restaurování jediné genetické změny z celé multistupňové kaskády vedoucí k immortalizovanému fenotypu tento fenotyp ruší a obnovuje senescenci, byl využit i experimentálně k mapování nových genů senescence a immortalizace metodou transferu individuálních chromozomů (microcell-mediated chromosome transfer). Podstatou této metody je buněčná fúze mezi studovanou immortalizovanou buněčnou linií a hybridní buněčnou kulturou, nesoucí na pozadí myšičího genomu (buněčná linie A9) vždy jediný konkrétní lidský chromozom značený selekčním markerem (obvykle *Neo<sup>r</sup>*-gen). Nese-li tento chromozom gen spojený se senescencí či krizí, který je homozygotně mutačně vyřazen u použité immortalizované buněčné linie, dostaví se vzápětí po fúzi senescence nebo krize. Část hybridních klonů se ovšem vždy vrací k původnímu immortalizovanému fenotypu a u těchto revertantů zpravidla dochází k delecí menšího či většího úseku daného vneseného chromozomu. Jednotlivé klony revertantů jsou proto podrobeny mapovací analýze na retenci či ztrátu jednotlivých genetických markerů analyzovaného chromozomu a tímto způsobem je stanovena tzv. minimální deletovaná oblast, tj. nejmenší průnik delecí všech analyzovaných klonů revertantů. Takto lze zpravidla poměrně přesně zmapovat pozici hledaného genu, řádově s přesností megabází DNA. Následující jemně mapování sleduje v podstatě obecnou metodiku pozičního klonování genů, tj. vytvoření fyzikální mapy dané oblasti v podobě uspořádané sestavy fragmentů DNA v podobě YAC- (yeast arteficial chromosome) či BAC- (bacterial

arteficial chromosome) klonů (které lze rovněž funkčně otestovat zavedením do dané immortalizované buněčné linie, metodika je ovšem složitější), selekce exprimovaných oblastí (EST - expressed sequence tagg), kandidátních genů atd. V uvedeném experimentálním systému lze senescenci indukovat velmi rychle (po 5 až 9 PD), naproti tomu v případě represoru telomerázy dochází k indukci krize až po postupné destrukci telomer, která nastává až po 20 - 40 PD (48).

Alternativní metodika byla zcela převzata z molekulární genetiky nádorů a spočívá v hledání oblastí, na jednotlivých předem vytypovaných chromozomech, popř. i na úrovni celého genomu, vykazujících konzistentní ztrátu heterozygotnosti (LOH), což je charakteristický znak lokalizace tumorového supresorového genu. Za modelový systém můžeme pokládat výše zmíněnou kultivaci fibroblastů jedinců postižených Li-Fraumeni syndromem (35). Jiný systém vycházející z klasického modelu analyzoval chování fibroblastů immortalizovaných po transfekci T-antigenem SV40. Senescence je zde překonána blokováním *p53*- a *pRb*-proteinů transfektovaným virovým onkoproteinem, ale ukazuje se, že k immortalizaci je vedle aktivace telomerázy nutná ještě genetická změna na úrovni *6q26-27* (49). Jiný vhodný systém představuje baterie buněčných linií odvozených z nádorů hlavy a krku (SCCHN) - z těchto nádorů se podařilo ustavit buněčné linie v různém stupni "immortalizační dráhy" (t.j. presenescentní, jejichž kultivace končí senescencí, postsenescentní, jejichž kultivace končí krizí, i immortalizované) a tyto linie takto tvoří velmi výhodný vstup celogenomové srovnávací analýzy na ztrátu heterozygotnosti dostupných genetických markerů, které v případě LOH označují polohu zasaženého tumorového supresorového genu (50).

Touto metodikou mohly být přiřazeny chromozomy pro jednotlivé komplementační skupiny (A - chr. 6, B - chr. 4, C - chr. 1 a D - chr. 7) a v různých liniích byla senescence korelována s transferem lidských chromozomů 2, 3, 11, 13, 16 a 18 (28, 45, 48, 51). Gen pro senescenci komplementační skupiny B byl již klonován (*MORF4*-gen), zdá se ovšem jisté, že další geny na chromozomu 4 je třeba ještě vyklonovat, poněvadž samotný *MORF4*- gen indukuje senescenci až po 20 - 30 PD, na rozdíl od intaktního chromozomu 4, který po transferu indukuje senescenci už po 5-10 PD, a navíc u části buněčných linií přiřazených do komplementační skupiny B je *MORF4* zcela neúčinný (52, 53). V brzké budoucnosti se dá rovněž očekávat vyklonování genu pro komplementační skupinu D (*SEND*-gen na chromozomu 7q31) (46). Gen pro represor telomerázy byl mapován na chromozomu 3 do oblastí 3p21.3-22 a 3p12-21.1 (54).

Molekulární podstata senescence a immortalizace může být odhalena ještě z úplně jiné strany. Jak senescence, tak i immortalizace jsou totiž charakterizovány změnou expresního profilu genů ve srovnání s normálními buňkami téhož typu (55). Tyto diferencovaně exprimované geny je pak možné izolovat speciálními metodikami jako je analýza typu "differential display" (56, 57), subtrakční klonování (58) či analýza typu "DNA-microarrays" (59).

### Replikativní senescence jako bariéra nádorové transformace

Pojetí replikativní senescence jako přirozené protitumorové bariéry vychází z několika pozorování. Za prvé, tytéž geny, jejichž proteinové produkty zprostředkovávají trvalé zablkování další proliferace v senescenci, patří mezi nejčastěji mutované tumorové supresorové geny v klinických nádorech. Každému z nich přísluší v případě germinální mutace specifický syndrom dědičné nádorové predispozice: *p53* - Li-Fraumeni syndrom se širokým spektrem nádorů, *pRb* - rodinný retinoblastom, *p16<sup>INK4a</sup>* - rodinným melanom (14); velmi vzácně se vyskytující forma rodinného melanomu je rovněž kodována specifickou mutací v *CDK 4*- genu, která propůjčuje insenzitivitu vůči inhibici aktivace cyklinem D ze strany *p16<sup>INK4a</sup>* (38). *p53*, *p16<sup>INK4a</sup>* a v řadě případů současně i *p14<sup>ARF</sup>* patří rovněž mezi nejčastěji mutované tumorové supresorové

geny u spontánních nádorů, rovněž často pozorovanou alternativou mutace je u  $p16^{INK4a}$  zrušení exprese hypermetylační promotoru. I když se mutace v  $pRb$  u spontánních nádorů vyskytují méně často, jejich výskyt se striktně vylučuje s mutacemi v  $p16^{INK4a}$ , což potvrzuje ekvivalenost dopadu obou mutací; často se proto hovoří o  $p16^{INK4a}/pRb$  - tumorové supresorové dráze (38, 60).

Druhé pozorování ve prospěch nutnosti proražení bariéry replikativní senescence v procesu tumorigeneze vychází z toho, že z nádorů lze bez nutnosti další mutagenese či genové manipulace odvodit, podle konkrétního typu snadněji či obtížněji, immortalizované buněčné linie. To svědčí o tom, že většina nádorů postoupila během nádorové progresy ještě dál - až k překonání krize a k immortalizaci. Třebaže lze vždy vznést námitku, že k immortalizaci může dojít až v procesu *in vitro* kultivace, skoro 90% podíl nádorů, které vykazují telomerázovou aktivitu, dosti pádně hovoří ve prospěch immortalizace jako součásti karcinogeneze *in vivo* (61, 62). Dokonce v některých případech nenahraditelnost nádoru jakožto vylučného možného zdroje pro odvození permanentních buněčných linií vedla k produkci transgenických myší, u nichž byla tumorigeneze cíleně směřována do žádaného specializovaného buněčného typu - velmi se v tomto ohledu osvědčil T-antigen viru SV40 pod kontrolou tkáňové či buněčně specifických promotorů (63). Existuje vlastně nějaký koncepční důvod, proč by z hlediska nádorové buňky vyvstávala nutnost překonání proliferčních bariér senescence a krize a následně immortalizace? Čistě teoreticky ne - prostor oněch 50 PD představuje více než dostatečnou proliferční kapacitu pro vytvoření smrtelného nádoru. Je třeba ovšem vzít v úvahu, že celý proces multistupňové karcinogeneze vedoucí ke konečnému, plně malignímu, metastatickému a vůči terapii rezistentnímu fenotypu vyžaduje řadu genetických změn, které se asemblují procesem náhodné mutagenese a následné selekce, což je proces neefektivní, při němž dochází k velkým buněčným ztrátám. Z tohoto pohledu je pravděpodobně zapotřebí daleko větší proliferční kapacity než kolik vymezuje senescentní bariéra (61, 64). Navíc oněch 50 PD bylo odvozeno pro fibroblasty a předpokládá se či bylo prokázáno, že u řady jiných buněčných typů může senescence nastávat podstatně dříve. Zjistilo se rovněž, že u některých buněčných typů je senescence funkcí stádia diferenciace; diferencované tyroidní folikulární buňky podléhají dvěma časným proliferčním bariérám, z nichž první je  $pRb$ -závislá, t.j. překonatelná E7-onkogenem HPV, ale  $p16^{INK4a}$ -nezávislá, mechanismus druhé není znám. Dediferenciace ovšem ruší tyto bariéry a jejich výsledkem jsou buňky, které se s ohledem na senescenci blíží fibroblastům, t.j.  $p53$ - a  $pRb$ -závislá senescence nastává okolo 40 PD (62). Je téměř zbytečné dodávat, že dediferenciace je součástí morfologie řady nádorů. Je ovšem nutné dodat, že existují příklady nádorů, z nichž byly izolovány pre-senescentní buněčné linie (například šupinatý karcinom hlavy a krku - SSCHN). Dokonce se podařilo izolovat jednu linii, která sice mutovala  $p53$ - a  $p16^{INK4a}$ -geny, dostatečně ovšem neaktivovala telomerázu, a její kultivace *in vitro* končí krizí (50).

### Předčasná senescence

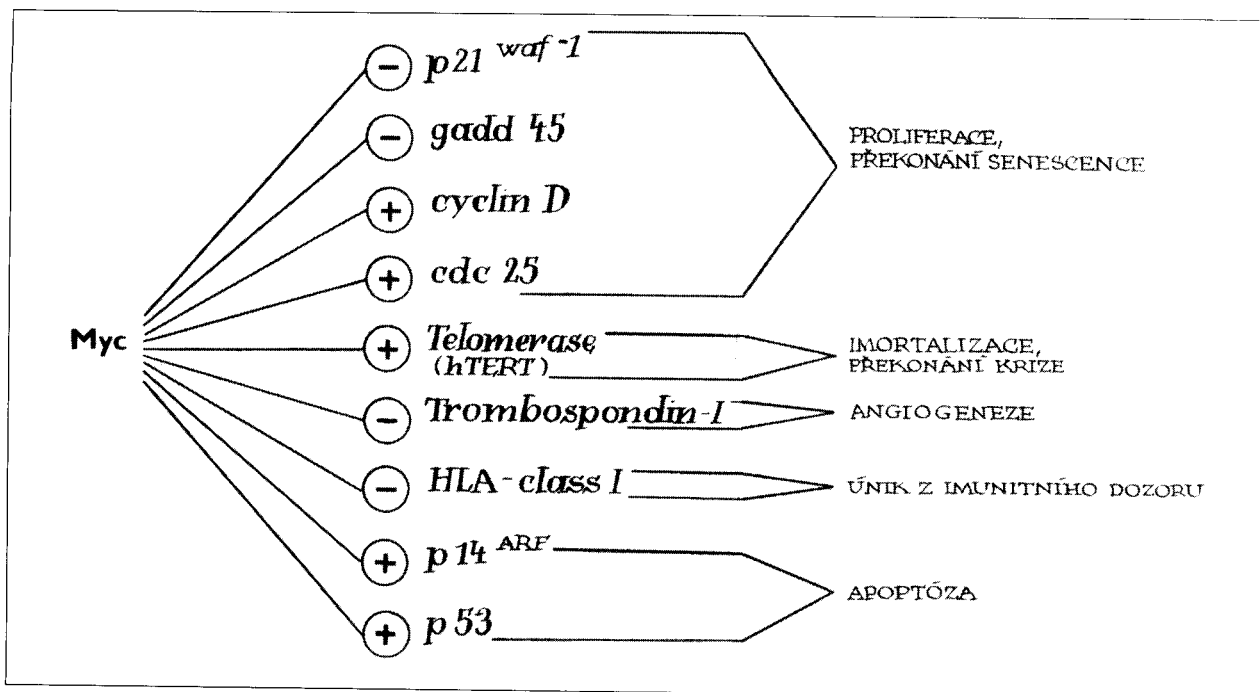
V době velmi nedávné se zjistilo, že postavení senescence jako protinádorové bariéry může nabývat mnohem aktivnější podoby. Překvapující výsledek byl získán při studiu důsledků ektopické exprese jednoho z nejdůležitějších onkogenů - *ras*. Geny pro malé GTP-vazebné proteiny *ras* (*Ha-ras*, *Ki-ras* a *N-ras*) patří mezi vůbec nejčastější cíle mutagenese v klinických nádorech, přičemž typických dopadem takové mutace je rozvrácení normální regulace aktivity proteinu (65). V uvedeném experimentu se ovšem zjistilo, že aktivovaný *ras*-onkogen v normálních buňkách nejen že nepůsobí onkogeně, ale přímo zastavuje proliferaci za stavu, který nese všechny atributy senescence - tj. buňky nabývají typickou rozplácitou morfologií, zůstávají živé, ale nejsou schopny další proliferace ani po

stimulaci sérem, stimulace sérem nevede k indukci *c-fos* faktoru a buňky exprimují typické markery senescence - se senescencí asociovanou  $\beta$ -galaktosidázovou aktivitu (SA  $\beta$ -Gal) a inhibitor aktivátoru plasminogenu typu I (PAI-I) (66). Dochází k aktivaci molekulárních mediátorů senescence -  $p53$ ,  $p14^{ARF}$ ,  $p21^{waf-1/cip-1/sdi-1}$ ,  $p16^{INK4a}$  a v tomto případě i  $p15^{INK4b}$  (obr. 1) (66, 67). K totožnému efektu dochází i aktivací downstream-efektorů *ras* ve směru mitogen-aktivované kinázové kaskády, tj. *raf* a MAPK (68, 69). Tento fenotyp je evolučně konzervovaný, minimálně mezi myší, krysou a člověkem. Toto pozorování poskytuje vysvětlení pro nutnost současné aktivace onkogenů a inaktivace tumorových supresorových genů v procesu multistupňové karcinogeneze - aktivovaný *ras* může působit proliferačně jen tehdy, dojde-li k aktivací mutaci na pozadí mutačního vyřazení tumorových supresorových genů. Otázkou zatím zůstává, do jaké míry je *ras*-indukovaná senescence reverzibilní. Ve shora uvedených pracích byl aktivovaný *ras* do buněk zaveden vroděných infekcí, přičemž expresní hladina mutovaného *ras* dosahovala více než desetinásobku endogenní exprese. Za těchto podmínek je vyvolaný senescentní fenotyp ireverzibilní, tj. jestliže po vyvolání senescence dojde následně k vyřazení lokusu tumorových supresorových genů, nevolně to senescentní blok (66, 68). Ačkoli se obecně tvrdí, že senescence znamená ireverzibilní zablokování buněčného cyklu, ukazuje se, že v řadě případů to tak docela být nemusí - například při kultivaci Li-Fraumeni fibroblastů dochází vždy k zástavě proliferace v souladu se senescentní bariérou a až v průběhu této zástavy dochází k vyřazení druhé kopie *p53*- genu (LOH), což se u malé části buněk projeví jako zotavení se z proliferční zástavy (35). Je tudíž docela dobře možné a bylo by i logické očekávat, že za reálných podmínek *in vivo* vede aktivací *ras*-mutace k zástavě proliferace, ovšem buňka je schopna v tomto senescenci podobném stavu čekat měsíce a třeba i roky (což může být usnadněno rezistencí senescentních buněk vůči apoptóze), nedojde-li k mutačnímu vyřazení tumorových supresorových genů, a v tom případě znovu zahájí proliferaci, nyní již ve směru nádorové transformace (70).

### Myc

Již od začátku 80. let je známo, že *ras* není schopen sám transformovat primární myší fibroblasty a že potřebuje kooperaci některého z onkogenů DNA-tumorových virů či vyřazení tumorových supresorových proteinů jiným způsobem, např. použitím dominantních negativních konstruktů (vysvětlení bylo právě podáno). Existuje zde ovšem jedna výjimka, kdy je efektivní kooperace schopen jiný buněčný onkogen, a to právě *myc* (71). *Myc* tedy představuje zcela vyjimečnou onkogenní rodinu (*c-myc*, *L-myc*, *N-myc*); funkčně se jedná o jaderné transkripční faktory, které v heterodimerické podobě v komplexu s proteinem zvaným *max* regulují expresi sady efektorových genů nesoucích ve svých regulačních oblastech příslušnou rozpoznávací vazebnou sekvenci (snad ve všech případech genů přímo regulovaných *myc/max* dimerem se jedná o downstream-regulační sekvence, které nejsou lokalizovány v promotoru jako obvykle, nýbrž uvnitř genu, zpravidla v prvním intronu). *Myc* je také v tom neobvyklý, že dokáže jak aktivovat, tak i reprimovat expresi cílových genů; obecně se dá ovšem říci, že *myc* působí jako transkripční aktivátor, celý protein je ovšem výrazně slabším aktivátorem, než chimerické konstrukty transaktivací domény *myc* a nějaké jiné DNA-vazebné domény (např. kvasničného faktoru GAL-4), z čehož se usuzuje, že se někde uvnitř *myc* proteinu nachází negativní regulační doména zeslabující sílu transaktivace (72). *Myc*-faktory obecně působí jako proliferaci-stimulující proteiny, v průběhu diferenciace, kdy dochází k přirozenému omezení proliferace buněk, je *myc* vystřídán skupinou faktorů *mad* (funkční entitou jsou tedy *mad/max* heterodimery); *mad*-faktory přitom působí jako aktivní transkripční represory (73).





**Obr. 4.** Důsledky aktivace *myc*-onkogenu během nádorové progresse. Myc působí jako transkripční faktor, který je schopen jak aktivace (+), tak i represe (-) cílových genů. Důsledkem jsou změny v úrovni exprese řady genů působících během celé dráhy karcinogeneze.

*Myc*-onkogeny patří spolu s *ras* k nejčastěji mutovaným buněčným onkogenům; na rozdíl od *ras* zde ovšem převážná část mutací postihuje expresi a jejím výsledkem je tedy neregulovaná vysoká exprese sekvenčně nezměněného onkogenu, například jako důsledek chromozomální translokace do blízkosti aktivního transkripčního enhanceru nebo genové amplifikace (65). Onkogenní účinek *myc*-faktoru se odvíjí po celé dráze nádorové progresse (obr. 4), včetně překonání přirozených proliferčních bariér senescence a krize. Myc reprimuje expresi genů pro p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup> (74) a jiný inhibitor postupu buněčným cyklem gadd45 (75), naopak aktivuje expresi fosfatázy buněčného cyklu (nutné pro aktivaci cyklin-dependentních kináz) cdc25 (76) a cyklinu D (74) (čím vyšší je exprese cyklinu D, tím lze očekávat relativní utlumení efektu p16<sup>INK4a</sup>). Tím vším *myc* bezprostředně podporuje proliferaci a přispívá k překonání senescentní bariéry. Myc ovšem stejnou měrou přispívá i k překonání krize, neboť bezprostředně aktivuje expresi genu pro katalytickou podjednotku telomerázy (30, 77, 78) (maď tuto expresi naopak reprimuje - 79). Onkogenní působení *myc*-faktoru se ovšem odvíjí i na dalších úrovních nádorové progresse; *myc* bezprostředně podporuje nádorovou angiogenezi repressí exprese jednoho s inhibitorů angiogeneze, trombospondinu - I (80), a rovněž může přispět k úniku z imunitního dozoru repressí exprese *HLA*-genů I. třídy (81). Je přitom zajímavé, že nejméně ve třech případech přímo reprimovaných genů (p21<sup>waf-1/cip-1/sdi-1</sup>, gadd45, *tsp-1*) se jedná o geny přímo aktivované tumorovým supresorovým proteinem p53 (24); vzájemná transkripční interference p53 a *myc* by představovala nepochybně velmi zajímavý vědecký projekt.

Vztah *myc* a p53 není ovšem vyhraněně negativní, naopak. Myc stojí vůči p53 v podobném vztahu jako *ras*, ovšem nikoli vzhledem k senescenci, nýbrž vzhledem k apoptóze. Myc je totiž vedle svých dalších efektů rovněž schopen indukovat apoptózu, zejména v odpověď na protichůdné mitogenní signály (v experimentech nejčastěji simulované tak, že nadměrná ektopická exprese *myc* je kombinována s kultivací buněk bez přítomnosti séra - 72). Myc-indukovaná apoptóza je zprostředkována a plně závislá na p53; *myc* bezprostředně aktivuje expresi p53-genu jakož i p14<sup>ARF</sup> (82). Odtud pochází další

seleční tlak na eliminaci p53- a p14<sup>ARF</sup>-p16<sup>INK4a</sup>- lokusů. Jedná se tedy o mechanismus velmi analogický předčasné senescenci indukované *ras* - protichůdná mitogenní signalizace (např. amplifikace *myc*-onkogenu bez současné mitogenní signalizace růstovými faktory v prostředí) normálně indukuje rychlou apoptózu, avšak na pozadí nulovém pro p53-gen je buňkou interpretována jako čistě mitogenní signál (70).

Jestliže se p53 přímo účastní jak senescence, tak apoptózy, přičemž oba dva procesy představují sice ekvivalentní, nicméně navzájem neslučitelné protinádorové bariéry, co rozhoduje o tom, kterým směrem má p53 regulovat buněčnou odpověď? Tato otázka zůstává dosud nezodpovězena, zdá se, že odpověď buňky je výslednicí řady faktorů, jako je např. buněčný typ, buněčný kontext, celkové hormonální prostředí atp. (24).

### Telomeráza

Překonání krize a imortalizace je v ~85% případů spojeno či dokonce podmíněno aktivací enzymu telomeráza - jak již bylo výše naznačeno, tato aktivace může být buď přímá, jako je tomu v případě amplifikace *myc*-onkogenu, nebo se může jednat spíše o derepresi, kterou musíme mít na mysli v případě chromozomálních přestaveb zahrnujících oblast 3p nesoucí represor telomerázy. Klinické důsledky aktivace telomerázy jsou předmětem četných přehledných článků (9, 83, 84, 85) a na tomto místě se proto omezíme pouze na dva aspekty dotýkající se bezprostředně našeho tématu, t.j. postavení senescence v procesu tumorigenní transformace. Za prvé, telomeráza je pokládána za velmi slibný cíl protinádorové terapie. Argumentuje se přitom jednak výraznou tkáňovou specificitou exprese telomerázy - telomeráza je ve většině somatických tkání reprimována, k expresi dochází v buňkách germinální linie a v tzv. kmenových buňkách, včetně hematopoetických, a v některých na proliferaci náročných buněčných typech, jako jsou aktivované lymfocyty. Z hlediska specificity by proto inhibitory telomeráz neměly vykazovat vyšší obecnou toxicitu než např. cytostatika. Druhým argumentem ve prospěch vyvoje těchto léků je pozorování, že většina nádorů nese, i přes telomerázovou aktivitu, kratší telomery než odpovídající somatické buňky. Bylo předloženo několik možných vysvětlení tohoto pozorování - je možné, že je to důsledek pozdní akti-

vace telomerázy při překonání krize, je ovšem také možné, že nádor vzniká z kmenové buňky, která exprimuje telomerázu, ovšem na úrovni nedostatečné pro udržení délky telomer za podmínek intenzivní proliferace. Efektivita enzymu je ovšem negativně korelována s délkou telomery; je tudíž možné, že telomerázová aktivita v kmenové buňce nestačí zabránit destrukci původní délky telomery, je ovšem dostatečná pro stabilizaci zkrácené telomery ve výsledném nádoru (62, 84). Ať už je příčina zkrácených telomer nalézáných ve většině nádorů jakákoli, uvažuje se v tom smyslu, že inhibice telomerázy by vzhledem ke kratším telomerám mohla vést u nádoru podstatně dříve k proliferačnímu arestu než u kmenových buněk. Téměř vždy ovšem tyto úvahy zapomínají vzít v potaz skutečnost (85), že důsledky inhibice telomerázy v nádorové a kmenové buňce budou principiálně odchylné. U kmenové buňky bude výsledkem inhibice telomerázy senescence, kterou spustí signál poškození DNA po kritickém zkrácení délky telomer. Naproti tomu nádorové buňky v naprosté většině případů již překonaly senescenční bariéru v průběhu nádorové progresu vyřazením molekulárních mediátorů senescence a inhibice telomerázy zde může vést k jedinému myslitelnému důsledku - krizi. Jinými slovy, nádorová buňka disponuje dodatečným povoleným proliferačním prostorem ve srovnání

s kmenovou buňkou. Dá se proto očekávat, že inhibitory telomerázy bude nutné aplikovat individuálně, po stanovení délky telomer daného nádoru a kmenových buněk daného pacienta.

V předchozím textu jsme se již dotkli i druhého aspektu, který bychom rádi zmínili. Jedná se o případy tzv. buněčné terapie, v nejjednodušší podobě na příkladu transplantace kostní dřeně či přímo hematopoetických kmenových buněk. Taková transplantace je spojena s expanzí čili masivní proliferací transplantované buněčné populace, která i přes telomerázovou aktivitu kmenových buněk vede k destrukci telomer a "zestárnutí" transplantátu (86). V takových případech by bylo velmi výhodné umět telomerázovou aktivitu zvýšit. Rovněž zde je na místě opatrný přístup. Třebaže telomeráza není sama o sobě onkogenem, poněvadž nespouští buněčnou proliferaci, pouze ji umožňuje, telomeráza je schopna s onkogeny v procesu nádorové transformace kooperovat (87). Zjistilo se rovněž, že immortalizace ektopickou expresí katalytické podjednotky telomerázy neznámým způsobem aktivuje *myc*-onkogen (88), se zhora podrobně specifikovanými možnými důsledky. Dá se proto předpokládat, že praktickému uplatnění "řízené" exprese telomerázy v buněčných transplantátech musí ještě předcházet základní experimentální práce.

## Literatura

1. Stevenson H., Gazdar A.F., Phelps R., Linnoila R.L., Ihde D.C., Ghosh B., Walsh T., Woods E.L., O'Connell T., Makuch R., Kramer B.S., Mulshine J.L.: Tumor cell lines establishment *in vitro*: An independent prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Ann Intern Med.* 113, 1990, 764-770.
2. Pecoraro G., Morgan D., Defendi V.: Differential effects of human papillomavirus type 6, 16 and 18 DNAs on immortalization and transformation of human cervical epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.* 86, 1989, 563-567.
3. Woodworth C.D., Doniger J., DiPaolo J.A.: Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J.Virol.* 63, 1989, 159-164.
4. Paraskeva C., Corfield A.P., Harper S., Hague A., Audeant K., Williams A.C.: Colorectal carcinogenesis: Sequential steps in the *in vitro* immortalization and transformation of human colonic epithelial cells (Review). *Anticanc. Res.* 10, 1990, 1189-2000.
5. Williams A.C., Hague A., Manning A.M., van der Stappen J.W., Paraskeva C.: *In vitro* models of human colorectal cancer. *Canc. Surv.* 16, 1993, 15-29.
6. Freshney R.L.: The transformed phenotype. In: *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques*, 3rd ed. (R.L.Freshney ed.) Wiley-Liss 1994, s.231-241.
7. Park M.: Oncogenes: Genetic abnormalities of cell growth. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th ed. (C.R.Scriver, A.L.Beaudet, W.S.Sly, D.Valle, J.B.Stansbury, J.B.Wyngaarden, D.S.Fredrickson eds.) McGraw-Hill Inc. 1995, s.589-611.
8. Trbušek M., Vojtěšek B.: Protein MDM-2 a nádorová onemocnění. *Klin.onkol.* 11, 1998, 144-146.
9. Šimičková M., Cernoch M.: Význam stanovení aktivity telomerázy v onkologii. *Klin.onkol.* 12, 1999, 73-77.
10. Pospíšilová Š., Vojtěšek B.: Protein p21<sup>WAF1</sup> a jeho úloha v regulaci buněčného cyklu. *Klin.onkol.* 13, 2000, 13-16.
11. Hayflick L., Moorhead P.S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp.Cell Res.* 25, 1961, 585-621.
12. Hayflick L.: The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp.Cell Res.* 37, 1965, 614-636.
13. Hayflick L.: Une brève histoire de la découverte de la mortalité et de l'immortalité cellulaire et de son influence sur nos conceptions concernant le vieillissement et le cancer. *Path.Biol.* 47, 1999, 1094-1104.
14. Duncan E.L., Reddel R.R.: Genetic changes associated with immortalization. A review. *Biochemistry (Moscow)*, 11, 1997, 1263-1274.
15. Gire V., Wynford-Thomas D.: La sénescence dans les cellules humaines: un obstacle au développement tumoral. *Médecine/Sciences*. 15, 1999, 1096-1104.
16. Girardi A.J., Jensen F.C., Koprowski H.: SV40-induced transformation of human diploid cells: crisis and recovery. *J.Cell.Comp.Physiol.* 65, 1965, 69-84.
17. Sugimoto M., Ide T., Goto M., Furuichi Y.: Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mechan.Ageing Devel.* 107, 1999, 51-60.
18. Wei W., Sedivy J.M.: Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp.Cell Res.* 253, 1999, 519-522.
19. Bond J.A., Houghton M.F., Rowson J.M., Smith P.J., Gire V., Wynford-Thomas D., Wyllie F.S.: Control of replicative life span in human cells: Barriers to clonal expansion intermediate between M1 senescence and M2 crisis. *Mol.Cell.Biol.* 19, 1999, 3103-3114.
20. Kiyono T., Foster S.A., Koop J.L., McDougall J.K., Galloway D.A., Klingelhuiz A.J.: Both Rb/p16<sup>INK4a</sup> inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*. 396, 1998, 84-88.
21. Johnson D.G., Walker C.L.: Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 39, 1999, 295-312.
22. Band V.: The role of retinoblastoma and p53 tumor suppressor pathways in human mammary epithelial cell immortalization (Review). *Int.J.Oncol.* 12, 1998, 499-507.
23. Haber D.A.: Splicing into senescence: The curious case of p16 and p19<sup>ARF</sup>. *Cell*, 91, 1997, 555-558.
24. Ryan K.M., Vousden K.H.: Regulation of cell growth and death by p53. In: *Signaling networks and cell cycle control: The molecular basis of cancer and other diseases*. (J.S.Gutkind ed.) Humana Press Inc 1999, s. 411-427.
25. Waga S., Hannon G.J., Beach D., Stillman B.: The p21 inhibitor of cyclin dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*. 369, 1994, 574-578.
26. Chen J., Jackson P.K., Kirschner M.W., Dutta A.: Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*. 374, 1995, 386-388.
27. Luo Y., Hurwitz J., Massagué J.: Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21<sup>Cip1</sup>. *Nature*. 375, 1995, 159-161.
28. Reddel R.R.: A reassessment of the telomere hypothesis of senescence. *BioEssays*, 20, 1998, 977-984.
29. Chiu C.-P., Harley C.B.: Replicative senescence and cell immortality: The role of telomeres and telomerase. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 214, 1997, 99-106.
30. Cerni C.: Telomeres, telomerase and *myc*. An update. *Mutation Res.* 462, 2000, 31-47.
31. Martens U.M., Chavez E.A., Poon S.S.S., Chmoo C., Lansdorf P.M.: Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp.Cell Res.* 256, 2000, 291-299.
32. Vaziri H., Benchimol S.: Alternative pathways for the extension of cellular life span: inactivation of p53/pRb and expression of telomerase. *Oncogene*, 18, 1999, 7676-7680.
33. Chin L., Artandi S.E., Shen Q., Tam A., Lee S.-I., Gottlieb G.J., Greider C.W., DePinho R.A.: p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*, 97, 1999, 527-538.
34. Young J., Smith J.R.: Epigenetic aspects of cellular senescence. *Exp.Gerontol.* 35, 2000, 23-32.
35. Rogan E.M., Bryan T.M., Hukku B., Maclean K., Chang A.C. M., Moy E.L., Englezou A., Warnford S.G., Dalla-Pozza I., Reddel R.R.: Alterations in p53 and p16<sup>INK4a</sup> expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol.Cell.Biol.* 15, 1995, 4745-4753.
36. Noble J.R., Rogan E.M., Neumann A.A., Maclean K., Bryan T.M., Reddel R.R.: Association of extended *in vitro* proliferative potential with loss of p16<sup>INK4a</sup> expression. *Oncogene*, 13, 1996, 1259-1268.
37. Brown J.P., Wei W., Sedivy J.M.: Bypass of senescence after disruption of p21<sup>CIP1/WAF1</sup> gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*. 277, 1997, 831-834.

38. Huschtscha L.I., Reddel R.R.: p16<sup>INK4a</sup> and the control of cellular proliferative life span. *Carcinogenesis*, 20, 1999, 921-926.
39. Greider C.W.: Telomerase activation - one step on the road to cancer? *Trends Genet.*, 15, 1999, 109-112.
40. Muggleton-Harris A., DeSimone D.: Replicative potential of various fusion products between WI-38 and SV40 transformed WI-38 cells and their components. *Somat.Cell Genet.*, 6, 1980, 689-698.
41. Pereira-Smith O.M., Smith J.R.: The phenotype of low proliferative potential is dominant in hybrids of normal human fibroblasts. *Somat.Cell Genet.*, 8, 1982, 731-742.
42. Pereira-Smith O.M., Smith J.R.: Evidence for the recessive nature of cellular immortality. *Science*, 221, 1983, 964-966.
43. Pereira-Smith O.M., Smith J.R.: Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 85, 1988, 6042-6046.
44. Shay J.W.: Toward identifying a cellular determinant of telomerase repression. *J.Natl.Canc.Inst.*, 91, 1999, 4-6.
45. Ran Q., Pereira-Smith M.: Genetic approaches to the study of replicative senescence. *Exp.Gerontol.*, 35, 2000, 7-13.
46. Black D.M.: Characterization of a multi-tissue tumour suppressor and senescence gene. *Br.J.Cancer*, 80 (Suppl 1), 1999, 42-45.
47. Steiner M.S., Zhang Y., Farooq F., Lerner J., Wang Y., Lu Y.: Adenoviral vector containing wild-type p16 suppresses prostate cancer growth and prolongs survival by inducing cell senescence. *Canc.Gene Therap.*, 7, 2000, 360-372.
48. Tanaka H., Horikawa W., Kugoh H., Shimizu M., Barrett J.C., Oshimura M.: Telomerase-independent senescence of human immortal cells induced by microcell-mediated chromosome transfer. *Mol.Carcinogen.*, 25, 1999, 249-255.
49. Banga S.S., Kim S., Hubbard K., Dasgupta T., Jha K.K., Patsialis P., Hauptschein R., Gamberi B., Dalla-Favera R., Kraemer P., Ozer H.L.: SEN6, a locus for SV40-mediated immortalization of human cells, maps to 6q26-27. *Oncogene*, 14, 1997, 313-321.
50. Loughran O., Clark L.J., Bond J., Baker A., Berry I.J., Edington K.G., Ly I.-S., Simmons R., Haw R., Black D.M., Newbold R.F., Parkinson E.K.: Evidence for the inactivation of multiple replicative lifespan genes in immortal human squamous cell carcinoma keratinocytes. *Oncogene*, 14, 1997, 1955-1964.
51. Reddy D.E., Sandhu A.K., DeRiel J.K., Athwal R.S., Kaur G.P.: Identification of a gene at 16q24.3 that restores cellular senescence in immortal mammary tumor cells. *Oncogene*, 18, 1999, 5100-5107.
52. Bertram M.J., Bérubé N.G., Hang-Swanson X., Ran Q., Leung J.K., Bryce S., Spurgers K., Bick R.J., Baldini A., Ning Y., Clark L.J., Parkinson E.K., Barrett J.C., Smith J.R., Pereira-Smith O.M.: Identification of a gene that reverses the immortal phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor-like genes. *Mol.Cell.Biol.*, 19, 1999, 1479-1485.
53. Bryce S.D., Forsyth N.R., Fitzsimmons S.A., Clark L.J., Bertram M.J., Cuthbert A.P., Newbold R.F., Pereira-Smith O.M., Parkinson E.K.: Genetic and functional analyses exclude Mortality Factor 4 (MORF4) as a keratinocyte senescence gene. *Canc.Res.*, 59, 1999, 2038-2040.
54. Cuthbert A.P., Bond J., Trott D.A., Gill S., Broni J., Marriot A., Khoudoli G., Parkinson E.K., Cooper C.S., Newbold R.F.: Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J.Natl.Canc.Inst.*, 91, 1999, 37-45.
55. Wheaton K., Atadja P., Riabowol K.: Regulation of transcription factor activity during cellular aging. *Biochem.Cell Biol.*, 74, 1996, 523-534.
56. Da Silva L.D.C.G., Hu Y.F., Russo I.H., Ao X., Salicioni A.M., Yang X., Rosso J.: S100P calcium-binding protein overexpression is associated with immortalization of human breast epithelial cells *in vitro* and early stages of breast cancer development *in vivo*. *Int.J.Oncol.*, 16, 2000, 231-240.
57. Schonning B., Bévort M., Mikkelsen S., Andresen M., Thomsen P., Leffers H., Norrild B.: Human papillomavirus type 16 E7-regulated genes: regulation of S100P and ADP/ATP carrier protein genes identified by differential-display technology. *J.Gen.Virol.*, 81, 2000, 1009-1015.
58. Grillari J., Hohenwarter O., Grabherr R.M., Katinger H.: Subtractive hybridization of mRNA from early passage and senescent endothelial cells. *Exp.Gerontol.*, 35, 2000, 187-197.
59. Shelton D.N., Chang E., Whittier P.S., Choi D., Funk W.D.: Microarray analysis of replicative senescence. *Curr.Biol.*, 9, 1999, 939-945.
60. Sharpless N.E., DePinho R.A.: The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr.Opin.Gen.Devel.*, 9, 1999, 22-30.
61. Reddel R.R.: The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21, 2000, 477-484.
62. Wynford-Thomas D.: Cellular senescence and cancer. *J.Pathol.*, 187, 1999, 100-111.
63. Briand P., Kahn A., Vandewalle A.: Targeted oncogenesis: A powerful method to derive renal cell lines. *Kidney Intern.*, 47, 1995, 388-394.
64. Namba M., Tsuji T.: Early events during neoplastic transformation of human cells *in vitro*: Genetic and biological aspects of immortalization. In: *Molecular Pathology of Early Cancer*. (S.Srivastava ed.) IOS Press, 1999, s.27-38.
65. Perkins A.S., Stern D.F.: Molecular biology of cancer: Oncogenes. In: *Cancer: Principles Practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> ed. (V.T.deVita Jr., S.Hellman, S.A.Rosenberg eds.) Lippincott-Raven Publ., 1997, s.79-102.
66. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W.: Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *Cell*, 88, 1997, 593-602.
67. Malumbres M., De Castro I.P., Hernández M.L., Jiménez M., Corral T., Pellicer A.: Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15<sup>INK4b</sup>. *Mol.Cell.Biol.*, 20, 2000, 2915-2925.
68. Zhu J., Woods D., McMahon M., Bishop J.M.: Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic raf. *Genes Devel.*, 12, 1998, 2997-3007.
69. Lin A.W., Barradas M., Stone J.C., van Aelst L., Serrano M., Lowe S.W.: Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Devel.*, 12, 1998, 3008-3019.
70. Weinberg R.A.: The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play. *Cell*, 88, 1997, 573-575.
71. Lüand H., Parada L.F., Weinberg R.A.: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 304, 1983, 596-602.
72. Lscher B., Austen M., Sommer A., Hillenhaus S., Henriksson M.: Transcriptional regulation by the myc-max-mad network. In *Transcription Factors in Eukaryotes* (A.G.Papavassiliou ed.) Springer 1997, s.235-251.
73. McArthur G.A., Laherty C.D., Quéva C., Hurlin P.J., Loo L., James L., Grandori C., Gallant P., Shio Y., Hokanson W.C., Bush A.C., Cheng P.F., Lawrence Q.A., Pulverer B., Koskinen P.J., Foley K.P., Ayer D.E., Eisenman R.N.: The mad protein family links transcriptional repression to cell differentiation. *Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*, 63, 1998, 423-433.
74. Collier H.A., Grandori C., Tamayo P., Colbert T., Lander E.S., Eisenman R.N., Golub T.R.: Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that myc regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 97, 2000, 3260-3265.
75. Marhin W.W., Chen S., Faecchini L.M., Fornace Jr. A.J., Penn L.Z.: Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene*, 14, 1997, 2825-2834.
76. Galaktionov K., Chen X., Beach D.: Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*, 382, 1996, 511-517.
77. Wang J., Xie L.Y., Allan S., Beach D., Hannon G.J.: Myc activates telomerase. *Genes Devel.*, 12, 1998, 1769-1774.
78. Greenberg R.A., OHagan R.C., Deng H., Xiao Q., Hann S.R., Adams R.R., Lichtsteiner S., Chin L., Morin G.B., DePinho R.A.: Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene*, 18, 1999, 1219-1226.
79. Oh S., Song Y.-H., Yim J., Kim T.K.: Identification of mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene*, 19, 2000, 1485-1490.
80. Ngo C.V., Gee M., Akhtar N., Yu D., Volpert O., Auerbach R., Thomas-Tikhonenko A.: An *in vivo* function for the transforming myc protein: elicitation of the angiogenic phenotype. *Cell Growth Differentiat.*, 11, 2000, 201-210.
81. Israël A., Kourilsky P.: Regulation of MHC class I gene expression. In: *HLA and MHC: Genes, Molecules and Function*. (M.Browning, A.Michael eds.) BIOS Scient.Publ., 1996, s.139-157.
82. Zindy F., Eischen C.M., Randle D.H., Kamijo T., Cleveland J.L., Sherr C.J., Roussel M.F.: Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Devel.*, 12, 1998, 2424-2433.
83. Davis A.J., Siu L.L.: Telomerase: Therapeutic potential in cancer. *Canc.Investig.*, 18, 2000, 269-277.
84. Krupp G., Klapper W., Parwaresch R.: Cell proliferation, carcinogenesis and diverse mechanisms of telomerase regulation. *Cell.Mol.Life Sci.*, 57, 2000, 464-486.
85. Urquidí V., Tarín D., Goodison S.: Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu.Rev.Med.*, 51, 2000, 65-79.
86. Wynn R.F., Cross M.A., Hutton C., Will A.M., Lashford L.S., Dexter T.M., Testa N.G.: Accelerated telomere shortening in young recipients of allogeneic bone-marrow transplants. *Lancet*, 351, 1998, 178-181.
87. Hahn W.C., Counter C.M., Lundberg A.S., Beijersbergen R.J., Brooks M.W., Weinberg R.A.: Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400, 1999, 464-468.
88. Wang J., Hannon G.J., Beach D.H.: Risky immortalization by telomerase. *Nature*, 405, 2000, 755-756.

# REGULACE PROTINÁDOROVÉ IMUNITY POMOCNÝMI CD4+ TH1/TH2 LYMFOCYTY

## REGULATION OF ANTICANCER IMMUNITY BY T HELPER CD4+ TH1/TH2 SUBSETS

LAUEROVÁ L.<sup>1)</sup>, KOCÁK I.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>ODDĚLENÍ BUNĚČNÉ A MOLEKULÁRNÍ ONKOLOGIE

<sup>2)</sup>ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE II. MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

**Souhrn:** Přehled se zabývá úlohou pomocných CD4+ T lymfocytů v regulaci procesu buněčné a humorální imunity. Aktivované pomocné T lymfocyty se diferencují na Th1 a Th2 subpopulaci podle účinku a typu cytokinu, které vylučují. Buňky Th1 ovlivňují procesy buněčné imunity a tím i vývoj účinné protinádorové imunity, buňky Th2 vývoj humorální imunity. Nevzázáženost Th reakcí vede k patologickým stavům jako jsou zánětlivá, autoimunitní a alergická onemocnění. U některých nemocných nádory se prokázala snížená hladina Th1 cytokinu a zvýšené koncentrace některých Th2 cytokinů. Nevzázáženost Th1/Th2 reakcí u nemocných nádorů může být jedním z důvodů proč nádor unikne imunitnímu dozoru.

**Klíčová slova:** Pomocné T lymfocyty, CD4+, Th1 a Th2 subpopulace, cytokiny, nádory

**Summary:** Present review describes the involvement of CD4+ lymphocytes and their subsets in control of cellular and humoral immune cascades. It also analyzes the role of CD4+ in etiopathogenesis of immunopathy and cancer. Native T helper cells differentiate into two subsets, Th1 and Th2, each with distinct function and cytokine profiles. Recent theories have established that, during an ongoing immune response, the cytokines produced by Th1 and Th2 subsets are critical to the effectiveness of that response. Cytokines also play a role by stimulating the host immune system to generate anti-tumor specific reactions. Dysregulated expansion of one or other Th subset may contribute to the development of certain pathological disorders such as inflammatory, autoimmune and allergic diseases. Several studies have shown that an imbalance of Th1/Th2 cytokines in cancer patients might be involved in mechanism, that allows the tumor to escape from host immune surveillance.

**Keywords:** T helper cells, CD4+, Th1 and Th2 subsets, cytokines, malignancy

U nemocných některými druhy nádorů je prokázána imunosuprese na úrovni buněčné i humorální imunity. Není známo, jaké mechanismy se rozhodujícím způsobem na této imunosupresi podílejí a proč působí u jednoho druhu nádoru či jedince a u jiného nikoliv. Pro vytvoření účinné imunitní protinádorové reakce musí být zajištěny minimálně dva základní požadavky. Za prvé, nádor musí nést antigeny - peptidy, které mohou být rozpoznány T lymfocyty a které se nevyskytují na většině normálních buněk. Za druhé, imunitní systém musí rozpoznat tyto antigeny jako cizí. Existují důkazy, že modelové, ale i některé lidské nádory, mají specifické antigeny (tumor rejection antigen, TRA), které mohou T buňky rozpoznat. Současný model indukce protinádorové imunitní reakce je založen na kooperaci antigen prezentujících buněk (APC, CD80+), pomocných T lymfocytů (CD4+) a efektorových T lymfocytů (CD8+). Podle této představy se na prvním signálu pro spuštění protinádorové reakce mohou podílet dva mechanismy. Jedním je tvorba komplexu TRA s MHC molekulami I. třídy na povrchu nádorové buňky, a jeho přímá interakce s odpovídajícím receptorem na CD8+ T buňce. Druhým mechanismem je předložení TRA T buňkám prostřednictvím antigen prezentujících buněk (APC). Patří mezi ně dendritické buňky, aktivované makrofágy, B buňky a další - pravděpodobně nesoucí molekuly MHC II. třídy. Sídli převážně v periferních tkáních a jsou aktivovány antigeny (peptidy) pocházejícími z patogenů, nebo nádorové tkáně. APC tyto cizorodé antigeny fagocytují, degradují kyselými proteázami v endozomech a lysozomech a následně asociují s molekulami MHC II. třídy. Tento komplex je exprimován na povrchu APC a předkládán T buňkám k jejich aktivaci. Aktivované T lymfocyty exprimují na své buněčné membráně markery spe-

cifické pro aktivaci (15), receptory pro cytokiny (19), začnou vylučovat cytokiny (8, 33) a dochází k jejich klonální proliferaci a diferenciaci specifické pro daný antigen (40). Cytotoxické T lymfocyty (CD8+) a pomocné T lymfocyty (CD4+) vyžadují ke své aktivaci minimálně další dva signály. Jedním je tzv. kostimulační signál kdy molekula CD80+ (CD86+), exprimovaná na APC, reaguje s receptorovou molekulou CD28+ na T buňkách. Druhým je mitogenní signál určený pro zmnožení aktivovaných, antigen specifických CD8+ T buněčných subpopulací a je poskytován pravděpodobně převážně interleukinem 2 (IL-2) vylučovaným z aktivovaných CD4+ pomocných T lymfocytů (4).

### Regulace imunitních reakcí cytokiny.

V posledních letech se soustředil výzkum protinádorové imunity na cytokiny a jejich vliv na regulaci buněčné imunity. Aktivované pomocné CD4+ T lymfocyty (T helper = Th0) se diferencují do dvou funkčně odlišných skupin, tj. na Th1 a Th2 subpopulace podle účinku a typu cytokinů, které syntetizují a uvolňují do okolí. Buňky subpopulace Th1 podporují buněčnou imunitu - tvorbu cytotoxických CD8+ T buněk a NK buněk, které jsou považovány za hlavní efektorové buňky v protinádorové imunitě. Buňky Th2 ovlivňují humorální imunitu - aktivují B lymfocyty k syntéze a vylučování antigen-specifických protilátek. Funkční rozdíly mezi Th subpopulacemi jsou dány především různým účinkem cytokinů, které uvolňují. Buňky Th1 vylučují IL-2, IL-12, IL-18 a IFN gama. Th2 vylučují IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, a IL-10. V poslední době se množí důkazy, že IL-10 je u lidí, na rozdíl od myši, uvolňován i subpopulací Th1. Diferenciace aktivovaných Th0 buněk je ovlivněna nejen samotným antigenem (peptidem), jeho kon-

centrací a vazbou kostimulačních molekul (CD80+, CD86+), ale neúčinnějším regulátorem Th buněčné diferenciace jsou samotné cytokiny. Klíčovým cytokinem indukujícím vývoj Th0 v Th1 subpopulaci je IL-12. Je to cytokin s pleotropním účinkem, který ovlivňuje celou řadu biologických aktivit T a NK buněk. Jeho hlavním zdrojem jsou aktivované APC. Myši defektní v syntéze IL-12, nebo nemající receptory pro tento interleukin (IL-12R), netvoří Th1 subpopulaci (10). Hlavním induktorem diferenciace Th2 buněk je IL-4. Myši defektní v syntéze IL-4, nebo nemající receptory pro tento interleukin (IL-4R), netvoří Th2 subpopulaci (25). Oba interleukiny působí na Th0 buňky přes své signální proteiny STATy (signal transducer and activators of transcription). IL-4 působí přes protein STAT6 a IL-12 přes protein STAT4 (41). Je prokázáno, že myši které nemají některý z těchto signálních proteinů, nediferencují příslušnou Th subpopulaci. Pravděpodobně i další cytokiny ovlivňují Th diferenciaci. Myši, jejichž buňky nedokáží syntetizovat IL-18, nebo IFN-gama, mají rovněž poškozenou diferenciaci Th0 buněk v Th1 subpopulaci. Dosavadní výsledky naznačují, že oba cytokiny se přímo neúčastní Th diferenciace, ale zesilují účinek IL-12 (26).

Cytokiny uvolňované Th1 a Th2 buňkami nejen že autokrině podporují růst a diferenciaci klonů, jimiž jsou produkovány, ale zároveň inhibují růst a diferenciaci opačné subpopulace. Např. IL-4 vylučovaný Th2 buňkami zpětně působí na receptory pro IL-4 přítomné v prekurzorech Th0, aktivuje je a iniciuje tak Th2 diferenciální proces (29). Zároveň potlačuje v Th0 buňkách expresi receptorů pro IL-12 nutných pro Th1 diferenciaci (27, 34). Kromě toho IL-10, interleukin produkovaný rovněž subpopulací Th2, inhibuje uvolňování IL-12 aktivovanými makrofágy (APC) a tím také nepřímo inhibuje diferenciaci v Th1 subpopulaci (9). IFN-gama, který je vylučován Th1 buňkami, podporuje zpětně vývoj a diferenciaci Th1 tím, že indukuje vylučování IL-12 aktivovanými makrofágy a expresi IL-12R na antigenem aktivovaných Th0 a tak přímo inhibuje jejich vývoj v Th2 buňky (24, 34). Znamená to tedy, že cytokiny uvolňované Th subpopulacemi uplatňují navzájem pozitivní i negativní účinek a tím řídí vývoj a polarizaci pomocných CD4+ T lymfocytů.

### Molekulární základy Th1/Th2 diferenciace

V posledních několika letech byl učiněn významný pokrok v objasnění molekulárního základu Th diferenciace. Jsou známy některé transkripční faktory, které kontrolují přechod Th0 v Th1 a Th2 subpopulaci. Specifickým transkripčním faktorem pro Th1 je Stat4 (17) a IRF1 (22). Jejich absence má za následek snížení diferenciace v Th1 buňky. Více znalostí máme o Stat4. Je exprimován u obou subpopulací, Th1 i Th2, ale fosforylován (aktivován) může být prostřednictvím IL-12 pouze v Th1 buňkách, protože v Th2 jsou specificky potlačeny IL-12R beta (34). Kromě toho je prokázáno, že Stat4 je exprimován jak v CD4+ tak i v CD8+ T lymfocytech a obě subpopulace produkují IFN gama, přestože mají odlišné funkce. Nedávno bylo zjištěno, že pouze CD4+ buňky potřebují pro syntézu IFN gama Stat4, avšak obě populace potřebují Stat4 k indukci syntézy IFN gama pomocí IL-12 (5). Dalším, nově objeveným specifickým transkripčním faktorem Th1 diferenciace, je T-bet (35). Patří do skupiny transkripčních faktorů kódovaných geny označovaných jako T box (28). Aktivuje gen pro IFN-gama, indukuje jeho syntézu v CD4+ buňkách, zároveň potlačuje IL-4 a tím nasměruje jejich diferenciaci v Th1 subpopulaci.

Diferenciace v subpopulaci Th2 pomocí IL-4 vyžaduje aktivaci Stat6 (16). Molekulární mechanismus, kterým Stat6 ovlivňuje Th2 diferenciaci, je stále ještě málo objasněn. Je známo několik transkripčních faktorů, jako GATA-3 a c-Maf, které jsou klíčové pro vývoj a diferenciaci Th2 buněk (13, 20). Myši, které nemají c-Maf mají výrazně sníženou syntézu IL-4 (20). Indukce exprese GATA-3 v Th2 buňkách je závislá na aktivaci Stat6 pomocí IL-4, není však jasné, zda Stat6 přímo aktivuje transkripci GATA-3 (27).

Na myších deficitních na Stat4 nebo na Stat6 se prokázalo, že tyto transkripční faktory hrají důležitou roli při Th1 a Th2 diferenciaci. Je zajímavé, že myši deficitní na oba tyto faktory (double-deficient) diferencují Th1 buňky cestou nezávislou na STATech na rozdíl od myši deficitních pouze na Stat4 (18). Nejsou však schopné diferencovat Th2 buňky, stejně jako myši deficitní pouze na Stat6. To podporuje názor, že Stat6 je nezbytný pro vývoj Th2 buněk, ale Stat4 není nezbytně nutný pro diferenciaci Th1, ale je nutný pro zvýšení syntézy IFN gama v Th1 subpopulaci.

IL-4 je cytokin, který aktivuje Stat6 a navíc aktivuje expresi speciálního genového programu, který reguluje viabilitu, proliferaci a diferenciaci imunocyty. Stat6 rozpoznává fosforylovaný tyrosin pouze na cytoplazmatické části alfa řetězce receptoru pro IL-4 (IL-4R alfa) a nereaguje s fosforylovaným tyrosinem receptoru pro IFN-gama (IFN-gamaR). Opačně, Stat-1, který je aktivován IFN-gama, nerozpoznává fosforylovaný řetězec IL-4R (41).

### Patologické změny v rovnováze Th1/Th2 reakcí

Dnes již máme důkazy o tom, že porucha v rovnováze Th diferenciálních procesů vede k některým imunopatím (23). Např. převaha Th1 aktivity se uplatňuje v etiologii zánětu a některých autoimunitních onemocnění (fulminantní hepatitis, diabetes mellitus, ulcerativní colitis ale i v "graft-versus host" reakci). Naopak, převaha Th2 aktivit se podílí na alergických stavech, jako je atopická dermatitis a bronchiální astma.

Ze současné úrovně znalostí můžeme usuzovat na to, že porucha v rovnováze a aktivitách Th1/Th2 buněk ovlivňuje i vývoj protinádorové imunity (38). Nízká aktivace Th1 buněk, nebo silná aktivace Th2 subpopulace může mít, ve svém důsledku, inhibiční účinek na vývoj buněčné cytotoxicity zprostředkované Th1 subpopulací. U některých solidních nádorů je prokázáno, že nádor-infiltrující lymfocyty (TIL), ale i samotné nádorové buňky, produkují Th2 cytokiny, což ukazuje na převahu imunitní reakce typu 2 v místě nádoru a na inhibici buněčné cytotoxicity (1, 6, 14, 31, 37). Systémové změny v imunitní odpovědi Th1 a Th2 se nepřímo monitorují měřením hladin příslušných cytokinů v sérech nemocných a in vitro v supernatantech periferních krevních mononukleárů (PBMC) po stimulaci fytohemaglutininem (PHA), nebo lipopolysacharidem (LPS, tzv. mitogenem indukovaná proliferační reakce). Tato vyšetření prokazují, že u celé řady lidských neoplazií jsou zvýšené hladiny cytokinů typu Th2 a snížené hladiny cytokinů typu Th1 (7, 21, 30, 32). Pellegrini a spol. (30) vyšetřovali hladiny IL-2 a IL-4 uvolňovaných z PHA stimulovaných PBMC nemocných kolorektálním karcinomem v pokročilém stadiu. Popisují signifikantně nižší hladinu IL-2 (cytokin typu 1) a vyšší IL-4 (cytokin typu 2) než u kontrolních PBMC zdravých osob. Stejně výsledky byly zjištěny u 38 nemocných různými druhy pokročilých solidních nádorů a navíc snížené hladiny IFN-gama a IL-12 (cytokiny typu 1) (12). Signifikantně snížená sekrece IL-2 a IFN-gama je prokázána rovněž u nemocných karcinomem močového měchýře, ledvin a prostaty (7, 21). Údaje o hladinách Th2 cytokinů jsou kontraverzní. Někteří badatelé nenašli rozdíly mezi nemocnými a zdravými kontrolami v sekreci IL-4, IL-6 a IL-10 (cytokiny typu 2), ale pouze sníženou sekreci IL-2 a IFN-gama z PHA aktivovaných PBMC. Činí proto závěr, že nemocní mají poškozenou aktivitu Th1 a normální aktivitu Th2 subpopulace (7). Jiní zjistili zvýšenou hladinu IL-4 a IL-6 v sérech nemocných i v supernatantech po aktivaci PBMC a zároveň snížené hladiny Th1 cytokinů (12, 21). Uvažují proto, že maligní proces je provázen poruchou v rovnováze Th1/Th2 reakcí spojenou s expanzí Th2 a zároveň s poškozenou funkcí Th1 subpopulace (2, 30, 32). Zvýšená hladina IL-6 v séru nemocných je spojována se špatnou prognózou a vývojem metastáz u karcinomu ledvin, cervixu (39) a u maligního melanomu (36). Rovněž zvýšená sérová hladina IL-10, cytokinu s imunosupresivním účinkem, je popisována u nemocných maligním melanomem v pokročilém stadiu (3). Názor, že růst nádoru může být podporován Th2 cytokiny, potvrzují i pozorová-

vání na myších. Nevyváženost reakce Th1/Th2, tj. zvýšený IL-4 a snížený IFN-gama, je popisována ve slezinných T buňkách myši s implantovaným renálním karcinomem. S progresí nádoru se IFN-gama postupně snižoval, ale úspěšná léčba byla provázena normalizací hladiny tohoto interleukinu (11).  
Vztahy mezi cytokiny a nádorem jsou mnohočetné a komplikované. Cytokiny mohou na straně jedné stimulovat imunitní systém k účinné protinádorové reakci, ale na straně druhé mohou podporovat růst i metastazování nádoru. Je pravděpo-

dobné, že sekrecí vlastních cytokinů ovlivňuje nádor své mikroprostředí ve svůj prospěch a vyvolává v místě svého růstu imunosupresi. Zda tomu tak skutečně je, zda Th1/Th2 profil v bezprostředním milieu nádoru může být příčinou úniku nádorových buněk z imunitního dozoru a malé účinnosti cytokinové imunoterapie, je předmětem intenzivního výzkumu.

**Výzkum je podporován grantovým projektem IGA MZ ČR NC/5571-3 a VZ MOU č. MZ 00020980501.**

## Literatura

- Asselin-Paturel, C., Echchakir H., Carayol, G., Gay, F., Opolon, P., Grunewald, D., Chouaib, S., Mami-Chouaib, F.: Quantitative analysis of Th1, Th2 and TGF-beta1 cytokine expression in tumor, TIL and PBL of non-small cell lung cancer patients. *Int. J. Cancer* 1998 Jul 3;77(1):7-12
- Berghella, A.M., Pellegrini, P., Del Beato, T., Marini, M., Tomei, E., Adorno, D., Casciani, C.U.: The significance of an increase in soluble interleukin-2 receptor level in colorectal cancer and its biological regulating role in physiological switching of the immune response cytokine network from TH1 to TH2 and back. *Cancer Immunol. Immunother.* 1998 Jan; 45(5):241-9
- Boyano, M.D., Garcia-Vázquez, M.D., López-Michelena, T., Gardeazabal, J., Bilbao, J., Canavate, M.L., Garciam De Galdeano, A., Izu, R., Díaz-Ramón, L., Raton, J.A., Díaz-Pérez, J.L.: Soluble interleukin-2 receptor, intercellular adhesion molecule-1 and interleukin-10 serum levels in patients with melanoma. *Brit. J. Cancer* 2000; 83(7):847-52
- Bubeník, J.: Gene transfer for immunotherapy of cancer. *Gene Therapy* 1996 Nov; 3(11):944-5
- Carter, L.L., Murphy, K.M.: Lineage-specific requirement for signal transducer and activator of transcription (Stat4) in interferon gamma production from CD4(+) versus CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* 1999 Apr 19; 189(8):1355-60
- Coventry, B.J., Weeks, S.C., Heckford, S.E., Sykes, P.J., Bradley, J., Skinner, J.M.: Lack of IL-2 cytokine expression despite IL-2 messenger RNA transcription in tumor-infiltrating lymphocytes in primary human breast carcinoma: selective expression of early activation markers. *J. Immunol.* 1996 May 1; 156(9):3486-92
- Elsässer-Beile, U., Köhle, N., Grussenmeyer, T., Schultz-Seemann, W., Wetterauer, U., Gallati, H., Schulte-Mönting, J., Von Kleist, S.: Th1 and Th2 cytokine response patterns in leukocyte cultures of patients with urinary bladder, renal cell and prostate carcinomas. *Tumor Biol.* 1998; 19:470-6
- Finklemann, F.D.: Relationships among antigen presentation, cytokines, immune deviation, and autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 1995 Aug 1; 182(2):279-82
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T., Howard, M., Moore, D.W., O'Garra, A.: IL-10 acts on the antigen-presenting cells to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 1991 May 15; 146(10):3444-51
- Gately, M.K., Renzetti, L.M., Magram, J., Stern, A.S., Adorini, L., Gubler, U., Presky, D.H.: The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16:495-521
- Ghosh, P., Komschlies, K.L., Cippitelli, M., Longo, D.L., Subleski, J., Ye, J.: Gradual loss of T-helper 1 populations in spleen of mice during progressive tumor growth. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995 Oct 4;87(19):1478-83
- Goto, S., Sato, M., Kaneko, R., Itoh, M., Sato, S., Takeuchi, S.: Analysis of Th1 and Th2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells as a parameter of immunological dysfunction in advanced cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 1999 Nov; 48(8):435-42
- Hodge, M.R., Chun, H.J., Rengarajan, J., Alt, A., Lieberson, R., Glimcher, L.H.: NFAT-driven interleukin-4 transcription potentiated by NIP45. *Science.* 1996 Dec 13; 274(5294):1903-5
- Chen, Q., Daniel, V., Maher, D.W., Hersey, P.: Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int. J. Cancer* 1994 Mar 1; 56(5):755-60
- Jeanin, P., Herbault, N., Delneste, Y., Magistrelli, G., Lecoanet-Henchoz, S., Caron, G., Aubry, J.P., Bonnefoy, J.Y.: Human effector memory T cells express CD86: a functional role in naive T cell priming. *J. Immunol.* 1999 Feb 15;162(4):2044-8
- Kaplan, M.H., Schindler, U., Smiley, S.T., Grusby, M.J.: Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 1996 Mar; 4(3):313-9
- Kaplan, M.H., Sun, Y.L., Hoey, T., Grusby, M.J.: Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996 Jul 11; 382(6587), 174-7
- Kaplan, M.H., Wurster, A.L., Grusby, M.J.: A signal transducer and activator of transcription (Stat4)-independent pathway for the development of T helper type 1 cells. *J. Exp. Med.* 1998 Sep 21; 188(6):1191-6
- Kaye, J., Janeway, C.A.: Induction of receptors for Interleukin-2 requires T cell Ag: Ia receptor crosslinking and Interleukin-1. *Lymphokine Res.* 1984; 3(4):175-82
- Kim, J., Ho, I.C., Grusby, M., Glimcher, L.H.: The transcription factor c-Maf controls the production of IL-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 1999 Jun; 10(6):745-51
- Lauerova, L., Dušek, L., Šimicková, M., Rovný, F., Spurný, V., Rovný, A., Šlampa, P., Zaloudík, J., Rejthar, A., Wotke, J., Kovarik, J.: Renal cell carcinoma - associated immune impairment that may interfere with the response to cytokine therapy. *Neoplasma* 1999;46(3):141-9
- Lohoff, M., Ferrick, D., Mittrucker, H.W., Duncan, G.S., Bischof, S., Rollinghoff, M., Mak, T.W.: Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vitro. *Immunity* 1997 Jun; 6(6):681-9
- Lucey, D.R., Clerici, M., Shearer, G.M.: Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infections, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996 Oct; 9(4):532-62
- Ma, X., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dziado, R., Trinchieri, G.: The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J. Exp. Med.* 1996 Jan 1; 183(1):147-57
- Nelms, K., Keegan, A.D., Zamorano, J., Ryan, J.J., Paul, W.E.: The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17:701-38
- O'Garra, A.: Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998 Mar; 8(3):275-83
- Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.J., Sha, W.C., Murphy, K.M.: Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4 independent mechanism. *Immunity* 1998 Nov; 9(5):745-55
- Papaioannou, V.E.: T-box family reunion. *Trends Genet.* 1997 Jun; 13(6):212-13
- Paul, W.E., Seder, R.A.: Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994 Jan 28; 76(2):241-51
- Pellegrini, P., Berghella A.M., Del Beato, T., Cicia S., Adorno D., Casciani, C.U.: Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression. *Cancer Immunol. Immunother.* 1996 Jan; 42(1):1-8
- Roussel, E., Gingsras M.C., Grimm, E.A., Bruner, J.M., Moser, R.P.: Predominance of a type 2 intratumoral immune response in fresh tumour-infiltrating lymphocytes from human gliomas. *Clin. Exp. Immunol.* 1996 Aug; 105(2):344-52
- Sato, M., Goto, S., Kaneko, R., Ito, M., Sato, S., Takeuchi, S.: Impaired production of Th1 cytokines and increased frequency of Th2 subsets in PBMC from advanced cancer patients. *Anticancer Research* 1998 Sept-Oct; 18(5D):3951-6
- Scott, D.F., Gause, W.C., Finklemann, F., Steinberg, A.D.: Anti-CD3 antibody induces rapid expression of cytokine genes in vitro. *J. Immunol.* 1990 Oct 1;145(7):2183-8
- Szabo, S.J., Dighe, A.S., Gubler, U., Murphy, K.: Regulation of the interleukin (IL)-12R beta2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J. Exp. Med.* 1997 Mar 3; 185(5):817-24
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fatham, C.G., Glimcher, L.H.: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000 March 17; 100:655-69
- Tartour, E., Dorval, T., Mosseri, V., Deneux, L., Mathiot, C., Brailly, H., Montero, F., Joyeux, I., Pouillart, P., Fridman, W.H.: Serum interleukin 6 and C reactive protein levels correlate with resistance to IL-2 therapy and poor survival in melanoma patients. *Br. J. Cancer* 1994 May; 69(5):911-5
- Tartour, E., Gey, A., Sastre-Garau X., Lombard Surin L., Mosseri V., Fridman W.H.: Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998 Feb 18; 90(4):287-94
- Tartour, E., Fridman, W.H.: Cytokines and cancer. *Int. Rev. Immunol.* 1998 16(5-6):683-704
- Thiounn, N., Pages, F., Flam, T., Tartour, E., Mosseri, V., Zerbib, M., Beuzeboe, P., Deneux, L., Fridman, W.H., Debré, B.: IL-6 is a survival prognostic factor in renal cell carcinoma. *Immunol. Lett.* 1997 Jul;58(2):121-4
- Vasseur, F., le Campion, A., Pavlovitch, J.H., Penit, C.: Distribution of cycling T lymphocytes in blood and lymphoid organs during immune responses. *J. Immunol.* 1999 May 1; 162(9):5164-72
- Wurster, A.L., Tanaka, T., Grusby, M.J.: The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000 May 15;19(21):2577-84

## AMPLIFIKACE A OVEREXPRESSE HER-2/NEU V INVAZIVNÍCH KARCINOMECH PRSU : SROVNÁVACÍ ANALÝZA METOD IMUNOHISTOCHEMICKÝCH A FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE

## AMPLIFICATION AND OVEREXPRESSION OF HER-2/NEU IN INVASIVE BREAST CARCINOMAS : COMPARATIVE ANALYSIS OF IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS AND FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDISATION

HERMANOVÁ M.<sup>1</sup>, NENUTIL R.<sup>2</sup>, KROUPOVÁ I.<sup>1</sup>, BRAZDIL J.<sup>1</sup>, LUKÁŠOVÁ E.<sup>3</sup>, KOZUBEK S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV FN BRNO, LÉKARSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY

<sup>2</sup>ODD. PATOLOGIE, FN BRNO, PRACoviŠTĚ PORODNICE

<sup>3</sup>BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV BRNO, AV ČR

**Souhrn:** *Východiska:* Proto-onkogen HER-2/neu lokalizovaný na dlouhém raménku 17. chromosomu kóduje transmembránový receptor, který je strukturálním homologem receptoru pro epidermální růstový faktor. Exprimuje se na plazmatických membránách adultních i fetálních epitelových buněk a uplatňuje se v normálním růstu a diferenciaci. Overexpresse HER-2/neu je v literatuře popisována u 10-34% invazivních karcinomů prsu. V 90% těchto případů je způsobena amplifikací genu HER-2/neu a nezávisle asociována se špatnou prognózou u pacientek s prokázanými metastázami v lymfatických uzlinách. Výsledky preklinických i klinických studií ukazují, že laboratorní průkaz exprese a amplifikace genu HER-2/neu je důležitým prognostickým faktorem, ale hraje i významnou roli v predikci odpovědi na různé terapeutické modalitty, které se uplatňují v terapii invazivních karcinomů prsu. *Typ studie a soubor:* Standardní průkaz amplifikace a overexpresse HER-2/neu se tímto stává nesmírně významný. Cílem naší studie bylo posouzení validity metod imunohistochemických (IHC) při použití různých primárních protilátek a metodických postupů ve srovnání s metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) na formol-parafinověm materiálu pro diagnostické účely. *Metody a výsledky:* Vyšetřili jsme šedesát vzorků invazivních karcinomů prsu zpracovaných standardně pro histologické vyšetření metodami IHC při použití diagnostického kitu DAKO HercepTest<sup>TM</sup> a tři monoklonálních protilátek firmy Novocastra (NCL-c-erbB-2-316, NCL-c-erbB-2-356, NCL-CB11) a metodou FISH při použití INFORM HER-2/neu Gene Detection System, (Ventana). Amplifikace byla detekována v 13,3% případů. Overexpresse byla detekována v 13,3%-28,3% v závislosti na použité metodologii a primární protilátce. Perfektní shoda byla zaznamenána mezi metodou FISH a IHC při použití monoklonálních protilátek firmy Novocastra NCL-c-erbB-2-316, NCL-c-erbB-2-356, v metodickém postupu, který vynechává tzv. oživení (retrieval) antigenu ve vodní lázni. Devět DAKO HercepTest<sup>TM</sup> pozitivních případů (sedm 2+ a dva 3+) bylo metodou FISH klasifikováno jako neamplifikované. *Závěry:* Naše výsledky ukazují, že vysoká úroveň overexpresse (3+) stejně jako normální HER-2/neu exprese (0, 1+) mohou být spolehlivě detekovány oběma metodami. Hraniční případy, zejména 2+ pozitivita, musí být interpretovány velmi pozorně při využití obou metod (IHC a FISH) a optimalizovaných metodických postupů. Navrhujeme algoritmus screeningu a detekce overexpresse HER-2/neu, kombinující obě metodiky.

**Klíčová slova:** karcinom prsu, ERBB2/HER-2, imunohistochemie, FISH

**Summary:** *Background:* The HER-2/neu proto-oncogene encodes one of the epithelial growth factor receptors in the cell membrane, the functions of which include stimulation of mammary epithelial cell proliferation. In breast carcinomas, overexpression has been reported in 10-34% of invasive cancer. Data published to date shows that ERBB2/HER-2 protein overexpression has been caused by gene amplification in 90% of these cases and has been shown to be associated with poor prognosis. Results of both preclinical and clinical studies show that laboratory assessment of ERBB2/HER-2 status can be useful not only as a prognostic factor in breast cancer, but also as a predictive marker for projecting response to different therapy regimens. *Design and subjects:* Standardised determination of ERBB2/HER-2 status has become more important. The purpose of this study has been a determination of the validity of different methods for detecting the status of ERBB2/HER-2 oncogene in formalin fixed and paraffin-embedded breast cancer tissues for diagnostic use. *Methods and results:* Sixty routinely formalin fixed and paraffin-embedded invasive breast carcinoma tissues were investigated both by fluorescence in situ hybridisation (FISH) using INFORM<sup>TM</sup> Her-2/neu Gene Detection system (Ventana) and by immunohistochemistry (IHC) using DAKO-HercepTest<sup>TM</sup> and Novocastra monoclonal antibodies (NCL-HER2-356, NCL-HER2-316, NCL-CB11). Amplification was detected in 13,3% of the cases. Overexpression was detected in 13,3-28,3% of the cases depending on the methodology and/or reagent used. Perfect concordance was found between results of FISH and IHC using NCL-HER2-356 as well as between FISH and IHC using NCL-HER2-316 with no antigen retrieval. Nine DAKO-HercepTest<sup>TM</sup> positive carcinomas (seven 2+, two 3+) were classified as non amplified using FISH. *Conclusions:* Our results indicate that high level expression as well as normal ERBB2/HER-2 status can be reliably detected both by IHC and FISH using the standardised methodology. Borderline results, especially 2+ immunopositivity should be interpreted with caution using both methods (IHC and FISH) with standardised methodological approaches. An algorithm of screening and evaluation of ERBB2/HER2 status using both above approaches is suggested.

**Key words:** breast cancer, ERBB2/HER-2, immunohistochemistry, FISH

## Úvod

Protoonkogen HER-2/neu (c-erbB-2, ERBB 2) je lokalizován na dlouhém raménku 17. chromosomu, v oblasti 17q12-21.32. Kóduje transmembránový glykoprotein, známý rovněž jako p185, jehož vnitřní doména má tyrosinkinázovou aktivitu, extracelulární doména je strukturálním homologem receptoru pro epidermální růstový faktor (1). HER-2/neu je exprimován na plazmatických membránách fetálních i adultních epitelových buněk a uplatňuje se v normálním růstu a diferenciaci (2). Amplifikace a overexprese HER-2/neu byla pozorována u celé řady primárních tumorů včetně karcinomů prsu, ovaria, plic, žaludku, endometria, dutiny ústní a močového měchýře (3-9). U karcinomů prsu byla overexprese onkogenu HER-2/neu zjištěna u 10-34% invazivních karcinomů (5, 11). Ve více než 90% případů je overexprese přičítána amplifikaci genu HER-2/neu, čili zvýšení počtu kopií tohoto genu v buňce, což vyústí ve zvýšení koncentrace příslušné mRNA a následně ve zvýšenou syntézu proteinu lokalizovaného v plazmatické membráně (5, 12). Ve zbývajících případech se pravděpodobně uplatňují jiné mechanismy, například aktivace transkripce či jiné posttranskripční dysregulace (4). Overexprese HER-2/neu je nezávisle asociována se špatnou prognózou u žen s karcinomem prsu s prokázanými metastázami v lymfatických uzlinách. Prognostický význam průkazu overexprese HER-2/neu u pacientek bez metastáz v lymfatických uzlinách není jednoznačně objasněn (11, 13). Přesné stanovení amplifikace a overexprese genu HER-2/neu nabývá na významu. Expres HER-2/neu není u karcinomu prsu pouze prognostickým faktorem, ale rovněž markerem umožňujícím predikci odpovědi na různé terapeutické modalilty. Celá řada klinických studií se zabývala vztahem amplifikace a overexprese genu HER-2/neu a citlivostí karcinomů prsu na různé druhy terapií (26). Důraz je v poslední době kladen na rozvoj imunoterapeutických přístupů v léčbě invazivních karcinomů prsu. Preklinické studie prokázaly inhibici růstu nádorových buněk karcinomu prsu in vitro při použití myší monoklonální protilátky 4D5 (15). Tato protilátka, která se váže na extracelulární doménu HER-2/neu, byla humanizována a vyprodukována protilátka IgG1 obsahující v komplementaritě určitých oblastech elementy výchozí protilátky myší (16). Následně preklinické a klinické studie s touto rekombinantní protilátkou rhuMAB HER-2 (trastuzumab, Herceptin<sup>®</sup>) prokázaly antiproliferační efekt na buňky karcinomu prsu in vitro, který může být zvýšen v kombinaci s některými chemoterapeutiky (16, 23, 25). Z výše uvedeného vyplývá nutnost vypracování vysoce senzitivních a specifických metodik na průkaz amplifikace a overexprese HER-2/neu. K určení statusu HER-2/neu byla použita celá řada metod detekujících jednak genovou amplifikaci (Southern blotting, slot blot, polymerase chain reaction, in situ hybridizace, fluorescenční in situ hybridizace), jednak metody hodnotící overexpresi mRNA (Northern blotting, slot blot) či metody hodnotící overexpresi HER-2/neu na úrovni proteinu (Western blotting, immunoassaye a metody imunohistochemické). Většina z těchto metod neumožňuje zpracování formalínem fixovaného v parafínu zalitého materiálu a nemohou být tudíž prováděny na archívním materiálu. Metodiky fluorescenční in situ hybridizace (FISH) detekující počet kopií genu HER-2/neu v buňce a metodiky imunohistochemické detekující úroveň exprese HER-2/neu tuto nevýhodu nemají a s jejich pomocí lze úspěšně detekovat amplifikaci a overexpresi HER-2/neu na materiálu standardně zpracovaném pro histologické vyšetření (14). Proto se tyto dvě metody stávají metodami volby pro průkaz HER-2/neu amplifikace a overexprese na formol-parafínovém materiálu pro diagnostické účely. Cílem naší studie byl průkaz validity metod imunohistochemických (IHC) ve srovnání s metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) na formol-parafínovém materiálu.

## Materiál a metody

Retrospektivně jsme vyšetřili soubor 60 pacientek s invazivním karcinomem prsu operovaných ve FN Brno (pracoviště

porodnice) v roce 1999. Soubor zahrnoval 45 invazivních ductálních karcinomů blíže neurčených, 2 invazivní ductální karcinomy komedonového typu, 2 ductální mucinózní karcinomy, 4 tubulární karcinomy, 1 čistý mucinózní karcinom, 2 smíšené invazivní karcinomy se složkou ductální i lobulární, 3 invazivní lobulární karcinomy a 1 atypický medulární karcinom. Pro IHC vyšetření jsme použili diagnostický kit DAKO HercepTest<sup>™</sup> (obsahující polyklonální protilátku proti vnitřní doměně proteinu HER-2/neu) a tři monoklonální protilátky: NCL-c-erbB-2-316, NCL-CB11 (proti vnitřní doměně proteinu HER-2/neu) a NCL-c-erbB-2-356 (proti zevní doměně proteinu HER-2/neu) firmy Novocastra. Současně jsme testovali vliv tzv. retrievalu antigenu ve vodní lázni nepocháním tohoto kroku v metodickém postupu. Počet kopií genu HER-2/neu v nádorových buňkách jsme detekovali pomocí diagnostického kitu INFORM-HER-2/neu Gene detection Systém<sup>®</sup>, (Ventana). Metoda FISH se vyznačuje vysokou senzitivitou, reprodukovatelností a přesností při použití na formol-parafínovém archívním materiálu a je metodou volby pro průkaz amplifikace genu HER-2/neu ve standardně histologicky zpracovaných tkáňových řezech (18).

## Průkaz amplifikace genu HER-2/neu metodou FISH

Metoda i hodnocení bylo prováděno přesně podle pokynů výrobce a distributora diagnostického kitu INFORM-HER-2/neu Gene Detection Systém<sup>®</sup> (Ventana) uvedených v „Procedure and Interpretation Guide“.

Tkáňové řezy 4 $\mu$ m silné, na elektrostaticky upravených sklech (Superfrost Plus, Menzel, SRN) byly sušeny přes noc při teplotě 65 °C, standardně odparafinovány a natráveny v Protein Digestion Solutin (Ventana). Po dehydrataci řezu bylo aplikováno 10 $\mu$ l biotinylované HER-2/neu probe a provedena denaturace při 75 °C. Hybridizace probíhala přes noc ve vlhké komůrce při teplotě 37 °C, druhý den byla nespecificky navázaná proba vymyta v roztoku obsahující 50% formamid a bylo přistoupeno k detekci a amplifikaci získaných signálů. V dalším kroku byl aplikován fluoresceinem značený avidin vyznačující se chemickou vazbou na biotin konjugovaný na probe. Biotinem značená anti-avidovaná protilátka se v dalším kroku váže na fluoresceinem značený avidin navázaný na biotinylovanou probe, což umožňuje zesílení fluorescenčního signálu po aplikaci dalšího fluoresceinem značeného avidinu. V každém běhu jsem používali pozitivní a negativní kontroly. Jaderná DNA byla dobarvena DAPI/Antifadem. K hodnocení jsme používali fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse E1000 vybavený FITC a DAPI filtrem a systém obrazové analýzy LUCIA<sup>®</sup>.

Hodnotili jsme fluorescenční signály celkem ve 40 buňkách, ve dvou oddělených oblastech vždy po 20 buňkách v rámci jednoho tkáňového řezu. Pro lepší orientaci v tkáňovém řezu jsme používali paralelní tkáňové řezy obarvené hematoxylinem-eosinem. Hodnotili jsme signály v nepřekrývajících se intaktních náhodně vybraných buňkách. Tumory s počtem signálů na buňku  $\leq 4$  jsme hodnotili jako neamplifikované. Tumory s počtem signálů na buňku  $>4$  byly hodnoceny jako amplifikované (obr. 5-7).

## Průkaz overexprese HER-2/neu metodami IHC

Pro vyšetření imunohistochemická jsme využili diagnostický kit HercepTest<sup>™</sup> firmy DAKO obsahující králičí polyklonální protilátku proti vnitřní doměně proteinu HER-2/neu (anti-human ERBB2-oncoprotein, Code No. A0485, DAKO) a tři myší monoklonální protilátky firmy Novocatra (NCL-c-erbB-2-316 a NCL-CB11 proti vnitřní doměně proteinu HER-2/neu a NCL-c-erbB-2-356 proti zevní doměně proteinu HER-2/neu). Při práci s kitem HercepTest jsme postupovali přesně podle pokynů výrobce uvedených v „DAKO HercepTest Quick Guide“. Neutrálním 10% pufovaným formalínem fixované v parafínu zalité tkáňové bloky byly nařezány na mikrotomu na tkáňové řezy o tloušťce 4-5 $\mu$ m, standardně odparafinova-



ny a rehydratovány. Ve vodní lázni obsahující Epitope retrieval solution a destilovanou vodu v poměru 1:10 předehřáté na 95-99 °C byly za účelem tzv. oživení antigenů řezy inkubovány po dobu 40 minut. Následovala aplikace blokátoru endogenní peroxidázy a 100µl vlastní králičí polyklonální protilátky (předředěné výrobcem, ready to use) nebo Negative Control Reagent. K vizualizaci vazby antigen-protilátka byl využit DAKO EnVision™ systém (HRP.Rabbit DAB+, obr.B), kde se jako chromogen využívá diaminobenzidin (DAB), který po finální peroxidázové enzymatické reakci dává pozitivní hnědé zbarvení. K dobarvení jader nádorových buněk byl použit hematoxylin. Preparáty byly hodnoceny ve světelném mikroskopu podle kritérií daných výrobcem diagnostického kitu nezávisle dvěma patologi. Obdobně jsme postupovali při imunohistochemickém vyšetření s monoklonálními protilátkami NCL-c-erbB-2-316 (ředění 1:100), NCL-CB11 (ředění 1:100) a NCL-c-erbB-2-356 (ředění 1:50) firmy Novocastra. Na těchto protilátkách jsme současně testovali vliv retrievalu antigenu ve vodní lázni, provedený stejným způsobem jako při použití diagnostického kitu HercepTest DAKO™. Reakce antigen-protilátka byla vizualizována systémem EnVision™ DAKO (K 4006 HRP.Mouse DAB+). Hodnocení bylo prováděno podle stejných kritérií jako při použití diagnostického kitu DAKO HercepTest™ nezávisle dvěma patologi. 0 negativní případy vykazovaly částečnou membránovou pozitivitu v méně než 10% nádorových buněk (obr. 1), 1+ pozitivní případy jsou charakterizovány slabou, rovněž pouze částečnou membránovou pozitivitou ve více než 10% nádorových buněk (obr. 2). 2+ pozitivní případy vykazovaly slabě až středně intenzivní membránovou pozitivitu ve více než 10% nádorových buněk (obr. 3). Pozitivita byla patrná na celých membránách stejně jako u případů 3+ pozitivních, kde silná pozitivní membránová reakce je detekována ve více než 10% nádorových buněk (obr. 4).

### Statistické hodnocení

Korelace mezi frekvencí HER-2/neu pozitivních a negativních případů detekovaná různými metodami při použití různých primárních protilátek a reagensů byla hodnocena pomocí kontingenčních tabulek statisticky analyzovaných Pearsonovým chí kvadrátem (pro kontingenční tabulky 2-6) a Fisherovým exact testem s Yatesovou korekcí (pro kontingenční tabulky 2x2). Dále jsou dopočítány hodnoty specifity, senzitivity, efektivity, prediktivní hodnota pozitivního a negativního výsledku a koeficient shody Cohenovo Kappa u jednotlivých IHC metod ve srovnání s FISH.

### Výsledky

Amplifikace byla detekována v 8 ze 60 případů (13,3%) metodou fluorescenční in situ hybridizace. Počet signálů v amplifikovaných případech se pohyboval v rozmezí 4,65 - 13,375 signálů na buňku. Průměrný počet signálů na buňku v amplifikovaných případech byl 7,386. Ve všech pozitivních případech se jednalo o invazivní duktální karcinomy, z toho dva komedonového typu, grade 2 nebo 3. Nebyla zastížena amplifikace u karcinomu grade 1. 52 ze 60 případů (86,7%) bylo interpretováno jako neamplifikované s počtem signálů v rozmezí 1,450-3,720 signálů na buňku. Overexprese byla detekována ve 13,3-28,3% případů v závislosti na použité protilátce a metodologii. Všechny IHC negativní případy až na jeden (protilátka CB11 bez antigen retrievalu) byly interpretovány jako neamplifikované ve FISH. Prediktivní hodnota negativního výsledku byla 100% ve všech pozitivních IHC metodických postupech kromě protilátky CB11 bez použití retrievalu antigenu. Perfektní shoda byla zaznamenána mezi výsledky FISH a IHC při použití monoklonálních protilátek NCL-c-erbB-2-316 a NCL-c-erbB-2-356 (Novocastra) v metodickém postupu vynechávajícím retrieval antigenu ve vodní lázni. 95% shodu mezi výsledky FISH a IHC jsme zaznamenali při použití monoklonální protilátky NCL-c-erbB-2-356, kde součás-

**Tabulka 1.** Srovnání protilátek a protokolů z hlediska predikce výsledku FISH

Protilátka, protokol	Efektivita (%)	Senzitivita (%)	Specifita (%)	PH+V* (%)	PH-V** (%)
DAKO Herceptest	85	100	83	47	100
DAKO bez retrievalu §	93	100	92	67	100
Novocastra 316 retrieval	93	100	92	67	100
Novocastra 316 bez retrievalu	100	100	100	100	100
Novocastra 356 retrieval	95	100	94	73	100
Novocastra 356 bez retrievalu	100	100	100	100	100
Novocastra CB11 retrieval	92	100	90	62	100
Novocastra CB11 bez retrievalu	97	88	98	88	98

\* Prediktivní hodnota pozitivního výsledku

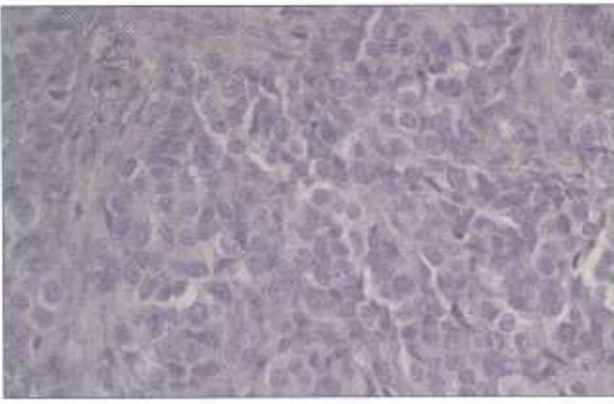
\*\* Prediktivní hodnota negativního výsledku

§ vyšetření opakováno bez retrievalu pro výsledky Herceptestu 1+, 2+, 3+. Výsledky Herceptestu 0 považovány za negativní i pro toto vyšetření

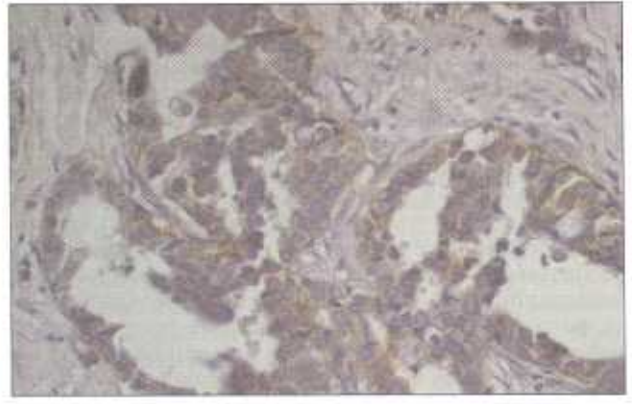
tí použité metodiky byl retrieval antigenu ve vodní lázni (tři 2+ pozitivní případy v této metodě byly interpretovány jako neamplifikované při použití FISH). Výsledky FISH a IHC byly shodné v 93% případů při aplikaci protilátky NCL-c-erbB-2-316 s provedeným retrievalem antigenu (čtyři 2+ pozitivní případy v této metodě byly metodou FISH interpretovány jako neamplifikované). Nejmenší efektivitu vykázal DAKO HercepTest™ (85%). Sedm DAKO HercepTest 2+ pozitivních případů a dva DAKO HercepTest 3+ pozitivní případy byly klasifikovány jako neamplifikované ve FISH. Jeden případ vykazoval pouze úsekovitou overexpresi proteinu HER-2/neu, hodnocenou v různých IHC metodách jako 2+ nebo 3+ pozitivita. Analýza FISH prokázala ve dvou oddělených oblastech tohoto nádoru hraniční amplifikaci genu HER-2/neu s průměrným počtem signálů na buňku 4,75. Hodnocení protilátek a protokolů z hlediska predikce výsledku FISH obsahuje tabulka 1. Je zřejmé že imunohistologie má vysokou senzitivitu a variabilní specifitu podle použitého protokolu. Vzhledem k nižší ceně a metodické náročnosti se tedy jeví jako vhodné screeningové vyšetření.

### Diskuse

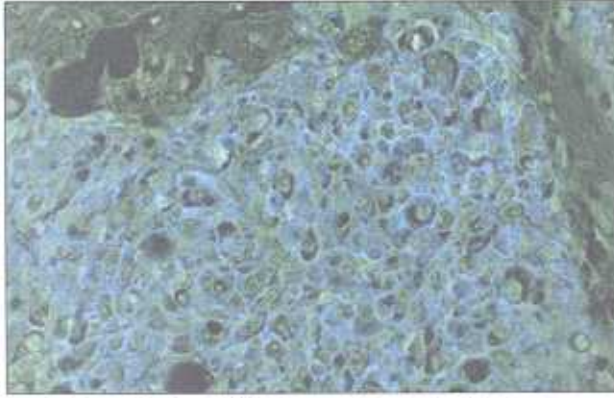
Výsledky naší metodologické studie prokázaly vysokou úroveň korelace mezi metodami IHC a FISH, což je ve shodě s výsledky obdobných recentních komparativních studií (18-22). Procento případů invazivních karcinomů prsu s prokázanou amplifikací a overexpresí genu HER-2/neu nevybočuje z publikovaného rozmezí 10-34% HER-2/neu pozitivních invazivních karcinomů prsu (5,11). Nejmenší efektivitu ve srovnání s FISH vykázal DAKO HercepTest™. Nápadné je zejména vysoké procento 2+ pozitivních případů, které byly metodou FISH interpretovány jako neamplifikované (sedm 2+ pozitivních případů interpretováno metodou FISH jako neamplifikované). Nález je ve shodě s některými studiemi, které rovněž použily tento diagnostický kit (18, 21) a porovnávaly metody IHC a FISH. Tuto skutečnost lze vysvětlit vyšší senzitivitou polyklonální protilátky obsažené v kitu ve spojení s vysoce citlivým vizualizačním systémem EnVision™. Nelze opomenout skutečnost, že v literatuře je uváděno až 10% případů invazivních karcinomů prsu, u nichž zvýšená exprese proteinu HER-2/neu není v souvislosti s amplifikací genu HER-2/neu, ale uplatňují se zde i jiné mechanismy jako aktivace transkripce případně jiné posttranskripční dysregulace (4,17). Naše výsledky získané použitím monoklonálních protilátek při metodickém postupu, který vynechává retrievalu antigenu, však ukazují úplnou shodu mezi amplifikací genu HER-2/neu detekovanou metodou FISH a overexpresí proteinu



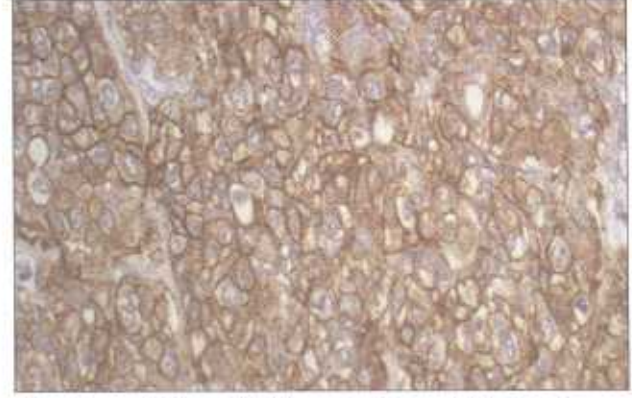
Obr. 1. Imunohistologie HER-2/neu, negativní výsledek, skóre 0



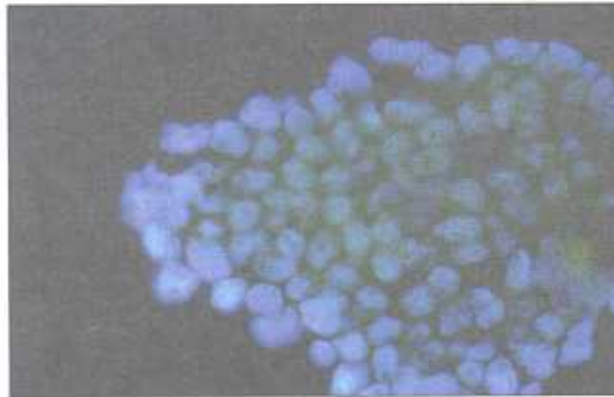
Obr. 2. Imunohistologie HER-2/neu, negativní výsledek, skóre 1+



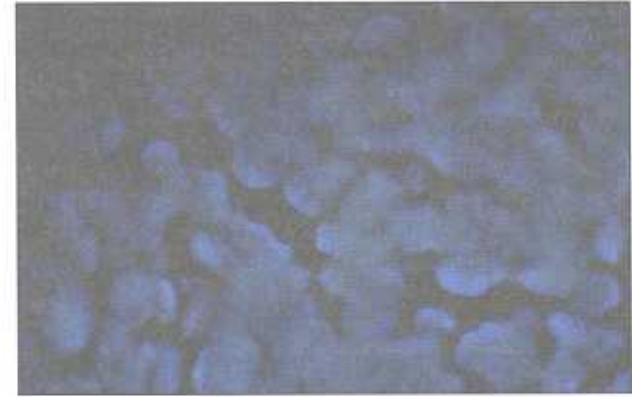
Obr. 3. Imunohistologie HER-2/neu, pozitivní výsledek, skóre 2+



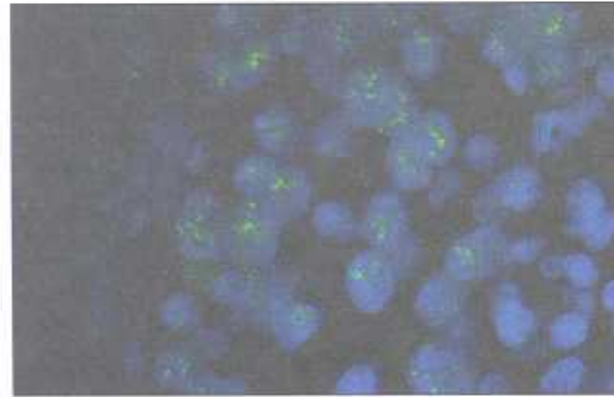
Obr. 4. Imunohistologie HER-2/neu, pozitivní výsledek, skóre 3+



Obr. 5. FISH, bez amplifikace HER-2/neu



Obr. 6. FISH, hraniční amplifikace HER-2/neu



Obr. 7. FISH, amplifikace HER-2/neu



Obr. 8. Navržený algoritmus vyšetřování statusu HER-2/neu

Tab. 2

Herceptest versus FISH			
	NA	A	celkem
N	43	0	43
P	9	8	17
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		23,348	1	<0.000
Fisherův exact test		19,454	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	0,560			
Efektivita				85%
Senzitivita				100%
Specifická				83%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				47%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

Tab. 3

NCL-c-erbB-2-316 (s retrievalem) versus FISH			
	NA	A	celkem
N	48	0	48
P	4	8	12
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		36,923	1	<0.000
Fisherův exact test		31,379	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	0,762			
Efektivita				93%
Senzitivita				100%
Specifická				92%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				67%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

Tab. 4

NCL-c-erbB-2-316 bez retrievalu) versus FISH			
	NA	A	celkem
N	52	0	48
P	0	8	12
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		60		1
<0.000				
Fisherův exact test		51,658	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	1,0			
Efektivita				100%
Senzitivita				100%
Specifická				100%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				100%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

HER-2/neu detekovanou určitými IHC metodami. Výjimkou je případ, kde hraniční amplifikace genu HER-2/neu (4.75 signálů na buňku) je provázena klonální úsekovitou overexpresí proteinu HER-2/neu, při níž se mohly uplatnit i výše zmíněné mechanismy aktivace transkripce a posttranskripčních dysregulací. Procento 2+ pozitivních případů interpretovaných v metodě FISH jako neamplifikované je výrazně vyšší i při použití monoklonálních protilátek firmy Novocastra v metodickém postupu, který zahrnuje retrieval antigenu ve vodní lázni (tři 2+ pozitivní s protilátkou NCL-c-erbB-2-356 a čtyři 2+ pozitivní s protilátkou NCL-c-erbB-2-316, 6 2+ a 1 3+ pozitivní s protilátkou NCL-CB11). Porovnání efektu retrievalu antigenu ve vodní lázni na efektivitu IHC metod ve srovnání s FISH nás vede k úvaze o vynechání tohoto kroku v meto-

Tab. 5

NCL-c-erbB-2-356 (s retrievalem) versus FISH			
	NA	A	celkem
N	49	0	49
P	3	8	11
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		41,119	1	<0.000
Fisherův exact test		35,066	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	0,813			
Efektivita				95%
Senzitivita				100%
Specifická				94%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				73%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

Tab. 6

NCL-c-erbB-2-316 bez retrievalu) versus FISH			
	NA	A	celkem
N	52	0	48
P	0	8	12
celkem	52	8	60

Statistický test		hodnota	SV	PR
Pearsonův chí kvadrát		60	1	<0.000
Fisherův exact test		51,658	1	<0.000
S Yatesovou korekcí				
Koeficient shody (Cohenovo kappa)	1,0			
Efektivita				100%
Senzitivita				100%
Specifická				100%
Prediktivní hodnota pozitivního výsledku				100%
Prediktivní hodnota negativního výsledku				100%

dickém postupu. Tento náleží je v rozporu s některými studiemi, které považují retrieval antigenu za nezbytný k získání spolehlivých výsledků imunohistochemických vyšetření formou fixovaných v parafínu zalitých tkání (22). Všechny naše vzorky byly přikrojeny bezprostředně po operaci a fixovány v neutrálním 10% formalínu. Byla dodržována přibližně 24 hodinová doba fixace. Vzorky byly zpracovány v jedné laboratoři a hodnocení prováděno nezávisle dvěma patology. Zůstává otázkou, zda by bylo možné obdržet obdobné výsledky i v případě větší variability ve fixaci a následném zpracování tkáně pro histologické vyšetření (např. při zpracování vzorku získaných z různých nemocnic a laboratoří). Nelze opomenout ani ekonomickou stránku věci. Cena jednoho vyšetření FISH je asi 28x vyšší než cena jednoho IHC vyšetření (19). FISH metody jsou rovněž časově náročnější ve srovnání s IHC a hodnocení výsledků FISH je rovněž pracnější. FISH metody vyžadují nákladný fluorescenční mikroskop a systém obrazové analýzy, i když již existují alternativní postupy (např. kit fy Zymed), umožňující detekci DAB a hodnocení ve světelném mikroskopu, obdobně jako u IHC metod. Ne každé oddělení patologie je vybaveno materiálně i profesionálně na metodiky FISH, IHC je však většinou již metodou rutinní. Výše uvedené důvody nás vedly k vypracování této srovnávací metodologické studie a k hledání metod imunohistochemických, jejichž validita je srovnatelná s metodou fluorescenční in situ hybridizace.

### Závěr

Na základě výsledků naší studie jsme dospěli k názoru že, imunohistochemická detekce stavu exprese HER-2/neu je závislá na nastavení senzitivity IHC reakce a případném retrievalu antigenu. Vysoká úroveň exprese HER-2/neu (3+ pozitivní případy) a normální exprese HER-2/neu (0, 1+ negativní případy)

mohou být spolehlivě detekovány imunohistochemicky při použití optimalizovaných postupů. Imunohistologii lze, vzhledem k vysoké senzitivitě této metody, nižší ceně a metodické náročnosti používat jako screeningové vyšetření statusu HER-2/neu. Případy s hraničním výsledkem imunohistochemického vyšetření (zejména 2+ pozitivní případy) by pak měly být vyšetřeny IHC extenzivněji (více protilátek, srovnání výsledků s retrievalem a bez něj), případně vyšetřeny FISH před vyslovením konečného stanoviska. Tato vyšetření by měla provádět pracoviště, která mají k dispozici metodiku in situ hybridizace k průběžné kalibraci a kontrole výsledků. Navrhujeme proto algoritmus vyšetření statusu HER-2/neu zahrnující IHC jako

screeningové vyšetření s použitím in situ hybridizace pouze k verifikaci imunohistologicky hraničních případů (Obr. 8). Pro zařazení do klinických studií by dle našeho názoru měly být pacientky stratifikovány do tří skupin (1. skupina: HER-2/neu pozitivní; 2. skupina: amplifikaci a overexpresi nelze jednoznačně vyloučit; 3. skupina: HER-2/neu negativní).

#### Poděkování

Práce vznikla s materiální podporou českého zastoupení firmy Roche, dále byla podporována Výzkumným záměrem MZ ČR 000 65 26 17 05. Autoři dále děkují Markétě Smolové za zhotovení celkem asi 600 imunohistologických preparátů.

#### Literatura:

- Bargmann CI, Hung MC, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor related protein. *Nature* 1986, 319, 226-230
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ulrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relaps and survival with amplification of HER-2/neu oncogen. *Science* 1987, 235, 177-182
- Van de Vijver MJ, Mooi WJ, Peterse JL, Nusse R. Amplification and overexpression of the neu oncogene in human breast carcinomas. *Eur J Surg. Oncol* 1988, 14, 111-114
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of HER-2/neu proto-oncogene in human breast ovarian cancer. *Science* 1989, 244, 707-712
- Shi D, He G, Cao S, Pan W, Zhang HZ, Yu d, et al. Overexpression of the c-erbB-2/neu encoded p185 protein in primary lung cancer. *mol carcinog.* 1992,5,213-218
- Albino AP, Jaehne J, Altorki a, Blundell M, Urmacher C, Lauwers G, et al. Amplification of HER-2/neu gene in human gastric carcinomas: correlation with primary site. *Eur J Surg. oncol* 1995, 21, 56-60
- Hetzel DJ, Wilson TO, Keeney GL. HER-2/neu expression: A major prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecol oncol* 1992, 47, 179-185
- Brandt B, vogt u, Schlotter CM, Jackisch C, Werkmeister R, Thomas M, et al. Prognostic relevance of aberrations in the erbB oncogenes from breast, ovarian, oral and lung cancers: double differential polymerase chain reaction (ddPCR) for clinical diagnosis. *gene* 1995, 159, 35-42
- Swanson PE, Frierson-HF J, Wick MR. c-erbB-2 (HER-2/neu) oncoprotein immunoreactivity in localised, high-grade transitional cell carcinoma of the bladder. *Mod. Pathol* 1992, 5, 531-536
- Revellion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998, 34, 791-808
- Naber SP, Tsutsumi Y, Yin S, et al. Strategies for the analysis of oncogene overexpression. Studies of the neu oncogene in breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 1990, 94, 125-136
- Ross JS, Fletcher JA. the HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem cells* 1998, 16, 413-428
- Press MJ, Bernstein L, Thomas PA et al. Her-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridisation: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol* 1997, 15, 2894-2904
- Lewis GD, Figari I, Fendly B, Wong WL, Carter P, Gorman C, Shepard HM (1993) Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 37:255
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM (1992) Humanization of an anti-p185HER-2 antibody for human cancer therapy. *Proc natl Acad Sci USA* 89:4285
- Pegram M, Hsu S, Lewis G, Pietras R, beryt M, Skliwowski M, Coombs D, Baly D, Kabbinnar F, Slamon D (1999) Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogen* 18:2241
- Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. detection and quantification of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using FISH. *oncogene* 1996, 13, 63-72.
- Wang S, Saboorian MH, Frenkel E, Hynan L, Gokaslan ST, Ashfaq R (2000) Laboratory assessment of the status of HER-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence in situ hybridisation assays. *J Clin Pathol* 2000,53,374-381
- Jacobs TW, Gown AM, Yaziji H, Barnes M, Schnitt SJ (1999) Comparison of fluorescence in situ hybridisation and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J Clin Oncol.* Vol 17, No7, 1999, 1974-1982
- Jimenez RE, Walli T, Tabaszka BS, Visscher DW (2000) Determination of HER-2/neu status in breast carcinoma: Comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000, 13(1):37-45
- Bankfalvi A, Simon R, Brandt B, Burger H, Vollmer I, Dockhorn-Dvorniczak B, Jelle RJ, Bocker W (2000) Comparative methodical analysis of ERBB2/HER-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. Accepted for publication in *Histopathology*
- Haerslev T, Jacobsen GK: Microwave processing of formalin fixed paraffin-embedded sections improves the immunoreactivity of c-erbB-2 oncoprotein in breast cancer. (1993) *Appl Immunohistochem.* 1:223-226
- Lebwohl DE, Canetta R :New developments in chemotherapy of advanced breast cancer. (1999) *Ann Oncol.* 10Suppl 6, 139-146
- Gilewski T, Seidman A, Norton L, Hudis C: An immunotherapeutic approach to treatment of breast cancer: focus on trastuzumab plus paclitaxel. *Breast Cancer Medicine Service* (2000) *Cancer Chemother Pharmacol.* 46(Suppl):S23-S26
- Stebbing J, Copson E, O'Reilly S: Herceptin (trastuzumab) in advanced breast cancer. (2000) *Cancer Treat Rev.* Aug, 26(4):287-90
- Piccart MJ, Di Leo A, Hamilton A: HER2: a "predictive factor" ready to use in the daily management of breast cancer patients ? (2000) *Eur J Cancer.* 36, 1755-61

# VÝZNAM SELEKCE CD 34+ PROGENITORŮ U NEMOCNÝCH S NON-HODGKINSKÝM LYMFOMEM LÉČENÝCH VYSOKODÁVKOVANOU CHEMOTERAPIÍ S NÁSLEDNOU AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACÍ KRVE-TVORNÝCH BUNĚK

## THE SIGNIFICANCE OF CD 34+ PROGENITORS SELECTION FOR PATIENTS WITH NON-HODGKIN'S LYMPHOMA TREATED WITH AUTOLOGOUS STEM CELLS TRANSPLANTATION

VÁLKOVÁ V.<sup>1</sup>, TRNĚNÝ M.<sup>1</sup>, SLABÝ J.<sup>1</sup>, MATĚJČKOVÁ Š.<sup>2</sup>, VODVÁŘKOVÁ Š.<sup>2</sup>, GAŠOVÁ Z.<sup>2</sup>, MARINOV I.<sup>2</sup>, JELÍNEK J.<sup>2</sup>, APLTAUEROVÁ M.<sup>1</sup>, PROCHÁZKA B.<sup>3</sup>, KARBAN J.<sup>1</sup>, KLENER P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I. INTERNÍ KLINIKA I. LF UK A VFN, PRAHA

<sup>2</sup> ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVŇÍ TRANSFUZE, PRAHA

<sup>3</sup> STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, FNKV, PRAHA

**Souhrn:** *Cíl:* Srovnání kinetiky a bezpečnosti příhojení a porovnání doby přežití bez relapsu/progrese nebo úmrtí (EFS) a celkového přežití (OS) u nemocných léčených pro non-Hodgkinský lymfom vysokodávkovanou chemoterapií a následně autologně transplantovaných selektovaným versus neselektovaným štěpem. *Soubor a metodika:* Hodnoceno bylo celkem 35 pacientů, 12 nemocných bylo transplantováno štěpem po CD 34+ selekci, kontrolní skupina 23 neselektovaných pacientů byla vybrána (v poměru 1:2) tak, aby stav onemocnění v době transplantace odpovídal selektované skupině. Při statistickém zpracování neparametrických dat byl využit počítačový program EpiInfo 6, analýza přežití byla zpracována Kaplan-Meierovou metodou, pro statistickou významnost rozdílu byl použit log-rank test. *Výsledky:* 1. Medián příhojení v trombocytech nad  $20 \times 10^9/l$  byl ve skupině neselektovaných pacientů 11 dní, ve skupině selektovaných 14,5 dne ( $p < 0,05$ ) stejně tak byl signifikantní rozdíl v mediánu příhojení v trombocytech nad  $50 \times 10^9/l$  – 15 vs 22 ( $p < 0,05$ ). Rovněž medián příhojení v granulocytech nad  $0,5 \times 10^9/l$  byl signifikantně nižší ve prospěch neselektované skupiny (10 dnů proti 11), stejně pak v leukocytech nad  $1,0 \times 10^9/l$  (10 dnů proti 11) ( $p < 0,05$ ). Absolutní doba leukopenie, rozdělená do 3 stupňů podle závažnosti (počet dnů s leukocyty pod 1, 0,5 a  $0,2 \times 10^9/l$ ) byla ve všech 3 parametrech signifikantně delší ve skupině selektovaných pacientů. Medián dnů febrilní neutropenie, 2,5 dne ve skupině neselektovaných se statisticky významně nelišil od selektované skupiny (medián 4,5 dne). 2. Pravděpodobnost přežití (OS) ve 3 letech pro celý soubor byla 63,5%, při porovnávání obou skupin pak 75% pro selektované a 57,3% pro neselektované nemocné. Pravděpodobnost přežití bez úmrtí či relapsu (EFS) byla ve 3 letech pro celý soubor 35,9% resp. 33,3% pro selektovanou a 37,2% pro neselektovanou skupinu. Medián sledování byl 33,5 měsíce (12-61) pro skupinu selektovaných a 32 měsíců (7-73) pro neselektované nemocné. Medián období od transplantace do relapsu či progrese byl 21 měsíců (4-25 měsíců) u selektovaných a 8 měsíců (0,8-37 měsíců) u neselektovaných pacientů (rozdíl byl statisticky nevýznamný). *Závěry:* Nenalezli jsme signifikantní rozdíl v přežití pacientů, měřený OS a EFS ve 3 letech. Rovněž medián období od transplantace do relapsu se statisticky významně nelišil. Pomalejší kinetika příhojení, kterou jsme pozorovali ve skupině selektovaných pacientů, byla pravděpodobně důsledkem nižšího počtu CD 34+ progenitorů u selektovaných nemocných v důsledku jejich ztrát při zpracování a manipulaci. Vzhledem k jejich dostatečnému absolutnímu počtu se však neprojevila větším počtem komplikací.

**Klíčová slova:** non-Hodgkinský lymfom, autologní, transplantace, selekce, CD34+.

**Summary:** *Purpose:* The comparison of kinetics and safety of hematopoietic reconstitution and time to relaps/ progression (EFS) and overall survival (OS) of patients with non-Hodgkin's lymphoma undergoing ASCT, transplanted with selected or non selected harvest. *Patients and methods:* On the whole 35 transplanted patients were evaluated, 12 with CD 34+ selected harvest and as a control, group of 23 patients with non selected harvest transplanted. The control group was selected in 1:2 proportion, according to the disease status at time of transplantation (equal for both groups). For statistical analysis of non-parametric values we used the software program EpiInfo6, survival times (EFS and OS) were calculated using the Kaplan-Meier method. Comparisons of these times to event distributions were made using the log-rank test. *Results:* 1. Median of thrombocyte engraftment over  $20 \times 10^9/l$  was 11 days for non-selected patients, resp. 14,5 days for selected group ( $p < 0,05$ ), also the median of thrombocyte engraftment over to  $50 \times 10^9/l$  was significantly lower for non-selected – 15 vs 22 ( $p < 0,05$ ). As well the median of granulocyte engraftment over  $0,5 \times 10^9/l$  was significantly lower in favor of the non-selected group (10 vs 11 days), equally for leucocyte engraftment up to  $1,0 \times 10^9/l$  (10 vs 11 days) ( $p < 0,05$ ). Absolute period of leucopenia, divided into 3 grade (number of days with leucocytes under 1, 0, 0,5, and  $0,2 \times 10^9/l$ ) was for all 3 grades significantly longer in the selected group. Median of days of febrile neutropenia (2,5 days for the non-selected group) was not significantly different in comparison to the selected group (median 4,5 days). 2. The overall survival probability (OS) at 3 years for all patients was 63,5% represented by 75% and 57,3% for selected and non-selected group respectively. Event free survival probability (EFS) at 3 years was 35,9% for all patients, resp. 33,3% for selected and 37,2% for non-selected patients. Median follow-up was 33,5 months (12-61) for group of patients with selected harvest transplanted and 32 month (7-73) for non-selected group. Median time to relaps or/ progression measured from transplantation date was 21 months (4-25 months) for selected and 8 months (0,8-37 months) for non-selected patients (NS differ). *Conclusions:* We have not found the significant difference in survival between both groups of patients measured by OS and EFS at 3 years. Also the median time to relaps was not different. The slower kinetics of hematopoietic reconstitution observed in group of selected patients was probably caused by lower CD 34+ progenitors number in selected harvests because of their lost during ex vivo manipulation. However, in consequence of their sufficient absolute numbers, the complications rate was similar in both groups.

**Keywords:** non-Hodgkin's lymphoma, autologous, transplantation, selection, CD 34+

## Úvod

Vysokodávkovaná chemoterapie s podporou autologních kmenových buněk (ASCT) je efektivní a široce užívaná metoda léčby řady hematologických malignit a některých solidních tumorů (Horowitz, 1997). Ve srovnání s allogenní transplantací je výhodou relativně nízká peritransplantační mortalita (méně než 5%) a odpadající nutnost hledání vhodného dárce. Na druhé straně však zůstává hlavním problémem relativně vysoká míra relapsů (signifikantně vyšší než po allogenní transplantaci u většiny malignit). Příčinou terapeutické výhody allogenních kmenových buněk ve smyslu nižšího počtu relapsů základního onemocnění spočívá nejspíše v chybění imunitně podmíněného tzv. graft-versus leukemia (lymphoma) (GVL) efektu u autologních transplantací (Champlin, 1999). Za zdroj relapsů jsou obecně považovány přežívající nádorové buňky v organismu nemocného, nedostatečně eradikované terapií a dále se uvažuje o možném vlivu reinfuse nádorových buněk zpět pacientovi v kontaminovaném štěpu, eventuálně o kombinaci obou faktorů. Jednou z možností jak zabránit reinfusi potenciálních klonogenních buněk zpět pacientovi jsou na různém principu založené metody ex vivo čištění štěpu. Patří sem jednak inkubace s cytotatiky (Hrubá, 1997), inkubace se směsí monoklonálních protilátek s následnou lýzou komplementem (Gribben, 1991) a v posledním řadě selekce CD 34 pozitivních (kmenových) krvetvorných buněk event. spojená s negativní selekcí buněk nesoucích určitý antigen a využívající automatické systémy (Cell Pro, Isolex Baxter, CliniMacs Miltenyi). Přes některé údaje podporující význam přítomnosti nádorových buněk ve štěpu (Gribben 1991, Rill 1994, Pilar-ski 2000), jednoznačné potvrzení významu čištění štěpu pro zlepšení až již EFS nebo OS nebylo dosud podáno. V naší analýze jsme se zaměřili formou párované retrospektivní analýzy na porovnání výsledků u nemocných transplantovaných pro NHL pomocí CD34+ selektovaného štěpu se skupinou kontrolní transplantovanou neselektovaným štěpem.

## Soubor a použité metodiky

**Výběr a charakteristika pacientů:** V našem souboru jsme retrospektivně hodnotili celkem 35 pacientů léčených pro non-Hodgkinův lymfom vysokodávkovanou chemoterapií s následnou autologní transplantací krvetvorných buněk. 12 nemocných bylo transplantováno selektovaným štěpem, kontrolní skupina 23 pacientů, (poměr selektovaných k neselektovaným 1:2, navíc pak 1 nemocný v každé skupině transplantovaný tandemově), kteří byli transplantováni neselektovaným štěpem byla vybrána tak, aby jejich stav onemocnění hodnocený v době transplantace byl srovnatelný. V dalším hodnocení jsme se pokusili srovnat některé faktory vztahující se k charakteristikám onemocnění v době transplantace, ke kinetice příhojení, peritransplantační toxicitě a následně dalšímu osudu nemocných po transplantaci v obou skupinách.

**Definice:** Období bez významné události (EFS) bylo definováno jako doba od transplantace do relapsu/progrese či úmrtí. Zvláště byl spočítán medián období od transplantace do progrese/relapsu, měřeno v měsících. Přežití nemocných (OS) bylo definováno jako interval od transplantace do úmrtí. Medián sledování byl stanoven u žijících nemocných.

Odpověď na terapii: jako kompletní remise (KR) byl hodnocen stav bez klinických i laboratorních známek choroby a úplná normalisace původního patologického nálezu. Jako parciální remise (PR) byl hodnocen stav, kdy bylo léčbou dosaženo více než 50% redukce původního patologického nálezu.

Pro hodnocení odpovědi na terapii v období transplantace jsme nemocné rozdělili do dalších skupin: na nemocné transplantované v rámci indukční terapie z důvodů rizikových faktorů při diagnóze (skupina 1) – nemocní dosáhli KR, (skupina 2) – nemocní byli v PR, na nemocné transplantované po dosažení 2. nebo další KR po záchranné terapii pro relaps (skupina 3),

nemocné transplantované v 2. nebo další PR po záchranné terapii pro relaps (skupina 4) a na nemocné, kteří byli transplantováni v 1.PR z důvodu nemožnosti dosáhnout indukční terapií kompletní remise (skupina 5).

## Metodiky

### 1. Stanovení a hodnocení rozsahu onemocnění

Hodnocení rozsahu onemocnění bylo prováděno standardními zobrazovacími metodami:

Obligátně: rentgenová, ultrasonografická vyšetření, počítačová tomografie (CT).

V individuálních případech: nukleární magnetická resonance (MRI), galiová scintigrafie, eventuelně pozitronová emisní tomografie (PET).

Hodnocení postižení kostní dřevě: histologie, průtoková cytometrie, v individuálních případech molekulární biologie (PCR)

### A. Průtoková cytometrie

Pomocí průtokové cytometrie byl zjišťován imunofenotyp lymfocytárních populací ve vzorcích krve, kostní dřevě, tkáně uzlin, dle nutnosti i v mozkomíšním moku a v různých punktátech. Přítomnost CD znaku byla prokazována jednostupňovým značením (tzv. přímá imunofluorescence) monoklonálními protilátkami s navázaným fluorochromem FITC (Fluorecein isothiocyanate) nebo PE (R- Phycoerythrin). Současně jsme vyšetřovali dva znaky, kde jedním byl tzv. „lineage marker“ (tj. znak specifický pro určitou buněčnou linii, např. CD 19 pro B lymfocyty), druhým byl znak, jehož exprese nás u dané buněčné linie zajímala. Používali jsme protilátky (Immunotech) proti následujícím znakům: CD3(UCHL1), CD4 (13B8.2), CD5 (BL1a), CD8 (B9.11), CD10 (ALB2), CD11c (BU15), CD14(RMO52), CD19(J4.119), CD20 (HRC20), CD38 (T16), CD45 (J.33), FMC7, HLA DR (B8.122), lehké řetězce KAPPA(J4.119), lehké řetězce LAMBDA (J4.119), IgD, IgM, isotypové kontroly (IgG1/IgG1).

Připravené vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru FACSCalibur (Becton Dickinson). Udávaná citlivost přístroje je  $1 \times 10^{-3}$  –  $1 \times 10^{-4}$  buněk

**B. Ostatní vysoce citlivé metody** - molekulárně biologické - využívající různé modifikace PCR, klonogenní pokusy (in vitro kultivace nádorových linií) byly v našem souboru použity pouze u některých nemocných a proto nejsou dále rozváděny

### 2. Selekce

Principem CD34+ selekce je vychytávání kmenových buněk nesoucích CD 34 antigen.

Positivní selekce vede kromě izolace cílových CD34+buněk k nepřímému odstranění nežádoucích buněk včetně nádorových u různých typů maligních onemocnění (Mapara, 1997, Civin, 1996). Další potenciální výhodou je zmenšení objemu buněčné suspenze a tím i snadnější skladování a při transplantaci menší zatížení organismu převáženým dimetylsulfoxidem a objemem tekutin.

V souboru našich pacientů byly jako metodiky pro selekci použity systémy CellPro a Isolex

### Cell-Pro

Positivní selekce pomocí přístroje CellPro (Bothell, WA USA) umožňuje vychytání kmenových buněk nesoucích CD34 antigen jak z kostní dřevě, tak z PBPC. Celý proces selekce je řízen počítačem, do průběhu jednotlivých kroků lze manuálně zasahovat. Používané protilátky jsou myší anti CD34 monoklonální protilátky s navázaným biotinem. Silná afinita mezi avidinem a biotinem způsobuje, že CD34+ buňky s navázanými protilátkami s biotinem se naváží na kuličky potažené avidinem v koloně přístroje a jsou zde vychytány, zatímco neoznačené buňky projdou a jsou zachyceny jako negativní frak-

ce. Vychytané kmenové buňky se uvolní mechanicky mírnou rotací, při které dochází k přerušení vazby mezi kmenovou buňkou a protilátkou, a jsou sebrány jako pozitivní frakce.

#### Imunomagnetická selekce na přístroji Isolex 300i (software verze 1,12 a 2,5)

Systém Isolex 300i (sw 2,5) je plně automatický a umožňuje výběr pozitivní nebo jednokrokové pozitivní/negativní selekce. Základní kroky jsou shodné v obou procesech, kombinovaný proces však vykazuje vyšší depleci nežádoucích buněk ve srovnání se samotnou pozitivní selekcí. Tvorba rozet CD34+ buněk s imunomagnetickými kuličkami probíhá před negativní selekcí. Během tvorby rozet je buněčná suspenze, předem sensibilizovaná anti-CD34+ protilátkou, smísená s imunomagnetickými kuličkami v separační komoře. Po vytvoření rozet jsou tyto zadrženy magnetickým polem v separační komoře a necílové buňky jsou převedeny do vaku pro negativní frakci. Systém opakuje tento proces třikrát pro dokonalé převedení necílových buněk do negativní frakce. Bezprostředně před třetím promytím jsou přidány protilátky proti cílovým buňkám a suspenze je 15min inkubována. Po senzibilizaci cílových buněk je dokončeno třetí promytí a buňky jsou resuspendovány v separační komoře a připraveny k uvolňovacímu kroku. Uvolnění CD34+buněk probíhá současně s tvorbou rozet cílových buněk pro depleci. V separační komoře jsou magnetickým polem zachyceny rozety depletovaných buněk a volně imunomagnetické kuličky. CD34+ buňky jsou po zakoncentrování převedeny do finálního vaku.

Kombinace pozitivní a negativní selekce vede k optimální depleci nádorových buněk ze štěpu odstraněním kontaminujících nádorových buněk a tím redukcí minimální reziduální choroby.

#### 4. Statistika

Při zpracování neparametrických dat jsme použili softwarový program EpiInfo6 s využitím neparametrických testů Mann Whitneyova a Wilcoxonova. Analýza přežití byla zpracována Kaplan-Meierovou metodou, statistická významnost rozdílů mezi skupinami byla stanovena pomocí log-rank testu. Testování bylo prováděno na hladině významnosti 0,05.

#### Výsledky

##### 1. Srovnání obou skupin nemocných v základních charakteristikách v době od diagnózy do transplantace:

V celém souboru jsme retrospektivně hodnotili celkem 35 pacientů. 12 pacientů bylo transplantováno pomocí selektovaného štěpu, z toho u 8 byla selekce prováděna pomocí přístroje CellPro a u 4 pomocí přístroje Isolex 300i. U 23 pacientů selekce prováděna nebyla. Kontrolní skupina 22 pacientů byla vybrána tak, aby se v základních parametrech stavu onemocnění v době před transplantací shodovala se skupinou selektovaných nemocných (v poměru 1:2). 1 neselektovaný pacient navíc byl vybrán jako kontrolní k 1 nemocnému v selektované skupině, oba byli transplantováni tandemově. V obou skupinách byla obě pohlaví zastoupena stejnoměrně, rovněž věkový medián (53 let u selektovaných a 49 let u neselektovaných) se významně nelišil. V celém souboru bylo zastoupeno celkem 6 pacientů s lymfomem z plášťových buněk / MCL / (4 ve skupině selektovaných, 2 v neselektovaných), 21 s folikulárním lymfomem / FCL / (7/14), 6 difusních velkobuněčných lymfomů / DLCL / (1/5) a u 2 nemocných ve skupině neselektovaných se jednalo o B lymfomy blíže nezařazené. Rovněž rozložení jednotlivých histologických typů lymfomů se v obou skupinách statisticky významně nelišilo.

Pokročilost a rozsah onemocnění jsme hodnotili pomocí mezinárodního prognostického indexu (IPI) (Shipp, 1993), klinického stadia (Ann Arbor staging systém pro lymfomy) a postižení kostní dřeně. Vyšetření a hodnocení postižení kostní dřeně bylo prováděno mikroskopicky a pomocí průtokové cytometrie. Vysoce citlivé metody (molekulární biologie)

byly použity jen u několika pacientů, proto dále nebyly do analýzy zahrnuty.

Tyto parametry jsme hodnotili jak při diagnóze, tak před mobilisací a následnou transplantací. Iničiální IPI a klinické stadium byly v obou skupinách srovnatelné, rozdíl v postižení kostní dřeně byl na hranici statistické významnosti ( $p=0,069$ ), 10 ze 12 selektovaných mělo iničiální postižení kostní dřeně oproti 11 z 23 ve skupině neselektovaných. V době před transplantací byly opět oba soubory srovnatelné z hlediska IPI, statisticky významně se však lišily v postižení kostní dřeně před sběrem krvetvorných buněk, kdy ve skupině selektovaných pacientů mělo infiltraci kostní dřeně celkem 9 (75%) nemocných, zatímco ve skupině neselektovaných byla infiltrace zjištěna pouze u 2 (8,6%). V důsledku výše uvedeného rozdílu v postižení kostní dřeně, bylo též zastoupení nemocným s vyšším klinickým stadiem v době před transplantací větší ve skupině selektovaných. (Tabulka č. 1)

Tabulka č. 1. Porovnání obou skupin v základních charakteristikách v době diagnózy:

	selektováni 12	neselektováni 23	P
<b>Muži</b>	6	12	NS
<b>Ženy</b>	6	11	NS
<b>Věkový medián (roky)</b>	53 (30-68)	49 (35-65)	NS
<b>Histologický typ lymfomu:</b>			NS
MCL	4	2	
FCL	7	14	
DLCL	1	5	
B blíže neurč	0	2	
<b>Iničiální klinické stadium</b>			NS
H (III, IV)	10	21	
L (I, II)	2	2	
<b>Iničiální IPI</b>			
H (2,3)	2	9	
L (0,1)	10	14	NS
<b>Iničiální postižení kostní dřeně</b>			0,069
Ano	10	11	
Ne	2	12	

L = low (nízké)  
H = high (vysoké)

Za jeden z nejvýznamnějších faktorů, určujících další osud nemocných je považován stav onemocnění v době transplantace, jehož měřítkem byl v našem souboru mezinárodní prognostický index (IPI). Odpověď na terapii jsme hodnotili pomocí 7 stupňů: 1 kompletní remise, 2 plánovaná první parciální remise, 3 druhá a další kompletní remise, 4 druhá a další parciální remise, 5 první parciální remise – nedostatečný efekt úvodní léčby, 6 primárně resistantní onemocnění, 7 resistantní relaps onemocnění. V našem souboru byly zastoupeny pouze odpovědi 1-5. Rovněž v takto hodnocené odpovědi na terapii před transplantací se oba soubory statisticky významně nelišily. Celkem bylo před transplantací dosaženo 12 remisí (2 KR a 10 PR), tj. 100% odpovědi ve skupině selektovaných a 23 remisí (10 KR a 13 PR), tj. rovněž 100% odpovědi ve skupině neselektovaných. Žádný ze sledovaných nemocných nebyl transplantován ve fázi resistantní choroby.

Míru předléčení v obou sledovaných skupinách jsme hodnotili počtem cyklů chemoterapie, podaných před transplantací, jejichž medián byl srovnatelný 9,5 (4-23) u selektovaných a 9,0 (3-18) ve skupině neselektovaných. Medián doby od diagnózy do transplantace byl v obou skupinách srovnatelný - 13 měsíců ve skupině selektovaných resp. 11 měsíců ve skupině neselektovaných. (Tabulka č.2)

**Tabulka č.2.** Porovnání obou skupin podle stupně předlčení a pokročilosti choroby v době před transplantací:

	selektováni 12	neselektováni 23	p
počet cyklů předchozí terapie M	9,5 (4-23)	9,0 (3-18)	NS
Postižení KD před ASCT: ano	9	2	p<0,05
ne	3	21	
IPI před ASCT: (0,1) L	9	22	NS
(2,3) H	3	1	
Klinické stadium před ASCT:			p<0,05
(I,II) L	2	14	
(III,IV) H	10	9	
* Stav při ASCT: 1	1	4	NS
2	2	2	
3	1	3	
4	6	12	
5	2	2	
Remise celkem před ASCT: (KR+PR)	12	22	NS
KR	2	10	
PR	10	13	
Doba od dg do transplantace (medián-měsíce)	13,3 (5,9- 94,1)	11,3 (4,4- 51,2)	NS

M = medián  
H = high (vysoké)  
L = low (nízké)

- \*  
Skupina 1: transplantace jako plánovaná součást indukční léčby – nemocný již byl v KR  
Skupina 2: transplantace jako plánovaná součást indukční léčby – nemocný byl ještě v PR  
Skupina 3: transplantace po dosažení 2. nebo následné KR po záchranné léčbě pro relaps  
Skupina 4: transplantace po dosažení 2. nebo následné KR po záchranné léčbě pro relaps  
Skupina 5: transplantace v 1. PR z důvodu nemožnosti dosáhnout indukční terapií i terapií 2. linie KR

## 2. Použité transplantační režimy a parametry převedených progenitorů

Jako přípravné režimy (vysokodávkovaná chemoterapie) byly použity: BEAM 400 (8x) (Trněný, 1998), BEAM 200 (22x), TBI-CFA (3x) a 2 pacienti (v každé z obou skupin 1 nemocný) byli léčeni tandemovou transplantací (1. fáze Melfalan + Mitoxantron, 2. fáze BEAM 200). Všechny uvedené režimy jsou součástí standardních protokolů pro ASCT na našem pracovišti. Zastoupení jednotlivých režimů se v obou skupinách statisticky významně nelišilo. Celkem 34 nemocných (12 selektovaných a 22 neselektovaných) bylo transplantováno mobilisovanými periferními kmenovými buňkami, pouze u jedné nemocné byla jako zdroj krvetvorných buněk použita kostní dřeň. Kvalitu štěpů v obou sledovaných skupinách jsme hodnotili absolutním počtem CD 34+ buněk ( $\times 10^6/\text{kg}$ ) a absolutními hodnotami CFU-GM ( $\times 10^4/\text{kg}$ ). Zde se oba soubory statisticky významně lišily v počtu CD 34+ buněk, jejichž medián byl ve skupině selektovaných  $3,19 \times 10^6/\text{kg}$  oproti  $6,4 \times 10^6/\text{kg}$  ve skupině neselektovaných ( $p < 0,05$ ). Rozdíl v mediánu počtu CFU-GM byl v obou skupinách statisticky nevýznamný. (Tabulka č.3)

## 3. Srovnání parametrů kinetiky přihojení a peritransplantační toxicity

Při srovnávání standardních parametrů kinetiky přihojení jsme v našem souboru našli statisticky významný rozdíl v mediánu přihojení ve prospěch skupiny pacientů transplantovaných neselektovaným štěpem. Medián přihojení v trombocytech nad  $20 \times 10^9/\text{l}$  byl ve skupině neselektovaných pacientů 11 dní (6-16), ve skupině selektovaných 14,5 dne (9-32), stejně tak byl signifikantní rozdíl v mediánu přihojení v trombocytech nad

**Tabulka č. 3.** Použité transplantační režimy a parametry převedených progenitorů

	selektováni 12	neselektováni 23	p
přípravný režim :			NS
BEAM 400	1	7	
BEAM 200	7	15	
TBI-CFA	3	0	
Tandem	1	1	
CD 34+ v PBPC ( $\times 10,6/\text{kg}$ ) M	3,19 (1,67- 12,98)	6,4 (1,15-24,16)	p<0,05
CFU-GM v PBPC ( $\times 10,4/\text{kg}$ ) M	25,65 (1,1-163,9)	50,7(1,28-174,3)	NS
ANC v BM ( $\times 10,8/\text{kg}$ )		3,0	
CFU-GM v BM ( $\times 10,4/\text{kg}$ )		13,88	
Transplantace PBPC	12	22	
BM	0	1	

M = medián

$50 \times 10^9/\text{l} - 15$  vs 22. Rovněž medián přihojení v granulocytech nad  $0,5 \times 10^9/\text{l}$  byl signifikantně nižší ve prospěch neselektované skupiny (10 dnů proti 11), stejně pak v leukocytech nad  $1,0 \times 10^9/\text{l}$  (10dnů proti 11). V korelaci s protražovanějším přihojením byl též signifikantně větší počet podaných erymas a trombokonzentrátů ve skupině selektovaných nemocných. Absolutní doba leukopenie, rozdělená do 3 stupňů podle závažnosti (počet dnů s leukocyty pod 1,  $0,5$  a  $0,2 \times 10^9/\text{l}$ ) byla ve všech 3 parametrech signifikantně delší ve skupině selektovaných pacientů. Tato skutečnost se však neodrazilila v komplikacích periody leukopenie, měřené počtem febrilních dnů v tomto období, jejichž medián 2,5 dne ve skupině neselektovaných se statisticky významně nelišil od selektované skupiny (medián 4,5 dne). Rovněž peritransplantační mortalita (2 úmrtí ve skupině selektovaných a 1 ve skupině neselektovaných do 100 dnů po transplantaci) se významně nelišila. (Tabulka č.4)

**Tabulka č. 4.** Srovnání parametrů přihojení a peritransplantační toxicity

	selektováni 12	neselektováni 23	p
přihojení v trombo nad 20 M ( $\times 10,9/\text{l}$ ) D	4,5 (9-32)	11 (6-16)	p<0,05
přihojení v trombo nad 50 M ( $\times 10,9/\text{l}$ ) D	22 (11-53)	15 (9-40)	p<0,05
ANC nad $0,5 (\times 10,9/\text{l})$ D M	11 (10-13)	10 (8-13)	p<0,05
WBC nad $1,0 (\times 10,9/\text{l})$ D M	11 (10-13)	10 (8-13)	p<0,05
počet dnů s leuko pod 0,2 M	5 (2-10)	3 (0-9)	p=0,05
počet dnů s leuko pod 0,5 M	8 (6-12)	6 (3-11)	p<0,05
počet dnů s leuko pod 1,0 M	9 (7-14)	8 (5-13)	p<0,05
počet trombokonzentrátů M	6 (2-10)	3 (1-7)	p<0,05
počet erymas M	6 (2-14)	4 (0-10)	p<0,05
počet febrilních dnů M	4,5 (0-17)	2,5 (0-9)	NS
počet úmrtí do 100 dnů po ASCT	2	1	NS

M = medián

## 4. Dosažená odpověď a sledování po ASCT

Hodnotitelných bylo ve skupině selektovaných 11 pacientů, z nichž u všech 11 bylo dosaženo léčebné odpovědi (100%), z toho 7 (64%) kompletních a 4 (36%) parciální remise. 1 nemocná ve skupině selektovaných zemřela 26. den po transplantaci na sepsi, odpověď na léčbu nebyla hodnotitelná. 1 pacient zemřel 37. den na infekční komplikaci v kompletní remisi. U neselektovaných pacientů bylo léčebné odpovědi dosaženo u všech 23 (100%), z toho 16 (70%) kompletních a 7 (30%) parciálních remisí. 1 pacient zemřel 30. den na sepsi, v kompletní remisi.



Tabulka č. 5. Odpověď na léčbu a sledování:

	selektovaní 12	neselektovaní 23	p
Nejlepší výsledek po ASCT: KR	7	16	NS
PR	4	7	
časné úmrtí	2	1	NS

Progrese / relaps	5	14	NS
Úmrtí	3	10	NS
Remise celkem : KR+PR	6	10	NS
KR	5	9	
PR	0	1	
Medián sledování od BMT- měsíce	33,5 (12-61)	32 (7-73)	NS
Medián od BMT do relapsu- měsíce	21,2 (4,4-25,0)	8,1 (0,8-37,1)	NS

Tabulka č. 6. Výsledky přežití:

	celkem % (CI 95%)	selektovaní % (CI 95%)	neselektovaní % (CI 95%)	p
OS ve 3 letech	63,5% (45,6-81,4)	75% (50,5-99,5)	57,3% (33,8-80,8)	NS
EFS ve 3 letech	35,9% (18,3-53,5)	33,3% (3,5-63,1)	37,2% (15,6-58,8)	NS

V parametrech dosažení odpovědi se tedy oba soubory výrazněji nelišily. V dalším sledování došlo k progresi/relapsu onemocnění u 5 pacientů (42%) ve skupině selektovaných a u 14 pacientů (40%) ve skupině neselektovaných. Rozdíl byl opět nesignifikantní. Medián období od transplantace do relapsu či progresi byl 21 měsíců (4-25 měsíců) u selektovaných a 8 měsíců (0,8-37 měsíců) u neselektovaných pacientů. Rozdíl byl statisticky nevýznamný ( $p=0,458$ ). Zemřeli celkem 3 pacienti (25%) v souboru selektovaných (z toho 2 časné úmrtí na infekční komplikace, 26., resp. 37. den po transplantaci) a 10 pacientů (43%) v souboru neselektovaných nemocných. (1 časné úmrtí na sepsi 30. den po transplantaci) ( $p=0,46$ ). V mediánu sledování (u nemocných žijících v době hodnocení), který byl 33,5 měsíců (12-61) u selektovaných a 32 měsíců (7-73) u neselektovaných, bylo v remisi 6 (50%) pacientů ve skupině selektovaných (všichni v kompletní remisi), ve skupině neselektovaných bylo v remisi celkem 10 (43%), z toho 9 (39%) v kompletní a 1 (4%) v parciální remisi. ( $p=0,66$ ). (Tabulka č. 5)

Pravděpodobnost přežití (OS) ve 3 letech pro celý soubor byla 63,5% (CI 95%; 45,6-81,4), při porovnávání obou skupin pak 75% (CI 95%; 50,5-99,5%) pro selektované a 57,3% (CI 95%; 33,8-80,8%) pro neselektované nemocné. (Graf č. 1) Pravděpodobnost přežití bez úmrtí či relapsu (EFS) byla ve 3 letech pro celý soubor 35,9% (CI 95%; 18,3-53,5%), resp. 33,3% (CI 95%; 3,5-63,1%) pro selektovanou a 37,2% (CI 95%; 15,6-58,8%) pro neselektovanou skupinu. (Graf č. 2) Rozdíl mezi oběma skupinami byl v obou parametrech (OS i EFS) nesignifikantní. (Tabulka č. 6)

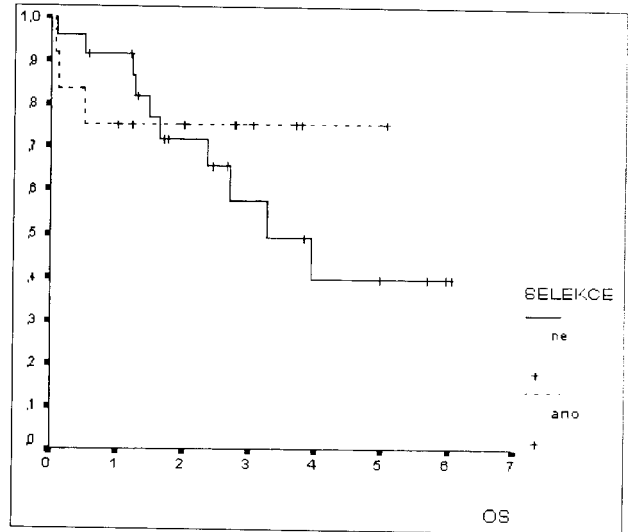
Celkově se tedy oba soubory v žádném z parametrů, tj. dosažené odpovědi, počtu i době do relapsu a úmrtí a pravděpodobnosti přežití statisticky významně nelišily.

## Diskuse

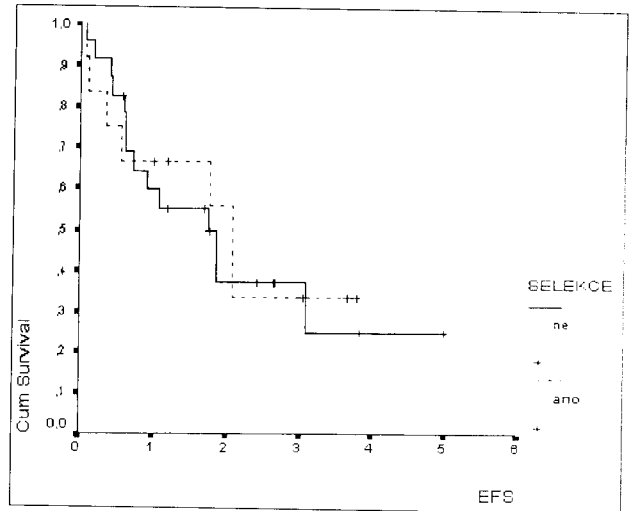
V úvodu jsme se zmínili o tom, že za jednu z možných příčin relapsů po autologních transplantacích je považována přítomnost residuálních klonogenních buněk v převáděném štěpu. (Pilarski, 2000)

Studie zabývající se významem čištění štěpu však dosud nevyznívají jednoznačně. Řada klinických studií prokázala, že nádorová kontaminace autologních produktů je spojena s kratším DFS a naopak úspěšný ex vivo purging je spojen s lepšími

Graf č. 1. Celkové přežití (OS) ve 3 letech:



Graf č. 2. Období bez známek relapsu či úmrtí (EFS) ve 3 letech:



mi klinickými výsledky. (Fields, 1996, Sharp, 1996, Gertz, 1997). Například Gribben, 1991 a Freedman, 1996 referují o zlepšení přežití (RFS) u nemocných s folikulárním lymfomem po úspěšném čištění PBPC produktů monoklonálními protilátkami, obdobně pak Corradini, 1997 i pro lymfomy z plášťových buněk. Tyto studie vedly často k interpretaci, že nádorové buňky obsažené ve štěpu jsou zjevnou příčinou relapsu po transplantaci a tudíž pro zlepšení výsledků léčby je nezbytné čištění těchto produktů. Naproti tomu retrospektivní EBMT data (Williams, 1996) nepotvrdily rozdíly v DFS u pacientů s lymfomy transplantovaných čištěným nebo nečištěným štěpem. Přítomnost nádorových buněk ve štěpu nebo nedostatečný purging může být spíše v korelaci s rozsahem systémové residuální choroby a/nebo s chemoresistencí tumoru a tudíž reinfuse nádorových buněk jako příčina relapsu není zdaleka evidentní. Zvláštní skupinu mohou tvořit nemocní s vysoce chemosenzitivním onemocněním, nedetekovatelnou systémovou residuální chorobou a následnou vysokodávkovanou chemoterapií, u kterých pak může být relativní počet nádorových buněk obsažených v autologním štěpu determinujícím faktorem.

Na druhou stranu existují práce ukazující buď neefektivní čištění (Andersen, 1997) nebo na stejný osud nemocných ať již byli transplantováni čištěným či nečištěným štěpem (Cooper, 1998, Gupta, 1999, Lemoli, 2000, Patriarca, 2000).

V některých recentnějších pracích se však opět objevují zpra-

vy o prodloužení přežití u pacientů, u kterých bylo do vysokodávkované chemoterapie s následnou ASCT zařazeno čištění autologních produktů provázené kontinuální PCR negativitou vzorků kostní dřeně. (Freedman, 1999).

Dosud však neexistují randomizované studie, které by prokázaly zlepšení přežití (DFS) pomocí čištění. Proto i skutečný vliv nádorových buněk obsažených v autologním štetu na následný relaps onemocnění zůstává kontroverzní.

V našem souboru bylo analysováno celkem 35 pacientů s diagnosou non-Hodgkinského lymfomu různých histologických typů a pokročilosti choroby, kteří byli léčeni vysokodávkovanou chemoterapií s následnou autologní transplantací krvetvorných buněk. U 12 nemocných byla provedena selekce CD 34+ buněk, kontrolní skupinu tvořilo 23 pacientů u kterých selekce provedena nebyla. Obě skupiny byly srovnatelné z hlediska pokročilosti a rozsahu onemocnění (hodnoceno pomocí IPI) v době diagnózy i v době před mobilisací a následnou ASCT. Přestože jsou naše výsledky jistě ovlivněny malým počtem pacientů ve všech srovnávaných parametrech, naše sledování spíše potvrzuje význam kvality odpovědi na léčbu a dosažení maximální eradikace residuální choroby, než roli nádorové „dekontaminace“ použitím selekce jako ex vivo purgingu převáděných krvetvorných buněk. Z hlediska srovnání míry residuální choroby před transplantací, literárně považované za jeden z nejvýznamnějších prognostických faktorů (Haas 1996, Mills, 1995) byly oba soubory porovnatelné z hlediska mezinárodního prognostického indexu (IPI), signifikantně se však lišily v počtu nemocných s prokázanou infiltrací kostní dřeně (a z toho vyplývajícím i větším zastoupením vyšších klinických stadií), která byla častěji postižena ve skupině selektovaných nemocných. Tento fakt by teoreticky mohl zvýhodňovat neselektovanou skupinu z hlediska menší kontaminace štetu maligními buňkami. Na druhé straně je však nutno vzít v úvahu, že stěžejním hodnocením postižení kostní dřeně ve většině případů nemocných bylo histologické vyšetření, jehož hladina detekce residuální nádorové populace je nízká ( $5 \times 10^8$  buněk). Pro relevantnější závěry budou jistě nutné širší prospektivní studie, využívající vysoce citlivé techniky genové značení, které umožní podrobnější srovnání zdroje relapsu u čištěných a nečištěných autologních štetů.

Práce, zabývající se bezpečností a kinetikou přihojení ve vztahu k selekci, většinou referují o srovnatelných charakteristikách proti neselektované skupině (Vescio, 1999, Dreger, 1999, Lemoli, 2000).

Při hodnocení parametrů přihojení jsme našli signifikantní rozdíly, když přihojení bylo statisticky významně rychlejší ve skupině neselektovaných pacientů a to jak v trombocytech, tak v leukocytech. Tato skutečnost však jednoznačně korelovala se signifikantně vyšším absolutním počtem CD 34+ buněk ve štetech neselektovaných pacientů. Hodnoty CFU-GM byly v obou skupinách srovnatelné. Hlavním důvodem pomalejšího přihojení selektovaných nemocných zde tedy byly pravděpodobně vyšší ztráty CD 34+ progenitorů při ex vivo manipulaci. Pro celkově bezpečný absolutní počet CD 34+ buněk (medián  $3,19 \times 10^6/\text{kg}$ ) však lze i pro selektovanou skupinu pacientů průběh hemopoetické restituce hodnotit jako rychlý a bezpečný. V námi sledovaném souboru tomu odpovídalo zjištění srovnatelně krátkého trvání období febrilní neutropenie. Rovněž peritransplantační mortalita byla srovnatelná pro obě skupiny.

### Závěry

1. Při srovnání pacientů transplantovaných selektovaným a neselektovaným štetem jsme nenalezli signifikantní rozdíl v dosažení odpovědi, době do relapsu ani v parametrech přežití ve prospěch selektované skupiny.

Výsledky našeho pozorování, které je nutné brát malému počtu pacientů pouze jako předběžné, tedy význam reinfuse nádorových buněk jako příčinu relapsů a s tím související nutnosti čištění autologních štetů zpochybňují. Pro jednoznačější zodpovězení této otázky by byly nutné širší randomizované studie.

2. Pomalejší kinetika přihojení, kterou jsme pozorovali ve skupině selektovaných pacientů, byla pravděpodobně důsledkem nižšího počtu CD 34+ prekursorů u selektovaných nemocných v důsledku jejich ztrát při zpracování a manipulaci. Vzhledem k jejich dostatečnému absolutnímu počtu se však neprojevila větším počtem komplikací.

**Práce byla podporována grantem: IGA MZ ČR 4822-3**

### Literatura:

- Andersen NS, Donovan JW, Borus JS et al., Failure of immunologic purging in mantle cell lymphoma and polymerase chain reaction detection of minimal residual disease. *Blood* 1997; 90: 4212-21
- Brenner MK, Rill DR, Moen RC et al., Gene marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341: 85-6
- Civin CI, Trischmann T, Kadan NS et al., Highly purified CD 34-positive cells reconstitution hematopoiesis. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2224-33
- Cooper WC, Moss TJ, Ross AA et al., Occult tumor contamination of hematopoietic stem cell products does not affect clinical outcome of autologous transplantation in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3509-17
- Corradini P, Astolfi M, Cherasco C et al., Molecular monitoring of minimal residual disease in follicular and mantle cell non-Hodgkin's lymphoma treated with high-dose chemotherapy and peripheral blood progenitor cell autografting. *Blood* 1997; 89: 724-31
- Dreger P, Viehmann K, von Neuhoff et al., Autografting of highly purified blood progenitor cells following myeloablative therapy in patients with lymphoma: a prospective study of the long-term effects on tumor eradication, reconstitution of hematopoiesis and immune recovery. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 153-61
- Fields KK, Elfenbein GJ, Trudeau WL et al., Clinical significance of bone marrow metastasis in patients with breast cancer undergoing high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1868-76
- Freedman AS, Gribben JG, Neuberg D et al., High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation in patients with follicular lymphoma during first remission. *Blood* 1996; 88: 2780-6
- Freedman AS, Neuberg D, Mauch P et al., Long-term follow-up of autologous bone marrow transplant patients with relapsed follicular lymphoma. *Blood* 1999; 94: 3325-33
- Gertz MA, Witzig TE, Pineda AA et al., Monoclonal plasma cells in the blood stem cell harvest from patients with multiple myeloma are associated with shortened relapse-free survival after transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19: 337-42
- Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D et al., Immunologic purging of marrow by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *A Engl J Med* 1991; 325: 1525-33
- Gupta D, Bybee A, Cooke F et al., CD 34+ selected peripheral blood progenitor cell transplantation in patients with multiple myeloma: tumor cell contamination and outcome. *Br J Haematol* 1999; 104: 166-77
- Haas R, Moos M, Mohle R et al., High-dose therapy with peripheral blood progenitor cell transplantation in low-grade non-Hodgkins lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 149-155
- Horowitz MM, Rowlings PA, An update from the International Bone Marrow Transplant Registry and Autologous Blood and Marrow Transplant Registry on current activity in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin hematol* 1997; 4: 395-400
- Hrubá A, Skala JP, Matějčková S et al., Čištění hematopoetických krvetvorných buněk u autologních transplantací. *Čas Lek Česk* 1997; 4: 395-400
- Champlin R, Khouri I, Kornblau S et al., Reinventing bone marrow transplantation: reducing toxicity using nonmyeloablative preparative regimens and induction of graft-versus-malignancy. *Curr opin oncol* 1999; 11: 87-95
- Lemoli RM, Martinelli G, Zamagni E et al., Engraftment, clinical, and molecular follow-up of patients with multiple myeloma who were reinfused with highly purified CD 34+ cells to support single or tandem high-dose chemotherapy. *Blood* 2000; 95: 2234-9
- Majumdar MY, Korner JJ, Hildebrandt M, et al., Monitoring of tumor cell purging after highly efficient immunomagnetic selection of CD34 cells from leukapheresis products in breast cancer patients: comparison of immunocytochemical tumor cell staining and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Blood* 1997; 89: 337-44.
- Mills W, Chopra R, Mc Millan A et al., BEAM chemotherapy and autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed or refractory non-Hodgkins lymphoma. *J Clin Oncol* 1995; 13: 588-93

20. Patriarca F, Damiani D, Fanin R et al., High-dose therapy in multiple myeloma: effect of positive selection of CD 34+ peripheral blood stem cells on hematologic engraftment and clinical outcome. *Haematologica* 2000; 85: 269-74
21. Pilarski LM, Hipperson G, Seeberger K et al., Myeloma progenitors in the blood of patients with aggressive or minimal disease: engraftment and self-renewal of primary human myeloma in the bone marrow of NOD SCID mice. *Blood* 2000; 95: 1056-65
22. Prince HM, Imrie K, Crump M et al., The role of intensive therapy and autologous blood and marrow transplantation for chemotherapy-sensitive relapsed and primary refractory non-Hodgkin's lymphoma: identification of major prognostic groups. *Br J Haematol* 1996; 92: 880-889
23. Rill DR, Santana VM, Roberts WM et al., Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells. *Blood* 1994; 84: 380-3
24. Sharp JG, Kessinger A, Mann S et al., Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J Clin Oncol* 1996; 14: 214-9
25. Shipp et al., *New England Journal of Medicine* 1993; 329: 987-994
26. Trněný M, Slabý J, Benešová K et al., Intenzifikace vysokodávkované chemoterapie BEAM s autologní transplantací periferních krvetvorných buněk u nemocných s nehodgkinským maligním lymfomem. *Hematologia a Transfuziologia* 1998
27. Vescio R, Schiller G, Stewart AK et al., Multicenter phase III trial to evaluate CD 34+ selected versus unselected autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 1999; 93: 1858-68
28. Williams CD, Goldstone AH, Pearce RM et al., Purging of bone marrow in autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case-matched comparison with unpurged cases by the European Blood and Marrow Transplant Lymphoma Registry. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2454-64

## knihy

### CLINICAL RADIATION ONCOLOGY GUNDERSON, L. L., TEPPER, J. E. (EDS.)

Churchill Livingstone, New York – Edinburgh 2000. 1296 str. 8000 obr. (včetně barev.), 470 tab., ISBN 044307609X, cena 169,- GBP

Toto rozsáhlé dílo vzniklo pod vedením editorů – profesorů na univerzitách v Rochesteru (Minnesota) a Chapel Hill (North Carolina) – za spolupráce 142 odborníků převážně z USA a dále z Kanady, Francie, Dánska a dalších zemí. 63 kapitol je rozděleno do tří sekcí, z nichž první a třetí sekce jsou dále členěny do částí. Názvy sekcí v první části (v závorce jsou temata kapitol): radiobiologie (biologické základy radiační onkologie, molekulární a buněčná biologie), fyzika, jiné disciplíny onkologie (chirurgie, chemoterapie, interakce chirurgie a chemoterapie), různé (modifikátory dávky v radioterapii, statistika a klinické triály). Kapitoly v druhé sekci (brachyterapie, intraoperativní ozařování, stereotaktické ozařování – lineární urychlovač a gama nůž, terapie nabitými částicemi, trojzsměrná konformální terapie, hypertermie, radioimunoterapie, paliace metastáz). Části třetí sekce (v závorce jsou temata některých kapitol): nádory CNS (gliomy, nádory míchy aj.), nádory hlavy a krku (nádory ústní dutiny, orofaryngeální, nasofaryngeální a laryngeální nádory aj.), nádory hrudníku, gastrointestinální nádory (žaludku, pankreatu, tlustého střeva aj.), genitourinární nádory (prostata, močového měchýře aj.), nádory prsu, sarkomy, nádory v dětském věku (CNS, sarkomy, Wilmsův tumor, retinoblastom aj., leukémie a lymfomy, řídké se vyskytující nádory), lymfomy a hematologické malignity (Hodgkinova nemoc, transplantace kostní dřeně při hematologických malignitách aj.).

Mimofádně velký objem knihy (formát 220 x 283 mm) dovolil autorům i značný rozsah kapitol, např. pojednání o biologických základech radiační onkologie je na 40 stranách, pojednání o brachyterapii na 20 stranách aj. Bylo proto možné zajít i do značných podrobností, což uspokojí i náročné čtenáře. Osm kapitol v první sekci o vědeckých základech radiační onkologie zahrnuje všechny aspekty, jež se uplatňují v multidisciplinární péči o onkologické pacienty. Kapitoly v druhé sekci, jež jsou spíše klinicky orientované, poskytují přehled o klinickém přínosu jednotlivých ozařovacích technik. Přehledné členění kapitol do nevelkých odstavců včetně úvodu a souhrnu dovoluje čtenáři rychle nalézt požadované informace.

Kapitoly ve třetí nejrozsáhlejší sekci (zaujímající 70 % knihy) o tumorech v jednotlivých systémech a orgánech sestávají z následujících odstavců: etiologie a epidemiologie, prevence a časná detekce, patologie, anatomie a cesty šíření, biologické charakteristiky a molekulární biologie, klinická manifestace, hodnocení pacientů, staging, primární terapie, léčebné algoritmy, ozařovací techniky, komplikace léčby, závěr. Značná pozornost je věnována výsledkům terapie, což dovoluje výběr nejvhodnější léčebné metody pro dané onemocnění. Přehlednost textu a orientaci v něm zvyšuje stručné shrnutí obsahu každé kapitoly členěné do stručných položek. Rozsáhlá citovaná literatura za každou kapitolou o více než 100 položkách není výjimkou. Množství kvalitně reprodukováných snímků spolu s pěknou grafickou úpravou zvyšují atraktivnost této mimořádné publikace. Kniha se vyznačuje velmi pečlivou redakční úpravou příspěvků úctyhodného množství odborníků. Jak je uvedeno v předmluvě, oba uvedení editoři spolu s dalšími osmi přidruženými editory dbali nejen na odbornou úroveň prací, ale také značně na jejich uspořádání a příměřenosti. Zdařila

se jim výtečná monografie, jež se rozsahem a kvalitou řadí k těm nejlepším, které dosud ve světě o radiační onkologii vyšly. Knihu distribuuje Harcourt Publishers Ltd., Harcourt Place, 32, Jamestown Rd, London NW1 7BY, England (internet: [www.harcourt-international.com](http://www.harcourt-international.com)). V. H

### DIAGNOSTIC BREAST IMAGING, MAMMOGRAPHY, SONOGRAPHY, MAGNETIC RESONANCE IMAGING, AND INTERVENTIONAL PROCEDURES, 2ND EDITION, ENLARGED AND REVISED

HEYWANG – KÖBRUNNER, S. H., DERSHAW, D. D., SCHREIER, I. Stuttgart – New York, Thieme 2001. 481 str., 843 obr., 14 tab., ISBN 3-13-102892-0/696, cena DM 239,-

Úspěšná kniha o zobrazovací diagnostice onemocnění prsu vychází v druhém rozšířeném a přepracovaném vydání s bohatší obrazovou částí než mělo vydání první. Podnětem k druhému vydání byl technický pokrok v přístrojích, další cenné informace získané z ultrazvuku a zobrazování magnetickou rezonancí, zdokonalování biopických technik, profiloubení znalostí o genetických a rizikových faktorech karcinomu prsu a větší zkušenosti ze screeningů. Obsáhla problematika je rozdělena do tří oddílů se 22 kapitolami.

V prvním oddíle se rozebírají jednotlivé diagnostické metody za doprovodu množství schémat, vysvětlujících přehledů, reprodukci obrazů; každá kapitola je uzavřena souhrnem a seznamem literatury. Podrobně je popisována mamografie se všemi současnými finesami, ultrasonografie ma zařazena i dopplerovská vyšetření. MRI je analyzována velmi podrobně a hodnocena jako nejcitlivější metoda pro diagnostiku afekcí prsu. Nejsou opomenuty rovněž metody, jež jsou zatím ve vývoji (scintimamografie, MR spektroskopie) a biopické techniky (biopsie tenkou jehlou, core biopsie a vakuová biopsie), které autoři indikují velkoryse, aby se eliminovala nutnost excizní biopsie. Je diskutována otázka předoperační lokalizace okultních lézí a skiagrafie preparátů, kterou je kontrolována úspěšnost biopsie.

Druhá část, jež je těžištěm knihy, obsahuje systematický výčet normálních a patologických nálezů a jejich odraz v mamografickém, ultrazvukovém a MR zobrazení. Postupně jsou demonstrovány benigní procesy, cysty, benigní tumory, zánětlivé afekce, *in situ*, invazivní afekce, lymfatické uzliny, další semimaligní a maligní tumory (fyloidní tumory), změny po úrazech, operacích nebo ozařování, změny na kůži a mužský prs. Podstatný prostor je vyčleněn pro problematiku kalcifikací. Třetí oddíl je orientován na nálezy při screeningovém vyšetřování, jehož výsledky se liší podle pracovišť. U pečlivě prováděného screeningů je pokles mortality 50 - 70 %. Dále jsou navrženy algoritmy vyšetření u dříve žitých skupin nálezů. V dodatku je uvedena podrobná TNM klasifikace a definice anatomických lokalizací.

Monografie shrnuje pohled na diagnostiku onemocnění prsu při využívání všech současných zobrazovacích postupů, s formulováním odhadu účinnosti metod, které jsou ve vývoji; vyniká propracovanou diferenciací diagnostikou a jasnou strategií volby terapeutických postupů se zřetelem na patologické nálezy. Kniha poskytující všestranné rady by měla být dostupná na všech specializovaných mamologických pracovištích.

V. R., V. H

# TECHNIKA BIOPSIE SENTINELOVÉ UZLINY PŘI RESEKCI PLÍCE PRO KARCINOM

## TECHNICAL DETAILS OF THE SENTINEL LYMPH NODE BIOPSY DURING LUNG CANCER RESECTION

KLEIN J.<sup>1</sup>, BOHANES T.<sup>1</sup>, KRÁL V.<sup>1</sup>, NEORAL Č.<sup>1</sup>, TICHÝ T.<sup>2</sup>, ŠKARDA J.<sup>2</sup> HAJDÚCH M.<sup>3</sup>

I. CHIRURGICKÁ KLINIKA LF UP A FN OLOMOUC  
ÚSTAV PATOLOGIE LF UP A FN OLOMOUC  
LABORATOR EXPERIM. MEDICÍNY LF UP A FN OLOMOUC

**Souhrn:** *Východiska:* Názor na význam různých typů lymfadenektomie pro staging a terapii časných stadií nemalobuněčné plicní rakoviny (NSCLC) stejně jako na možný prognostický benefit radikální lymfadenektomie je dosud kontroverzní. Cílem studie bylo vyzkoušet metodu identifikace první drenážní (sentinelové) uzliny pomocí patentní modři a zhodnotit specifitu této metody v možnosti predikce stavu postižení vyšších etáží lymfatických uzlin. *Typ studie a soubor:* Nerandomizovaná prospektivní studie z jednoho centra na 16 pacientech s malým periferním plicním karcinomem (předoperačně T<sub>1-2</sub> N<sub>0-1</sub> M<sub>0</sub>). *Metody a výsledky:* Plicní tkáň v bezprostřední blízkosti tumoru byla infiltrována celkem 4 ml patentní modři, první nabarvená uzlina byla označena jako sentinelová. Sentinelová uzlina byla nalezena u 13 ze 16 předoperačně diagnostikovaných karcinomů. V našem souboru odpovídala negativita sentinelové uzliny negativitě všech dalších etáží regionálních lymfatických uzlin. *Zhodnocení:* Identifikace sentinelové uzliny dává možnost detailnějšího a specializovaného vyšetření této uzliny patologem. Pro definitivní vyhodnocení role biopsie sentinelové uzliny u plicního karcinomu budou nutné další a rozsáhlejší studie, které dají odpověď na otázku, zda při negativitě sentinelové uzliny můžeme minimalizovat rozsah lymfadenektomie při resekci.

**Klíčová slova:** Karcinom plic – Nmalobuněčná plicní rakovina – Lymfadenektomie – Biopsie sentinelové uzliny – Sentinelová uzlina – Patentní modř

**Summary:** *Background:* The value of different types of lymphadenectomy for staging and treatment of early stages of non-small cell lung cancer (NSCLC) remains still controversial and prognostic benefit of radical lymphadenectomy is also questionable. The aim of this study was to identify specifically the first tumor draining lymph node (sentinel node) using patent blue dye, followed by sentinel node biopsy (SLNB), and to determine specificity of this „sentinel node technique” in predicting of subsequent lymph node levels state in early stages of NSCLC. *Design and subject:* Non-randomized single-center prospective study in 16 patients with small peripheral lung cancer (preoperatively T<sub>1-2</sub> N<sub>0-1</sub> M<sub>0</sub>). *Methods and results:* Peritumorous pulmonary tissue was infiltrated with 4 ml of patent blue dye to identify the sentinel lymph node. The node was found in 13 of 16 patients with preoperatively diagnosed small peripheral NSCLC. Negativity of the sentinel lymph node corresponded with absence of more distant lymph nodes involvement in the lung and mediastinum in all of the members of our group. *Conclusions:* Patent blue dye may be used to facilitate the precise identification and therefore the subsequent biopsy of the sentinel lymph node. The role of SLNB in staging of NSCLC must be analyzed in further studies. However, this technique could probably minimize the extent of lymph node dissection.

**Key words:** Lung cancer – Non-small cell lung cancer – Lymphadenectomy – Sentinel lymph node biopsy – Sentinel lymph node – Patent blue dye

### Úvod

Základními prognostickými faktory u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem jsou jednotlivé parametry TNM klasifikace podle UICC (1,2). Ukazatel T má pro chirurga zásadní význam z hlediska lokální operability, pouze kompletní resekce dává šanci na vyléčení (3). Pokud je prokázána vzdálená metastáza (M<sub>1</sub>), nemá operace až na ojedinělé výjimky smysl. Pro plicní karcinom je však charakteristická preference lymfogenního metastazování, které má do určité míry lokální charakter. Správné určení parametru N má tedy zásadní význam, protože maligní diseminace do jednotlivých etáží lymfatického systému plic snižuje pravděpodobnost pětiletého přežití řádově o desítky procent. Na většině pneumologických pracovištích je předoperační průkaz lymfogenního metastazování karcinomu plic založen na CT (4). Pokud je na CT scanu popsána uzlina větší než 10 mm, je vhodné invazivní vyšetření -mediastinoskopie či torakoskopie, jejich alternativou se v poslední době stává PET scan (5,6). Všechny tyto metody mají svá určitá úskalí, ale jejich kombinací lze dosáhnout

60 - 90 % spolehlivosti předoperační diagnózy.

Definitivní zhodnocení stavu postižení lymfatických uzlin jak samotné plíce, tak plicního hilu i mediastina poskytuje až samotná operace a histopatologický nálezn v odstraněných uzlinách (7). Názory na rozsah disekce uzlin mediastina se liší v naší literatuře i ve sděleních z renomovaných pracovištích, která se touto problematikou zabývají (8). Některé kliniky považují za dostatečné odstranění zvětšených či klinicky suspektních uzlin, řádově výš je princip disekce spádových uzlin (každý plicní segment má určitou predilekční cestu metastazování). Bohužel víme, že přibližně 20-25 % nádorů diseminuje mimo svůj přirozený spád (9). Proto se většina pracovištích v současnosti kloní k systematické disekci jednotlivých skupin uzlin plíce a stejné strany mediastina nebo k lymfadenektomiím en bloc, někdy rozšířené i na opačnou stranu mediastina (10). Operace, při které nebyly odstraněny všechny uzliny plíce a přilehlé strany mediastina, je některými autory považována za paliativní. Kritici lymfadenektomií poukazují na delší operační čas, rizika rozsáhlejšího výkonu a také na snížení

lokální onkorezistence po lymfadenektomii, přičemž jednoznačný vliv na prodloužení přežití ani po superradikálních výkonech na lymfatickém systému nebyl prokázán.

V kontrastu s tímto extenzivním zásahem do lymfatického systému plic je metoda biopsie sentinelové uzliny. Princip sentinelové uzliny byl poprvé popsán Cabanensem v roce 1977 u karcinomu penisu (11). Autor předpokládá, že metastazování lymfatickou cestou se děje po jednotlivých krocích, definuje sentinelovou uzlinu jako první drenážní filtr, který je schopen zadržet a uchovat buňky metastazující nádorové populace. Pokud je tato uzlina negativní, predikuje to analogicky negativitu dalších etází lymfatických uzlin ve spádu. K vyhledání sentinelové uzliny použil lymfangiografii. Identifikaci sentinelové uzliny dle přirozené anatomické drenážní oblasti zmiňuje T. Naruke. Na svém souboru 1815 pacientů provedl detailní rozbor uzlin odebraných při resekci pro plicní karcinom a popsal typické cesty lymfogenního metastazování z jednotlivých plicních laloků. Sentinelovou uzlinu tedy definuje více-méně statisticky (12). Kvalitativní posun u této metody znamenala možnost označení resp. nabarvení sentinelové uzliny intra vitam lymfofilním barvivem, např. patentní modří (Patentblau, Patent blue-dye). Při aplikaci tohoto barviva do bezprostředního okolí tumoru dojde k jeho vychytání a odvedení lymfatickou cestou do příslušného lymfatického povodí, první uzlina na cestě této drenáže je tedy sentinelová. Možnost využití principu vychytání cizorodého a lymfofilního barviva intra vitam, tedy ještě před započatím resekce, navíc dává i možnost průkazu diskontinuálních metastáz. Plicce má poměrně konstantně utvářený lymfatický systém, který drénuje lymfu cestou subpleurální sítě a peribronchovaskulární pleteně do hilových uzlin a odtud centripetálně do mediastinálních uzlin směrem k oběma venózním úhlům. Každý plicní segment má predilekční cestu lymfatické drenáže, avšak lymfatickým mapováním se prokázalo, že až v 30 % případů existují lymfatické zkratky mezi periferními lymfatickým řečištěm a lymfatickými strukturami v mediastinu, nad klíčkem, v retroperitoneu a v hrudní stěně. Lymfa i nádorové metastázy mohou také obejít bližší uzlinu v typickém spádu intranodálními či extranodálními zkratkami a to tehdy, je-li uzlina vyřazena ze své funkce např. zánětem či fibrózou a metastázy se pak manifestují až v další funkční uzlině. Barvivo je stejně jako lymfa schopno obejít tuto překážku a tuto uzlinu nabarvit (9). Tyto diskontinuální metastázy lze tímto způsobem v mediastinu identifikovat. Samozřejmě, biopsie sentinelové uzliny postrádá smysl při klinicky zjevném postižení uzlin, při maligní lymfadenopatii ověřené biopsií předoperačně a při prokázaném vzdáleném metastazování. Metodu biopsie sentinelové uzliny zavedl do klinické praxe Morton v roce 1992 ve stadiu maligního melanomu (13). První reference o jejím využití u karcinomu plic je z roku 1999 (14). Přesnost metody lze ještě zvýšit pomocí dynamické lymfoscintigrafie sirmatým koloidem značeným techniciem, která pomůže určit, kde hledat sentinelovou uzlinu peroperačně gama-sondou. U plicního karcinomu je však problematická cílená aplikace pertechnátu, která musí proběhnout v dostatečném odstupu před samotnou resekci (15). V naší republice je biopsie sentinelové uzliny používána ve stadiu maligního melanomu a karcinomu prsu, o použití u karcinomu plic není v našem písemnictví do současnosti zmínka (16,17).

### Materiál a metodika

Sentinelovou uzlinu jsme se pokusili vyhledat u 16 nemocných, operovaných na naší klinice od června 1999 do června 2000 pro nemalobuněčný plicní karcinom ve stadiu I event. II TNM klasifikace ( $T_{1-2} N_{0-1} M_0$ ). Jednalo se o 13 mužů a 5 žen průměrného věku 61,7 let. V 10 případech byl diagnostikován spinocelulární karcinom, 5x adenokarcinom a jedenkrát velkobuněčný karcinom. Parametr T byl předoperačně stanoven jako  $T_1$  ve 4 případech a jako  $T_2$  ve 12 případech, definitivní cT bylo ve shodě. Postižení lymfatických uzlin bylo předope-

račně vyhodnoceno pomocí CT jako  $N_0$  v 9 případech a jako  $N_1$  v 5 případech, rozdíly s definitivním nálezem (pN) budou diskutovány.

Operačním přístupem byla standardní posterolaterální torakotomie pátým mezižebřím. Po dokončení torakotomie byla do bezprostředního okolí tumoru i přímo do tumoru injektována patentní modř (Patentblau® firmy Byk-Gulden), v množství 4 ml. Odstup několika desítek minut byl dostatečný k tomu, aby se nabarvily lymfatické cévy drénující nádor včetně lymfatických uzlin. Uzlina, která se nabarvila nejdříve, případně uzlina, která byla při další preparaci v plicním parenchymu nalezena nabarvená blíže tumoru, byla označena jako sentinelová a peroperačně vyšetřena histologicky (Obr. 1,2). Poté byla provedena resekce plice včetně systematického samplingu uzlin plicce a přilehlé strany mediastina, uzliny byly označeny dle schématu podle Mountaina (1) a včetně sentinelové definitivně zpracovány patologem.

### Výsledky

U 16 nemocných se nám sentinelovou uzlinu podařilo nalézt ve 13 případech. 8x byla negativní a také uzliny plicce, plicního hilu a mediastina byly nepostiženy (vždy minimálně 6 skupin uzlin). 5x byla uzlina pozitivní, 3x se jednalo o intralobární uzlinu příslušného plicního laloku, z těchto 3 případů jsme 2x našli mnohočetné metastatické postižení stejnostranných hilových a mediastinálních uzlin ( $N_2$ ) a jedenkrát byly všechny uzliny vyšších etází negativní. V dalším případě byla pozitivní sentinelová uzlina uložena v interlobiu, uzliny nižších i vyšších etází byly negativní. V posledním případě jsme našli pozitivní sentinelovou uzlinu při karcinomu horního laloku pravé plicce paratracheálně vpravo ( $N_3$ ), zbylé uzliny plicce a mediastina byly negativní, jednalo se tedy o solitární „skip“ metastázu. Celkem 3x byl tedy rozpor mezi předoperačním CT vyšetřením a definitivním nálezem maligního postižení mediastinálních uzlin ( $N_3$ ). Průběh operace samotná biopsie sentinelové uzliny zásadně neovlivnila, zdržení lze kvantifikovat řádově na minuty, čas nutný k nabarvení uzliny lze věnovat přípravě resekce samozřejmě mimo průběh lymfatických cest. V lékopise jsou udávány alergické reakce na barvivo vzhledem k stigmatizaci populace běžně přítomnými aniliny. Jsou různého stupně až po anafylaxii, samu jsme se s nimi nesetkali.

### Diskuze

Biopsie sentinelové uzliny je perspektivní metoda, v chirurgii plicní rakoviny nová a ne zcela vyzkoušená. Není zatím standardní procedurou na žádném pneumochirurgickém pracovišti a to z toho důvodu, že její spolehlivost zatím nebyla prokázána na dostatečně velkých souborech. Pokud by se potvrdily předpoklady, že negativita sentinelové uzliny je dostatečně spolehlivým ukazatelem předpovídajícím stav postižení, resp. negativitu všech dalších lymfatických uzlin, ušetřilo by to nemocné zbytečného zásahu na lymfatickém systému plicce a mezihrudí se všemi popisovanými komplikacemi. Diskuzi zasluží spolehlivost metod sloužících k identifikaci sentinelové uzliny. Barvení patentní modří se zdá dostatečně přesně, optimistické jsou i literární zmínky o vyhledávání sentinelové uzliny scintigraficky (13,14,15), nicméně těžkosti spojené s cílenou aplikací koloidu značeného techniciem v dostatečném odstupu před operací tuto metodu v plicní onkologii diskvalifikují. Jiný přístup k teorii sentinelové uzliny představuje práce T. Narukeho, který pro každou lokalizaci primárního nádoru určuje na svém obrovském souboru pacientů s lymfadenektomií možné lokalizace sentinelové uzliny. Tento princip uplatňuje při videoasistovaných operacích menších periferních tumorů. Riziko tohoto anatomického principu vyhledávání sentinelové uzliny minimalizuje odběrem jedné či více uzlin v dalších etážích s nejpravděpodobnější lokalizací metastázy. Jde vlastně o minimalizovanou blokovou disekci. Sentinelová uzlina sice není označena, ale nachází se s vyso-

**Obr. 1** –  
Plicní nádor  
nabarvený  
patentní  
modří



**Obr. 2** –  
Nabarvená  
sentinelová  
uzlina  
v interlobiu



kou pravděpodobnosti v této statisticky definované části regionálního lymfatického povodí dané plíce (12). Další spornou otázkou je otázka možné chyby peroperačního vyšetření uzliny na kryostatu, je to dáno tím, že z každé uzliny jsou standardně vyšetřovány pouze 3 řezy, malá metastáza nemusí být zachycena (18). Identifikace sentinelové uzliny má proto i ten význam že umožňuje její důkladnější a přesnější definitivní vyšetření např. na mikrometastázy resp. struktury cytoskeletu epitelálních buněk (19,20).

## Závěr

Identifikace sentinelové uzliny patentní modří je poměrně jednoduchý způsob, který může ve většině případů odhalit místo nejpravděpodobnější lymfatické metastázy. Vyčerpávající histopatologické vyšetření této uzliny může odkrýt maligní změny, které by mohly zůstat při klasickém vyšetření neznámé. Okolnost, zda může negativita sentinelové uzliny limitovat nutnost a rozsah mediastinální lymfadenektomie, bude vhodné prověřit na větších souborech.

**Podpořeno granty MŠMT J 14/98 15110001 a LF UP Olomouc 13101103/2000**

## Literatura:

1. Mountain C. F.: Current recommendations for lung cancer staging and regional lymph node classification. News from ESTS 1999,4,5-13
2. Naruke T., Goya T., Tsuchiya R., Suemasu K.: Prognosis and survival in resected lung cancer based on the new international staging system. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 96,1988, 440-7
3. Paľko P., Schützner J., Kabát J.: Operační léčba nemalobuněčného bronchogenního karcinomu. Prakt. Lék. 1994,3,177-178
4. Heřman M., Kolek V.: Možnosti výpočetní tomografie s vysokou rozlišovací schopností v diagnostice plicních onemocnění. Klinické aplikace. Čs. Radiol. 46,1992,204-9
5. Lowe V. J., Naunheim K.: Current role of positron emission tomography in thoracic oncology. Thorax 1998, 8, 703-12
6. Ginsberg R. J.: Evaluation of the mediastinum by invasive techniques. Surg. Clin. of North Amer. 1987, 5,1025-35
7. Graham A. N. J., Chan K. J., Pastorin U., Goldstraw P.: Systematic nodal dissection in the intrathoracic staging of patients with non-small cell lung cancer. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 117,1999,246-251
8. Izbicki J. R., Passlick B., Pantel K., Pichelmeier U., Hosch S. B., Karg O., Thetter O.: Effectiveness of radical systematic lymphadenectomy in patients with resectable non-small cell lung cancer: Results of a prospective randomized trial. Ann. of Surg. 237,1998,134-44
9. Tateishi M., Fukuyama Y., Hamatake M.: Skip mediastinal lymph node metastasis in NSCLC. J.Surg. Oncol. 59,1995,251-54
10. Klein J., Král V., Neoral Č., Bohanes T., Aujeský R., Kolek V., Grygárková Y., Heřman M.: Lymphadenectomy as a part of resection for non-small cell lung carcinoma. Biomed. Papers 143,2000,88
11. Cabanas R.: An approach for the treatment of penile carcinoma. Cancer 39,1977,456-66
12. Naruke T., Tsuchiya R., Kondo H., Nakayama H., Asamura H.: Lymph node sampling in lung cancer: how should it be done? Eur. J. Cardiothorac. Surg. 16,1999,17-24
13. Morton D. L., Wen D. R., Wong J. H.: Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch. Surg. 127,1992,392-9
14. Little A. G., De Hoyos A., Kirgan D. M., Arcomano T. R., Murray K. D.: Intraoperative lymphatic mapping for NSCLC: the sentinel node technique. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 117,1999,220-4
15. Liptay M. J., Masters G. A., Winchester D. J., Edelman B. L., Garrido P. J., Hirschtritt T. R., Perlman R. M., Willard A. F.: Intraoperative radioactive sentinel lymph-node mapping in non-small cell lung cancer. Ann. Thorac. Surg. 70,2000,384-90
16. Fait V., Žaloudík J., Pacovský Z.: Mapování lymfatické uzliny a biopsie sentinelové uzliny – nový přístup k problematice lymfadenektomie. Rozhl. Chir. 74,1995,8,425-8
17. Fait V., Chrenko V., Žaloudík J.: Sentinelová lymfadenektomie u kožního maligního melanomu – krátkodobé výsledky a prognostický význam. Rozhl. Chir. 77,1998,10,466-73
18. Theunissen P. M., Bollen E. M., Koudstaal J., Thumissen I. B. M.: Intra-nodal and extranodal tumor growth in early metastasised NSCLC: problems in histological diagnosis. J. Clin. Pathol. 47,1997, 920-3
19. Passlick B., Izbicki J., Kubuscheck B., Thetter O., Pantel K.: Detection of disseminated lung cancer cells in lymph nodes: Impact on staging and prognosis. Ann. Thorac. Surg. 61,1996, 177-83
20. Klein J., Bohanes T., Tichý T., Král V., Kolek V., Řiháková P., Škarda J., Neoral Č., Aujeský R., Grygárková I.: Odhad metastatického potenciálu plicního karcinomu. Rozhl. Chir. 79,2000, 10,460-63.

## NAŠE PRVNÍ VÝSLEDKY LÉČBY METASTATICKÉHO KARCINOMU PRSU IFOSFAMIDEM A PACLITAXELEM PŘI RECIDIVĚ PO ANTRACYCLINU

### IFOSFAMIDE AND PACLITAXEL TREATMENT IN METASTATIC BREAST CANCER, RELAPSED AFTER ANTRACYCLINE TREATMENT: OUR FIRST RESULTS

MAGDOLNA V. DANK<sup>1</sup>, MIKLÓS SZÚCS<sup>2</sup>, MAGDOLNA CSEPREGHY<sup>3</sup>, BÉLA PIKÓ<sup>4</sup>, ERNŐ K. MAKÓ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SEMMELWEIS UNIVERSITY BUDAPEST, ONCORADIOLOGY CLINIC

<sup>2</sup>ONCORADIOLOGY CENTER KECSKEMÉT

<sup>3</sup>PÉTERFY HOSPITAL BUDAPEST, ONCOLOGY DEPARTMENT

<sup>4</sup>COUNTY HOSPITAL GYULA, ONCOLOGY DEPARTMENT, HUNGARY

**Souhrn:** Kombinace chemoterapie má při léčbě karcinomu prsu důležitou úlohu. Jako podpůrné prostředí může její aplikace prodloužit celkové přežití bez obtíží. Ifosfamid a Paclitaxel mají schopnost vyvolat při tomto onemocnění účelovou reakci nádoru. Jejich kombinace je novým časovým plánem při ošetřování pokročilého karcinomu prsu. 13 pacientů, u nichž došlo po antracyclinu k recidivě, dostávalo tuto kombinaci buď jako výchozí podpůrnou terapii, nebo jako chemoterapii první linie. Léčba 1. den sestávala ze 135 mg/m<sup>2</sup> paclitaxelu a pokračovala 2.–4. den 1700 mg/m<sup>2</sup> ifosfamidu. Pacienti kombinací velmi dobře snášeli. Výsledkem je jedna celková a pět částečných reakcí. Zásadou jejich různých mechanismů činnosti a jednoznačně nehematologických profilů toxicity bude pravděpodobně kombinace ifosfamidu a paclitaxelu lákovou alternativou při ošetřování metastatického karcinomu prsu.

**Summary:** Combination chemotherapy plays an important role in the treatment of breast cancer. Administration of them like adjuvant setting can prolong the disease free and overall survival. Both ifosfamide and paclitaxel are able to produce objective tumor response in this disease. The combination of them is a new schedule in the management of advanced breast cancer. 13 patients relapsed after antracycline based adjuvant or first line chemotherapy received this combination. Treatment consisted of 135 mg/m<sup>2</sup> paclitaxel on day 1, followed by 1700 mg/m<sup>2</sup> ifosfamide on days 2–4. The combination was well tolerated. One complete and five partial responses resulted. Due to their different mechanisms of action and their distinct non-hematological toxicity profiles, the combination of ifosfamide and paclitaxel seems to be an attractive option in the management of metastatic breast cancer.

#### Introduction

Cytotoxic medication plays a central role in the treatment of breast cancer. Adjuvant therapy can reduce the risk of recurrence and death among women with early-stage disease.<sup>1</sup> In advanced stage breast cancer chemotherapy offers a significant opportunity for palliation and longer survival.<sup>2</sup> Until the 1990's the classical chemotherapy of breast cancer has been based on several families of drugs ranging from alkylators to intercalators, antimetabolites and tubulin inhibitors.<sup>3</sup> Although many cytotoxic drugs have proven activity in breast cancer, from the 1980's combination of alkylating agents and antracyclines have been being most extensively used as first line treatment of advanced breast cancer.<sup>4,5,6</sup> Antracyclines are among the most active first line drugs in advanced breast cancer, achieving objective response rates of 40–50% when used as single agent<sup>7</sup> and of up to 70% in combination regimen.<sup>8</sup> In spite of this the overall survival of treated patients did not change significantly because of the low complete remission rate and short duration of responses.<sup>9</sup> However, increasing use of antracyclines in adjuvant treatment in premenopausal and postmenopausal patients has led to limitation of their use in relapsed patients.<sup>10,11</sup> Among the novel agents that emerged in the 1990s (ie. taxanes, vinorelbine, gemcitabine) the taxanes appear to be the most promising and probably will be remembered in the future as the chemotherapies of the 1990s.<sup>3</sup>

The first taxane is the paclitaxel, with schedule-dependent activity. Used as first line treatment its response rates ranges from 29% to 62%.<sup>12</sup> In a phase II trial it was found 26% response rate in antracycline-resistant patients and 36% as a first line therapy also in a phase II randomised study.<sup>13</sup> Preclinical studies demonstrate additive and/or synergistic interaction between taxanes and ifosfamide. Ifosfamide is an isomeric analogue of cyclophosphamide. Early preclinical studies demonstrated a wider spectrum of ifosfamide activity compared with its parent compound. In addition incomplete cross-resistance between the various alkylating agents was observed. Using like first-line therapy, ifosfamide has also reported to produce objective tumor responses in 45% of cases, complete responses has occurred in 10% of the patients.<sup>15</sup> In patients treated previously by cytotoxics, ifosfamide treatment can lead to objective responses in 15–20% of cases.<sup>16,17</sup> Based on the above mentioned the combination of ifosfamide and paclitaxel seems to be an attractive option in the management of metastatic breast cancer, like salvage regimen.<sup>18</sup> Due to the different mechanisms of action of ifosfamide and paclitaxel and their distinct non-hematological toxicity profiles, we used this combination to the patients who relapsed after the antracycline based adjuvant or first line chemotherapy.



## Patients and Methods

### Treatment program design

This was a treatment program for investigating the effect of ifosfamide and paclitaxel combination treatment after failure of anthracyclin treatment in advanced breast cancer. Our plan was to determine the time to progression (TTP), the survival and to measure the tumor response.

### Patient population

To enter this treatment program the patients were required to have histologically proven primary breast cancer that had progressed after a complete anthracyclin based adjuvant chemotherapy or after first line anthracyclin treatment for advanced disease. Prior hormonal therapy for advanced disease was not allowed. Up to now 13 patients were included in the program.

### Examination

Blood cell count, serum biochemistry (AST, ALT, alkaline phosphatase, bilirubin, creatinine, calcium, sodium, potassium), ECG and staging investigations: chest X-ray, bone scintigraphy and bone X-ray, when it was indicated, and ultrasound or computer tomography of the liver were performed before the therapy started. Laboratory values: AGC  $\geq 1500$  u/L, platelets  $\geq 100,000$  u/L, total bilirubin  $\leq 2 \times$  ULN, AST or ALT  $\leq 2 \times$  ULN. ULN = upper limit of normal range

Lesions were assessed every third course, at treatment discontinuation. Response evaluation was performed according to WHO recommendation with modification by the EORTC.<sup>9</sup>

### Treatment program

Patients received paclitaxel as a 3-hour intravenous infusion on day 1 of each cycle in doses of  $135 \text{ mg/m}^2$ . Premedication was given before the administration of paclitaxel: methylprednisolone 100 mg orally, midnight and at 6 o'clock

am before paclitaxel, plus chloropyramine 50 mg iv and ranitidine 50 mg iv 30-60 min before, and ondasetron 8 mg iv 30 min before the drug administration. Ifosfamide was given at  $1.8 \text{ g/m}^2$  with mesna  $360 \text{ mg/m}^2$  iv., 15 min before respective 4 and 8 hours later, on days 2-4. The two drugs were given on separate days because of the long administration period of each.

### Toxicity

The combination of ifosfamide and paclitaxel was well tolerated. Nausea and vomiting WHO grades 1-2, alopecia grade 2 and neutropenia grade 1-2 were seen in most patients. There was no grades 3-4 infection. Grade 3 nail toxicity in 1 patient, grade 3 fluid retention in 1 patient, grade 3 neuropathy in 2 patient were detected. Four patients had reversible grade 3 neutropenia. Less common toxic effect consisted of a mild local phlebitis in 1 patient and a mild cutaneous hypersensitivity reaction also in 1 patient.

### Results

13 patients with metastatic breast cancer were treated with combination of ifosfamide and paclitaxel, between December 1997 and July 2000 in four oncological centers. There were given 84 cycles (2-12), median cycles per patients 6.46. The median survival was 21.6 month; the progression free survival 7.0 month. Overall responses (CR+PR) were seen at 6 patients, stable diseases at 3 patients and progression of the process at 4 patients. (table 3.)

### Discussion

In the preclinical studies the cell-killing effects of chemically induced DNA damage by alkylating agents are intensified by paclitaxel.<sup>19,20</sup> In the clinical setting paclitaxel has shown enhanced activity and possible synergistic effect when combined with alkylating agents ifosfamide/cyclophosphamide.<sup>21</sup> Paclitaxel inhibits the energy-dependent enzymatic reactions, by disengaging activated intracellular phosphate (e.g. ATP and GTP), required for repair of the DNA damage induced by ifosfamide (prevention of DNA strand preparation and unwinding). The synergistic interaction between paclitaxel and DNA-damaging agents is based on the ability of paclitaxel to slow the DNA-process. For this reason is important the administration of ifosfamide after paclitaxel.<sup>22</sup> The cytotoxic interaction of 4-OOH-ifosfamide with various other clinically relevant drugs, including doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel were evaluated by classic isobologram analysis in a panel of established human ovarian and breast cancer cell lines. On the basis of isobologram analyses of drug interactions in vitro was demonstrated that applying ifosfamide before paclitaxel resulted in drug antagonism, administering ifosfamide concurrently with paclitaxel was additive, and administering ifosfamide after paclitaxel was synergistic.<sup>23,24</sup> In the first phase I studies on the combination of ifosfamide and taxanes the major toxicity was granulocytopenia grade 3 and 4, which occurred in 89% of all courses, and appeared to be ifosfamide dose dependent.<sup>25</sup> The optimal doses of paclitaxel ( $135\text{-}200 \text{ mg/m}^2$ ) and ifosfamide ( $1.5\text{-}5.0 \text{ g/m}^2$ ) have to be established in the future.<sup>26</sup>

### Conclusions:

Our data should indicate that ifosfamide -and paclitaxel -based combination programs are potential clinical values for metastatic breast cancer relapsed after anthracyclin therapy. The regimen is feasible for patients with tolerable toxicity. Further studies with more patients are warranted.

**Table 1.** Patient Characteristics N=13

Median age (range)	48 (27—66)
ECOG Performance Status	
0-1	10
2	3
Prior chemotherapy for adjuvant disease: 8	
FEC /FAC	4
4Ag8CMF	4
1st line chemotherapy for metastatic disease	5
Organ involved at time of metastases:	
lung	7
lymph nodes	6
liver	5
bone	4
chest wall	4
pleural effusion	2
Number of organs involved	
=1	5
=2	6
$\geq 3$	2

**Table 3.** Response to paclitaxel and ifosfamide

CR (complete remission):	1
PR (partial remission):	5
SD (stable disease):	3
PD (progressive disease):	4

## Literatura:

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy. 133 randomized trials involving 31,000 recurrences and 24,000 death among 75,000 women *Lancet* 339, 71-85, 1992
2. Henderson IC: Chemotherapy for metastatic disease. in Harris JR, Hellman S, Henderson IC et al (eds) *Breast Diseases*, Philadelphia, PA, Lippincott, 1991, pp 604-665
3. Nabholz JM, Lindsay MA, Hugh J et al.: The academic global virtual concept in clinical cancer research and its application to breast cancer: The Breast Cancer International Research Group *Semin in Oncol Vol 26, No 3 Suppl 8 (June) 1999*, pp 4-8
4. Tannock IF, Boyd NF, De Boer G et al: A randomized trial of two dose levels of cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy for patients with metastatic breast cancer. *J. Clin Oncol*: 6:1377-1387, 1988
5. Habeshaw T, Paul J, Jones R et al: Epirubicin at two dose levels with prednisolone as treatment for advanced breast cancer: The results of randomized trial *J. Clin Oncol* 9:295-304, 1991
6. French Epirubicin Group: A prospective randomized phase III trial combination chemotherapy with cyclophosphamide, fluorouracil, and either doxorubicin or epirubicin *J Clin Oncol* 6:679-688, 1988
7. Henderson IC: Chemotherapy for metastatic disease. In Harris Jr, Hellman S, Henderson IC et al (eds): *Breast diseases*, second edition, Philadelphia, PA: Lippincott 1991, 604-65
8. Mouridsen HT: Systemic therapy of advanced breast cancer *Drugs* 1992, 44(Suppl4):17-28
9. Pagani O, Sessa C, Martinelli G et al.: Dose-finding study of epirubicin and docetaxel as first-line chemotherapy in patients with advanced breast cancer. *Ann of Oncol* 10:539-545, 1999
10. Coombes RC, Bliss JM, Wils J et al: Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil versus fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide chemotherapy in premenopausal women with axillary node-positive operable breast cancer: Results of randomized trial. *J. Clin Oncol* 14:35-45, 1996
11. Docetaxel (Taxotere) An effective agent in the management of second-line breast cancer *Semin in Oncol Vol 22 No 6, Suppl 13, 1995:pp22-28*
12. Seidman AD. Single-agent paclitaxel in the treatment of breast cancer Phase I and II development *Semin in Oncol Vol 26 No 3 Suppl 8 1999 pp 14-20*
13. Nabholz JM, Gelmon K, Bontenbal IM et al: Multicenter randomized, comparative study of two doses of paclitaxel in patients with metastatic breast cancer *J Clin Oncol* 14: 1858-1867, 1996
14. Kaijser GP, Beijnen JH: Oxazaphosphorines: Cyclophosphamide and ifosfamide. in Grochow LB, Ames MM (eds): *A clinician's Guide to chemotherapy, pharmacokinetics and pharmacodynamics* Baltimore, MD WilliamsWilkins, 1998, pp 219-258
15. Hortobagyi G: Activity of ifosfamide in breast cancer *Semin Oncol* 19 (6Suppl12):36-41, 1992
16. Becher R, Hofeler H, Kloke O et al: Ifosfamide, methotrexate and 5-FU in advanced pretreated breast cancer *Semin Oncol* 16:56-59, 1989
17. Fields KK, Effenbein GJ, Perkins JB et al: Two novel high-dose treatment regimens for metastatic breast cancer - ifosfamide, carboplatin, flutemetamol and mitoxantrone plus thiotepa: outcomes and toxicities *Semin Oncol* 20:59-66, 1993
18. Murrad AM, Guimaraes RC, Amorim WC et al: Phase II trial of paclitaxel and ifosfamide as a salvage treatment in metastatic breast cancer *Breast Cancer Res. And Treatment* 45:47-53, 1997
19. Tischler RB, Geard CR, Hall EJ et al: Taxol sensitizes human astrocytoma cells to radiation *Cancer Res* 52: 3495-3497 1992
20. Tischler RB, Schiff PB, Geard CR et al: Taxol a novel radiation sensitizer *Int J Rad Oncol Biol Phys* 22: 613-617, 1992
21. Bunnell CA, Thompson L, Buswell L et al: A phase I trial of ifosfamide and paclitaxel with granulocyte-colony stimulating factor in the treatment of patients with refractory solid tumors. *Cancer* 82: 561-566 1998
22. Kosmas C, Tsavaris NB, Polyzos A et al: Phase I study of dose-escalated paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin (PIC) combination chemotherapy in advanced solid tumors *British J of Cancer* 2000, 82(2): 300-307
23. Yasuo, Y., Tatsuya T., Sachiko A., et al.: Effect of 4-hydroperoxy ifosfamide in combination with other anticancer agents on human cancer cell lines *J Orthop Sci* 4:231-237, 1999
24. Dittich C: Ifosfamide: Actual data, new insights, and persisting questions *Semin in Oncol Vol 27, No 1, Suppl 1 (febr) 2000, pp1-2*
25. Pronk LC, Schrijvers D, Schellens JHM et al: Phase I study on docetaxel and ifosfamide in patients with advanced solid tumors *British J of Cancer* 1998 77(1) 153-158
26. Vanhoefler U, Schleucher N, Klaassen U et al: Ifosfamide-based drug combination: preclinical evaluation of drug interaction and translation into the clinic *Semin in Oncol Vol 27, No 1, Suppl 1, 2000, pp 8-13*

# knihy

## MANAGEMENT OF PATIENTS AT HIGH RISK FOR BREAST CANCER

VOGEL, V. G. (ED.)

Blackwell Science, Oxford 2001

306 str., 62 obr., 36 tab., ISBN 0-632-04323-7, cena 75,- GBP

Tato kniha, jejímž editorem je profesor na univerzitě v Pittsburgu, byla napsána za spolupráce 28 odborníků z USA a Kanady. Kniha si klade za úkol poskytnout klinikům informace o stanovení rizika zhoubného nádoru v prsu a prevenci tohoto onemocnění. Editor knihy uvádí v předmluvě, že mnoho kliniků určitě není obeznámeno s postupy uvedenými v knize a mají malé zkušenosti s hodnocením a zvládnutím rizika zhoubného nádoru. Temata jednotlivých kapitol knihy: epidemiologie, genetické faktory (tři sdělení), kvantitativní stanovení rizika, ovariální karcinom (dvě sdělení), zobrazování u pacientek s vysokým rizikem, perkutánní biopsie, novější metody zobrazování, speciální klinika (ústav) pro stanovení rizika, profylaktická mastektomie, chemoprevence, psychologická péče o ženy s rizikem nádoru prsu, právní a etické otázky, porovnání nákladů a efektivity při identifikaci žen s vysokým rizikem prsního a ovariálního nádoru, strategie prevence těchto onemocnění. Dále je věnována bližší pozornost některým sdělením.

V první kapitole L. H. Kuller podrobně rozebírá faktory, jež zvyšují riziko a faktory toto riziko snižující, měřitelné determinanty rizika, úlohu stravy aj. W. S. Rubinstein poskytuje přehled genetických syndromů zvyšujících riziko nádoru prsu, metod genetického testování a genetického poradenství. S. O'Neill pojednává o dvou modelech kvantitativního stanovení rizika publikovaných M. H. Gailem a spol. v r. 1994. F. J. Couchem a spol. v r. 1997 a dalšími autory. Tyto modely dovolují hodnocení vlivu rodinné anamnézy na riziko nádoru prsu, dovolují odhad pravděpodobnosti, že žena je nositelkou specifické genetické mutace aj.

Velmi kontroverzní v prevenci ovariálního karcinomu je úloha profylaktické ooforektomie (A. S. Y. Sit, R. P. Edwards). U mladých žen: abnormální vyšetřením prsu může kombinace ultrazvukového vyšetření a omezené mamografie (v závislosti na věku pacientky) napomoci odlišit benigní nález od ložisek, jež jsou pravděpodobně maligní; doporučuje se roční mamografický screening žen ve věku 40 let a starších ke snížení mortality v důsledku nádoru prsu a zlepšení kvality života (K. M. Harris). Do souboru vyšetřovacích metod u diagnosticky obtížných případů se zařazuje tomografie pozitronovými zářiči (PET), jednofotonovými zářiči (SPECT) a zobrazování magnetickou rezonancí (MRI) (K. C. Shestak a spol.). Autoři kapitoly o profylaktické mastektomii uvádějí, že tento chirurgický zákrok snižuje výskyt zhoubného nádoru prsu u pacientek se středním a vysokým rizikem, avšak vyjadřují naději, že v blízké budoucnosti budou všechny indikace k profylaktické mastektomii vyloučeny. D. M. Posluszny a A. Baum rozebírají přímý neochoť žen s vysokým rizikem nádoru prsu podstupovat vyšetření: důvody jsou komplexní, lze však vyléčit dva faktory: vnímání rizika a emocionální reakci. Podle A. Trentham-Dietze a spol. je prevence nádoru prsu obtížná vzhledem k neúplnému porozumění biologii této choroby; úspěšnost preventivních opatření v široké populaci závisí na jejich přijatelnosti, snadné a produkovatelnosti, malé četnosti vedlejších účinků a nízkých nákladech.

Odbornou úroveň knihy i formální úpravu je možné označit za vynikající. Přehledné uspořádání textu, logický výklad, citlivé praktické věci mnohými odkazy na literaturu a tvůrčí přístup autorů kapitol ke zpracování problematiky usnadňují četbu a orientaci v obsahu. Editor v předmluvě uvádí, že příspěvky odborníků mohou být základem pro vytvoření nové klinické subspecializace zabývající se rizikem zhoubných nádorů prsu. Adresa pro objednání: Blackwell Science, 108 Cowley Road, Oxford Services, Ltd, P.O. Box 269, Abingdon, Oxon OX14 3UE, UK, tel. +44

## OECI SCIENTIFIC MEETING AND GENERAL ASSEMBLY, ISTITUTO EUROPEO DI ONCOLOGIA, Milan, June 9-10, 2001

FAIT V...  
Masarykův onkologický ústav Brno

Setkání probíhalo v prostorách IEO, mělo část odbornou a organizační, v odborné části byla hlavní problematikou otázka sentinelových biopsií z různých aspektů, další problematikou byla otázka chemoprevence.

### 1. U. Veronesi: Karcinom prsu

Prof. Veronesi se zdůraznil prokázanou skutečností, že disekce axily u karcinomu prsu ani ve 30letém sledování nezlepšuje prognózu. Falešnou negativitu při vyšetřování sentinelové uzliny udává 3,2%, což nepřevyšuje falešnou negativitu při disekci axily. Zmínil možnost jednoduchého odstranění sentinelové uzliny v oblasti vnitřní mamární žíly, obvykle ze stejného řezu jako odstranění tumoru v prsu. Uvedl také techniku vyšetření sentinelové uzliny na zmrzlo, kterou potom dále rozebral G.Viale.

### 2. N. Mozzillo: Melanom a jiné nádory

Ve svém úvodu uvedl hlavní oblasti aplikace techniky sentinelových uzlin kromě prsu.

Na prvním místě je to pochopitelně maligní melanom, kde je již jedná o téměř standardní proceduru, zdůraznil poměrně dlouhou dobu učení, ke zvládnutí této techniky je nutno minimálně 30 operací. Možnost dokonce i po proběhlé široké excizi, úspěšnost je však nižší.

U nádorů hlavy a krku se jedná o poměrně obtížnou oblast, a úspěšnost metody je výrazně nižší, udává se 12-41% falešně negativních nálezů, až 30% falešně pozitivních, ve více než 10% jsou přítomny mnohočetné sentinelové uzliny, a 18% sentinelových uzlin se nachází mimo klasické spádové oblasti. I přes tyto obtíže je však možnost vyhnout se radikální disekci nesmírným přínosem.

S vyšetřováním sentinelových uzlin u karcinomu žaludku jsou zatím menší zkušenosti, existuje však možnost i laparoskopického přístupu, především u drobných nádorů je výsledek rozhodující pro volbu mezi radikální gastrektomií s lymfadenektomií nebo lokální excízi žaludku.

U nádorů kolorekta je úspěšnost hledání sentinelové uzliny 70-100%, kromě zpsněného stadiu zde v některých případech vede ke změně rozsahu operace. U vulvárních nádorů je úspěšnost 83-100%, zde zjednodušuje i rozhodování o straně inguinální disekce.

Dále byla stručně zmíněna možnost vyšetřování sentinelových uzlin u nádorů plic, jícnu, štítnice a jater

### 3. G. Paganelli: Radioaktivní látky

Popsal možnosti radionavigovaného vyhledávání sentinelových uzlin. Podmínkou je kombinace s lymfoscintigrafii. Přesnost radionavigovaného vyhledávání závisí na velikosti partikulí radioaktivního nosiče, optimální velikost, která zajistí vychytání skutečně jen v první uzlině je cca 200-300nm. Velikost u komerčně dostupných preparátů je však výrazně nižší, konkrétně u t.č. jediného dostupného preparátu v EU ( a s i i u n á s ) je cca 50nm. Tedy větší množství sentinelových uzlin je zčásti způsobeno průtokem do dalších uzlin. Doporučuje podávání dávek cca 0,1-0,3mCi Technecia 99. U karcinomu prsu, doporučuje podávání v malém množství, cca 0,2ml, podkožně nad tumor, nebo lépe peritumorálně, při intratumorálním podání až ve 30% nedochází k postupu nosiče, toto podání však lze s výhodou využít u nehmotných lézí k jejich předoperačnímu označení, současně s podáním hluboko pod tumor, (ROLL, technika)

### 4. A. Giuliano: Modré barvivo

Popsal svou klasickou techniku s využitím barviva, sondu nevyužívá, doporučuje podání 3-5ml 1%lymfazurinu peritumorálně. Ve Spojených Státech je technika sentinelové biopsie prosazována jako standard, s doporučením následně disekce při pozitivně sentinelové uzliny. Doporučuje histologické vyšetření z parafinových řezů, při sériovém prořezání, běžně vyšetření na zmrzlo nedoporučuje. Definitivní histologie dle jeho slov prodlužuje čekání o jeden, maximálně dva dny!

### 5. Chirurgické techniky u karcinomu prsu

#### A) V. Galimberti

Chirurgická technika u karcinomu prsu je doporučována většinou s použitím scintilační sondy, incise z axille délky cca 2-3 cm, při požití sondy nemusí být mimo eventuelní incísi pro disekci, zásadou je nepoškodit nervové cévní struktury, čímž by se miniinvazivní metody znehodnotila. Je-li přítomna, je vhodné odstranit i uzlina při v. mammaria interna.

Je možno použít lokální anesthézii, kontraindikací k této je však obezita, zachycení sent. Uzliny v povodí v. mammaria interna a uzlina mimo I. etáž (tedy indikací lze stanovit až po lymfoscintigrafii). Znovu byla zmíněna možnost ROLL, techniky (Radioguided Occult Lesion Localisation)

#### B) G. Canevese

Možnost sentinelové biopsie i po proběhlé lumpectomii, s injekcí do okrajů po excízi, výsledky lehce nižší, zdůrazněna nutnost velmi opatrného odstranění uzliny a vyhnout se pálení v okolí uzliny. Část mikrometastáz bývá při

tomna těsně pod pouzdrém a po dekortikaci nebo poškození pálením nemusí být zachyceny.

### 6. O. E. Nieweg: Chirurgické techniky u melanomu:

Jednoznačné doporučení kombinace techniky modrého barviva a scintilační sondy (v našich podmínkách opět problém – chybění barviva). Jmak upozorněno na skutečnost, že v 7% případů je sentinelová uzlina mimo přirozenou spádovou oblast, falešná negativita se ukazuje být cca 10-22%. Je pozorován vysoký výskyt 13-18% intransitních metastáz při pozitivní sentinelové uzlině. Upozornil i na možnost nestejného výsledku, při opakovaných lymfoscintigrafích s odstupem 1 týdně až ve 12% případů rozdílný nález.

### 7. B. Luibonski: Chirurgické techniky u nádorů hlavy a krku:

Nastíněna byla historie krčních disekcí od radikálních krčních disekcí po dnešní regionální disekce. Existence poměrně přesně definovaných regionů a jejich spádovosti, s možností disekce příslušných regionů s relativně malou morbiditou potřebu používání techniky sentinelových biopsií v oblasti hlavy a krku poněkud snižuje, nicméně i zde se tato technika pomalu prosazuje.

### 8. S. Saha: Chirurgické techniky u břišních nádorů:

Jedná se především o GIT nádory, konkrétně u kolorektálních nádorů je u 10-20% případů přítomna pouze mikrometastáza, k jejíž detekci je zapotřebí velmi důkladně vyšetřit uzlinu, v 69-72% se jedná o metastázy do 5mm. V případě kolorektálních nádorů se tedy nejedná ani tak o vyhnout se odstranění regionálních metastáz, které jsou standardními resekcemi odstraněny, jako spíše o označení uzlin, kterým má patolog věnovat zvýšenou pozornost. Je možno použít scintilační sondy (problém aplikace nuklidu na sál), přednost je dávana barvivu. Autor požívá kombinaci vitální modří s 10% fluoresceinem, který září při osvětlení Woodovou lampou, a jehož výhodou je dobrá viditelnost i u obézních pacientů. (Snad by fluoresceinem mohla být patení modř nahrazena?) Barvení je v zásadě možné jak in situ, tak i ex vivo na preparátu. Autor upozorňuje na cca 5,4% případů, kdy sentinelová uzlina se nachází včetně metastáz mimo obvyklé hranice resekcí – například v osovce k lénální flexuře. Falešná negativita je cca 4%.

### 9. G. Viale: Použití zmrzlých řezů:

Metodika kompletního sériového zpracování na zmrzlo, používána v IEO, uzlina rozpolena, sériově prokrájeno, 30 párů řezu po 50mm, je-li uzlina větší, dále krájeno po 100mm. Z každého řezu dva řezy, jeden k barvení HE, při suspekci na tomto se druhý barví imunohistochemicky na cytokeratin (E-POS). Postupuje se od středu, kde je největší pravděpodobnost záchytu k okrajům, pozitivní výsledek je ihned hlášen na sál, vyšetření údajně trvá 30-40minut. Průměrný počet pozitivních uzlin u Ca prsu udává na 34%, pravděpodobnost korelace s velikostí: při pT1mic-4%, pT1a-5%, pT1b-20%, pT1c-39%, pT2-46%, pT3-66%, dále koreluje s histologickým typem, při medulárním Ca je záchyt 0%, bez korelace se stavem SR, koreluje s přímou vaskulární invazí, při přítomnosti 69,7%, bez 22,8%.

22% pacientek s mikrometastázou v uzlině má další metastázu v axille, pravděpodobnost přítomnosti další metastázy v axille závisí na velikosti mikrometastázy, u mikrometa pod 1mm ve 15,6%, nad 1mm je 36,4%. Imunohistochemie není výrazně lepší než prostě barvení HE, doporučuje se pouze při suspekci nebo nejasnosti. Obisková cytologie vhodná pouze u metastaskopicky suspektních uzlin.

Možnost falešně pozitivity, existují simulátory mikrometastázy

- kapsulární névy
- benigní epitelální inkluze
- možnost pasivního transportu epitelálních buněk po traumatu - zde zcela nemožné odlišení

### 10. P.A. Ascierto: Úloha molekulárně biologických metod

Jedná se především o RT-PCR, která je schopna identifikovat jednu pozitivní buňku v 10 000 000 buněk. Jako signální molekuly lze použít u melanomu tyrosinázu, MUC8, p67, MelanA, GAPDH, za nejlepší se t.č. považovává kombinace tyrosinazy a MelanA. Byla dokumentována studie, které prokazují zhoršené přežívání pacientů s pozitivní PCR v sentinelové uzlině při negativní histologické nálezů. Zmíněna byla i možnost detekce v periferní krvi. Obecně jsou však tyto metody hodnoceny jako až příliš citlivé a tudíž produkující informace, které v současnosti neumíme dobře zhodnotit.

### 11. N. Cascinelli:

Ve svém příspěvku v zásadě zhodnotil výsledky studie WHO melanoma group, které spolu s jinými studii ukazují, že technika sentinelových biopsií u melanomu vyžaduje určitou dobu učení, a poté má prakticky stejné výsledky na všech pracovištích. Vzdějším produktem je pochopitelně zásadní rozdílná prognóza pacientů s pozitivními a negativními nálezy.

### 12. A. Goldhirsch: Adjuvantní terapie

Vystoupil s provokativním projevem, který de facto zpochybňuje jak stažení o zjevně stadiu sentinelovou biopsií, tak i vlastní disekce, ve velice logickou argumentaci, že v současné strategii terapie karcinoma prsu, ale i mnoha jiných nádorů nehraje stav uzlin tak zásadní roli, jak je proklamováno, adjuvance je vázavou takřka do všech stádií. Pro rozhodování o adjuvanci jsou t.č. nejdůležitější informace o stavu steroidních receptorů, o ním o cích HER2 a proliferaci pomocí ki67. V případě objevení se účinnějších léků

pak bude přesný staging zcela zbytečný, podobně jako dnes hraje jen podružnou roli v plánování terapie testikulárního karcinomu.

### 13. J. Van Den Steene: Úloha radioterapie

Přednáška do bloku sentinelových uzlin minimálně zapadající, ukazující zlepšení přežití a DFI po adjuvantním ozáření

### 14. A. Decensi: Farmakoprevence karcinomu prsu

Studie NSABP-P1 studie s podáváním Tamoxifenu zdravým ženám prokázala snížení výskytu invazivních a neinvazivních karcinomů, současné snížení počtu zlomenin, současné trojnásobné zvýšení endometriálních karcinomů, zvýšení výskytu tromboembolických příhod.

Jediným současným způsobem určení rizikovitosti je Gailova metoda dle anamnestických rizikových faktorů, která funguje na populaci, určení rizika pro jednotlivou ženu je nedostatečné. Ke zpřesnění je možno využít zhodnocení hormonálního stavu žehy, vyšetření genové a duktální laváž, kterou považuje za velmi přesnou metodu, při které je možno zachytit atypie, při níž je až 5x zvýšené riziko, (až 20% žen ve věku 39 let má přítomen DCIS, LCIS nebo atypickou duktální hyperplasií).

K otázce dávkování tamoxifenu udává studii, při níž pacientkám před operací prsu byl nasazován tamoxifen v různých dávkách a hodnocena hladina Ki67, pokles byl stejný při podávání 20mg i 1mg.

V současné době je zkoumán jako prevence Raloxifen, který nemá endometriální účinek, probíhá studie STAR – TX versus Raloxifen.

V úvahu dále připadají inhibitory aromatáz, Anastrozol a letrozol, v kombinaci s TX však spíše zhoršení účinnosti.

Veškeré hormonální prevence však účinkují pouze za ER pozitivní, ER negativní tumory mají asi jinou etiologii, v rámci prevence zvažovány kombinace TX a statinů, TX a retinoidů, a TX a inhibitory COX2.

### 15. R.W. Stockbrugger: Farmakoprevence kolorektálního karcinomu

Doporučen pozornosti Italský preventivní program.

Studie s prevencí zvýšeným příjmem vlákniny selhaly.

Kam a spolupracovníci v r 1988 publikovali pozorování, u nichž pacienti, z nějakého důvodu pravidelně užívající Aspirin měli o 50% snížený výskyt kolorektálních nádorů, vysoké snížení bylo i u karcinomů prsu. Toto pozorování bylo potvrzeno studií u pacientů s FAP, kde docházelo k redukcí množství polypů. Zavedení do běžné praxe brání především velké množství krvácivých projevů.

Tyto projevy chybí u selektivních inhibitorů cyklooxygenasy 2, teoreticky je možné ovlivnění suprese COX2 genu (funguje u myši).

Zkoušen celecoxib (Calobrex), který jeví minimální toxicitu, vykazuje jasnou aktivitu ve smyslu ústupu polypů i duodenálních plaků.

V organizační části byly předneseny zprávy o hospodaření, přijetí nových členů. Dále byla zhodnocena činnost jednotlivých sekcí, které jsou otevřeny všem zájemcům institucí. Existuje zde skupina, která má na starosti vytvoření standardů, které jsou v zásadě hotovy ve Francii, nyní se pracuje na předkladech, eventuálně úpravách tak, aby mohly fungovat jako Evropské standardy. Velmi zajímavý je projekt telematiky a telemedicíny, který umožňuje kromě jiného okamžitou konzultaci předních odborníků po celém světě a pomoc při zavádění nových technologií.

Další setkání se bude konat 10-12. Května 2002 v Lisabonu a jeho odborným programem bude léčení nádorů thyreoidálních a parathyreoidálních.

## ZPRÁVA Z MEZINÁRODNÍCH SYMPOSIÍ O MNOHOČETNÉM MYELOMU V ROCE 2001

VIIIth. International Myeloma Workshop Banff, Alberta, Kanada 4.-8. 5. 2001

„Recent advances in the management of multiple myeloma“, Heidelberg, 31. 8. - 1. 9. 2001

HÁJEK R., MAYER J.

Interní hematologická klinika FN Bohunice - Brno

**Obecný souhrn:** Každý druhý rok se koná nejvýznamnější setkání specialistů na mnohočetný myelom. V roce 2001 proběhlo v Kanadě za tradiční mimořádně kvalitní účasti. Byla zveřejněna řada nejnovějších výsledků, na které se netrpělivě čekalo. Přestože se symposium v Heidelbergu konalo 3 měsíce po významném setkání specialistů na mnohočetný myelom (MM) v Kanadě, podařilo se organizátorům zajistit účast „top 10“ světových odborníků, zvláště pak z USA. Dvoudenní intenzivní jednání muselo být zákonitě odlehčeno od méně důležitých témat. To dalo jednání velmi akční ráz, zvláště pak když některé skupiny uvedly svá klíčová sdělení až tady. Níže uvedeny jsou informace z obou událostí.

### I. Klinická část

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění charakterizované zhoubnou proliferací jednoho klonu plasmatických buněk, které produkují monoklonální imunoglobulin (M-Ig). MM se podílí 1% na četnosti nádorových onemocnění a 10% na všech hematologických nádorových onemocněních. V současnosti je využívána léčebná strategie s použitím vysokodávkované chemoterapie s podporou periferních kmenových buněk (PBSC). Zpravidla jsou dlouhodobé výsledky nejméně o 1 rok lepší než výsledky standardní léčby (Barlogie Banff 2001, Goldschmidt, Heidelberg 2001). K rozšíření autologního přístupu u MM přispěla velmi dobrá tolerance myeloablativního režimu, s peritransplantační mortalitou kolem 2-3%, tedy s rizikem podobným jako při provedení léčby standardní. Výsledky transplantační léčby jsou velmi povzbuzivé a zavádění dvojíých (tandemových) transplantací se zdá o něco

účinnější než provedení jedné transplantace (Attal, Banff 2001) s dosažením dlouhodobého přežití. V Total Therapy I asi ve 20 % po 10-ti letech (Barlogie Banff 2001). Přesto byla první randomizovaná studie IFM 96 francouzských výzkumníků srovnávající jednu versus dvě transplantace (Attal Banff, 2001) podrobena poměrně ostré kritice neboť statistické zpracování studie nebylo přesvědčivé. Další studie řešící tuto problematiku nejsou dostatečně „zralé“ (Cavo Banff, 2001, Goldschmidt, Heidelberg 2001) a na definitivní odpověď si budeme muset počkat. Z dalších studií zaujala velmi elegantní studie italských kolegů (Boccardo, Banff, 2001), kteří z různých pohledů vyhodnocovali léčebnou účinnost a toxicitu poloviční myeloablativní dávky standardně podávané u MM (100 mg/m<sup>2</sup> melifalanu místo 200mg/m<sup>2</sup>). Jejich výsledky zvláště u starších nemocných s MM byli velmi dobré. Zdá se, že použití poloviční dávky výrazně snižuje toxicitu, ale neovlivňuje klinický výsledek (Boccardo, Banff 2001). Rovněž zaujaly dosud nezralá data randomizovaných studií srovnávající konvenční léčbu s transplantační (Child Banff, 2001, Bladé Heidelberg, 2001). Zdá se, že přínos transplantační léčby nemusí být až tak velký, jak v pilotní randomizované studii IFM 90 ukázali francouzští výzkumníci. Tradičně stále více dat zaznává o alogenním přístupu. Z dat EBMT prezentovaných Gahrtonem (Banff, 2001, Heidelberg, 2001) vyplývá, že díky kvalitní podpurné léčbě zvláště infekčních komplikací klesla peritransplantační mortalita (den +100) z neakceptovatelných více než 40 % na 10 % . Novější přístupy využívající redukovány myeloablativních režimů, jsoou dále zdokonalované (Lokhorst Banff 2001, Storb Banff, Heidelberg, 2001) a věkový limit pro mini-alogenní přístup v nových protokolech láme rekord sedmdesát let (Gahrton Banff 2001, Heidelberg 2001). Alogenní transplantace v podobě minialogenních režimů je stále více zafazovaná up-front a nejmodernější protokoly kombinují autologní transplantaci s následnou minialogenní (Gahrton Banff, 2001, Heidelberg, 2001).

**Angiogeneze:** Úspěšné testování náhodně objeveného léčebného protinyleomového účinku thalidomidu u relabujících nemocných s MM (Barlogie Banff a Heidelberg 2001) nastartovalo mimořádný zájem o problematiku angiogeneze jak na teoretické, experimentální, tak i klinické úrovni (Van Riet, Epstein, Bellamy, Berenson, vše Banff 2001; Vacca, Mohler, vše Heidelberg 2001). Intenzivně se připravují nové inhibitory angiogeneze a prvním z nich, IMiD, je již testován ve studiích fáze I/II (Anderson Banff 2001). I ze říci, že zájem se přesunuje v experimentální i klinické rovině do oblasti „lokalí myelomových buněk“ v kostní dřeni. Tzv. „microenvironment“ se zdá klíčovým pro proliferaci maligního klonu (Anderson Banff 2001). Následně se vedle již dobře známých bisfosfonátů a výše uvedených inhibitorů angiogeneze začíná studovat řada dalších experimentálních léků, jejichž cílem nejsou primárně nádorové buňky, ale buňky v jejich okolí. Většinou jde o různé inhibitory cytokinů, jejichž produkce ovlivňuje myelomové buňky i okolní buňky v kostní dřeni (Dalton, Bakkas, Bartl, vše Heidelberg 2001). Z vyložené praktických klinických otázek byla v diskusích nejvíce řešena toxicita thalidomidu a optimální dávkování tohoto léku jak v indukční léčbě (Barlogie Heidelberg 2001), tak v léčbě udržovací (Durie Banff, 2001). Dlouhodobé nežádoucí účinky tohoto léku nejsou dobře definované a odborná veřejnost bude ještě několik let čekat na dlouhodobá data jak o vedlejších účincích, tak i o účinnosti.

**Prognostika:** Zdá se, že věci se daly konečně do pohybu správným směrem. V rámci International Myeloma Foundation byl vytvořen tým vedený dr. San Miguelem a dr. Greippem, který si dal za úkol vytvořit na podkladě dostupných ověřených dat mezinárodní prognostický index, podobně jak je tomu již například u lymfomu (Greipp Banff 2001). Nejprve bude ověřena platnost indexu pro nemocné léčené standardní (netransplantační) chemoterapií, poté přijde na řadu zpracování prognostického indexu pro nemocné podstupující autologní transplantaci. Z řady dalších prezentací lze podtrhnout význam cytogenetiky (Barlogie Banff 2001) a FISH (Drach Banff 2001, Avet-Loiseau Heidelberg 2001, Fonseca Banff 2001). Delece či jiná aberace chromozomu 13 je dnes považována za významný nezávislý prognostický faktor. Rada pracovních skupin dnes indikuje nemocné k agresivním léčebným postupům mají-li tuto chromozomální odchylku v kombinaci s jiným nezávislým prognostickým faktorem, například vysokou hladinou beta 2 mikroglobulinem (Harousseau Banff 2001, Goldschmidt Heidelberg 2001).

### 2. Experimentální část:

Microarray čipy: Jedním z témat, které dominovalo experimentální části bylo zavádění technologií microarray umožňující vyšetření několika tisíc definovaných genů z nepatrného množství DNA. Jsou známe zejména tři pracovní verze tzv. myelomových čipů, které s následnou robustní statistickou analýzou mohou dále přispět k odhalení patogenez MM a klíčových genů zodpovědných za vznik MM (Shaughnessy Banff 2001, Staudt Banff 2001, Bergsagel Banff a Heidelberg 2001, Backhouse Banff 2001).

Imunoterapie: prulom v oblasti experimentální i klinické imunoterapie se nekonal. Zajímavé je testování nových monoklonálních protilátek (Ozaki Banff 2001, Cremer Heidelberg 2001, Rossi Heidelberg 2001), vakcín sestávajících z dendritických buněk a nádorového antigenu (Massaia Heidelberg 2001), nebo DNA vakcín (Stevenson Heidelberg 2001). Využití telomerasy – respektive její katalytické podjednotky k přípravě univerzálního nádorového antigenu patřilo k největším novinkám této oblasti (Schultz Banff 2001). Zdá se, že vakcíny založené na využití Id proteinu a dendritických buněk nejsou schopné navodit zásadní léčebnou odpověď, i když v některých případech asi do 20 % lze klinickou účinnost pozorovat. Hledají se „silnější“ antigeny, zdo konalují se protokoly imunoterapie.

# ACO, AMDO, CAO, SAKK SCHWERPUNKTSYMPOSIUM. MELANOM, NEUE DIAGNOSTISCHE UND THERAPEUTISCHE MÖGLICHKEITEN.

St. Veit an der Glan, Kärnten. 13.-15. 9. 2001.

V. FAIT

Masarykův onkologický ústav Brno

Setkání se konalo v malebném starobylém městečku St. Veit, které na první pohled upoutá jak malebností svého starobylého centra, tak i velmi krásným okolím. Město je lemováno zeleněnými kopci, na jejichž vrcholcích jsou umístěny bizarní hrady, kostely nebo zříceniny, to vše v dále doplněno alpskými štíty.

Symposium se zabývalo jednotlivými aspekty diagnostiky terapie melanomu a bylo tedy pojato jako setkání všech zainteresovaných oborů, dermatologů, chirurgů, plastických chirurgů, chemoterapeutů i radioterapeutů.

V prvním bloku byly probírány aspekty diagnostické. Prof. Pehamberger probíral základní aspekty epidemiologické a klinické diagnostiky. Z epidemiologického hlediska zdůraznil soustavný nárůst incidence melanomu a zmínil základní rizikové faktory, tedy fototyp, počet dysplastických naevů, v popředí našeho snažení pak musí být jako jediný skutečně preventabilní faktor snaha o minimalizaci expozice UV záření, přičemž používání ochranných opalovacích faktorů se bohužel jeví spíše kontroverzní či dokonce negativní. K otázce expozice v soláriích se staví jednoznačně negativně, dokonce se v Rakousku objevuje snaha činnost solárií administrativně omezit.

M. Binder popsal možnosti dermatoskopie (dermoskopie, epiluminiscence), která u získaných lézí může významně zvýšit přesnost jejich diagnostiky, nicméně při nedokonalém získání tonu naopak významně snižuje. K jejímu využívání je tedy nutný asi 14 denní intenzivní trénink. Jako snaha o objektivizaci dermatoskopie se jeví digitální dermatoskopie (např. Mole-Max), kde kromě omezení subjektivní chyby je dále ceněna možnost opakovaného vyšetřování s přesným srovnáním. Tato metody je obzvláště vhodná pro sledování pacientů s mnoha atypickými naevy, kde diagnostická excise všech podezřelých morf je neúnosná.

R. Hofmann-Wellenhof a spol. popsali novou klasifikaci naevů, jejíž základní typy jsou retikulární, globulární a homogenní typy, popsali pravděpodobný vývoj naevů od dětství. V experimentální části zkoušeli dermatoskopické změny po ozáření naevu UVB, ozařovali vždy polovinu naevu, již po krátké době od ozáření docházelo k výrazným atypickým změnám v dermatoskopickém obraze, s jedním vznikem melanomu in situ. Další částí bylo zhodnocení sunscreensu, tedy polovinu naevu byla ozařena rovnou, polovina krytá sunscrenem, opět významně výraznější změny v přímo ozářené polovině.

I.H. Wolf pak v přehledné přednášce předvedla jednotlivé typy pigmentových lézí, s důrazem především na diferenciální diagnostiku obtížné stavby.

Druhý blok se zabýval stagingem, stagingovými vyšetřeními a markery a chirurgií primárního melanomu

M. Binder ukázal současné stagingové systémy. V současnosti existují v zásadě 3 stagingové systémy, DDG která odpovídá u nás v současnosti platné TNM klasifikaci, méně používaný UICC systém a nová, již přijatá revize AJCC systému. Nový AJCC systém je poměrně komplikovaný, jednotlivé stagingové faktory jsou však podrobně prověřeny klinickými studii a dává relativně nejjasnější představu o prognóze. Pro pacienty zařazované do mezinárodních studií bude nadále požadována tato klasifikace.

G. Weinhilf probíral možnosti stagingových vyšetření včetně jejich ekonomiky. Do popředí jako velmi přesná a citlivá metody, nicméně i velmi nákladnou vystupuje PET. Jako vyšetření, které dle jeho zkušeností má poměrně velkou validitu, doporučuje vyšetřování metalloithoniinu, jehož overexpresie je spojena se špatnou prognózou. Z markerů jsou nejlépe hodnoceny S100 a MIA. Nejasná je zatím úloha RT-PCR vyšetřování maligních buněk v periferní krvi.

M. Frey se zabýval primární chirurgickou terapií melanomu, byla vyčena doporučení radikality excise, která jsou v současné době výrazně tolerantnější, dle jednotlivých autorů se mírně liší. Platí snaha většinu excisí osětit primární suturou, není-li možno, je nejlépe volit lokální lalokovou plastiku, z nichž se jako velmi vhodná v mnohých případech jeví Limbergova plastika, pochopitelně zbývají vždy případy, které je nutno řešit jinými metodami, především transplantáty a složitějšími lalokovými plastikami.

D.F. Kalbermatten představil použití Washiova temporoparietálního retroaurikulárního laloku k rekonstrukci defektu nosu a dolního víčka.

Třetí blok se zabýval sentinelovými biopsiemi. E. Diem přehledně popsal historii, techniku a základní indikace sentinelových biopsií pro maligní melanom, zásadně je doporučována kombinace vyhledávání pomocí gamma sondy a Patentblau V.

H. Sitzinger podal přehled nukleárně medicínské problematiky v této oblasti, zásadně je doporučována přísně intradermální injekce koloidu, lymfoscintigrafie dynamická i statická, zakreslení průmětů ve dvou rovinách, ideálně je velmi těsná spolupráce s chirurgem.

K. Gaída podala přehled rozšířenosti metody v Rakousku, na základě dotazníkové akce.

Dále následoval blok 4 přednášek, hodnotících klinické zkušenosti s touto metodou, většinou spíše charakteru technických zkušeností a úspěšnosti metody, do bloku patřila i naše přednáška, hodnotící soubor 220 pacientů s minimální dobou sledování 22 měsíců, u nichž již bylo možno zhodnotit i relapsy.

J. Wieberneit přednesl své výsledky se souborem 3 pacientů s melanomem anorektálního přechodu. Vzhledem k relativní ojedinělosti těchto případů se jedná o dosti velký soubor. Autoři doporučují pokud možno menší zářok,

tedy pokud lze, raději se vyhnout ambdominoperineální amputaci, sentinelová biopsie pak slouží jako vodičko pro rozsah eventuální lymfadenektomie, teoretický spád je zde od mesorekta a do obou inguin.

T. Schwierz pak zhodnotil zkušenosti svého pracoviště se sentinelovými biopsiemi u kožních nádorů v oblasti hlavy a krku.

Ve čtvrtém bloku byly probírány možnosti ovlivnění pokročilých stadií, tedy chirurgie metastáz, chemoterapie etc.

Th. Rath rozebral množství chirurgické terapie metastáz, tato je indikována při solitárních ložiscích, přičemž je nutno si uvědomit, že i při negativních dalších vyšetřeních jsou v 80-90% případů přítomny vzdálené metastázy. Tedy indikace k resekci je nutno volit velmi uvážlivě.

H. Kittler se zmínil o možnostech systémové chemoterapie, za standard je stále považován DTIC, s RR cca 12,5%, jako nové slibné cytostatikum se u melanomu je nyní Tenzolomid, jeho RR je 13,5%, výhodou je možnost perorálního podání. Kombinované režimy mají v nerandomizovaných studiích relativně vysoké RR, ovšem při randomizovaném srovnání je obvykle efektyvíta srovnatelná s monoterapií.

J. Göhl a W. Lindemann sdělili své zkušenosti z izolovanou hypertermickou perfúsi končetin, která se jeví u mnohočetných končetinových relapsu jako metoda jednoznačně přínosná, byť ne kurativní. Standardem je použití Melphalanu, efektivitu lze zvýšit přidáním TNF.

E. Richtig popsala zkušenosti s paliativním užitím lokální hypertermie u inoperabilních relapsů, jedná se o metodu, která nabízí jisté symptomatické ulehčení. U. Prettenhofer pak popsala zkušenosti se zevní radioterapií pro okulární melanom, nejlepších výsledků dosahují v kombinaci s chirurgickým odstraněním, je však efektivně použitelná i jako samostatná metoda.

Pátý blok se zabýval mechanismy metastazování a možnostmi virové etiologie. E. Richtig popsala možnosti PET diagnostiky, která je schopna velmi úspěšně odhalovat metastázy melanomu, nicméně i tato metoda má asi 8,1% neuspěchů, nevýhodou je velmi vysoká pořizovací i provozní cena. Obtíže mohou nastat především u pacientů se špatně kompenzovaným diabetem.

J. Smolle se zabýval interakcí strumatu a tumoru jako jednoho ze základních mechanismů metastatického procesu spolu s možností koexistence tumoru s původní tkání. Prokázali, že u podkožních metastáz, kde existuje možnost inkorporace tukových buněk do tumoru, je množství inkorporovaných buněk v přímé úměře se špatnou prognózou.

T. Muster v solisticky přednášce ukázal, že u humánního melanomu je možno izolovat partikule retrovirů, a že tyto jsou dále vysoce infekční, virovou etiologii u maligního melanomu je nutno brát v úvahu přinejmenším jako kofaktor.

M. Bergmann přednesl experimentální práci na myších s použitím genové manipulované viru chřipky A, buňky s overexpresí ras jsou pohotovější k onkogenním změnám.

Poslední blok se dotkl možnosti imunoterapie a genové terapie a následně péče

H. Pehamberger se zabýval možnostmi adjuvantní terapie maligního melanomu, stručně zmínil historii především imunoterapie od BCG vakcíny, hlavním důraz byl pochopitelně kladen na imunoterapii interferonem alfa, která prozatím jako jediná přináší signifikantní zlepšení prognózy cca o 10%. Hlavní část přednášky pak byla věnována možnosti ovlivnění odpovědi na chemoterapii antisense oligonukleotidem proti Bcl 2, proteinu, jehož overexpresie blokuje apoptózu. Výsledky ve zřetelém experimentu jsou velmi dobré, klinická studie první fáze proběhla, nyní je již plánována randomizovaná multicentrická studie III. fáze, DTIC 1000mg/m<sup>2</sup> versus DTIC 1000mg/m<sup>2</sup> plus Genasense (antisense oligonukleotid).

A. Schneeberger popsal nejběžnější melanomové antigeny, současně s možnostmi mechanismů úniku. Aktivní imunoterapie může být založena u nádorových buněk nebo na antigenech. Použití nádorové buňky mohou být nerůznějšího původu, a nejrůzněji modifikované. Jednou z možností je transfekce buněk IL-2. Buněčná vakcína aktivuje T-lymfocyty. V experimentu proběhla studie fáze I. S autologními melanocyty transfekovanými IL-2, klinické výsledky přinesly několik parciálních remisí. Metoda nemá zásadní vedlejší účinky, je vak drahá a časově náročná. Plánována je studie fáze II. Současně byl podán přehled nových přístupů k imunoterapii a jejich výsledků.

E. Richtig v posledním sdělení přednesla koncept AMDO sledování pacientů s melanomem. Návrh předpokládá intenzivní sledování 5 let, následně celoživotní sledování. Primární sledování je rozděleno dle stadií, při stadiu 0 (melanom in situ) klinická kontrola 1x za 12 měsíců. Při stadiu IA klinická kontrola jednou za 6 měsíců, sonografie regionální lymfatické oblasti jednou za 12 měsíců, ostatní vyšetření dle klinické potřeby. Ve stadiu IB klinická kontrola po 3-6 měsících, sonografie po 6 měsících, rtg plic a sono břicha a laboratorní vyšetření po 12 měsících, stejné schéma u stadia IIA, u stadia IIB klinická kontrola po 3 měsících, sonografie po 6 měsících, rtg plic, sono břicha a laboratorní vyšetření po 6-12 měsících. Ve stadiu IIC klinická kontrola po 3 měsících, sonografie po 6 měsících, rtg plic, sono břicha a laboratorní vyšetření po 6 měsících, stejné schéma pak u stadia IIIA a IIIB, ve stadiu IIIC doporučuje klinickou kontrolu s laboratorní po 1-3 měsících, sonografii po 3 měsících, rtg plic, sono břicha po 3 měsících, ve IV. stadiu klinickou kontrolu s laboratorní po 1-3 měsících, sonografii regionální uhlí po 3 měsících, rtg plic, sono břicha a CT po 3 měsících. Tento koncept sledování je jistě velmi dukladný a lze předpokládat, že vede v časném zachytu relapsu, otázku je však kromě značné časové a finanční náročnosti i to, jak zaručit aby významný zachyt relapsu a především vzdálených měl skutečně přínivý dopad na osud pacienta.

# onkologické společnosti

## ČESKÁ ONKOLOGICKÁ SPOLEČNOST ČESKÉ LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI J. E. PURKYNĚ

Předseda: Prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc. Tel: (02) 297471  
Vědecký sekretář: Doc. MUDr. Luboš Petruželka, CSc. Tel: (02) 294304  
Adresa: U nemocnice 2, Praha 2, 128 08, Česká republika

### Zápis ze schůze výboru České onkologické společnosti JEP dne 4. 9. 2001

Přítomní: prof. Klener, Prof. Vorlíček, prof. Koutecký, doc. Petruželka, prim. Fischer, dr. Jelínková, dr. Příbylová, prim. Šmelhauz.  
Omluveni: doc. Žaloudík, dr. Drbal.

Hosté: doc. Eckschlager, nám. ministra zdravotnictví Dr. Malina, za VZP dr. Pečenka, doc. Němeček.

1. Kontrola zápisu  
Všechny body splněny
2. Informace o situaci omezující aplikaci Herceptinu  
V současnosti se jedná o stadium zavádění nově registrovaného léku do praxe, není dostatečně finančně krytý pro aplikaci všem nemocným, splňujícím indikace pro aplikaci tohoto léku. Proto byla specifikována centra a v každém centru je možné použít tento lék pro 3 nemocné. Tento limit nelze překročit. Situace je platná do konce roku 2001. K novému roku 2002 budou vypracována nová doporučení pro preskripci herceptinu a nové vymezení indikací, protože současné omezení neodpovídá indikační potřebě. Bude předhodnocen seznam vybraných center. Nemocné, které měly schváleno podávání před 1. 7. 2001 na kód 99999, budou mít dále aplikaci hrazenou z prostředků VZP, pro ostatní rozléčené pacientky (ze zásob dodaných firmou) je nutno požádat firmu o lék na dokončení terapie. Léčbu nelze ukončit.
3. Žádost Dr. Březovského o vyjádření k žádostem: zřízení centra pro thyreoidální diagnostiku a endokrinní orbitopatie ve FNM, zřízení centra pro pneumologii ve VFN.  
Výbor na základě hlasování nepodporuje vznik nových center naopak navrhuje revizi a aktualizaci seznamu center stávajících.  
Dopis: Prof. Klener
4. Předložena zpráva o hospodaření za rok 2000 (Prim. Fischer) a rozpočet na rok 2002. Oba dokumenty výbor schválil.
5. Členská základna  
V současnosti více než 500 členů, nutná revize seznamu – provede pí Amiroucheová.  
Přijetí nových členů: Dvořák Dalibor, MUDr., Malý Ivan, MUDr., Novák Karel, prof. MUDr., DrSc., Šváb Jan, doc. MUDr., CSc., Příborský Miroslav, MUDr., Mec Vlastimil, MUDr., Czudek Stanislav, MUDr., CSc., Matloch Josef, MUDr., Říha Daniel, MUDr., Štěrba Jaroslav, MUDr., PhDr., Pavelka Zdeněk, MUDr., Smrčková Alena, MUDr., Ganevová Marta, MUDr., Drahokoupilová Eva, MUDr., Novotný Jan, MUDr., Svoboda Marek, MUDr.  
Všem bude zasláno písemné oznámení o přijetí.
6. Předání ceny prof. Staška udělované firmou Janssen Cilag bude uskutečněno na JOD.  
Ceny ČLS a ČOS – dosud nedošlo rozhodnutí ČLS-pí. Amiroucheová.  
a) informace o schůzi pediatrické sekce ČOS – doc. Eckschlager. Konání 9.6.2001 v Brně, proběhla volba vědeckého sekretáře – Dr. Klepák – byl předložen návrh této sekce. Navrhované sekce: 1x ročně zasedání sekce 1x ročně schůze pracovních skupin. Probíhá příprava internetových stránek, které budou uveřejněny na www linkos.  
Na Pediatrickém sjezdu s mezinárodní účastí, který se bude konat v příštím roce, bude jeden blok věnován pediatrické onkologii.  
b) informace o chirurgické sekci odloženy na příští schůzi pro nepřítomnost doc. Žaloudíka.  
Programové cíle sekce – zprávu podá doc. Žaloudík na příští schůzi.  
c) Setkání mladých onkologů proběhlo velmi úspěšně. Výbor kladně zhodnotil vydaná abstrakta. Děkovný dopis organizátorům zašle Prof. Klener. Příští téma – ca prsu.
7. Průběžnou aktualizací stránek www linkos pověřuje výbor Dr. Novotný z Onkologické kliniky VFN.
8. Dopisy se žádostí o navržení garantů pro onkologii pro kraj Liberec a Pardubice.  
Výbor není přesně obeznámen s personální situací v těchto oblastech, navrhuje pro Pardubice dr. Pavlíkovou, pro Liberec dr. Hanuše či dr. Bartoše, nutno však ověřit, zda mají specializaci v oboru.
9. Vědecká rada ČLK žádá návrh rozsahu znalostí z onkologie pro rekvifikaci praktických lékařů – vyřídí Dr. Jelínková
10. Ministr zdravotnictví informuje výbor ČLK o zákazu provádění devitalizace na jiných pracovištích mimo ustanovená centra. Stanovisko ČOS k devitalizaci pro Časopis lékařů českých připraví doc. Žaloudík.
11. Akce pod záštitou ČOS JEP v roce 2002:  
JOD termín 17. – 20. 10. 02  
BOD termín bude upřesněn  
VII. Staškův den 26. 3. 2001-09-07  
Den podpůrné léčby – termín bude upřesněn  
Dny mladých onkologů 7. – 9. 6. 2002
12. Výbor ČOS doporučuje všem členům odebrání oficiálních časopisů ČLS – JEP.
13. Dr. Petraš fa Schwarcé žádá výbor ČOS o vyjádření k nové léčivé formě fentanyl – lízátko. Výbor není schopen odhadnout případné množství, zájem však o tuto lék. formu jistě bude.
14. Výbor byl informován o akci, pořádané Ligou proti rakovině 1. 10. 2001 v 9.00 h v Lékařském domě: Sněm o vytýčení aktivit profesionálních a zájmových skupin.
15. Mgr. Mazánková, ÚZIS žádá výbor ČOS o zpracování nové klasifikace MKN-O k vydání. Nutno požádat Mzd o překlad. Vyřídí prof. Klener.
16. a) Doc. Neuwirthová informuje o 49. pracovní konferenci chemoterapeutické sekce dne 20. 11. 2001 v Lékařském domě v Praze – program: Užití vakcín u infekčních a nádorových chorob.  
b) Dr. Kozák informuje o II. sympoziu o Hodgkinově chorobě dne 24. 1. 2002 na III. LF UK
17. Různé :  
a) Ustanovení pracovní skupiny k vymezení indikací pro stanovení prognostických markerů. Výbor navrhuje: prof. Kodet, doc. Řichterová, doc. Petruželka, dr. Jelínková.  
b) Screening v mammologii: Vzhledem k připravovanému zavedení regulérního screeningu karcinomu prsu bude pro ujednocení společného postupu svoláno jednání zástupců výboru Onkologické a Radiologické společnosti. Zajistí Doc. Petruželka.

Prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., předseda  
Doc. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., vědecký sekretář