
klinická onkologie

3/2008

ROČNÍK / VOLUME 21

15. června 2008

VYDÁVÁ / PUBLISHER
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
J. E. PURKYNĚ
CZECH MEDICAL ASSOCIATION
J. E. PURKYNĚ
IČO 444359

V NAKLADATELSTVÍ / PUBLISHING HOUSE
ApS BRNO, spol. s r. o.
IČO 00543535
Božetěchova 2
612 66 Brno
e-mail: papezova@aps-brno.cz

REDAKCE / EDITORIAL OFFICE
Masarykův onkologický ústav Brno
Žlutý kopec č. 7
656 53 Brno

Sekretář redakce / Journal coordinator
Brian Fait
mobil: 775 368 144
Přijetí příspěvků:
e-mail: vukfait@gmail.com
e-mail: fait.brian@gmail.com

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

Vychází 6krát ročně / Issued six times a year
Roční předplatné 180 Kč
pro studenty LF 90 Kč

Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce

Ministerstvo kultury ČR
MK ČR 5158
ISSN 0862-495 X (print)
ISSN 1802-5307 (online)

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

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA
EXCERPTED IN BIBLIOGRAPHIA
MEDICA CZECH

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VÝKONNÁ REDAKČNÍ RADA
MANAGING EDITORS

VEDOUcí REDAKTOR
EDITOR-IN-CHIEF

REJTHAR ALEŠ

VÝKONNÝ REDAKTOR
DEPUTY EDITOR

FAIT VUK

REDAKTOŘI
ASSOCIATE EDITORS

ČOUPEK PETR, Brno
FORETOVÁ LENKA, Brno
HÁJEK ROMAN, Brno
KOCÁK IVO, Brno

SVOBODA MAREK, Brno
VALÍK DALIBOR, Brno
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
ŽALOUdÍK JAN, Brno

REDAKČNÍ RADA
EDITORIAL BOARD

ADAM ZDENĚK, Brno
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava
BARTOŠ JIŘÍ, Liberec
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno
CWIERTKA KAREL, Olomouc
JURGA LUDOVIT, Trnava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava
KLENER PAVEL, Praha
KOVAŘÍK JAN, Brno

KOZA IVAN, Bratislava
MAYER JIŘÍ, Brno
MELICHAR BOHUSLAV, Hr. Králové
ONDROŠ DALIBOR, Bratislava
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
VYZULA ROSTISLAV, Brno
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice

ČESTNÍ ČLENOVÉ REDAKČNÍ RADY
EDITORS EMERITI

BILDER JOSEF, Brno
ECKARDT SANDOR, Budapešť
KLAŠTERSKÝ JAN, Brusel
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

MECHL ZDENĚK, Brno
NĚMEC JAROSLAV, Brno
PLEŠKO IVAN, Bratislava
UJHÁZY VILIAM, Bratislava

Vyzvaný článek

Abrahámová J.

Léčebné postupy u nepokročilých testikulárních germinálních nádorů neseminomového typu 81

Přehled

Vyskočil J., Poprach A., Petráková K., Lakomý R., Vyzula R., Čoupek P.

Seminom v prvním klinickém stadiu – léčebné možnosti 86

Michalová E., Poprach A., Němečková I., Nenutil R., Valík D., Žaloudík J., Vyzula R., Vojtěšek B.

Predikce citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům ex vivo – úskalí a limitace vlastní metody 93

Původní práce

Sauka C., Kohút A., Kundrát I., Janík M.

Polymorfismus genu p53 a apoptóza u pacientů s nádory plic – naše sledování 98

Matějková E., Očadlíková D., Smejkalová J., Mužíková J., Raida L., Toušová K., Pacasová R., Neničková M.,

Tesařová E., Štěrba J., Indrák K., Michálek J.

Selektivní deplece aloreaktivních T lymfocytů a studium protinádorové aktivity specifických klonů T lymfocytů u pacientů s leukémií 104

Fridrichová M., Dienstbier Z., Loučka M., Skala E., Blomannová E.

Výsledky sledování souboru pacientů léčených pro Hodgkinovu nemoc v letech 1971 až 1996 110

Sdělení

Poprach A., Michalová E., Pavlík T., Lakomý R., Vyskočil J., Němeček R., Žaloudík J., Vyzula R., Kocák I., Kocáková I.

Současný stav testování chemorezistence nádorů ex vivo v Masarykově onkologickém ústavu v Brně 116

Aktuality v onkologii

Významné pokroky v klinické onkologii dosažené v roce 2007 124

Onkologické společnosti

Zápis ze schůze výboru České onkologické společnosti dne 29. dubna 2008 v Mníšku pod Brdy 126

C O N T E N T S**3 / 2008****Invited article**

Abrahámová J.

Therapeutic approaches for early stage nonseminomatous germ cell testicular tumors. 81

Review

Vyskočil J., Poprach A., Petráková K., Lakomý R., Vyzula R., Čoupek P.

Treatment of seminoma I stage disease 86

Michalová E., Poprach A., Němečková I., Nenutil R., Valík D., Žaloudík J., Vyzula R., Vojtěšek B.

Chemosensitivity prediction in tumor cells ex vivo – difficulties and limitations of the method 93

Original publications

Sauka C., Kohút A., Kundrát I., Janík M.

Polymorphism of gen p53 and apoptosis in patients with malignant lung disease – our observation 98

Matějková E., Očadlíková D., Smejkalová J., Mužíková J., Raida L., Toušová K., Pacasová R., Neničková M.,

Tesařová E., Štěrba J., Indrák K., Michálek J.

Selective depletion of alloreactive T cells and study of anti-tumor activity of specific T cell clones in patients with leukemia. 104

Fridrichová M., Dienstbier Z., Loučka M., Skala E., Blomannová E.

Results of the monitoring the group of patients treated for the Hodgkin disease in the period of 1971 to 1996 110

Communication

Poprach A., Michalová E., Pavlík T., Lakomý R., Vyskočil J., Němeček R., Žaloudík J., Vyzula R., Kocák I., Kocáková I.

Actual state of ex vivo chemoresistance testing of malignant tumors in Masaryk Memorial Cancer Institute Brno 116

Topicalities in oncology 124

Oncological associations 126

LÉČEBNÉ POSTUPY U NEPOKROČILÝCH TESTIKULÁRNÍCH GERMINÁLNÍCH NÁDORŮ NESEMINOMOVÉHO TYPU

THERAPEUTIC APPROACHES FOR EARLY STAGE NONSEMINOMATOUS GERM CELL TESTICULAR TUMORS

ABRAHÁMOVÁ J.

FAKULTNÍ THOMAYEROVA NEMOCNICE, PRAHA

Souhrn

Autorka se zabývá současnými léčebnými postupy u nepokročilých testikulárních germinálních nádorů ne seminomového typu včetně preinvasivního CIS (carcinomu in situ). Všechna doporučení vycházejí z „European Association of Urology Guidelines 2007“ a z mezinárodně uznávaných rizikových kritérií. Při dodržení všech pravidel jsou nepokročilé testikulární germinální nádory ne seminomového typu prakticky zcela vyléčitelné (< 95 %)

Klíčová slova: testikulární germinální nádory, klinické stádium I, ne seminomy, angioinvasze

Summary

The author deals with current therapeutical approaches for early stage nonseminomatous germ cell testicular tumours, including preinvasive stage CIS (carcinoma in situ). All presented recommendation results from „European Association of Urology Guidelines – 2007“ and are based on respected risk factors of the disease progression. When all recommended approaches are kept, then most of these patients are fully curable (<95).

Keywords: testicular cancer, clinical stage I, germ cells, nonseminoma, angioinvasion

1. Preinvasivní CIS (TIN)

Rada studií se zabývala otázkou vhodnosti biopsie druhostranného, dosud nádorem nepostiženého, varlete. Přibližně 5 % nemocných s testikulárními germinálními nádory (TGN) má již v druhém varleti vytvořen CIS (TIN), z něhož se nakonec cca v 70 % případů vyvine invazivní testikulární germinální nádor (Skakebak et al., 1982). Provedení biopsie je provázeno komplikacemi, jako je bolest, hematom a snížení sérových hodnot testosteronu (Manning et al., 1998).

V případě zjištěného TIN obvykle následuje ozáření hemiskrota dávkou 20 Gy (frakce po 2 Gy). Po této léčbě však následuje vymizení exokrinní i endokrinní funkce varlete (Petersen et al., 2002).

Kontralaterální testikulární biopsie se v některých zemích provádí rutinně. Nízká incidence TIN, nízká incidence metachronní nádorové bilaterality (cca 2,5-5 %) a nezanedbatelná morbidita následující po biopsii a po radioterapii, činí doporučení k biopsii velmi kontroverzním (Dieckmann et al., 1996, Harland et al., 1998). Podle Doporučení Evropské urologické společnosti (European Association of Urology Guidelines 2007) by se biopsie kontralaterálního varlete měla nabídnout všem pacientům, kteří se řadí do skupin vysokého rizika. Jsou to nemocní s objemem varlete do 12 ml, dále s anamnézou kryptorchizmu a s věkem do 30 let.

Tam, kde je sice zjištěn CIS, ale nemocný ještě plánuje

v budoucnu koncepci, radioterapie není vhodná. V těchto případech se uplatňuje taktika zvýšeného dohledu a léčba spočívající v totální nebo parciální orchiektomii. Radioterapie se může provést později.

V každém případě, při zjištěném TIN, je radioterapie metodou volby. Je-li provedena, následuje infertilita a poškození funkce Leydigových buněk neschopných produkovat testosteron. Tento stav vyžaduje dlouhodobou (celoživotní) substituční hormonální léčbu (De Santis et al., 1999, Jacobsen et al., 2002). Před plánovanou radioterapií zjištěného TIN je třeba nemocnému nabídnout též kryoprezervaci spermatu.

2. Germinální nádory ne seminomového typu (GNNST) – klinické stádium I

Všechna následující doporučení vycházející z nejnovějších „European Association of Urology Guidelines 2007“.

Testikulární germinální nádory ne seminomového typu (GNNST) znamenaly v době před érou kombinované léčby s cisplatinou naléhavé ohrožení života nemocných. Zatímco dříve přežívala méně než jedna třetina pacientů trpících těmito zhoubnými novotvarami, dnes se vyléčí podle našich zkušeností 90 % nemocných. Některá pracoviště udávají celkové procento trvalého přežití 90–95 %. Tak se testikulární GNNST stávají modelem kurabilního zhoubného nádoru dospělých. Zlepšené výsledky dlouhodobého přežití a vylé-

čení nemocných jsou způsobeny pokroky v diagnostice jak rentgenologické – CT, USG (Abrahámová et al., 2008), tak biochemické (markery), což vede k upřesnění stagingu (Abrahámová, 1981, 2003, 2007). Přínos chirurgie v podobě retroperitoneálních lymfadenektomií, jak radikálních, tak zejména modifikovaných a v podobě cytoredukčních výkonů po intenzivní chemoterapii je nesporný. Byla to však především kombinovaná chemoterapie na bázi cisplatiny (a posléze karboplatiny), která způsobila rozhodný obrát v prognóze a léčebných výsledcích diseminovaného onemocnění.

Pod klinický pojem testikulární GNNST se řadí nádory jako embryonální karcinom, teratom, nádor ze žlutkového vaku, choriokarcinom, které mohou existovat v čisté podobě, nebo se mohou navzájem kombinovat (viz. kap. patologie). Vzhledem k tomu, že se dosud nenalezly léčebné způsoby specifické pro určitou nádorovou jednotku, léčebné způsoby jsou skupinové a klinické hodnocení se provádí souhrnně. Klinické stádium I znamená, že nádor je omezený pouze na varle a žádnou, v současnosti doporučenou, diagnostickou metodou nejsou zjistitelné lymfogenní ani hematogenní metastázy. Nejstarší léčebnou metodou je radioterapie. V šedesátých letech se objevily příznivé zprávy o radikální a posléze modifikované retroperitoneální lymfadenektomii. S rozvojem kombinované chemoterapie a úspěchy v léčbě diseminovaného onemocnění se projevila snaha mnohých kliniků uplatňovat u počátečního stádia konzervativnější, co nejméně poškozující režim. Tyto snahy vedly k vypracování taktiky zvýšeného dohledu („wait and watch“). Tento nesporně šetrný způsob péče však sebou nese poměrně velké nebezpečí relapsů, a proto se v indikovaných případech uplatňuje profylaktická adjuvantní chemoterapie.

2.1 Zhodnocení míry rizika

Pro správné klinické rozhodnutí o následující léčbě je nutné, aby patologický nález obsahoval dvě důležité informace: **1. Musí být přítomno jasné odlišení seminomu od nádoru neseminomového typu. Přehlednutí prognostiky závažných nálezů může mít pro nemocného dalekosáhlé nepříznivé důsledky. 2. Musí být přítomno jasné vyjádření, zda v nádoru je nebo není přítomna lymfovaskulární invaze.**

V řadě studií se zjistily vztahy mezi určitými morfologickými znaky orchiektomického materiálu a četností recidiv u NSGCT léčených retroperitoneální lymfadenektomií (RPLND), nebo u nemocných, kteří se podrobili taktice „wait and watch“ (Krege et al., 2001, Alexandre et al., 2001).

Nejvýznamnějším prediktivním faktorem pro možnou předpověď recidivy je **vaskulární invaze** (Klepp et al., 1990, 1997, Freedmann et al., 1987, Heidenreich et al., 1998). K relapsu dochází asi u 47 % nemocných, u kterých byla zjištěna vaskulární invaze a pouze u 15–20 % pacientů bez vaskulární invaze.

Pro definici skupiny s vysokým rizikem má zřejmě význam vysoký proliferační index měřený jako více než 70 % **MIB 1**. Dále je to nesporně **přítomnost buněk embryonálního karcinomu** ve více než 50 % (Albers et al., 2003).

Nepřítomnost vaskulární invaze má negativní prediktivní hodnotu v 77 %, dovoluje tedy „surveillance“ u nemocných nízkého rizika. Současný výskyt nízkého proliferačního

skóre MIB 1 (méně než 70 %) zvyšuje negativní prediktivní hodnotu na 87 %. Naproti tomu přítomnost vaskulární invaze má pozitivní prediktivní hodnotu pro přítomnost okultních metastáz v 53 %.

Kombinace přítomnosti vaskulární invaze s vysokým proliferačním skóre a s více než 50 % přítomností struktur embryonálního karcinomu, zvyšuje riziko nemocného z přítomnosti okultních metastáz na 64 % (vysoké riziko).

Podle evropských doporučení je třeba nemocné stratifikovat podle uvedených rizikových faktorů a podle těchto kritérií i vybrat vhodnou léčbu (Gilligan, 2005).

V současné době je ve většině evropských zemí uplatňována buď taktika zvýšeného dohledu, nebo adjuvantní chemoterapie. Na mnoha pracovištích v USA se autoři kloní k provádění modifikované RPLND. Donedávna existovala ještě pracoviště, která indikovala i u GNNST prvního klinického stádia radioterapii.

2.2 Radioterapie

Ozařování je nejstarší léčebnou metodou používanou v léčbě testikulárních GNNST. Dlouhodobé přežití, a to 80–95 % nebo 90–95 % u prvního stádia uvádí většina autorů. Výsledky byly nepochybně závislé na přesnosti stagingu, rozsahu primárního nádoru a na použité radiační technice. V šedesátých a sedmdesátých letech se ozařování GNNST na většině pracovišť provádělo megavoltáží, velkoobjemovou technikou, shodnou s technikou uplatňovanou u seminomů. Vzhledem k tomu, že GNNST jsou nádory s omezenou radiosenzitivitou, celková dávka byla vyšší než u seminomů a pohybovala se většinou v rozmezí 4000–4500–5000 cGy v 5–6 týdnech.

Radiační metoda, ač velmi dobře propracovaná a v současnosti již všeobecně dostupná, má u GNNST svá úskalí (Abrahámová et al., 1983, Raghavan, 1985).

1. GNNST jsou nádory s omezenou radiosenzitivitou a proto aplikovaná dávka 4000–4500 cGy na velký objem břicha přináší nebezpečí postradiačních komplikací časných i pozdních. Je to především myelosuprese, která může nepříznivě ovlivnit nezbytnou chemoterapii v případě relapsu. Radiační enteritidy časné a zejména pozdní nejsou výjimkou.

2. Nelze přehlížet kancerogenní efekt. Vzhledem k mladému věku nemocných a vysoké kurabilitě choroby je nanejvýš pravděpodobné, že takto léčení a vyléčení nemocní by se možného nádoru, způsobeného v tomto případě radiací, dožili.

3. Ozařením retroperitonea jsou ztíženy pozdější podmínky k možnému eventuálnímu chirurgickému výkonu v retroperitoneu.

4. Gonádová dávka, kterou pacient obdrží během ozařovací série, i když ponechané varle neleží v přímém svazku záření, není pravděpodobně bezvýznamná a nutno počítat s oligospermii či azospermii u části takto léčených nemocných.

5. Při nehomogenně nádorové populaci u GNNST nutno počítat s tím, že pro některé buněčné klonny nebude aplikovaná dávka dávkou tumoricidní.

Z výše uvedených důvodů bylo na většině pracovišť od pooperačního ozařování, jako rutinní léčebné metody klinického stádia I, upuštěno. Podle evropských doporučení je nutné tuto léčbu pokládat za opsolentní a kontraindikovanou.

2.3 Lymfadenektomie (RPLND)

O retroperitoneální lymfadenektomii (RPLND) jako léčebné metodě klinického stádia I se v posledních 20–25 letech velmi diskutuje. V r. 1959 uvedli Paton et al. studii 125 nemocných, u kterých zjistili při transabdominální RPLA v retroperitoneu metastázy embryonálního karcinomu s event. příměsí teratomových struktur. U těchto nemocných autoři popsali dlouhodobé přežití v 65 % oproti 13 % pacientů přežívajících po léčbě radiací. Je vysoce pravděpodobné, že tehdy nešlo jen o klinické stádium I (z hlediska dnešního stagingu). Toto sdělení bylo popudem pro provádění radikálních RPLND v širším měřítku. Po další desetiletí léčili klinici na většině amerických pracovišť nemocné stádia I právě tímto způsobem, zatímco na evropských pracovištích se nemocní s tímž nádorovým rozsahem léčili radiací. Výsledky obou léčebných způsobů byly srovnatelné. U radiace se udávalo 90–95 % úspěšnosti a u RPLA 95–98 %. Je zřejmé, že výkon, jakým je radikální RPLA, je náročný na zručnost chirurga a vybavení pracoviště a je tedy vyhrazen pro vrcholové pracoviště.

Současný staging nese sebou 10–15 % chyb v nerozpoznání subklinických retroperitoneálních metastáz (Pizzocero et al., 1985, Foster et al., 1998). RPLND odstraňuje tuto chybu, neboť při tomto výkonu provádí chirurg vlastně staging a dělí nemocné na nemocné patologického stádia I a nemocné s mikroskopickým metastatickým nálezem, kteří jsou dále léčeni způsobem, jak je obvyklé u II. klinického stádia. Odstranění retroperitoneálních metastáz může mít i kurativní efekt v případě, že vzdálené metastázy nejsou dosud založeny.

Rozvoj kombinované chemoterapie na bázi cisplatiny a její léčebné úspěchy u diseminovaného onemocnění GNNST vedl k logické úvaze, že by bylo možné léčit nemocné stádia I pouhou orchiektomií a případné relapsy léčit, až když vzniknou. Tím by se pacienti s iniciálním onemocněním vyhnuli rozsáhlému operačnímu výkonu a jeho hlavní komplikaci – ztrátě ejakulace. Navíc RPLND nemůže zabránit plicním relapsům (nebezpečí je 5–10 %) nebo jiným hematogenním metastázám. Proto byla vypracována taktika zvýšeného dohledu.

Modifikovaná lymfadenektomie jako rutinní léčebná metoda stádia I má v současné době své zastánce zejména v USA, kde se s úspěchem provádí. Stejně jako radikální RPLND je i modifikovaná lymfadenektomie výkonem pro zkušeného zručného odborníka. Vzhledem k nutnosti zvláště pečlivé pooperační biopsie vyžaduje také zručného patologa.

2.4 Taktika zvýšeného dohledu (“surveillance“, “wait and watch“)

Taktika zvýšeného dohledu znamená, že nemocní po orchiektomii zařazení na základě podrobných vyšetření do klinického stádia I, se nepodrobují další léčbě, ale jsou velice pečlivě programově sledováni. Tuto taktiku začali uplatňovat kolem r. 1979 pracovníci sedmi světových pracovišť. Do studie zařadili nemocné, kteří splňovali několik podmínek:

1. primární nádor neprorůstal do semenného provazce nebo paratestikulárních tkání,
2. hodnoty sérových markerů nebyly zvýšeny,
3. nemocní neměli v předchorobí žádný neadekvátní skrotnální výkon.

Důležitým faktorem byla disciplinovanost nemocných a ochota podrobit se pravidelným kontrolám, které zname-

naly měsíční návštěvu lékaře s jeho pečlivým vyšetřením. V uvedeném souboru všech sedmi pracovišť bylo 195 nemocných. Autoři pozorovali relaps u 43 z nich, tj. ve 22 %. Nejčastější lokalizací relapsu bylo retroperitoneum (Ragharvan, 1985).

Léčebnou strategii zvýšeného dohledu zkoumalo i několik pozdějších studií (Read et al., 1993, Sogani et al., 1998). Přibližně u 30 % nemocných dojde k recidivě. Je důležité vědět, že 80 % z uvedených relapsů se diagnostikuje během prvních 12 měsíců, 12 % během druhého roku sledování, 6 % ve třetím roce a kolem 1 % ještě ve čtvrtém a pátém roce od diagnózy. Kolem 60 % relapsů se zjišťuje v retroperitoneu. U nemocných se zjištěnými relapsy jsou asi ve 35 % normální sérové hodnoty nádorových markerů. I přes velice přísné sledování, 11 % relapsů se prezentuje jako velkoobjemová choroba (Colls et al., 1999, Spermon et al., 2002, Hendry et al., 2000, Lowe et al., 1993).

Uvedená data znamenají, že 70 % pacientů prvního klinického stádia, u nichž během sledování nedojde k relapsu, se vyhne závažnému chirurgickému výkonu (RPLND), nebo náročné chemoterapii na podkladě cisplatin.

Taktika zvýšeného dohledu však má své nedostatky:

- 1) Nutnost dodržovat program náročného sledování, k němuž musí být nemocný vysoce motivován.
- 2) V případě relapsu je třeba k další léčbě aplikovat 3–5 cyklů chemoterapie, zatímco na počátku léčby v adjuvanci se považují za dostatečné 2–3 cykly.
- 3) Pacient je vystaven značné nejistotě, což může snížit kvalitu jeho života.

Při zvažování taktiky zvýšeného dohledu jako léčebné alternativy, je třeba s těmito fakty počítat (Divrik et al., 2006). Podle evropských doporučení je tato taktika vyhrazena jen nemocným schopným dodržet program intenzivního sledování a jen na vybraná pracoviště, která vládnou velkými zkušenostmi s léčbou TGN a která jsou dobře personálně, přístrojově i prostorově vybavena (Kildahl-Andersen et al., 2005, Howard et al., 2005).

Je jasné, že návrh této léčebné modality musí vycházet ze zralé úvahy, ve které hrají roli prediktivní faktory. **Podle současných doporučení se surveillance pokládá za vhodný postup jen u nemocných, u nichž nebyla v orchiektomickém preparátu zachycena vaskulární invaze, ani struktury embryonálního karcinomu a proliferací skóre nebylo vysoké.**

2.5 Adjuvantní chemoterapie

Vzhledem k vysokému procentu relapsů v souborech pouze sledovaných pacientů vystoupila do popředí možnost adjuvantní kombinované chemoterapie na bázi cisplatin. Jestliže její aplikací lze u diseminovaných případů dosáhnout více než 80 % kompletních remisí, je jen logické, že táž léčba musí mít shodné účinky i na mikrometastázy. Zvýšené nebezpečí vzniku relapsů mají nemocní s vytypovanými prognosticky nepříznivými znaky a tito nemocní jsou kandidáty pro adjuvantní profylaktickou kombinovanou chemoterapii. Nejčastěji se podávají 2–3 cykly kombinace BEP. V souvislosti s adjuvantní chemoterapií vyvstává několik znepokojujících otázek. Proti podávání adjuvantní chemoterapie s prognosticky

nepříznivými znaky stojí argument, že ne všichni tito nemocní relabují a dále, že mohou relabovat i nemocní bez těchto znaků. Proti návrhu podávat adjuvantní chemoterapii uvedeným pacientům stádia I stojí argument, že u nemocných, kteří nerelabují, by byla tato léčba zbytečná. Je nanejvýš pravděpodobné, že kombinovaná chemoterapie, jejíž relativně značná toxicita je známá, se projeví i účinky pozdními.

Přesto však je možné u pacientů vybraných k adjuvantní chemoterapii snížit riziko relapsu z 50 % na méně než 5 % (Bohlen et al., 1999, 2004, Oliver et al., 1993).

Výhodou adjuvantní chemoterapie je zklidnění nemocného, který má uspokojivý pocit z léčby a péče lékaře. Je tak zbavován psychického napětí z očekávané možné recidivy.

Nespornou výhodou chemoterapie je její systémové působení, oproti operačnímu výkonu, který zasahuje pouze v retroperitoneu. Adjuvantní chemoterapie si klade za cíl zničení možných okultních metastáz či kryptogenních nádorových buněk všude v organizmu.

Na druhé straně je chemoterapie spojená s nepříznivými účinky vyplývajícími z expozice mladých pacientů cytostatikům, která vyvolávají toxické účinky časné i pozdní. Patří

k nim alopecie, myelosuprese, nefrotoxicita, neurotoxicita, ototoxicita, případně pneumotoxita, nepříznivý účinek na kardiovaskulární aparát. Aplikace etoposidu je asociována s vyšším výskytem leukémie. Kancerogenní pozdní účinek je třeba vždy brát v potaz (Bridges et al., 2007). Je třeba počítat i s možností další infertility pro vyvolanou oligo-až azoospermii (Bohlen et al., 2001, Huddart et al., 2003, Siener et al., 2002).

Doporučuje se nabídnout nemocným vždy před plánovanou adjuvantní chemoterapií možnost kryopreservace spermatu.

2.6 Persistující zvýšené hodnoty nádorových markerů (stadium I. S)

Obligatorní nádorové markery v séru (AFP, HCG) je nutné dlouhodobě pravidelně sledovat.

Zvýšené nádorové markery po orchiektomii znamenají reziduální chorobu. Je třeba pamatovat i na druhostranné varle, a to pečlivě sledovat (USG, palpce).

O nemocných stadia I.S se hojně diskutuje. Doporučuje se aplikace 3 cyklů kombinované chemoterapie typu BEP (Saxman et al., 1996).

Doporučení (European Association of Urology Guidelines 2007)

Stadium I. A – Nízké riziko (pT1, žádný rizikový prediktivní faktor)

1. Jestliže nemocní jsou schopni dodržet intenzivní program zvýšeného dohledu na vybraném a vhodném pracovišti, může se nabídnout pacientům dlouhodobá surveillance trvající nejméně 5 let. Tento způsob je vhodný jen pro specializovaná pracoviště.
2. Primární adjuvantní chemoterapie nebo RPLND u nemocných nízkého rizika se navrhuje jedině tam, kde není možné (z jakéhokoliv důvodu) uplatnit taktiku wait and watch. Na evropských pracovištích se dává v těchto případech přednost chemoterapii.

Stadium I. B – Vysoké riziko (přítomnost rizikových prediktivních faktorů, pT2-pT4).

1. V úvahu přichází adjuvantní chemoterapie, 2–3 cykly kombinace BEP
2. Taktika zvýšeného dohledu nebo RPLND připadá v úvahu jen tam, kde nemocný chemoterapii odmítne.

Literatura

1. Abrahámová, J. Germinální nádory varlat. Referátový výběr, 2007, roč. 1, č. 24, s. 3–26.
2. Abrahámová, J. Nádory varlat. Postgraduální medicína, 2003, roč. 6, č. 5, s. 599–615.
3. Abrahámová J., Povýšil C., Dušek L. a kol. Nádory varlat, Grada, Praha 2008.
4. Albers, P. Management of stage I testis cancer. European Urology, 2007, 51 (1), p. 34–43.
5. Albers, P. Ulbright, (TM), Albers, J. et al. Tumor proliferative activity is predictive of pathological stage in clinical stage A nonseminomatous testicular germ cell tumors. J. Urol., 1996, 155, p. 579–586.
6. Albers, P., Siener, R., Kliesch S. et al. German Testicular Cancer Study Group. Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German Testicular Cancer Study Group Trial. J. Clin. Oncol., 2003, 21, p. 1505–1512.
7. Albers, P., Siener, R., Kliesch, S. Risk factors for relapse in clinical stage I nonseminomatous testicular germ cell tumors: results of the German testicular cancer study trial. J. Clin. Oncol., 2003, 21, p. 1505–1512.
8. Alexandre, J., Fizazi, K., Mahe, C. et al. Stage I nonseminomatous germ-cell tumours of the testis: identification of a subgroup of patients with a very low of relapse. Eur. J. Cancer, 2001, 37, p. 576–582.
9. Bohlen, D., Borne, M., Sonntag, RW. et al. Long-term results following adjuvant chemotherapy in patients with clinical stage I testicular nonseminomatous malignant germ cell tumours with high risk factors. J. Clin. Urol., 1999, 161, p. 1148–1151.
10. Bohlen, D., Burkhard, FC., Mills, R. et al. Fertility and sexual function following orchietomy and 2 cycles of chemotherapy for stage I high risk nonseminomatous germ cell cancer. J. Urol., 2001, 165, p. 441–444.
11. Bridges, B., Hussain, A. Testicular germ cell tumors. Current Opinion in Oncology, 2007, 19 (3), p. 222–228.
12. Colls, BM., Harvey, VJ., Skelton, L. et al. Late results of surveillance of clinical stage I nonseminoma germ cell testicular tumours: 17 years' experience in a national study in New Zealand. B. J. Urol. Int., 1999, 83, p. 76–82.
13. De Santis, M., Albrecht, W., Holtl, W., Pont, J. Impact of cytotoxic

- treatment on long-term fertility in patients with germ cell cancer. *Int. J. Cancer*, 1999, 83, 864–865.
14. Dieckmann, KP., Loy, V. Prevalence of contralateral testicular intraepithelial neoplasia in patients with testicular germ cell neoplasms. *J. Clin. Oncol.*, 1996, 14, p. 3126–3132.
 15. Divrik, RT., Akdoan, B., Ozen, H. et al. Outcomes of surveillance protocol of clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors-is shift to risk adapted policy justified? *Journal of Urology*, 2006, 176 (4 Pt. 1), p. 1424–1429.
 16. European Association of Urology Guidelines, 2007.
 17. Foster, RS., Roth, BJ., Clinical stage I nonseminoma: surgery versus surveillance. *Semin. Oncol.*, 1998, 25, p. 145–153.
 18. Freedman, LS., Parkinson, MC., Jones, WG. et al. Histopathology in the prediction of patients with stage I testicular teratoma treated by orchiectomy alone. *Lancet*, 1987, ii, p. 294–298.
 19. Gilligan T. Changing management of clinical low-stage testicular cancer. *The scientific world journal*, 2005, 5, p. 852–867.
 20. Harland, SJ., Cook, PA., Fossa, SD. et al. Intratubular germ cell neoplasia of contralateral testis in testicular cancer: defining high risk group. *J. Urol.*, 1998, 160, p. 1353–1357.
 21. Heidenreich, A., Sesterhenn, IA., Mostofi, FK. et al. Prognostic risk factors that identify patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors at low risk and high risk for metastasis. *Cancer*, 1998, 83, p. 1002–1011.
 22. Hendry, WF., Norman, A., Nicholls, J. et al. Abdominal relapse in stage I nonseminomatous germ cell tumours of the testis managed by surveillance or with adjuvant chemotherapy. *BJU Int.*, 2000, 86, p. 89–93.
 23. Howard, GC., Conkey, DS., Peoples, S. et al. The management and outcome of patients with germ cell tumours treated in the Edinburgh Cancer Centre between 1988 and 2002. *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists)*, 2005, 17 (6), p. 435–440.
 24. Huddart, RA., Norman, A., Shahidi, M. et al. Cardiovascular disease as a long-term complication of treatment for testicular cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2003, 21, p. 1513–1523.
 25. Jacobsen, KD., Fossa, SD., Bjoro, TP. et al. Gonadal function and fertility in patients with bilateral testicular germ cell malignancy. *Eur. Urol.*, 2002, 42, p. 229–238.
 26. Kildahl-Andersen, A., Erke, MG., Sagstuen, H. et al. Patients with non-seminoma germ cell tumours treated in a minor oncology department: the importance of multi-institutional protocols and research collaboration. *Acta Oncologica*, 2005, 44 (6), p. 537–544.
 27. Klepp, O., Dahl, O., Flodgren, P. et al. Risk-adapted treatment of clinical stage I non-seminoma testis cancer. *Eur. J. Cancer*, 1997, 33, p. 1038–1044.
 28. Klepp, O., Olsson, AM., Henrikson, H. et al. Prognostic factors in clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors of the testis: multivariate analysis of a prospective multicenter study. *J. Clin. Oncol.*, 1990, 8, p. 509–518.
 29. Krege, S., Kalund, G., Otto, T. et al. Phase II study: adjuvant single-agent carboplatin therapy for clinical stage I seminoma. *Eur. Urol.*, 1997, 31, 405–407.
 30. Lowe, BA. Surveillance versus nerve-sparing retroperitoneal lymphadenectomy in stage I germ cell tumors. *Urol. Klin. North. Am.*, 1993, 20, 75–83.
 31. Manning, M., Junnermann, KP., Alken, P. Decrease in testosterone blood concentration after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Lancet*, 1998, 352, p. 37–43.
 32. Oliver, RTD., Raja, M., Ong, J. Gallagher, C. Pilot study to evaluate impact of a policy of adjuvant chemotherapy for high risk stage I malignant teratoma on overall relapse rate stage I cancer patients. *J. Urol.*, 1992, 148, p. 1453–1460.
 33. Petersen, P., Giwercman, A., Daugaard, G. et al. Effect of graded testicular doses of radiotherapy in patients treated for carcinoma-in-situ in the testis. *J. Clin. Oncol.*, 2002, 20, p. 1537–1543.
 34. Pizzocaro, G., Salvioni, R., Zanoni, F. Unilateral lymphadenectomy in intraoperative stage I nonseminomatous testis cancer. *J. Urol.*, 1985, 134, p. 485–489.
 35. Raghavan, D. Orchiectomy alone for stage I nonseminomatous germ-cell tumors. In: Garnick, MB., (Eds.) *Genitourinary cancer*. Churchill Livingstone. New York, 1985.
 36. Read, G., Stenning, SP., Cullen, MH. et al. Medical Research Council prospective study of surveillance for stage I testicular teratoma. *J. Clin. Oncol.*, 1992, 10, p. 1762–1768.
 37. Saxman, SB., Nichols, CR., Foster, RS. et al. The management of patients with clinical stage I nonseminomatous testicular tumors and persistently elevated serologic markers. *J. Urol.*, 1996, 155, 587–589.
 38. Siener, R., Albers P., Kliesch, S. et al. Fertility in patients with stage I non-seminomatous germ-cell tumors (NSGCT) analysis of the German prospective multicenter trial. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2002, 21, (abstr. 752).
 39. Skakkebaek, NE., Berthelsen, JG., Muller, J. Carcinoma in situ of the undescended testis. *Urol. Clin. North. Am.*, 1982, 9, p. 377–385.
 40. Sogani, PC., Perrotti, M., Herr, HW. et al. Clinical stage I testis cancer: long-term outcome of patients on surveillance. *J. Urol.*, 1998, 159, p. 855–862.
 41. Spermon, JR., Roeleveld, TA., van der Popel, HG. et al. Comparison of surveillance and retroperitoneal lymph node dissection in stage I non-seminomatous germ cell tumors. *Urology*, 2002, 59, p. 923–929.
 42. Sweeney, CJ., Hermans, BP., Heilman, DK. et al. Results and outcome of retroperitoneal lymph node dissection for clinical stage I embryonal carcinoma-predominant testis cancer. *J. Clin. Oncol.*, 2000, 18, p. 358–362.

Korespondenční adresa:
 prof. MUDr. Abrahámová Jitka Dr.Sc.
 Fakultní Thomayerova nemocnice s poliklinikou, Vídeňská 800
 140 59 Praha 4
 e-mail: jitka.abrahamova@ftn.cz

Došlo / Submitted: 16. 5. 2008
 Přijato / Accepted: 16. 5. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
 The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
 The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

SEMINOM V PRVNÍM KLINICKÉM STADIU – LÉČEBNÉ MOŽNOSTI

TREATMENT OF SEMINOMA I STAGE DISEASE

VYSKOČIL J.¹, POPRACH A.¹, PETRÁKOVÁ K.¹, LAKOMÝ R.¹, VYZULA R.¹, ČOUPEK P.²

¹KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

²KLINIKA RADIAČNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn

Seminom tvoří 35% všech maligních germinativních nádorů u mužů, z toho až 80% je diagnostikováno v I. klinickém stadiu. Počet trvale vyléčených pacientů se dlouhodobě blíží 100%. Adjuvantní radioterapie následující po radikální orchiektomii byla až donedávna považována za zlatý standard léčby. Léčebné možnosti radioterapie jsou ale limitovány možnými závažnými nežádoucími účinky, zejména gastrointestinálními onemocněními, rozvojem sekundárních maligních nádorů, kardiovaskulárními onemocněními a poruchou fertility. Proto je snaha o jejich minimalizaci – redukcí ozařovacího pole, snížením dávky radioterapie, sledováním pacientů či použitím adjuvantní chemoterapie s karboplatinou v monoterapii. Z dostupných studií je zřejmé, že adjuvantní radioterapie s redukcí velikosti ozařovacího pole i s redukcí dávky dosahuje srovnatelných výsledků jako dřívější referenční režimy. Tyto výsledky jsou přitom srovnatelné s publikovanou úspěšností chemoterapie s karboplatinou. Surveillance je další možností léčby, obzvláště u pacientů léčbu odmítajících či u těch, kteří mají k aktivní léčbě kontraindikace a nemají rizikové faktory relapsu. Jako rizikové faktory relapsu jsou definovány velikost tumoru > 4cm, invaze do rete testis a předoperační elevace nádorových markerů (bHCG). Všechny léčebné modalitty (adjuvantní radioterapie, adjuvantní chemoterapie s karboplatinou, surveillance u pacientů bez rizikových faktorů) dosahují srovnatelného 5-letého přežití od 93,1 % u sledovaných pacientů bez rizikových faktorů po 96% u pacientů po radioterapii a chemoterapii. Dle současných doporučení NCCN pro rok 2008 lze po primární operaci volit mezi sledováním pacientů (surveillance), adjuvantní radioterapií či chemoterapií. Autoři článku se pokusili na základě dat získaných z dostupných prací utvořit přehled o výhodách a nevýhodách nabízených léčebných modalit.

Klíčová slova: seminom, radioterapie, chemoterapie, karboplatina, surveillance, sekundární malignity

Summary

About 35% of men with malignant testicular germ cell cancer are diagnosed with seminoma, up to 80% of them with stage I disease. The number of men successfully treated reaches 100%. For many years radiotherapy following radical orchiectomy was considered the golden standard for treatment. Treatment efficiency of radiotherapy is limited by its late sequelae, notably gastrointestinal diseases, second cancer development, cardiovascular toxicity or infertility. Therefore there has been an effort made to minimise this late toxicity – by radiation field reduction, radiation dose reduction, surveillance or chemotherapy with carboplatine as a single agent. According to available studies the efficiency of radiotherapy reduced either in field area or dose are as efficient as previously used radiation regimens and is as efficient as adjuvant chemotherapy with carboplatine. On the other hand the results of surveillance studies are comparable to those of active therapies, especially in patients with contra-indications to active treatment especially without prognostic risk factors, i.e. tumour size >4cm, invasion to rete testis, pre – operative elevation of tumour markers (beta HCG). All of the above described treatment modalities (adjuvant radiotherapy or chemotherapy and surveillance of patients without risk factors) reach comparable 5 years' survival from 93,1% in surveillance to 96% in patients after radiotherapy or chemotherapy. Nowadays, according to the new NCCN guidelines 2008, we have several options for management strategies for post – orchiectomy treatment, i.e. adjuvant radiotherapy, surveillance and newly also adjuvant carboplatine – based chemotherapy. In our review article we discuss advantages and disadvantages of the various treatment modalities.

Keywords: seminoma, radiotherapy, chemotherapy, carboplatin, surveillance, second cancer

Úvod

Seminom tvoří zhruba 35 – 50 % všech maligních germinativních nádorů, z toho 60 – 80 % pacientů je diagnostikovaných v prvním klinickém stadiu, viz obrázek č.1 (1,16). Seminom je dlouhá léta považován za typický příklad vyléčitelného maligního onemocnění, kde se počet trvale vyléčených pacientů blíží 100% (2). Vzhledem k tomu, že toto onemocnění postihuje hlavně muže v produktivním věku, nejčastěji na vrcholu životních sil (medián věku 35 let), je

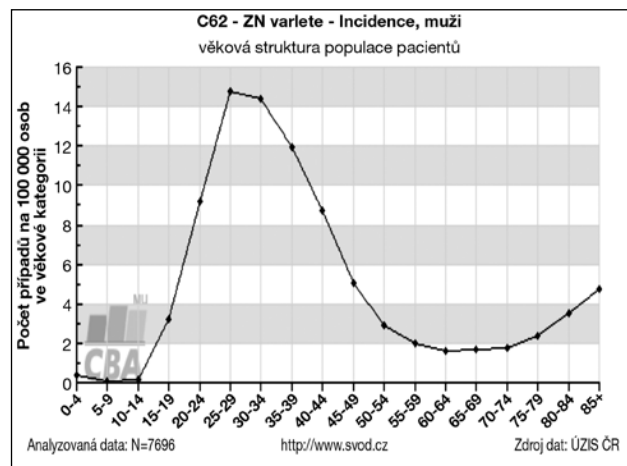
pochopitelný požadavek na zachování vysoké úrovně kurability (viz Obr. 1 a 2).

Vývoj v terapii pacientů se seminomem v prvním klinickém stadiu tedy již nemusí směřovat k dalšímu zvyšování procenta vyléčených mužů, naopak se již druhé desetiletí zaměřuje na udržení vysoké úspěšnosti léčby při omezování jejích nežádoucích účinků.

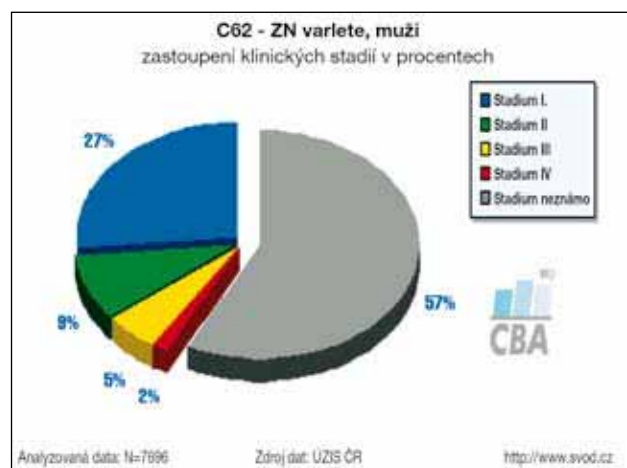
Základem léčby zůstává radikální orchiektomie, ale následně může lékař volit mezi adjuvantní radioterapií, che-

moterapii či pouhým sledováním pacientů (surveillance). Zatím se zdá, že žádná z těchto metod nemá jednoznačnou výhodu. Autoři článku se pokusili na základě dat získaných z dostupných prací vytvořit přehled o výhodách a nevhodách nabízených léčebných modalit.

Obrázek 1



Obrázek 2



Radioterapie

Seminomy patří do skupiny nádorů vysoce citlivých k účinkům ionizujícího záření (3). Adjuvantní radioterapie následující po radikální orchiektomii u pacientů se seminomem v prvním klinickém stadiu byla až donedávna považována za standardní léčebný postup (NCCN 2006) (4). Výsledky sledovacích studií, prací zabývajících se lymfangiografií u nádorů varlat (5), výsledků resekce prováděných v rámci léčby maligních germinativních nádorů varlat (6) společně s anatómií lymfatického systému varlat ukazují na to, že oblast paraaortálních lymfatických uzlin je prvním místem diseminace seminomů, v případě, že lymfatický systém není porušen předchozí (před orchiektomií) operací na skrotu či v inguinách. Proto byla cílovým polem pro radioterapii dlouhou dobu oblast paraaortálních uzlin a ipsilaterálních ilických pánevních uzlin. (v anglosaské literatuře DL, t.j. dog-leg, neboli hokejka). Omezení pole adjuvantní radioterapie na oblast paraaor-

tálních lymfatických uzlin může být podle této hypotézy dostatečné k eradikaci možných mikrometastáz, navíc vynechání pánve z ozařovacího pole vede ke snížení dávky záření pro kontralaterální varle a minimalizuje tak sekundární infertilitu (7), nemluvě o snížení gastrointestinální toxicity a vzniku sekundárních malignit v ozařovaném poli (8). Proto se v devadesátých letech minulého století začíná prosazovat ozáření cílené pouze na paraaortální lymfatické uzliny (tzv. paraaortal strip, PAS). Důsledkem těchto snah byla studie **Fossy a kolektivu** (1999) (9) srovnávající adjuvantní radioterapii metodou DL a PAS. Cílem bylo srovnat počet relapsů a akutní toxicitu v obou ramenech. V letech 1989 až 1993 bylo do studie zařazeno 478 mužů v klinickém stadiu I seminomu, 236 do ramene PAS a 242 do ramene DL. Medián doby sledování byl 4,5 roku. Autoři popsali 9 relapsů v každém rameni, z nichž 4 byly v pánvi (ve všech případech u PAS). Tříletého intervalu bez progresu onemocnění dosáhlo 96% pacientů po PAS, resp. 96,6% pacientů po DL. U pacientů v rameni s PAS polem byla popsána signifikantně menší incidence akutní toxicity – neasey, vomitu či leukopenie. Adjuvantní radioterapie metodou PAS byla spojena s nižším výskytem akutní toxicity, za cenu mírně zvýšeného rizika pánevního relapsu. Na základě této studie je paraaortální ozáření lymfatických uzlin u klinického stadia I u seminomu u pacientů bez předchozí operace v oblasti třísel (appendektomie, operace kýly) považováno za standardní metodu.

Společně s dalšími poznatky o pozdních nežádoucích účincích radioterapie (viz dále) se do popředí dostávaly snahy jednak o již zmíněnou redukci ozařovaného objemu, ale také se začíná uvažovat o redukci dávky, ze standardních 30 Gy na 25 Gy i 20Gy. První studií, která se zabývala snížením dávky radioterapie na 25 Gy, byla práce **Niazi M. T. a kolektivu** (2005) (10). Autoři sledovali dlouhodobé přežití pacientů v I. klinickém stadiu seminomu po adjuvantní radioterapii na oblast paraaortálních lymfatických uzlin. Ve studii bylo dosaženo desetiletého bezpříznakového přežití u 98,5% pacientů bez výskytu sekundární malignity či gastroduodenální vředové choroby. Do studie bylo celkem zařazeno 71 pacientů v letech 1991 až 2001, kteří po absolvování radikální orchiektomie prodělali adjuvantní radioterapii v dávce 25 Gy na pole zasahující od horní hranice obratle Th 11 po spodní okraj obratle L5, s průměrnou šířkou pole 9, 24cm (pozn.:Th – obratel hrudní páteře, L – obratel bederní páteře, čísla 11, resp. 5 označují pořadí obratlů, počítáno od shora). Medián doby sledování činil 75 měsíců. Celkové pětileté, resp. desetileté přežití bez známek recidivy činilo 98,5%, resp. 92%. Z nežádoucích účinků terapie dominovala neasea GI (35% pacientů), autoři nepozorovali žádné sekundární neoplazie ani vředovou chorobu gastroduodena. Studie tak potvrdila výsledek práce citované výše, tj. že adjuvantní radioterapie na PAS pole dosahuje slibných výsledků za cenu minimální akutní toxicity.

Daleko rozsáhlejší studii zpracovala **Německá skupina pro terapii testikulárních nádorů** (2004) (11), ve které autoři kombinovali redukci pole (metoda PAS) i dávky (26 Gy). Výsledky studie prokázaly minimální ale přesto signifikantní zvýšení počtu pánevních rekurencí (1,8%), které ale nebylo klinicky významné a nemělo dopad na

celkové přežití pacientů. Do studie autoři v letech 1991 až 1994 zařadili 675 pacientů, u nichž sledovali incidence a charakter akutních nežádoucích účinků radioterapie a počet rekurencí. Ozařovací pole zasahovalo od kraniálního okraje obratle Th11 po spodní okraj obratle L4, s průměrnou šířkou pole 9 cm, aplikováno bylo průměrně 26 Gy v 17 frakcích. Medián doby sledování činil 61 měsíců. Z celkového počtu pacientů zařazených do analýzy byl zjištěn relaps u 26 pacientů, u 22 pod bránicí, v 11 případech v ipsilaterálních pánevních uzlinách. Pětiletého, resp. osmiletého bezpříznakového přežití dosáhlo 95,8%, resp. 94,9% pacientů. Celkové přežití pacientů souboru činilo 99,1% po pěti letech a 98,6% za osm let. Z akutních nežádoucích účinků dominovala nevolnost (GI 46,1%, GII 6,7% a GIII 4%). Nebyla popsána žádná GIV toxicita. Sekundární maligní tumory byly popsány u 17 pacientů (2,5%), z nichž v 8 případech byly kontralaterální testikulární nádory, mezi jinými pak byly nonhodgkinské lymfomy, akutní leukémie, meningeom, glioblastoma multiforme, nádory hlavy a krku, oblasti GIT. Více světla se do problematiky snižování celkové dávky snažila vnést mezinárodní randomizovaná studie autorů **Jones G.W. A kolektivu** (2005) srovnávající adjuvantní radioterapii 20 Gy proti 30 Gy u pacientů se seminomem prvního klinického stádia (12). Výsledky studie potvrzují, že nižší dávka radioterapie je lépe tolerována při srovnatelném efektu. Do studie bylo zařazeno celkem v letech 1995 až 1998 celkem 625 pacientů s maximálním lokálním rozsahem pT3, s negativními pooperačními nádorovými markery (alfa 1 fetoprotein, dále AFP, beta podjednotka humánního choriového gonadotropinu, dále bHCG). Ozařovací pole zasahovalo od horní hranice Th11 po dolní okraj L5 (PAS), u pacientů po předchozím chirurgickém zákroku na skrotu nebo v oblasti třísla bylo pole standardně rozšířeno o ipsilaterální iliakální a pánevní lymfatické uzliny (DL). Primárním cílem studie bylo zjištění doby do progresu, sekundárním cílem pak byla akutní morbidita. Z akutních nežádoucích účinků dominovala nevolnost a vomitus, toxicita GIII a GIV byla signifikantně vyšší u ramene s 30 Gy (19,7% v. 18,4%, $p = 0,06$), stejně tak leukopenie byla častější u vyšších dávek ($p=0,02$). Počet pacientů, kteří během léčby pociťovali vyčerpávající únavu a slabost (20% v. 5%, $p<0,001$) a kterým tato komplikace znemožňovala brzký návrat do práce do 4 týdnů od ukončení léčby, byl opět vyšší u pacientů s dávkou 30 Gy ($p<0,001$). Střední doba sledování byla 61 měsíců. Pětiletého bezpříznakového přežití dosáhlo 97% pacientů v rameni s 30 Gy, resp. 96,4% pacientů ozařených jen 20 Gy. Autoři zaznamenali celkem 21 relapsů, 10 v rameni s 30 Gy a 11 v rameni s 20 Gy. Zajímavý je pohled na rozložení lokality rekurencí s ohledem na místo ozaření. V pánvi bylo 8 relapsů z 16 relabujících pacientů s PAS, bez ohledu na dávku ozaření a pouze 1 rekurence z 5 relabujících pacientů s DL. Citované studie jasně ukazují určitý benefit redukování dávek hlavně v oblasti akutní morbidity. Svým způsobem je ale alarmující počet pánevních relapsů u pacientů ozařovaných metodou PAS ve srovnání s počtem relapsů u pacientů ozařovaných metodou dog-leg. (12, 13). Zdá se, že dávka 20 – 25 Gy je dostatečná a ve svém účinku srovnatelná s aplikací 30 Gy. Je otázkou, zda by nebylo výhodné

léčit pacienty 20 Gy metodou DL. Standardem v České republice je aplikace 25,2 Gy metodou PAS při postižení pT1-2, v případě postižení pT3-4 se aplikuje 30,6 Gy metodou DL.(14).

Pozdní nežádoucí účinky radioterapie

Mezi nejčastější pozdní nežádoucí účinky radioterapie patří především gastrointestinální onemocnění, rozvoj sekundárních maligních nádorů, kardiovaskulární onemocnění a poruchy fertility.

Výskyt těchto pozdních nežádoucích účinků vedl k řadě studií, které porovnávaly redukci dávky a ozařovacího pole proti standardnímu režimu DL s cílem snížit tyto nežádoucí účinky a zároveň dosáhnout stejných úspěchů v celkovém přežití a počtu relapsů. (9, 12, 15, 16).

Kardiovaskulární onemocnění byla hrozbou především u režimů, kdy se preventivně ozařovalo mediastinum a supraklavikulární oblast, tyto přístupy byly již opuštěny v 80. letech minulého století (17). V souvislosti s infradiafragmatickou radioterapií se taktéž popisují případy zvýšeného výskytu srdečních onemocnění u pacientů (především ischemické choroby srdeční ve všech jejich formách), ale jedním dechem tyto studie upozorňují na nutnost zohlednění dalších rizikových faktorů koronární nemoci, resp. aterosklerosy obecně – arteriální hypertenze, hyperlipoproteinémie, kouření, diabetes (18). Tyto rizikové faktory vzala v úvahu studie, která probíhala od roku 1982 – 1992 ve Velké Británii, autorů **Huddarta R. A. A kolektivu** (2003) (19), která prokázala, že radioterapie je nezávislý rizikový faktor vzniku koronární nemoci. Pacienti, kteří byli ozařeni infradiafragmaticky, měli 2,74 x vyšší riziko vzniku ischemické choroby srdeční. Jako možnou příčinu koronární nemoci u těchto pacientů autoři uvádí, že i při paraaortálním ozaření dochází k určitému malému ozaření srdce.

Mezi gastrointestinální onemocnění, na jejichž vzniku by se mohla radioterapie podílet, řadíme především gastroduodenální vředovou chorobu, refluxní onemocnění jícnu a chronický průjem. Incidence refluxní jícnové choroby se pohybuje mezi 10% až 27%. (17, 20, 21). Přibližně platí, že se zvětšující se plochou ozařovacího pole a dávkou záření narůstá pravděpodobnost vzniku gastrointestinálních onemocnění. Taktéž bylo opakovaně prokázáno, že věk pacientů v době radioterapie je prediktorem vzniku těchto komplikací. Pacienti ozaření ve vyšším věku měli vyšší incidenci těchto onemocnění. Již vzpomenuť studie **Alie M.Garcii-Serra** (17) zmiňuje jednu potenciálně s léčbou spojenou fatální komplikaci, a to pacienta, který byl v roce 1980 ozařen na oblast paraaortální a pánevní, celkovou dávkou 30 Gy. Taktéž byla ozařena mediastinální oblast celkovou dávkou 25Gy. Přibližně za rok po léčbě pacient umírá, jako příčina smrti byla stanovena nekroza tenkého a proximální tlustého střeva v terénu postradiační enteritidy. Medián rozvoje refluxní choroby jícnové se pohyboval okolo 3,7 roku (od 1 měsíce do 15,4 let). Jen 45 % pacientů potřebovalo medikamentózní terapii, v naprosté většině byly dostačující blokátory H2 receptorů. Pokud se jedná o gastroduodenální vředovou chorobu, její výskyt byl spíše raritní, pohyboval se ve sledovaných studiích okolo 2%. Vředová choroba stejně jako refluxní

choroba mají multifaktoriální etiopatogenezu (kouření, stres, dietní zvyky, abusus NSAID) (22), jejich incidence se obecně mírně zvyšuje a studie, které by vyloučily vliv dalších etiologických faktorů na dostatečném množství pacientů zatím nebyly publikovány.

Závažným pozdním nežádoucím účinkem radioterapie je vznik sekundárních malignit. Tímto rizikem se zabývala rozsáhlá práce zpracovávající data od téměř 41 tisíc pacientů s testikulárními nádory (23). Relativní riziko vzniku sekundárních malignit se zvyšuje s rostoucím časem od stanovení diagnózy. Pacienti, kteří byli ozáření, měli po 1 – 4 letech relativní riziko (RR) 1,1, po 5 – 9 letech RR 1,5, po 10-ti a více letech RR 2,0. Riziko vzniku sekundární malignity je vyšší pro ozářená místa. Relativní riziko pro místa nacházející se v typickém infradiaphragmatickém radioterapeutickém poli bylo 2,7, ostatní regiony měli relativní riziko 1,6. U ozářených polí zůstává riziko zvýšeno pod dobu 35ti let i více, pro neozářená pole se zdá, že riziko klesá se stoupajícím časem od stanovení diagnózy. Nejčastěji se vyskytují – zhoubné nádory žaludku (RR 4,1), tlustého střeva (RR 1,9), rekta (RR 1,8), pankreatu (RR 3,8), plic (1,4), pleury (4,4), prostaty (RR 1,4), ledvin (RR 2,8), maligní melanom (RR 1,6) a zhoubný nádor štítné žlázy (RR 3,1). Kumulativní riziko se zvyšuje s klesajícím věkem pacienta v době diagnózy. Například pacienti, kterým byla diagnóza stanovena ve věku 20ti let, mají kumulativní riziko 47% ve věku 75ti let, pacient s diagnózou v 50ti letech mají kumulativní riziko 28% ve 75ti letech. Autoři článku si jsou vědomi toho, že se výše uvedené informace nevztahují pouze na pacienty se seminomem, ale na pacienty s testikulárními nádory obecně. Autorům článku šlo o to, aby demonstrovali nežádoucí účinky radioterapie obecně. V retrospektivní studii polských autorů, ve které sledovali pozdní nežádoucí účinky radioterapie, bylo relativní riziko vzniku sekundárních malignit více než 3x vyšší než u stejně staré zdravé populace. (18) Výsledky byly statisticky významné.

Dalším problémem u ozářených pacientů se seminomem jsou obtíže v sexuálním životě a v reprodukci. Problémem hodnocení těchto možných nežádoucích účinků je sběr dat u pacientů. Naprostá většina studií zkoumající toto téma probíhá formou telefonických či zásilkových dotazníků (17, 24). Informace jsou tedy často zkreslené a poměrně málo pacientů odpoví na tyto dotazníky. Pokud nějaká studie zkoumala spermioqram po radioterapii, většinou autoři naráželi na nízkou ochotu mužů poskytnout vzorek ke zkoumání, např. studie **Jeffreye a kolektivu** (24) zavzala 212 pacientů, ale jen 10 mužů poskytlo sperma k zkoumání. Základní otázky zpracované v dotaznících se týkají především toho, zda muž zplodil se svou partnerkou dítě před nebo po radioterapii, pokud po radioterapii, tak za jak dlouho po radioterapii došlo k otěhotnění, dále zda pozorovali nějaké změny v kvalitě sexuálního života a některé studie ještě měřili hodnotu testosteronu v séru před a po radioterapii (17). Již zmíněná **Jeffreyova** studie ještě zkoumala i jiné příčiny poruch reprodukce u mužů, např. zda měl varikokélu, kryptorchismus, vasetomie, infekce pohlavních orgánů a erektilní dysfunkce přítomné již před radioterapií. U všech pacientů byl použit gonadální štít. Jen 11 pacientů zkoušelo mít po radioterapii dítě, sedm

z nich dosáhlo těhotenství u partnerky. Zajímavé zjištění bylo, že jen u 25% mužů proběhla kryopreservace před radioterapií. Spermioqram po radioterapii byl proveden jen u 10 pacientů, 44% bylo vzorků bylo oligospermických, zbytek byl v normě. V roce 1986 **Fossa a kol.** prokázali (25), že jen 15% pacientů mělo persistující azoospermii po terapii, zatímco 52% mělo normální spermioqram během dvouletého sledování. **Jeffrey** (23) prokázal, že plných 56% pacientů mělo během 8 letého sledování normální spermioqram, 44% bylo oligospermických, nezachytili žádného pacienta s azoospermii. **Jeffrey** neprokázal vztah mezi dávkou záření a koncentrací spermií. Jako důvod rozdílu těchto dvou studií se uvádí používání jiných gonadálních štítů. Z uvedených studií vyplývá, že většina pacientů se seminomem, kteří chtěli počít dítě po radioterapii, byli úspěšní bez metod moderní asistované reprodukce (okolo 65- 75%). Všeobecně je ale známo, že řada pacientů s testikulárními nádory má patologický spermioqram již před léčbou. (26)

Surveillance – aktivní sledování

Další z možností léčby seminomu prvního klinického stádia je radikální orchiektomie s následným surveillance, tedy pouhým sledováním pacienta. Jednoznačný harmonogram sledování nebyl zatím publikován. Každé větší centrum se v programu sledování liší. Dle NCCN 2006 (4) je doporučována frekvence kontrol v následujícím sledu: první tři roky každé 4 měsíce, od 4 do 7 let každých 6 měsíců a následně jednou za rok. Při každé kontrole se doporučuje odběr nádorových markerů (alfa 1 fetoprotein, beta podjednotka humánního choriogonadotropinu a laktát dehydrogenáza, dále LDH), fyzikální vyšetření včetně vyšetření druhostranného varlete a CT vyšetření břicha a pánve. Rentgeneový snímek plic je také doporučován. **Choo a kolektiv** (2005) (27) prováděli ve své studii surveillance v jiném harmonogramu – první dva roky fyzikální vyšetření včetně kontroly tumorozních markerů (AFP, bHCG, LDH) a RTG plic každé 2 měsíce, od 3 – 5 let každých 6 měsíců, a pak ročně, CT břicha a pánve první dva roky každé 4 měsíce, od 3 – 5 let každých 6 měsíců a pak ročně.

Relaps free – rate byl v Choově studii v 5ti, 10ti a 15ti letech surveillance 83%, 80% a 80%. Medián doby do relapsu byl 13,6 měsíce. Pouze u dvou pacientů došlo k relapsu za 5 let po stanovení diagnózy. Z šesti pacientů s anamnézou orchiopechie či kryptoorchismu došlo k relapsu u tří, u dvou v ipsilaterálních inguinálních uzlinách a u jednoho v paraaortálních uzlinách. U 12 pacientů se relaps vyvinul v paraaortálních uzlinách, jeden pacient měl relaps jak v paraaortálních uzlinách, tak externích iliakálních uzlinách, dva pacienti měli relaps supradiaphragmaticky – jeden měl postižené mediastinum, druhý i plic.

Pokud dojde k relapsu, tak záchranná radioterapie a chemoterapie má potenciál dosáhnout dlouhodobé remise onemocnění. (28)

Jako prediktivní faktory možného relapsu jsou především invaze rete testis a velikost tumoru (horní hranice 4cm). Invaze do tunica albuginea, věk pacienta v době diagnózy, lymfatická a vaskulární invaze se také berou jako prediktivní faktory možného relapsu (29). Kdo by tedy mohl být v rámci prvního stádia sledován? Zřejmě by to byl pa-

cient, který odmítá onkologickou léčbu, pacient s mnoha interkurencemi, pacient, který se obává zhoršení fertility a nechce využít možnosti uchování spermatu, nejlépe však pacient bez rizikových faktorů relapsu.

Chemoterapie

Adjuvantní chemoterapie s použitím karboplatiny v monoterapii aplikované pouze v den 1, v jedné či dvou sériích, je nejnovějším příspěvkem v léčbě prvního klinického stádia u seminomu. Karboplatina patří do rodiny platinových derivátů s některými výhodami proti základnímu zástupci skupiny – cisplatině. Karboplatina je méně nefrotoxická, emetogenní a ve většině případů může být aplikována ambulantně (30). Karboplatina ale není žádným nováčkem v léčbě testikulárních nádorů, již přes deset let tvoří jeden ze základních pilířů vysokodávkované chemoterapie, m.j. pro svoji minimální orgánovou toxicitu (31). Jednou z prvních významných prací byla pilotní studie **Olivera a kolektivu (1994)** (32) na 224 pacientech srovnávající použití dvou resp. jedné série karboplatiny proti adjuvantní radioterapii a surveillanci. Výsledky studie potvrdily známou četnost relapsů (18%) u pacientů sledovaných či (6%) ozařovaných, přinesly ale na druhou stranu možnost další redukce četnosti relapsů použitím jedné série chemoterapie (1% relapsů u 2 serií, resp. žádný relaps u 1 série). Nevýhodou této studie bylo, že zařazení do jednotlivých ramen nepodléhalo náhodné randomizaci. V letech 1982 až 1992 bylo zařazeno 224 pacientů, z toho karboplatinou bylo léčeno 78 pacientů, radioterapii absolvovalo 79 pacientů a 67 pacientů bylo jen sledovaných. Výsledky této práce byly posléze potvrzeny četnými studiemi fáze II (33, 34, 35).

Po opakovaném potvrzení účinnosti karboplatiny v monoterapii ve studiích fáze II vznikla potřeba porovnat jednotlivé léčebné modalitty navzájem. Tak vznikly dvě španělské práce. První z nich byla práce **Aparacia a kolektivu (2003)** hodnotící dvojí přístup v léčbě pacientů se seminomem v klinickém stadiu I po radikální orchiektomii, a to surveillanci proti adjuvantní aplikaci karboplatiny v závislosti na rizikových faktorech (29). Celkem byli do studie zařazeni 203 pacienti, z nichž 60 pacientům na základě přítomnosti sledovaných faktorů (tumor > pT2, invaze do lymfatických a vaskulárních cév) byly podány dvě série karboplatiny v dávce 400 mg/m² v intervalu 28 dní, ostatní pacienti byli sledováni. Po mediánu sledování 52 měsíců v rameni s karboplatinou byly 2 relapsy (3,3%), kdežto sledovaných pacientů zrelabovalo 23 (16,1%), 5-letý disease free survival (DFS) byl 96,6% u karboplatiny a 83,5% u pacientů v surveillanci větvi, medián doby do relapsu byl 11 měsíců. Hlavními omezeními prezentované studie byla absence obecně přijímaných prognostických faktorů v době plánování studie. Proto na základě výsledků studie **Warde P. A kolektivu (2002)** (103 pacientů v surveillanci) (2), ve které jako signifikantní prognostické faktory relapsu vyšly lymfatická, potažmo vaskulární invaze, stejní autoři vytvořili novou studii srovnávající surveillanci proti aplikaci adjuvantní chemoterapie karboplatinou v jedné, resp. dvou seriích podle přítomnosti patologických rizikových faktorů. Zde autoři prokázali výrazné snížení rizika relapsu onemocnění na základě in-

dikace chemoterapie/surveillance podle přítomnosti rizikových faktorů: velikost tumoru > 40 mm, invaze do rete testis. Do studie bylo zařazeno 314 pacientů, z nichž 100 (31,8%) bez rizikových faktorů bylo jen sledovaných, 131 (41,7%) s tumorem > 40 mm dostalo jednu sérii karboplatiny a zbývajícím 83 pacientům (33 pacientů s invazí do rete testis a 50 s oběma rizikovými faktory) byly podány dvě série chemoterapie. Prospektivně jako možné rizikové faktory byly sledovány: věk pacientů (<30 v. >30 let), velikost nádoru (>40 mm), patologické stadium pT, vaskulární invaze, invaze do rete testis a předoperační hodnoty bHCG. V době analýzy byl medián doby follow up 34 měsíců. Celkem relabujících onemocnění bylo 6 (6%) u pacientů v surveillanci a 7 (3,3%) u pacientů léčených karboplatinou (0,8% u Tu>40mm, 9,1% s invazí rete testis a 6% u pacientů s oběma kritérii). Všechny relapsy byly lokalizovány v retroperitoneu, s mediánem doby do relapsu 9 měsíců. Pětileté přežití činilo 93,4% u pacientů v surveillanci a 96,2% u pacientů léčených karboplatinou. V rámci všech pacientů ve studii měli signifikantně lepší pětileté přežití pacienti starší 30 let (98,3% v. 90,1%, P= 0,0047), u pacientů sledovaných vyšly jako nezávislé rizikové faktory pro kratší disease free survival (DFS) věk < 30 let (P= 0,0146) a zvýšená předoperační hodnota bHCG (P=0,0369). U pacientů léčených karboplatinou negativně ovlivňují DFS jen invaze do rete testis (5-letý DFS 99,2% v. 91,6%, p=0,0108). Na základě multivariační analýzy výsledků byly identifikovány tři nezávislé prognostické faktory: věk < 30 let u všech pacientů, elevovaná hodnota bHCG před operací u pacientů v surveillanci a invaze do rete testis u pacientů s aplikací karboplatiny (36).

Nejdůležitější a zatím jedinou skutečnou randomizovanou studií fáze III je práce **Olivera a kolektivu (2005)** porovnávající efekt adjuvantní radioterapie proti adjuvantní aplikaci jedné série karboplatiny u klinického stadia I u seminomu. Do této multicentrické mezinárodní studie bylo zařazeno v letech 1996 až 2001 1477 pacientů ve 14 zemích. Vstupními kritérii byly patologické stadium pT1 – 3, klinické a radiologické stadium I, normální hodnoty AFP před i po radikální orchiektomii a normální hodnota bHCG po radikální orchiektomii. Primárním cílem studie bylo zhodnocení DFS, respektive prokázat stejnou efektivitu karboplatiny a radioterapie. Dále byl sledován výskyt sekundárních malignit vycházejících ze zárodečné tkáně i jiných orgánů, kvalita života a morbidita spojená s léčbou. Sekundárním cílem studie bylo porovnání efektu 20 Gy resp. 30 Gy na oblast PAS, proto celkový počet pacientů za účelem dosažení větší výpočetní hodnoty studie byl rozdělen v poměru 5:3 ve prospěch radioterapie. (v době plánování studie nebyly ještě k dispozici výsledky studie TE 18 (12)). Autoři zjistili, že aplikace 1 série chemoterapie s karboplatinou v monoterapii je ve srovnání s adjuvantní radioterapií stejně účinná v prevenci relapsu, lépe tolerovaná s dobrým profilem nežádoucích účinků. Pacienti se dříve vracejí do práce a mají méně kontralaterálních nádorů. Chemoterapie byla aplikována 571 pacientům v dávce podle AUC 7, tj. 7x(glomerulární filtrace v ml/min + 25) den 1. Z pacientů, kteří byli zrandomizováni do ramene adjuvantní radioterapie, 735 pacientů (87%) bylo ozařeno metodou PAS

a 118 (13%) pacientů metodou DL. Dávkou 30 Gy bylo ozařeno 477 (54%) pacientů, 20 Gy dostalo 322 (36%) pacientů, zbytek se pohyboval v rozmezí 23 – 29 Gy. Z akutních nežádoucích účinků dominovaly trombocytopenie (G III a IV u 4% pacientů s chemoterapií proti 0 % u radioterapie, $P < 0.0001$), zatímco incidence dyspepsie byla výrazně vyšší u ozařovaných pacientů ($P < 0.0001$). U pacientů léčených chemoterapií byla v prvních 72 hodinách pozorována větší únava a letargie než u pacientů ozařovaných, přesto se signifikantně více pacientů po chemoterapii dříve vrátilo k normálnímu způsobu života než pacienti ozařovaní. Medián sledování ve studii činil 4 roky. Po dosažení dvouletého sledování byl počet pacientů v kompletní remisi 96,7% všech ozařovaných pacientů a 97,7% pacientů po aplikaci karboplatiny. Po třech letech byl poměr opačný, a to 95,6% v. 94,8% ve prospěch radioterapie (bez statistické významnosti). Pacienti v rameni s karboplatinou měli relaps nemoci častěji v paraaortálních lymfatických uzlinách (74% v. 9% u radioterapie), zatímco progresse nemoci v mediastinu, nadklíčcích a pánvi byla častěji pozorována u pacientů ozařovaných. Za krátkou dobu sledování po léčbě autoři pozorovali celkem 12 druhostranných germinativních nádorů, z nichž pouze 2 u pacientů s karboplatinou a 7 negerminativních nádorů, opět více u ozařovaných pacientů (4:3). Většina pacientů ozařovaných metodou PAS (668 z 735) neměla vystínění kontralaterálního varlete. U těchto pacientů se sekundární germinativní nádor vyskytnul signifikantně častěji než u pacientů s karboplatinou. (5-let hazard ratio 1,96 v. 0,54, $p = 0,04$) (37).

Nevýhodou léčby karboplatinou je nedostatek dat týkajících se pozdních nežádoucích účinků. První prací, která se zabývá přímo pozdní toxicitou této adjuvantní chemoterapie je prospektivní studie **Powlese T. A kolektivu** (38). Autoři shromáždili data od 199 pacientů léčených adjuvantní chemoterapií pro seminom v klinickém stadiu I. Medián doby sledování byl 9 let. Autoři zjistili, že oproti normální zdravé populaci Velké Británie adjuvantní chemoterapie karboplatinou nezvyšuje u léčených pacientů ve sledovaném souboru celkovou mortalitu, počet úmrtí na

kardiovaskulární onemocnění ani riziko vzniku sekundárních malignit.

Závěr

Výše uvedené léčebné možnosti (adjuvantní chemoterapie, radioterapie nebo surveillance) mají dnes oporu v jak v NCCN tak v European Association of Urology (39). Z přehledu publikovaných prací jasně vyplývá snaha o zachování vysoké terapeutické úspěšnosti při co nejnižší léčebné zátěži pacienta. Každý z výše uvedených přístupů má své pro a proti. Pouhá surveillance ušetří až 80% pacientů chemoterapie i radioterapie, tedy potencionálně fatálních akutních i pozdních nežádoucích účinků. Pokud bychom zvolili sledování pacientů podle přítomnosti rizikových faktorů (resp. jejich nepřítomnosti – věk < 30 let, předoperační zvýšená hodnota bHCG, invaze rete testis), tak bychom dosáhli vyléčení prostou orchietomií u 93,4% pacientů. Je ovšem otázka, zda-li by si mnozí samotní pacienti nevybrali raději jistotu ve formě adjuvantní radioterapie, než život v nejistotě po dobu dvou let, kdy je riziko relapsu nejvyšší. Jako standard léčby byla dlouhou dobu považována adjuvantní radioterapie, v českých zemích 25,2 Gy metodou PAS při postižení pT1-2, v případě postižení pT3-4 se aplikuje 30 Gy metodou DL. Bohužel radioterapie s sebou přináší nezanedbatelné riziko sekundárních malignit či úmrtí na ischemickou chorobu srdeční. Možný kompromis terapeutických snah, tedy zachování úspěšnosti léčby při minimálních pozdních důsledcích, pravděpodobně přináší chemoterapie, aplikace karboplatiny v monoterapii v dávce AUC 7. Zdá se, že jedna série karboplatiny má srovnatelný efekt jako adjuvantní radioterapie metodou PAS, která je již standardně přijímána (4,39). Oponenti chemoterapie často argumentují příliš krátkou dobou sledování v randomizovaných studiích, ale follow up radioterapeutických studií zkoumajících redukci pole či dávky není o mnoho delší. Určitým rizikem chemoterapie by mohlo být přílišné spolehnutí na její účinnost, které by mohlo u některých lékařů vést k ztrátě pozornosti při pravidelném sledování po léčbě.

Literatura:

- Klener P. et al.: Klinická onkologie, Galén Praha 2002: 460.
- Warde P., Specht L., Horwich A., et al.: Prognostic Factors for Relapse in Stage I Seminoma Managed by Surveillance: a pooled analysis, *Journal of Clinical Oncology* 20: 4448 – 4452, 2002.
- Klener P. et al.: Klinická onkologie, Galén Praha 2002: 461.
- NCCN.org (internetová stránka). National Cancer Comprehensive Network (updated 1. 2008, citováno 16.1.2007). Dostupné z: <http://www.nccn.org>.
- Busch F. M., Sayegh E. S., Chenault O. W.: Some Uses of Lymphangiography in the Management of testicular Tumors, *Journal of Urology* 93: 490 – 495, 1965.
- Mason M. D., Featherstone T., Ollif J., Howich A.: Inguinal and Iliac Lymph Node Involvement in Germ Cell Tumours of the Testis: Implications for Radiological Investigation and for Therapy, *Clinical Oncology* 3: 147 – 150, 1991.
- Mason M. D., Featherstone T., Ollif J., Howich A.: Inguinal and Iliac Lymph Node Involvement in Germ Cell Tumours of the Testis: Implications for Radiological Investigation and for Therapy, *Clinical Oncology* 3: 147 – 150, 1991.
- Jacobsen K. D., Olsen D. R., Fossa S. D.: External Beam Radiotherapy in Patients with Seminoma Stage I: field type, testicular dose and spermatogenesis, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 39: 95 – 102, 1997.
- Fossa S. D., Horwich A., Russel J. M., et al.: Optimal Planning Target Volume for Stage I Testicular Seminoma: a Medical Research Council randomized Trial. medical Research Council Testicular Tumor Working Group, *Journal of Clinical Oncology* 17(9): 1146, 1999
- Niazi M. T., Souhami L., Sultanem K., et al.: Long – term Results of Para – aortic Irradiation for Patients with Stage I Seminoma of the Testis, *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 61: 741 – 744, 2005.
- Classen J., Schmidberger H., Meisner C., et al.: Para – aortic Irradiation for Stage I testicular Seminoma: results of a prospective Study in 675 Patients. A Trial of the German Testicular Cancer Study Group, *British Journal of Cancer* 90: 2305 – 2311, 2004.

12. Jones G. W., Fossa D. S., Mead M. G., et al.: Randomized Trial of 30 Versus 20 Gy in the Adjuvant Treatment of Stage i Testicular Seminoma: a report on Medical Research Council Trial TE 18, European Organisation for the Research and Treatment of Cancer Trial 30942, *Journal of Clinical Oncology* 23: 1200 – 1208, 2005.
13. Power E. R., Kennedy J., Crown J., et al.: Pelvic recurrence in stage i seminoma: a New Phenomenon that Questions Modern Protocols for Radiotherapy and Follow-up, *International Journal of Urology* 12: 378 – 382, 2005.
14. Šlampa P a kolektiv: Radiační onkologie v praxi, II. aktualizované vydání, Masarykův onkologický ústav, 2007:153 – 157.
15. Bruns F., Bremer M., Meyer A., Karstens H. J.: Adjuvant Radiotherapy in Stage i Seminoma: Is There a Role for Further reduction of Treatment Volume?, *Acta Oncologica* 44: 142 – 148, 2005.
16. Josefson D., Fossa S., The Management Strategies for Stage i Seminoma, *Clinical Oncology* 17: 539 – 542, 2005.
17. Garcia – Serra M., A., Zlotecki R., A., Morris G., C., et al.: Long – term Results of Radiotherapy for Early – Stage Testicular Seminoma, *American Journal of Clinical Oncology* 28: 119 – 124, 2005.
18. Majewski W., Majewski S., Maciejewski A., et al.: Adverse Effects after Radiotherapy for Early Stage (I, Iia, Iib) Seminoma, *Radiotherapy and Oncology* 76: 257 – 263, 2005.
19. Huddart R., A., Norman A., Shahidi M., et al.: Cardiovascular Disease as a Long-term Complication of Treatment for Testicular Cancer, *Journal of Clinical Oncology* 21: 1513 – 1523, 2003.
20. Yeoh E., Razali M., O'Brien P., C.: Radiation Therapy for Early Stage Seminoma of the Testis. Analysis of Survival and Gastrointestinal Toxicity in Patients Treated with Modern Megavoltage Techniques over 10 Years, *Australas Radiology* 37: 367 – 369, 1995.
21. Vallis K., A., Howard G., C., Duncan W., et al.: Radiotherapy for Stages i a II Testicular Seminoma: Results and Morbidity in 238 Patients, *The British Journal of Radiology* 68:400 – 405, 1995.
22. Klener P. et al: Vnitřní lékařství, druhé doplněné vydání, Galén, Praha 2001, 452 – 455.
23. Travis B., L., Fossa S. D., Schonfeld S., J., et al.: Second Cancers among 40 576 Testicular Cancers Patients: Focus on Long – Term Survivors, *Journal of the National Cancer Institute* 18: 1354 – 1364, 2005.
24. Jeffrey M., A., J., Nalesnik G., Sabanegh S. E., Buchholz T., A.: Fertility in Men After Treatment for Stage I and a Seminoma, *American Journal of Clinical Oncology* 27: 584 – 588, 2004.
25. Fossa S., D., Abyholm T., et al.: Post – treatment Fertility in Patients with Testicular Cancer, *British Journal of Urology* 58: 315 – 319, 1986.
26. Petersen P.M., Skakkebaek N.E., Vistisen K. et al.: Semen Quality and Reproductive Hormones before Orchiectomy in Men with Testicular Cancer, *Journal of Clinical Oncology* 17:941, 1999.
27. Choo R., Thomas G., Woo T., et al.: Long – term Outcome of Postorchiectomy Surveillance for Stage i Testicular Seminoma, *International Journal of Radiation Oncology, Biology , Physics* 61: 736 – 740, 2005.
28. Horwich A., Alsanjari N., A'hern R et al: Surveillance Following Orchiectomy for Stage i Seminoma, *British Journal of Cancer* 65: 775 – 778, 1992.
29. Aparacio J., del Muro X. G., Maroto P., et al.: Multicenter Study Evaluating a Dual Policy of Postorchiectomy Surveillance and Selective Adjuvant Single – agent Carboplatin for Patients with Clinical Stage i Seminoma, *Annals of Oncology* 14: 867 – 872, 2003.
30. Klener P. et al.: Klinická onkologie, Galén Praha 2002: 174.
31. Siegert W, Beyer J, Strohscheer I, et al. High-dose treatment with carboplatin, etoposide, and ifosfamide followed by autologous stem-cell transplantation in relapsed or refractory germ cell cancer: a phase I/II study, *Journal of Clinical Oncology* 12:1223, 1994.
32. Oliver R. T. D., Edmonds P. M., Ong J. Y., et al.: Pilot Studies of 2 and 1 Course Carboplatin as Adjuvant for Stage i Seminoma: Should It Be Tested in a Randomized Trial Against Radiotherapy, *International Journal of Radiation Oncology, Biology , Physics* 30: 3 – 8, 1994.
33. Reiter W. J., Brodowicz T., Alavi S., et al:Twelve Year Experience with Two Courses of Adjuvant Single – Agent Carboplatin Therapy for Clinical Stage i Seminoma, *Journal of Clinical Oncology* 19:101 – 104, 2001.
34. Krega S., Kalund G., Otto T., et al: Phase II Study: Adjuvant Single Agent Carboplatin Therapy for Clinical Stage i Seminoma, *European Urology*, 31: 405 – 407, 1997.
35. Dieckman K. P., Krain J., Kuster J, et al:Adjuvant Carboplatin Treatment for Semonima Clinical Stage I, *Journal of Clinical Oncology*, 122: 63 –66, 1996.
36. Aparacio J., Germa R.J., del Muro X.G., et al.:Risk – adapted Management for Patients With Clinical Stage i Seminoma: The Second Spanish Germ Cell Cancer Cooperative Group Study, *Journal of Clinical Oncology* 23: 8717 – 8723, 2005.
37. Oliver R. T. D., Mason M. D., Mead G. M., et al.: Radiotherapy versus Single – dose carboplatin in Adjuvant treatment of Stage i Seminoma: a Randomised Trial, *The Lancet* 366: 293 – 300, 2005.
38. Powles T., Robinson D., Shamash J., Moller H., Tranter N., Oliver T.: The long-term risks of adjuvant carboplatin treatment for stage i seminoma of the testis, *Annals of Oncology*, Nov 28 (Epub ahead of print), 2007.
39. Uroweb.org (internetová stránka) European Association of Urology (updated 3. 2008, citováno 20.3.2008). Dostupné z: <http://www.uroweb.org>

Korespondenční adresa:

Jiří Vyskočil

Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7, 65653 Brno

email: vyskocil@mou.cz, tel:543132450

Došlo / Submitted: 10. 1. 2008

Přijato / Accepted: 21. 4. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

PREDIKCE CITLIVOSTI NÁDOROVÝCH BUNĚK K CHEMOTERAPEUTIKŮM *EX VIVO* – ÚSKALÍ A LIMITACE VLASTNÍ METODY.

CHEMOSENSITIVITY PREDICTION IN TUMOR CELLS *EX VIVO* – DIFFICULTIES AND LIMITATIONS OF THE METHOD.

MICHALOVÁ E.¹, POPRACH A.³, NĚMEČKOVÁ I.¹, NENUTIL R.¹, VALÍK D.², ŽALOUDEK J.⁴, VYZULA R.³,
VOJTĚŠEK B.¹

¹MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ ONKOLOGICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, BRNO

²MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, BRNO

³MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, BRNO

⁴MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ CHIRURGICKÉ ONKOLOGIE, BRNO

Souhrn

In vitro / *ex vivo* testy představují naději, s níž by predikce citlivosti nádoru k vybraným chemoterapeutikům umožnila výběr co nejefektivnější léčby nádorových onemocnění za současné minimální zátěže pacienta. Možnost vytipování účinné látky na základě jednoduchého *ex vivo* testu by navíc jednoznačně zvýšila úspěšnost léčby při selhání standardní chemoterapie či v případě léčby primárně chemorezistentních nádorů. MTT test představuje zdánlivě jednoduchý proces pro stanovení citlivosti izolovaných nádorových buněk k cytostatickým látkám *ex vivo*, nicméně metoda sama je pouze nástrojem, který při nesprávném použití může vést k získání falešných výsledků. Četné limitující kroky značně snižují úspěšnost provedení testu a jednotlivé aspekty metody jsou důvodem k zamyšlení nad vlastním použitím testu.

Klíčová slova: chemorezistence, cytostatika, MTT test, maligní nádory

Summary

Certain hope is entertained in the prediction of chemosensitivity *in vitro* / *ex vivo* for the purpose of selecting the most effective treatment of malignant diseases with minimal patient loading. The possible choice of an effective substance based on the results of a simple *ex vivo* test would increase the success of the treatment in case of standard chemotherapy failure or in the treatment of primary chemoresistant tumor. MTT test seems to be an easy process for the prediction of chemosensitivity of isolated malignant cells *ex vivo*, however each method represents a simple tool, which can provide false results if incorrectly preformed. Numerous limitations significantly reduce the successful evaluation and constituent aspects of the methodic press to further reflections about the proper application of the test.

Keywords: chemoresistance, cytostatic agents, MTT test, neoplasms

Úvod

V dnešní době představuje chemoterapie součást standardních léčebných postupů protinádorové terapie a je rovnocennou léčbě chirurgické a radioterapii. Volba chemoterapeutik, jejich kombinace a dávkovací schémata jsou v případě jednotlivých diagnóz založena na zkušenostech a výsledcích bezpočtu studií. V systémové chemoterapii nádorových onemocnění se standardně využívají v klinických studiích ověřené režimy a statisticky nejúspěšnější terapie je vnímána jako nejlepší léčebný postup. Teprve při selhání léčby první, druhé, nebo vyšší řady je výběr chemoterapie omezen a volba léčby není standardně určena. Nicméně ani statisticky nejefektivnější způsob terapie není zárukou úspěšné léčby a vždy existuje podíl případů dané diagnózy, u nichž není dosaženo očekávaného účinku chemoterapie. Díky rychlému rozvoji molekulárně-biologických a imunohistochemických metod je zřejmé, že kaž-

dý nádor, přestože jednotně morfologicky klasifikován, je tvořen heterogenními populacemi buněk, které mohou disponovat rozdílnými molekulárními vlastnostmi předurčujícími jejich proliferační aktivitu, pohotovost k apoptóze, metastatický potenciál a taktéž stupeň citlivosti k aplikované terapii (1).

Účinek chemoterapeutik není přísně specifický a cytostatika nepůsobí selektivně na nádorové buňky, nýbrž svými toxickými účinky postihují více či méně i buňky normální. Vedlejší účinky cytostatik jsou dalším negativním faktorem chemoterapie a mohou vést až k závažným poškozením nemocného. Respektování faktorů individuality a zavádění „personalizované medicíny“ je směr, jehož cílem je co nejvíce zvýšit účinnost terapie s minimálním zatížením pacienta. Jedním z přístupů individualizované chemoterapie je snaha o výběr cytostatik s maximální účinností pro daný nádor za současné eliminace těch, k nimž je nádor

vysoce rezistentní, a to na základě hodnocení citlivosti nádorové populace k chemoterapeutikům v *ex vivo* podmínkách. Prediktivní *ex vivo* testy chemorezistence sice nikdy nemohou zcela napodobit podmínky *in vivo* a na základě jejich výsledků tedy není možno naprosto přesně předpovědět citlivost nádoru k danému cytostatiku. Cílem *ex vivo* testů je však nalézt cytostatikum potenciálně účinné pro daný typ nádoru a to zejména v případě pacientů, kteří již vyčerpali možnosti standardní léčby či pro něž standardní chemoterapie neexistuje.

Nejrozšířenější metodou *ex vivo* stanovení citlivosti k chemoterapeutikům je tetrazoliový test (jinak zvaný MTT test) (2, 3, 4). Metoda testu je založena na izolaci buněk ze vzorku nádorové tkáně a jejich následné kultivaci *ex vivo* s vybranými cytostatiky o různých koncentracích. Přežívání buněk v prostředí účinných látek je hodnoceno na základě zachování jejich metabolické aktivity, jejíž intenzita je hodnocena mírou schopnosti živých buněk redukovat žlutou rozpustnou tetrazoliovou sůl, MTT (3-[4,5-dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid), mitochondriálním enzymem, sukcinát-dehydrogenázou, na nerozpustný modrý formazan (5), který je následně rozpuštěn organickým rozpouštědlem (6, 7). Absorbance barevného produktu u buněk kultivovaných s testovaným cytostatikem je následně měřena fotometricky a získané hodnoty jsou srovnány s hodnotami identické kontrolní kultury bez ovlivnění. Metoda byla použita například pro hodnocení citlivosti nádorových buněk žaludku, střeva, sleziny, prsu, jícnu nebo lymfomů (8, 9, 10, 11).

V průběhu zavádění a optimalizace metody na pracovišti Masarykova onkologického ústavu (MOÚ) i během rutinního testování vzorků vyvstala řada problémů a otázek, které vyvolaly prudkou diskusi týkající se vlastního laboratorního provedení i principu samotné metody. Tato práce je rozbohem vybraných bodů vlastního provedení testu s cílem přiblížit princip metody a poukázat na faktory hrající úlohu ve výsledném hodnocení.

Metoda, výsledky a diskuse

a) izolace buněk ze vzorku nádorové tkáně

Za účelem homogenizace je vzorek tkáně maximálně rozstříhán a propasírován přes sítko do kultivačního média. Vzniklá suspenze obsahuje uvolněné buňky tkáně, které jsou následně purifikovány gradientovou centrifugací pomocí systému Lymphoprep (Ficoll-Isopaque, hustota 1,077 g/ml, Axis-Shield PoC AS). Část buněk je obarvena v Trypan Blue (Invitrogen Corp.) a je stanoven počet izolovaných živých buněk počítáním v Bürkerově komůrce (Meopta) (12). Suspenze buněk je následně dle potřeby ředěna na konečnou koncentraci 1×10^6 živých buněk/ml, přičemž pro stanovení citlivosti k 1 cytostatiku je zapotřebí zhruba 1 ml této suspenze. Klíčovým a tedy i omezujícím faktorem pro další postup je tedy množství získaných živých buněk. Při nedostatku živých buněk je citlivost hodnocena pouze k vybraným cytostatikům, nebo není u daného vzorku hodnocena vůbec.

Vzhledem k pozorované obecně nízké výtěžnosti byla testována možnost vynechat centrifugaci v gradientu a uvolněné buňky pouze promýt kultivačním médiem či fosfát-borátovým pufru ($1 \times$ PBS, pH 7,4) (13). Systém Lymphoprep

je původně navržen pro izolaci mononukleárních buněk (lymfocytů/-blastů a monocytů/-blastů) z periferní krve či kostní dřeně (14). V případě izolace nádorových buněk by gradientová centrifugace měla napomoci k odstranění mrtvých buněk, kdy mrtvé buňky klesají na dno gradientu, přičemž živé buňky se udržují na rozhraní Lymphoprepu a purifikované suspenze. Srovnáním obou postupů na vzorcích dostatečného objemu bylo zjištěno, že centrifugací v gradientu u některých z nich došlo i ke značným ztrátám živých buněk, aniž bylo dosaženo vyšší čistoty výsledné suspenze. Přestože je použití gradientové centrifugace deklarováno v odborné literatuře (15, 16), jevílo se několikrát promytí suspenze srovnatelné a samotný proces představoval značnou časovou úsporu. Celkové množství izolovaných buněk ze vzorku nádorové tkáně je však velmi individuální a vynechání gradientové centrifugace při zpracování se odvíjí od charakteru vzorku a poměru mrtvých a živých buněk v suspenzi. Neexistuje závislost mezi objemem výchozího materiálu a počtem izolovaných buněk. Výtěžnost vzorku je hodnocena na základě zastoupení živých buněk v získané suspenzi. Vzorek je po resekci transportován v kultivačním médiu při pokojové teplotě a po patologické charakterizaci okamžitě zpracován. Avšak ani minimální časová prodleva není zdaleka zárukou úspěšné izolace živých buněk a mnohdy vzorek nemůže být dále kultivován kvůli převládajícím mrtvým buňkám v suspenzi. Je třeba poznamenat, že izolačním postupem nelze mrtvé buňky zcela oddělit. Jsou tedy v rámci suspenze převedeny do kultury, kde tvoří slabší či silnější pozadí. Při jejich převaze mohou ovšem ovlivnit okolní prostředí kultury a tím i podmínky pro přežívající buňky. Převaha izolovaných mrtvých buněk je zřejmě způsobena zvýšenou citlivostí vzorku na stresové podmínky změny prostředí, poškozením buněk vlastním mechanickým zpracováním vzorku, předchozí léčbou pacienta, atd.

Při vlastní izolaci jsou buňky uvolněny do suspenze kultivačního média důkladným rozstříháním nádoru, propasírováním tkáně přes sítko a následným několikerým promytím. Získání homogenní suspenze jednotlivých buněk je nezbytné pro zajištění shodného počtu kultivovaných buněk ve všech srovnávaných jamkách. V některých případech je však úplné rozrušení buněčných shluků prakticky nemožné, jindy i při intenzivním rozsuspendování dochází k opětovnému shlukování buněk do kulovitých útvarů, pozorované i jinými autory (17). Enzymatické rozrušení tkáně v případě rigidních vzorků nádorů bylo testováno, avšak bez významnějšího efektu. Kvůli přítomnosti shluků ve výchozí suspenzi pak není možno zajistit shodný počet buněk v jednotlivých jamkách kultivační desky, který je jedním z klíčových předpokladů úspěšného hodnocení. Shluky mohou být, bohužel jen částečně, odstraněny krátkodobou centrifugací či sedimentací. Tento negativní faktor značně komplikuje dokonalé provedení testu a snižuje kvalitu získaných dat.

Konečně je třeba zdůraznit, že vlastní proces izolace buněk ze vzorku nijak neselektuje nádorové buňky a suspenze buněk použitá pro kultivaci *ex vivo* pak představuje heterogenní populaci nádorových a normálních buněk, které v různé míře přispívají svými hladinami metabolismu k výsledné hodnotě absorbance a ke konečnému hod-

nocení. Byly popsány metody purifikace nádorových buněk (15, 18), nicméně ani jedna z nich není stoprocentním nástrojem pro získání čisté suspenze nádorových buněk. Metoda násobné gradientové centrifugace (15) je kvůli vysokým ztrátám zcela nepoužitelná pro získání „vysokého“ počtu buněk. Purifikace nádorových buněk ze suspenze na základě rozdílné tendenci buněk přisedat na pevné kultivační povrchy (18) taktéž nezaručuje dostatečnou separaci nádorových buněk, ba naopak může být zdrojem selekce uvnitř jejich populace. V opačném případě lze na nádor pohlížet jako na heterogenní tkáň tvořenou maligními buňkami a řadou podpůrných buněk, bez nichž by samotné nádorové buňky nemohly existovat. Pak je možno oprostít se od faktu, že je citlivost stanovována v blíže neurčené heterogenní populaci a výsledek jednoznačně neodráží vlastnosti nádorových buněk. Nicméně v porovnání s provedením testu u homogenní kultury buněčné linie je právě kvůli tomuto faktu provádění testu u vzorků nádorové tkáně značně kontroverzní.



Obrázek č. 1: Suspenze izolovaných buněk vzorku karcinomu ledviny – jamka kontrolní kultivace bez přítomnosti cytostatika.

b) kultivace buněk *ex vivo* s cytostatiky

Suspenze buněk je přenesena do kultivační desky a buňky jsou kultivovány 72 hodin při 37 °C a 5 % CO₂ s cytostatiky ředěnými na 6 odlišných koncentrací a to vždy v duplikátu. Následně je k buňkám přidán substrát, který metabolizován pouze živými buňkami umožní sledovat vliv cytostatika. Výsledek chování buněk za jednotlivých podmínek umožní sestavit křivku dávkové odpovědi a stanovit EC₅₀ (efektivní koncentrace s 50% mortalitou buněčné populace), z níž je možno odvodit citlivost vzorku k danému cytostatiku. Namísto klasického MTT substrátu lze v tomto případě použít reagentii WST-1 (Roche Diagnostics). Tento načervenalý 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát je redukován na rozpustný temně červenohnědý formazan, přičemž daná reakce probíhá pouze na mitochondriální membráně živých buněk. Intenzita zabarvení formazanu je hodnocena spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm. Hodnota absorbance roztoku pak odpovídá intenzitě metabolismu a tedy viabilitě buněk. Použití WST-1 metodu vyhodnocení zjednodušuje a urychluje (19, 20).

Na optimální dobu přidání látek do kultury existují různé

pohledy. Při přenosu do *ex vivo* kultury jsou buňky vystaveny stresovým podmínkám, které mohou snížit jejich životaschopnost a tak zkreslit výsledky účinku cytostatických látek přidávaných ke kultuře bezprostředně po izolaci. Zůstává však zachován původní profil buněk. Při několikanásobné adaptaci buněk v kultuře *ex vivo* bez cytostatik jsou sice sníženy akutní stresové faktory spojené s explantací, na druhé straně dochází k jisté selekci a do kontaktu s cytostatiky tak přichází již neadaptovanější populace, která se může genotypově i fenotypově lišit od původního nádoru.

Při prvotním záměru testovat citlivost k chemoterapeutikům u širokého spektra diagnóz a tedy vysokého počtu vzorků se na MOÚ jevílo výhodným dopředu připravovat kultivační desky s kultivačním médiem a roztoky cytostatik ředěných v kultivačním médiu a skladovat je při -20 °C až do momentu jejich použití. Do takto připravených a rozmražených kultivačních desek pak byl přidán pouze požadovaný objem suspenze izolovaných buněk vzorku v kultivačním médiu. Zmrazení však mělo za následek znehodnocení kultivačního média vysrážením některých jeho složek vlivem nízké teploty a vznikem krystalů, které následně ovlivnily celkovou absorbanci v jednotlivých jamkách.

a) A₄₅₀=0,182

b) A₄₅₀=0,237

Obrázek č. 2: Vliv teploty na kultivační médium – A₄₅₀ jamky negativní kontroly s kultivačním médiem bez cytostatika a bez suspenze buněk. a) médium skladované při 4 °C (A₄₅₀ = 0,182), b) médium skladované při -20 °C (A₄₅₀ = 0,237).

Dalším negativním faktorem tohoto postupu byla nevyhnutelná kombinace kultivačních médií různého stáří a tím pH v rámci desky (změna pH kultivačního média v čase je pozorovatelná změnou jeho barvy díky obsahu fenolové červeně), která také přispěla k odchylkám absorbance. Mezi nestandardní postupy lze jmenovat i dlouhodobé skladování cytostatických látek (byť při nízké teplotě) ředěných v kultivačním médiu v předpřipravených kultivačních deskách. Pro testování citlivosti jsou používána cytostatika v podobě léčiv. Dle příbalových informací jednotlivých preparátů lze vyvodit, že jejich naředění do infúzních roztoků s obsahem solí a organických látek či v tomto případě velmi komplexního roztoku kultivačního média narušuje stabilitu účinné látky, kterou výrobce v takovém případě garantuje pouze na omezenou dobu v závislosti na typu látky. Stabilita cytostatik, která jsou dodávána ve formě lyofilizátů, je pak snížena již jejich vlastním rozpuštěním, a je proto nutné převést je do roztoku těsně před použitím. Potřebné roztoky cytostatik a jednotlivé kultivační desky je třeba připravovat těsně před jejich použitím. Není tak důvod k dlouhodobému skladování roztoků cytostatik, nedochází ke znehodnocení kultivačního média a k jeho případnému kombinování v rámci desek. Tímto je spolu se správnou manipulací zabezpečena i minimální degradace účinných látek.

c) hodnocení citlivosti na základě metabolické aktivity. Naměřené hodnoty absorbancí jednotlivých jamek kultivační desky jsou převedeny do programu Chemorezist 1.0 (21). Na základě nich jsou po odečtení absorbance negativní kontroly (= kultivační médium) sestrojeny křivky přežití, tedy podíl přežívajících buněk při jednotlivých koncentracích cytostatika vzhledem k pozitivní kontrole (= kultura bez cytostatika). Z průměrných křivek vycházejících z dvojího opakování koncentrační řady jsou pak odvozeny EC_{50} pro jednotlivá cytostatika. Vyšetřovaný nádor je považován za rezistentní, jestliže jeho izolované buňky přežívají (v tomto případě nadále vykazují metabolickou aktivitu na mitochondriální membráně) v prostředí chemoterapeutika o dané koncentraci z více než 50 %. Samotná kultivace *ex vivo* pro buňky představuje stresové podmínky, které mohou ovlivnit jejich životaschopnost. Stanovení citlivosti u slabě rostoucích či metabolizujících kultur (tj. buněk s nízkou mírou přeměny barevného substrátu i v kontrolní kultivaci) pak není možné, neboť výstupní hodnoty absorbancí jsou mnohem více zatíženy odchylkami způsobenými například již zmíněnými shluky buněk v suspenzi. Při závěrečném hodnocení pak nelze kvůli přítomnosti extrémních hodnot získat standardní křivky přežití, není možno odvodit odpovídající průměrnou křivku přežití pro stanovení EC_{50} (nízko korelující křivky přežití vycházející z dvojího opakování koncentrační řady cytostatika) a získaná data lze nazvat jako „nesmyslná“. Citlivost vzorku k danému chemoterapeutiku je tak nehodnotitelná. U intenzivně rostoucích či metabolizujících buněk představují drobné shluky pouze malé odchylky od celkových absorbancí a na výsledné křivky nemají významný vliv. Bohužel ani zařazení dalšího opakování koncentrační řady by v tomto případě rozhodně nemělo výraznější

vliv na výslednou průměrnou křivku, mnohdy by to ani nebylo možné z důvodu nedostatku materiálu. V určitém procentu případů buňky nejsou dostatečně odolné vůči všem stresovým podmínkám a v průběhu kultivace odumírají a to i v kultuře bez účinných látek. Tuto situaci není možno nijak zmírnit a takovou kultivaci pak evidentně není možno vyhodnotit. Je jisté, že v takto heterogenní populaci, jako je suspenze buněk získaná ze vzorku nádoru, dochází v průběhu kultivace s cytostatiky k selekci subpopulací více či méně citlivých k dané účinné látce, které se různou mírou podílejí na finálním hodnocení.

Závěr

Nádorová tkáň představuje velmi heterogenní systém, pro nějž je typické zastoupení normálních a nádorových buněk v různém poměru. Každý vzorek byť se stejnou diagnózou představuje jedinečnou tkáň odrážející individuální spektrum poškození normálních buněk vedoucích k maligní transformaci a individuální vývoj nádoru. Celková úspěšnost testu je předurčena zejména vzorkem samotným, tedy množstvím živých buněk a jejich schopností odolat stresovým podmínkám při zpracování vzorku a jejich chováním v podmínkách *ex vivo*. Kromě problematického výchozího materiálu však i drobné chyby v provedení metodiky mohou samotné či v kombinaci ovlivnit kvalitu získaných dat a tím i výsledek testu. Nicméně jako každá metodika, má i MTT test své limity. Není pomocí něj možno odlišit cytotoxický a cytostatický účinek na kultivované buňky a celkový výsledek testu může být značně ovlivněn přítomností vysokého procenta normálních buněk v kultuře. Pokud je k výsledkům MTT testu přihlíženo jako k poslední možnosti volby potenciálně účinného cytostatika, kdy standardní způsoby léčby nejsou účinné a pacient již prošel několika fázemi chemoterapie, je třeba vzít v úvahu, že původně stanovený účinek látky bude již do značné míry zkreslen adaptací odolávajících nádorových buněk. Rezistentní nádorová populace nemusí nutně vzniknout pouze dlouhodobou selekcí, ale naopak může být výsledkem rychlé aktivace molekulárních mechanismů zvýšené exprese genů rezistence či inhibice exprese cílových genů spojených s maligním potenciálem buněk (22). Především je nutno poznamenat, že *ex vivo* testy nemohou dostatečně napodobit podmínky lidského těla. Konečné vyhodnocení vzorku jako citlivého k určitému cytostatiku na základě *ex vivo* testu proto ještě nemusí nutně znamenat, že pacient bude na nasazenou léčbu úspěšně reagovat. Samotný princip metody je prostý a logický a takto jej lze velmi dobře aplikovat při studiích na buněčných liniích. Nicméně hodnocení citlivosti heterogenní buněčné populace izolované z nádoru jen slabě odráží skutečné vlastnosti nádorových buněk a nádoru jako celku co do odpovědi na přítomnost chemoterapeutik.

Poděkování

Tato práce byla podpořena z finančních zdrojů MZ ČR pro výzkumný záměr MOU MZOMOU2005 s názvem „Funkční diagnostika zhoubných nádorů“.

Literatura

1. Lichý, J.H., Dalbergue, F., Washington, C. *et al.* Genetic heterogeneity in ductal carcinoma of the breast. *Lab Invest*, 2000, 80: 291-301.
2. Black, M.M., Speer, F.D. Further observation on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the *in vitro* dehydrogenase activity of cancer tissue. *J Natl Cancer Inst*, 1954, 14: 1147-1158.
3. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, 65: 55-63.
4. Carmichael, J., De Graff, W., Gazdar, A. *et al.* Evaluation of a tetrazolium-based semi-automatic colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 1987, 47: 936-942.
5. Slater, T.F., Sawyer, B., Strnuli, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta*, 1963, 77: 383-393.
6. Denizot, F., Lang, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 1986, 89: 271-277.
7. Berridge, M.V., An, S.T., McCoy, K.D., Wang, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 1996, 4: 15-19.
8. Suto, A., Kubota, T., Shimoyama, Y. *et al.* MTT assay with reference to the clinical effect of chemotherapy, *J Surg Oncol*, 1989, 42: 28-32.
9. Furukawa, T., Kubota, T., Suto, A. *et al.* Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay, *J Surg Oncol*, 1991, 48: 188-193.
10. Saikawa, Y., Kubota, T., Furukawa, T. *et al.* Single-cell suspension assay with an MTT end point is useful for evaluating the optimal adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer, *Jpn J Cancer Res*, 1994, 85: 762-765.
11. Yamaue, H., Tanimura, H., Nakamori, M. *et al.* Clinical evaluation of chemosensitivity testing for patients with colorectal cancer using MTT assay. *Dis Colon Rectum*, 1996, 39: 416-422.
12. Freshney, R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 1987, p. 117, Alan R. Liss, Inc., New York.
13. Xu, J.M., Song, S.T., Tang, Z.M. *et al.* Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay *in vitro*. *Breast Cancer Res Treat*, 1999, 53: 77-85.
14. Bøyum, A. Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Invest Suppl*, 1968, 97: 7.
15. Yamaue, H., Tanimura, H., Tsunoda, T. *et al.* Chemosensitivity testing with highly purified fresh human tumour cells with the MTT colorimetric assay. *Eur J Cancer*, 1991, 27: 1258-1263.
16. Yamaue, H., Tanimura, H., Noguchi, K. *et al.* Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumour cells using MTT assay. *Br J Cancer*, 1992, 66: 794-799.
17. Krásná, L., Matoušková, E., Janoušek, M., *et al.* Využití buněk získaných z maligních výpotků k vedení léčby pacientů s pokročilým nádorem. *Klinická onkologie*, 2000, 13 (zvl. č. 2): 43-48.
18. Shimoyama, Y., Kubota, T., Watanabe, M. *et al.* Predictability of *in vivo* chemosensitivity by *in vitro* MTT assay with reference to the clonogenic assay. *J Surg Oncol*, 1989, 41: 12-18.
19. Yano, T., Teruya, K., Shirahata, S. *et al.* Ras oncogene enhances the production of a recombinant protein regulated by the cytomegalovirus promoter in BHK-21 cells. *Cytotechnology*, 1994, 16: 167-178.
20. Takenouchi, T., Muneoka, E. Trophic effects of substance P and beta-amyloid peptide on dibutyl cyclic AMP-differentiated human leukemic (HL-60) cells. *Life Sci*, 1995, 56: PL479-484.
21. Regner, B., Dušek, L., Hajdúch, M. Software chemorezist (verze 1.0) - komplexní nástroj pro analýzu dat a management testů chemorezistence nádorů. *Klinická onkologie*, 2000, 13 (zvl. č. 2): 30-32.
22. Di Nicolantonio, F., Mercer, S.J., Knight, L.A. *et al.* Cancer cell adaptation to chemotherapy. *BMC Cancer*, 2005, 5: 78.

Korespondenční adresa:

Mgr. Michalová Eva
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: michalova@mou.cz

Došlo / Submitted: 12. 3. 2008

Přijato / Accepted: 4. 5. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

POLYMORFIZMUS GÉNU P 53 A APOPTÓZA U PACIENTOV S NÁDORMI PĽÚC - NAŠE SLEDOVANIE.

POLYMORPHISM OF GEN P53 AND APOPTOSIS IN PATIENTS WITH MALIGNANT LUNG DISEASE – OUR OBSERVATION.

SAUKA C.¹, KOHÚT A.², KUNDRÁT I.¹, JANÍK M.¹

¹II. CHIRURGICKÁ KLINIKA, FN L.PASTEURA, KOŠICE, SLOVENSKÁ REPUBLIKA

²ÚSTAV FARMAKOLÓGIE LF UPJŠ, KOŠICE, SLOVENSKÁ REPUBLIKA

Súhrn

Východisko: Mnohé dokázané zmeny v genómoch buniek sú dávane do súvislosti so vznikom nádorov. Apoptóza, „programovaná“ smrť bunky, ktorá je morfológicky odlišná od nekrózy, je jedným z kontrolných mechanizmov delenia buniek a taktiež sa podieľa na tumorigenéze. **Metódy a výsledky:** Autori prezentujú svoje výsledky sledovania polymorfizmu génu p53 a úrovne apoptózy v skupine pacientov s potvrdenými malígnymi ochoreniami pľúc. Z porovnávaní genetického polymorfizmu génu p53 pacientov so zdravými jedincami vyplýva že rozloženie alel BstUI A2 a MspI A1 bolo spojené s pľúcnym karcinómom. U pacientov s karcinómom pľúc je apoptóza periférnych lymfocytov signifikantne zvýšená. Zo skupiny nemalobunkových (NSCLC) nádorov bola najvyššia u adenokarcinómov. Úroveň apoptózy bola taktiež sledovaná v korelácii s polymorfizmom génu p53. Výrazne zvýšenie apoptotických buniek sa zistilo u homozygotov BstUI 2/2 a MspI 2/2. Ako reakcia na chirurgický zákrok sa apoptóza lymfocytov v prvý aj druhý deň po operácii výrazne zvýšila. Sledované boli preto aj počty lymfocytov v periférnej krvi. Absolútne aj relatívne počty lymfocytov v diferenciálnych krvných obrazoch operovaných pacientov boli nižšie. **Záver:** Sledovanie polymorfizmu známych génov poukazuje na riziko ochorenia nádorom. Spolu so sledovaním úrovne apoptózy by mohlo dotvárať komplexnosť obrazu nádorového ochorenia pľúc či pomáhať určovať jeho prognózu.

Kľúčové slová: apoptóza, genový polymorfizmus, gén p53, malígne ochorenie pľúc

Summary

Backgrounds: Many proved alterations in genomes of cells are said to be related to tumorigenesis. Apoptosis - a “programmed” death of cell, which has different morphology from necrosis, is one of the control mechanisms of cell division and participates in tumorigenesis. **Methods and material:** The authors present their results of analysis of the relation between genetic polymorphism of the p53 gene and the level of apoptosis in patients with confirmed malignant lung disease. Comparison of genetic polymorphism of the p53 gene in patients with the healthy group showed that allocation of BstUI A2 and MspI A1 alleles was significantly related to lung cancer. The apoptosis of peripheral lymphocytes was significantly increased in lung cancer patients. The highest increase of apoptosis in non-small cell lung cancer (NSCLC) group was found in adenocarcinomas. The level of apoptosis was also studied in correlation to polymorphism of the p53 gen. Substantially higher percentage of apoptotic cells was detected in BstUI 2/2 and MspI 2/2 homozygotes. In response to operation a distinctive increase of apoptosis in the first and second postoperative day was recorded. Therefore a lymphocyte count in peripheral blood was also monitored. The lymphocyte count in patients that underwent the operation proved a decrease in absolute and relative values. **Conclusion:** Observation of known genetic polymorphisms indicates the risk of malignant disease. Together with the analysis of level of apoptosis it may add to complexity of the nature of malignant disease or serve as determinants of its prognosis.

Key words: apoptosis, genetic polymorphism, gene p53, lung cancer

Úvod

Štúdium ľudských neoplázií dokázalo, že nádorové ochorenie vzniká akumuláciou poškodení bunkových génov. Tieto zmeny postihujú hlavné tri skupiny génov: protoonkogény a/alebo antionkogény a gény zodpovedné za opravu DNA. Detekcia mutácií nádorových supresorových génov (antionkogénov) sa využíva pri stanovení dedičných predispozícií k vzniku nádoru v rodinách s vysokým výskytom niektorých ochorení. Molekulárna diagnostika pritom umožňuje detekciu aj ojedinelých nádorových buniek.

Využívajú sa pritom mutácie, ktoré sú charakteristické i pre väčšinu ľudských sporadických nádorov. Ide najmä o potvrdenie mikrosatelitovej nestability, detekciu mutácií v onkogéne RAS či mutácií v nádorových supresorových génoch (1,2).

Medzi najčastejšie genetické mutácie nádorov ľudí patria tie, ktoré postihujú antionkogén p53 nachádzajúci sa na chromozóme 17q11. Funkčným produktom génu p53 je jadrový fosfoproteín p53 prítomný vo väčšine zdravých tkanív. Jeho tzv. divoký typ riadi mechanizmom supresie

a podporou diferenciácie procesy proliferácie a apoptózy. Práve strata alely na chromozóme 17 a bodové mutácie génu p53 sú častými genetickými zmenami pri malígnych ochoreniach. Mutácia génu vedie k zvýšenej produkcii mutantného p53, ktorý stráca supresorovú aktivitu divokého typu, funguje ako inaktívny p53 proteín či nadobúda transformačnú aktivitu. Imunohistochemickými metódami sa zvýšená prítomnosť mutantného typu p53 zisťuje vo vyše 50% primárnych karcinómov mliečnej žľazy, pľúc, čreva, ale aj pri iných malígnych ochoreniach. Napríklad zvýšená produkcia mutantného p53 pri karcinóme prsníka koreluje s nízkou diferenciáciou nádorov, chýbaním ER a ukazuje sa ako nepriaznivý prognostický faktor s kratším prežívaním. Pomocou metód molekulovej genetiky je možné dokázať genetické variácie samotného génu p53. Ide o recesívny gén a pre ovplyvnenie jeho funkcie nepostačuje zmena jednej alely. U väčšiny ľudských nádorov sa našla inaktívacia oboch alel génu p53. Keďže mutácia sa nachádza v každej bunke je možné ju sledovať v bunkách lymfocytov z periférnej krvi, z ktorých sa izoluje DNA na ďalšiu analýzu. Apoptóza je „programovaná“ smrť bunky, morfológicky odlišná od nekrózy, pasívneho spôsobu bunkovej smrti (3). Tak ako mechanizmy proliferácie a diferenciácie buniek je aj apoptóza považovaná za jeden z kritických bodov bunkovej kontroly. Defekty v procesoch kontroly bunkovej smrti môžu predĺžiť životný cyklus buniek a prispieť k neoplastickej bunkovej expanzii. V práci bol hodnotený vzťah genetického polymorfizmu génu p53 ku jednotlivým typom nádorov a jeho korelácia s mierou apoptózy a nekrózy lymfocytov u pacientov s karcinómom a vzorkami krvi zdravých jedincov. Taktiež reakcia na operáciu pacientov zmenou úrovne apoptózy a počet lymfocytov v diferenciálnom krvnom obraze pred operáciou a po nej.

Metodika

Vyhodnocovali sme náhodne vzniknutý súbor pacientov, u ktorých bolo dokázané malígne ochorenie pľúc v rokoch 1998 až 2003 vo FN L. Pasteura v Košiciach. U pacientov sa spravili kompletne klinické a laboratórne vyšetrenia a zároveň sa urobili odbery krvi na stanovenie polymorfizmu génu p53 a úrovne apoptózy. Tieto vyšetrenia boli robené v Ústave farmakológie LF UPJŠ. Zo zdravotníckej dokumentácie menšieho súboru pacientov, ktorí boli operovaní na II. chirurgickej klinike sme porovnávali počty lymfocytov v periférnej krvi. (Nie všetci diagnostikovaní pacienti boli indikovaní k operácii a časť z indikovaných mohla byť operovaná v inom zdravotníckom zariadení).

Vyšetrované súbory

Do nášho sledovania bolo zaradených 109 pacientov s histologicky potvrdenou diagnózou malígneho ochorenia v pľúcach vo FN L. Pasteura. Stanovenie genetického polymorfizmu p53 a úrovne apoptózy bolo urobené pred začatím liečby. V súbore bolo 84 mužov a 25 žien a ich priemerný vek bol 61,6 rokov (41 - 79). Kontrolné skupiny na štúdium genetického polymorfizmu tvorilo 113 vzoriek na sledovanie apoptózy 25 krvných vzoriek zdravých darcov. V ďalšom súbore pacientov, kde bola sledovaná úroveň apoptózy a jej vzťah ku chirurgickej liečbe bolo zarade-

ných 15 pacientov (mužov) s pľúcnym karcinómom. Krvné vzorky boli odobraté jeden deň pred operáciou a potom v prvý a druhý deň po operácii.

Počty lymfocytov pred a po operácii sme hodnotili z dokumentácie 32 operovaných pacientov.

Stanovenie polymorfizmov génu p53

1. Izolácia DNA: DNA bola izolovaná z 5 ml periférnej krvi s prídavkom 0,5 ml 0,5M EDTA, použitím tzv. vysokotlačovej metódy.

2. Reštrikčná analýza polymorfizmov p53: Na detekciu p53-BstUI v exóne 4 na kodóne 72 bola použitá reštrikčná endonukleáza BstUI. Na detekciu p53-MspI v intróne bola použitá reštrikčná MspI. Na základe reštrikčnej analýzy sú pre obidva polymorfizmy definované alely označované ako A1 a A2.

Stanovenie apoptózy

Ku stanoveniu úrovne apoptózy sa použila metóda založená na farbení fosfatidylserínu Anexínom v (jeho externalizácia je súčasťou apoptotických zmien bunky) a na súčasnom určení smrti nekrozou (farbenie pomocou propidium iodidu). Detekcia buniek bola robená prietokovou cytometriou.

Počítanie lymfocytov

Na vyšetrenie krvi sa vo FN L. Pasteura používa automatický analyzátor KX-21N. Výsledky vytlačí vo forme diferenciálneho krvného obrazu. Hodnotili sme absolútne aj percentuálne počty lymfocytov.

Štatistické hodnotenie

Na štatistické vyhodnotenie sme použili Studentov t-test. Na vyhodnotenie genetického polymorfizmu bol použitý Personov χ^2 -test. Frekvencia alel bola hodnotená podľa Hilla (Hill, 1974). Pri výpočtoch bol použitý software ARCUS QU-ICKSTAT Biomedical ver.1. 1. Štatistické vyhodnocovanie počtu lymfocytov sa robilo Wilcoxonovým párovým testom.

Výsledky

Distribúcia genotypu a frekvencia alely A1 a A2 pri dvoch polymorfizmoch u zdravých jedincov a u pacientov s pľúcnym karcinómom sú zhrnuté v tabuľke 1. V obidvoch skupinách (zdraví aj pacienti) sme pozorovali zhodu s Hardy – Weinbergerovou rovnicou. Vo výskyte polymorfizmu BstUI a MspI nebol významný rozdiel. Avšak rozloženie BstUI A2 a MspI A1 alel bolo spojené s pľúcnym karcinómom.

Polymorfizmus		p53 typ			A 1 A 2	χ^2 HW	N
		1 - 1	2 - 1	2 - 2			
BstUI	Kontroly	15	45	53	0,332 0,668	1,1748	113
	Pacienti	5	51	53	0,280 0,720 ^a		
Msp I	Kontroly	3	24	86	0,133 0,867	0,6773	113
	Pacienti	1	36 ^c	72	0,174 ^b 0,833		

Tabuľka č. 1: Genetický polymorfizmus p53 (porovnanie pacientov a zdravých ľudí).

Rozdiely vo frekvencii alel zdraví vs. pacienti $^aP = 0,234$, $^bP = 0,224$. Rozdiely v distribúcii genotypu: χ^2 -test. Heterozygoti vs. homozygoti $^cP = 0,048$ Distribúcia genotypu p53 BstUI A2 a MspI A1 sa spája s pľúcnym karcinómom. Pri významnosti $p < 0,05$ je $^cP = 0,048$.

původní práce

V tabuľke 2. sú údaje o distribúcii genotypu MspI vo vzťahu k histologickej skupine pľúcneho karcinómu: malobunkový a nemalobunkový rozdelený na tri podskupiny: skvamózný, veľkobunkový a adenokarcinóm. Iba u MspI heterozygotov bola asociácia s výskytom adenokarcinómu OR 3,24 ($P = 0,038$). MspI heterozygoti v iných skupinách boli spojené s vyšším výskytom, ale štatisticky ne-signifikantným.

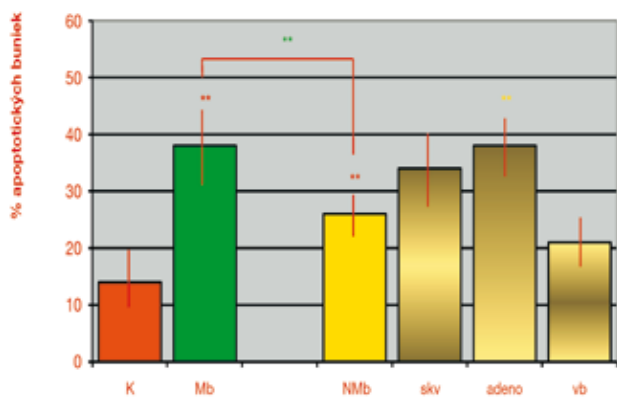
Typ karcinómu	P 53- MspI typ			P	OR 95% CI
	1-1	2-1	2-2		
Malobunkový	0	5	7	0,112	2,65 0,77 – 9,09
Skvamózný	1	23	53	0,176	1,60 0,81-3,07
Veľkobunkový	0	1	4	-	2,94
Adenokarcinóm	0	7	8	0,038	3,24 1,07– 9,85

Tabuľka č. 2: Výskyt typu karcinómu vo vzťahu k MspI A1/A2 genotypu. Typ karcinómu vo vzťahu k MspI A1/A2 genotypu. Iba u MspI heterozygotov bola asociácia s výskytom adenokarcinómu: OR 3,24 - vyznačená v tabuľke hrubšie (95% CI hodnota 1,07-9,85), pri významnosti $p < 0,05$ sa $P = 0,038$.

Typ operácie	Počet pacientov
Lobektómia	15
Pneumonektómia	5
Resekcia menšieho rozsahu (cuneiformis, tangentialis)	4
Torakotómia exploratíva	4
Videotorakoskopia (VTS), biopsia, talkáž	4

Tabuľka č. 3: Rozdelenie podľa typov operácií

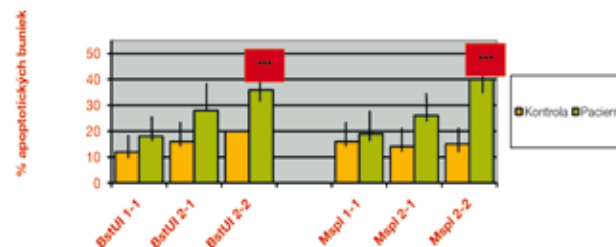
Apoptóza periférnych lymfocytov bola signifikantne vyššia u pacientov s malobunkovým i nemalobunkovým karcinómom v porovnaní so zdravými. V skupine nemalobunkových nádorov bola najvyššia pri adenokarcinómoch.



Graf č. 1: Apoptóza periférnych lymfocytov

Vzťah medzi typom pľúcneho karcinómu a mierou apoptózy. K (kontrola), Mb (malobunkový), nemalobunkový - NMb (skv - skvamózný, adeno - adenokarcinóm, vb - veľkobunkový). Údaje na grafe ukazujú, že apoptóza periférnych lymfocytov je signifikantne vyššia u pacientov s Mb karcinómom v porovnaní so zdravými. V skupine s NMb je vyššia tiež, ale nie natoľko ako v skupine Mb. Z nemalobunkových nádorov je najvyššia u adenokarcinómu ($p < 0,01$).

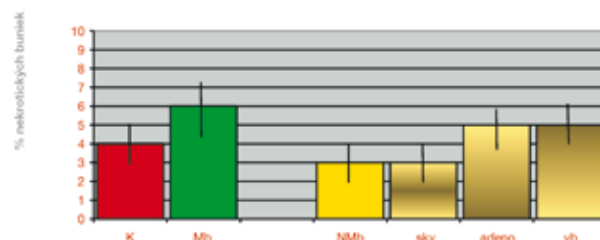
Z hľadiska korelácie miery apoptózy k jednotlivým genotypom antionkogénu p53 bolo signifikantné zvýšenie apoptózy pozorované iba u pacientov s karcinómom pľúc pri genotypy BstUI 2-2 a MspI 2-2.



Graf č. 2: Korelácia medzi mierou apoptózy a p53 genotypom

Miera apoptózy lymfocytov s ohľadom na p53 genotyp u kontrolných osôb a u pacientov. Signifikantné zvýšenie apoptózy ($p < 0,001$) bolo pozorované u pacientov s karcinómom pľúc pri genotypy BstUI 2-2 a MspI 2-2.

Na rozdiel od apoptózy podľa výsledkov percenta nekrotických lymfocytov nedošlo ku štatisticky významnému zvýšeniu nekroz lymfocytov u pacientov s nádorom pľúc v porovnaní so zdravými. I keď v niektorých typoch nádorov percento nekrotických lymfocytov kolísalo, ani v jednej skupine nádorov nebol rozdiel signifikantný.



Graf č. 3: Nekróza lymfocytov u kontrol a u pacientov s pľúcnym karcinómom

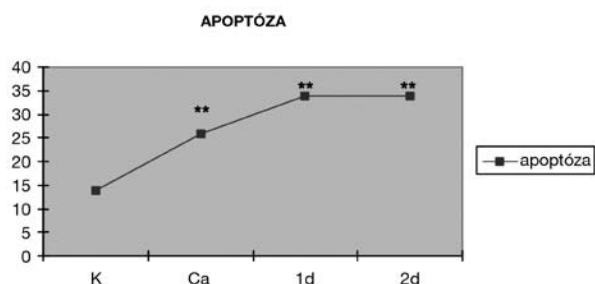
Nekróza lymfocytov u kontrol a u pacientov s pľúcnym karcinómom. Percentá nekrotických buniek vo vzťahu k typu karcinómu. K -kontrola, Mb -malobunkový, NMb -nemalobunkový karcinóm, skv - skvamózný, adeno - adenokarcinóm, vb - veľkobunkový karcinóm. Aj keď v jednotlivých typoch karcinómov je nekróza periférnych lymfocytov rôzna, ani v jednom prípade nebola odchýlka štatisticky významná pri $p < 0,01$.

Po operácii sa úroveň apoptózy zvýšila. V porovnaní s kontrolnou skupinou (14,1) bola u pacientov s karcinómom pľúc vyššia už pred operáciou a po nej sa ešte zvýšila z 26,2 na 34,1 v prvý deň, resp. 34 v druhý deň po operácii.

Rozdiel absolútneho počtu lymfocytov pred operáciou a po operácii bol u oboch skupín nádorov signifikantný. V percentuálnych hodnotách bol pokles lymfocytov u malobunkových nádorov z 27,23 % na 18,46 % a nemalobunkových z 19,57 % na 14,49 % - štatisticky významný bol iba u nemalobunkových nádorov.

Diskusia

Definitívne diagnózu karcinómu pľúc určí histologické vyšetrenie. Informácie z histopatologického vyšetrenia nádorových buniek a zo zistenia nádorovej infiltrácie okolitých lymfatických tkanív sú základom určenia „gradingu“.



Graf č. 4: Zmeny apoptózy periférnych lymfocytov pred a po operačnom zákroku

Apoptóza periférnych lymfocytov pred a po operácii v prvý a druhý deň ($p < 0.001$). Hodnoty u kontrolnej skupiny (K), u vybraných pacientov s karcinómom pľúc (Ca) **, 1. deň po operácii (1.d) ** a druhý deň po operácii (2d). ** Apoptóza periférnych lymfocytov bola vyššia u pacientov s karcinómom aj pred operáciou a po nej sa ešte zvýšila z 26,2 na 34,1 v prvý deň, resp. 34 druhý deň po operácii ($p < 0.001$).

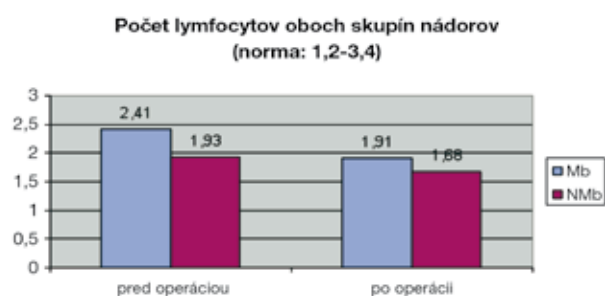
Wilcoxonov párový test (data)				
Označené testy sú významné na hladine $p < 0.05$				
Dvojice premenných	Počet platných	T	Z	Úroveň p
Abs pred & Abs po	26	76,00000	2,527099	0,011501

Tab. č. 4: Vzor hodnotenia štatistickej významnosti zmien počtu lymfocytov operovaných pacientov ($n = 32$); Absolútny počet lymfocytov. Hodnotenie absolútneho počtu lymfocytov pred a po operácii u nemalobunkových (NMB) nádorov. Rozdiel absolútneho počtu lymfocytov pred operáciou a po operácii bol u oboch skupín nádorov významný (Nmb = 0,011501) u malobunkových (Mb): $n = 6$, $P = 0,027709$.

Wilcoxonov párový test (data)				
Označené testy sú významné na hladine $p < 0.05000$				
Dvojice premenných	Počet platných	T	Z	Úroveň p
Rel pred & Rel po	26	57,50000	2,825226	0,004726

Tabulka č. 5: Relatívny počet lymfocytov

Percentuálne zastúpenie počtu lymfocytov v diferenciálnom KO u NMB nádorov pred operáciou a po operácii. Rozdiel zastúpenia lymfocytov v diferenciálnom krvnom obraze u Nmb nádorov bol významný ($P = 0,0047$). Pozn.: podobný výpočet u malobunkových (Mb, $n = 6$, $P = 0,074736$ pri $p < 0.05$) nebol významný.



Graf č. 5: Absolútny počet lymfocytov pred operáciou a po nej. Absolútny počet lymfocytov u sledovaných pacientov v závislosti od operácie pri rozdelení na dve hlavné skupiny: malobunkový karcinóm (Mb) a nemalobunkový karcinóm (NMB).

Úlohou nádorových markerov je z hľadiska diferenciálnej diagnostiky určiť či príčinou klinických prejavov pacienta je nádorový proces. Pri nádoroch pľúc sa vyšetrujú: CYFRA 21-1, produkovaný epidermoidnými a veľkobunkovými karcinómami, CEA (adenokarcinómami) a TPS (nediferen-

Č.pac.	Druh operácie	Histologický nález	Štádium	Pohl.
1.	resectio cuneif. ex lobo inf. dx.	stredne dif. epiderm. Ca	III. A	žena
2.	thoracotomia explorativa	epidermoid. Ca + fluidoth.	III. B	muž
3.	pneumonektomia I. dx.	epidermoidný karcinóm	III. A	muž
4.	lobectomia inf. I. sin.	stredne dif. adenokarcinóm	II. A	žena
5.	VTS, talkáž	epidermoid. Ca + fluidoth.	IV.	muž
6.	pneumonektomia I. dx.	bronchioloalveolový Ca	III. A	muž
7.	lobectomia sup. I. sin. /+ pericard/	epidermoidný karcinóm	III. A	muž
8.	lobectomia inf. I. sin.	nizkodiferenc. epiderm. Ca	II. A	muž
9.	lobectomia sup. I. sin.	Adenocarcinoma	II. A	žena
10.	pneumonektomia I. dx.	epidermoidný karcinóm	III. B	muž
11.	pneumonektomia I. sin.	nizkodiferenc. epiderm. Ca	III. B	muž
12.	lobectomia sup. I. sin.	Adenocarcinoma	III. B	muž
13.	thoracotomia explorativa I. sin.	epidermoidný karcinóm	IV.	muž
14.	res. tang. ap. pulm. via VATS I. dx.	nizkodiferenc. epiderm. Ca	III. A	muž
15.	lobectomia sup. I. sin.	epidermoidný karcinóm	III. A	muž
16.	resectio cuneif. ex lobo sup. dx.	epitelial. Tu. v. s. MTS urín.	IV.	muž
17.	pneumonektomia I. dx.	nizkodiferenc. epiderm. Ca	III. A	muž
18.	VTS et biopsio	nizkodifer. epidermoidný Ca	IV.	muž
19.	VTS, talkáž	adeno Ca, carcinomat. pleur.	IV.	muž
20.	lobectomia inf. I. dx. et ap. pulm.	epidermoidný karcinóm	III. A	muž
21.	VTS, talkáž	epiderm. Ca, mts pleurae	IV.	muž
22.	lobectomia inf. I. sin.	adenocarcinoma, stredne dif.	II. A	žena
23.	lobectomia sup. I. sin.	bronchioloalveolový Ca	II. B	muž
24.	lobectomia sup. I. sin.	epidermoidný karcinóm	II. B	muž
25.	lobectomia sup. I. dx.	epidermoidný karcinóm	I. A	muž
26.	lobectomia sup. I. dx. s. Paulson	adenoCa, mts cerebelli	IV.	muž
27.	thoracotomia probatoria I. sin.	nediferencovaný Mb	III. B-ext.	muž
28.	resectio cuneiformis	MTS malobunkového Ca	III. B-ext.	muž
29.	lobectomia inf. I. dx.	Mts malobunkového Ca	III. B-ext.	muž
30.	lobectomia inf. I. dx.	Mb karcinóm, MTS medias.	III. A-ext.	žena
31.	lobectomia sup. pulm. dx.	nediferenc. Mb karcinóm	III. B-ext.	muž
32.	Excisio tumoris e lobo sup. sin.	nádor neuroendokrín. typu	III. A	žena

Tabulka č. 6: Histologické nálezy a štádia ochorenia operovaných pacientov

covanými karcinómami). Doplnkovým markerom je CA 125 (stupeň poškodenia pleurálneho mezotelu) a enoláza špecifická pre neurón (NSE) pri podozrení na malobunkový karcinóm. Všetky tieto markery sú však nedostatočne citlivou a málo špecifickou metódou pre skríning. Používajú sa na určenie prognózy ochorenia, monitorovanie úspešnosti liečby, progresie, či recidívy ochorenia s hľadáním prípadných metastáz pri pravidelnom hodnotení stavu pacienta so sledovaním dynamiky markerov (1,4,5).

Predpokladá sa že detekcia zmien v génoch (molekulárny „staging“) ako doplnok k histopatologickému vyšetreniu bude významným príspevkom k presnejšiemu stanoveniu prognózy, k určeniu vhodnej terapie a predpokladom pre možnosť aplikácie netoxickej protinádorovej liečby. Molekulárna diagnostika umožňuje detekciu ojedinelých nádorových buniek v ľahko dostupných tkanivách. Hľadanie stupňa rizika tumorigenézy na molekulárnej a genetickej úrovni a sledovanie markerov, ktoré môže poukázať na liečebný efekt aplikovanej liečby je perspektívou. Ľudský genóm obsahuje 30 000 - 40 000 génov. V pľúcach je exprimovaných 15 500, aktívnych v nádoroch je 12 488. o genetickej predispozícii sa hovorí keď zárodočné bunky obsahujú mutovaný nádorový supresorový gén (ani-onkogén), poškodený gén systému opravy DNA, alebo výnimočne mutáciou zmenený onkogén. Následné ďalšie mutácie alebo fenotypové zmeny vedú k vzniku malígneho nádoru. Seriálna skríningová analýza by vyžadovala veľmi nákladnú sekvestráciu celého genómu. Na detekciu mutácií v génoch zodpovedných za predispozíciu k vzniku nádoru sa využívajú rôzne techniky a výber metódy závisí od charakteru predpokladanej mutácie. Detekcia mutácií anti-onkogénov sa využíva pri stanovení predispozícií k vzniku nádoru v rodinách s vysokým výskytom ochorenia (gény pre Ca prsníka – BRCA 1 a 2, familiárna polypóza kolón - APC). Hľadajú sa ale aj mutácie, ktoré sú charakteristické

pre väčšinu ľudských sporadických nádorov. Najmä stanovenie mikrosatelitovej nestability, detekciu mutácií v onkogéne RAS a mutácií v nádorových supresorových génoch p53, APC, DPC 4 a p16.

Medzi najčastejšie genetické mutácie nádorov ľudí patria zmeny antionkogénu p53 (6,7,8). Tento gén je negatívnym regulátorom prechodu G1/S fázy bunkového delenia. Hlavnou biochemickou funkciou nemutovanej formy proteínu p53 (wild type p53) je kontrola normálneho priebehu bunkového cyklu reguláciou transkripcie a DNA replikácie. U väčšiny ľudských nádorov, aj u rakoviny pľúc, sa našla inaktívacia oboch alel génu p53. Napríklad simultánny nález abnormalít v Rb systéme (zvlášť overexpresia Cyclin D1) a mutácii génu p53 podporuje genetickú príčinu diagnózy malignému a signifikantne zhoršuje prognózu (9,10).

V práci sme sledovali genetický polymorfizmus génu p53, jeho vzťah k jednotlivým typom nádorov v pľúcach a koreláciu s mierou apoptózy a nekrózy lymfocytov. DNA sa na analýzu izolovala z krvných lymfocytov. Asociácia polymorfizmu génu p53 BstUI a MspI genotypu s rôznymi druhmi karcinómov už bola v minulosti sledovaná. Kawajiri a spol. (11) v roku 1993 zistili spojenie tohto polymorfizmu so zvýšeným výskytom pľúcneho karcinómu. Vo švédскеj štúdii Birgander s kolektívom (12) podobný vzťah nepozorovali. Naše pozorovanie je v súhlase s prvou štúdiou. Pri stanovení p53 haplotypu sa ukázal zaujímavý fenomén. Haplotyp BstUI A2 a MspI A1 alela, ktorý bol vo švédскеj štúdii nájdený len v 1,2%, sa v našom pozorovaní vyskytol v 5,4% u pacientov s karcinómom pľúc a vôbec nebol prítomný v kontrolnej skupine.

Kerr navrhol pojem apoptóza, (1,2,13,14) pre „programovanú“ smrť bunky, ktorá je morfológicky odlišná od nekrózy, pasívneho spôsobu bunkovej smrti. Podobne ako mechanizmy proliferácie a diferenciácie je apoptóza považovaná za kritický bod bunkovej kontroly. Defekty v procesoch kontroly bunkovej smrti môžu predĺžiť životný cyklus buniek a tým prispievať k neoplastickej bunkovej expanzii. Úroveň apoptózy sme hodnotili v súbore pacientov s nádormi v hrudníku a porovnávali s kontrolnou skupinou zdravých ľudí. Vo výsledkoch sa potvrdili signifikantné rozdiely, najvýraznejšie u adenokarcinómov.

Dôležitý je tiež vzťah apoptózy ku genetickému polymorfizmu génu p53, ktorý je „strážca genómu“. Jeho produkt, proteín p53 zastavuje bunkový cyklus a je schopný aj nepriamo spúšťať apoptózu. V našom súbore korelácia medzi mierou apoptózy a polymorfizmom BstUI / MspI génu p53 odhalila signifikantne vyššie percento apoptotických buniek u homozygotov BstUI 2/2 a MspI A2/A2 v porovnaní s heterozygotmi A1/A2.

Niektorí autori považujú sledovanie expresie p53, ako odpovede na rádioterapiu či chemoterapiu za vhodný marker. Iní však, práve pre vysokú frekvenciu mutácií p53 u potvrdennej rakoviny pľúc, kde je vysoká pravdepodobnosť narušenia niektorých funkcií sprostredkovaných génom p53, úlohu tohto génu ako markera reakcie na liečbu neodporúčajú (15). Existujú aj úvahy o možných mediátoroch, ktoré stabilizujú proteín p53 práve v nádorových bunkách a to v línii buniek nemalobunkového nádoru pľúc (16). Mnohé nádorové bunky aj s defektnými génmi p53 si pritom zachovávajú apoptózovú aktivitu. Táto sa preto už stáva aj potenciálnym cieľom chemoterapie v liečbe rakoviny (17, 18).

Ako pozitívnu reakciu na stres si vysvetľujeme naše zistenie, že po operačnom zákroku dochádza k indukovanej apoptóze periférnych lymfocytov. Je možné uvažovať aj o imunologických mechanizmoch alebo bezpríznakovnej pooperačnej zápalovej reakcii. Súbor pozostával z pacientov v rôznom štádiu ochorenia, niekoľkí mali aplikovanú aj onkologickú liečbu, boli tam aj pacienti s MTS či s malígnym výpotkom. Či bolo aj zníženie počtu lymfocytov v periférnej krvi s tým spojené sa dá iba predpokladať, avšak z retrospektívnej analýzy diferenciálnych krvných obrazov u operovaných pacientov je zrejme, že sa absolútne aj relatívne počty lymfocytov znížili.

Záver a využitie pre klinickú prax

Porovnanie polymorfizmu BstUI a MspI antionkogénu p53 u pacientov s nádormi v hrudníku so zdravými jedincami v našom súbore ukázalo že rozloženie BstUI A2 a MspI A1 alel bolo spojené s pľúcnym karcinómom. Takáto genetická konfigurácia by sa mohla považovať za predispozíciu k tumorigenéze.

Apoptóza periférnych lymfocytov u pacientov s nádormi v hrudníku bola v porovnaní so zdravou populáciou zvýšená. Pritom najviac apoptotických buniek bolo u homozygotov BstUI 2/2 a MspI 2/2.

Zrejme ako reakcia na operáciu sa apoptóza periférnych lymfocytov krvi v našom súbore pacientov po operácii zvýšila čo sme chápali ako priaznivú odpoveď organizmu. Zrejme iba ďalšie sledovania ukážu či je možné úroveň apoptózy hodnotiť ako pozitívny marker prežívania pacientov o čom bolo v jednotlivých prácach diskutované (18,19).

S apoptózou hypoteticky spojené znížené hodnoty absolútneho aj percentuálneho počtu lymfocytov v periférii sú v diferenciálnom krvnom obraze ľahko dostupné a ich pokles bol v našej práci štatisticky významný (v relatívnom počte iba v skupine nemalobunkových nádorov).

Literatúra:

1. Kaušitz, J., Altaner, Č., a spol.: Onkológia, VEDA, Bratislava, s. 712, 2003, ISBN 80-224-0711-9
2. Sugio, K., Ishida, T. et al.: Ras gene mutations as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung without lymph node metastasis. Cancer Research 1992, vol 52, p 2903-2906
3. Rejthar A., Vojtěšek B.: Obecná patológia nádorového rastu, Grapa Publishing s.r.o., s. 208, 2002, ISBN 80-247-0238-X,
4. Trnovec, T., Dzúrik, R.: Štandardné diagnostické postupy, Osveta, Martin, s. 832 1998, ISBN 80-88824-84-2
5. Martinček, D.: Diagnostika nádorov obličiek, Klinická onkológia, 1996, zvl. č. 27
6. Bennett, W.P., Colby, T.V., Travis, W.D. et al.: p53 protein accumu-

- lates frequently in early bronchial neoplasia .Cancer Res.,vol.53, 4817- 4822, 1993
7. Kaye, F. J., Chen, W., Khleif, S. N., Otterson G. A.: Lung Cancer : Molecular and cellular abnormalities. Encyclopedia of Cancer .Academic Press Inc,1004-1014, 1997.
 8. Harpole, D. H., Herndon, J. E., Wolfe, W.G., et al.: a prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. Cancer Research 55 (1): 51-56, 1995
 9. Kirsch, D. G., and Kastan M. B.: Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. J. Clin. Oncology, vol. 16, p. 3158-3168, 1998
 10. Burke, L., Flieder D.B., Guinee D.G., Brambilla E., Freedman A.N., Bennet W.P., Jones R.T., Borkowski A., Caporaso N.A., Flemin M., Trastek V., Pairolero P., Tazelaar H., Midt-hun D., Jett J.R. Liotta L.A., Travis W.D., Harris C.C.: Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. Clin.Cancer Res., 2005 Jan. 1, 11(1):232-241.
 11. Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Watanabe, J., Hayashi, S.: Germ line polymorphisms of p 53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. Carcinogenesis, 16, 1085 - 1089, 1993
 12. Birgander, R., Sjölander, A., Rannug, A.: P53 polymorphisms and haplotypes in lung cancer. Carcinogenesis, 16, 2233 - 2236, 1995
 13. Hoffmann, B., Liebermann, D.A.: Molecular controls of apoptosis. Oncogene; vol. 226, p. 1097-1099, 1994
 14. Kohút, A., Mirrossay, L., Kalina, I.: Apoptóza – aktuálny problém života a smrti buniek. Slovenský lekár; vol.5-6, p.65-68, 1998
 15. Viktorson, K., De-Petris, L., Lewensohn, R.: The role of p53 in treatment responses of lung cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. ,Jun 10, 331(3): 868-880, 2005
 16. Yamauchi, M., Suzuki K., Kodoma S., Watanabe M.: Abnormal stability of wild-type p53 protein in human lung carcinoma cell line. Biochem.Biophys.Res.Comm., May 6 330 (2),p. 483-488, 2005
 17. Mashima T., Ohhara T., Sato S., Mochizuki M., Sugimoto Y., Yamazaki K., Hamada J., Tada M., Moriuchi T., Ishikawa Y., Kato Y., Tomodo H., Yamori T., Tsuruo T.: p53- defective tumors with a functional apoptosome - mediated pathway : a new therapeutic target. J. Natl. Cancer Inst. May 18, 97(10): 765 - 777, 2005.
 18. Tamm, I., Wang, Y. et al.: IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas(CD95), Bax, caspases and anticancer drugs. Cancer Research; vol.58, p. 5315-5320, 1998
 19. Volm, M., Koomagi, R.: Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small-cell lung cancer for patient survival. British Journal of Cancer. vol.82, p. 1747-1754, 2000

Korespondenční adresa:

MUDr. Sauka Cyril

II. chirurgická klinika, FN L. Pasteura v Košiciach

tel.: +421 556 152 140

e-mail: cyril.sauka@yahoo.com

Došlo / Submitted: 1. 2. 2008

Přijato / Accepted: 6. 3. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

SELEKTIVNÍ DEPLECE ALOREAKTIVNÍCH T LYMFOCYTŮ A STUDIUM PROTINÁDOROVÉ AKTIVITY SPECIFICKÝCH KLONŮ T LYMFOCYTŮ U PACIENTŮ S LEUKÉMIÍ

SELECTIVE DEPLETION OF ALLOREACTIVE T CELLS AND STUDY OF ANTI-TUMOR ACTIVITY OF SPECIFIC T CELL CLONES IN PATIENTS WITH LEUKEMIA

MATĚJKOVÁ E.¹, OČADLÍKOVÁ D.¹, SMEJKALOVÁ J.¹, MUŽÍKOVÁ J.¹, RAIDA L.², TOUŠOVSKÁ K.³, PACASOVÁ R.⁴, NENÍČKOVÁ M.⁴, TESAŘOVÁ E.⁴, ŠTĚRBA J.³, INDRÁK K.², MICHÁLEK J.^{1,5}

¹UNIVERZITNÍ CENTRUM BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO

²HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE, OLOMOUC

³KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, BRNO

⁴TRANSFÚZNÍ ODDĚLENÍ A KREVNI BANKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, BRNO

⁵1. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, BRNO

Souhrn

Východiska: Reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host, GVH) je obávanou komplikací alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk. Hlavní roli hrají T lymfocyty dárce, které v konečném důsledku mohou vést k těžkému poškození tkání hostitele, především kůže, jater a gastrointestinálního traktu. Selektivní deplece pomocí anti-CD25 imunotoxinu (IT) vede k eliminaci nežádoucích aloreaktivních T lymfocytů a uchování žádoucích T lymfocytů dárce, které vykazují protileukemickou a protiinfekční reaktivitu. **Soubor pacientů a metody:** Celkem bylo provedeno 15 smíšených lymfocytárních reakcí se vzorky klinického materiálu od 12 pacientů s různými typy leukémie (7x AML, 3x ALL, 1x CML, 1x CLL) a PBMC od 15 zdravých dárců z Transfúzní stanice FN Brno Bohunice. **Výsledky:** V našich experimentech bylo prokázáno, že protileukemický (GVL) efekt dárcovských, především CD4⁺, T lymfocytů byl dobře zachován (7,46%), zatímco nežádoucí aloreaktivní (GVH) reakce dárcovských buněk byla zcela potlačena, protože nedošlo k reaktivaci aloreaktivních T lymfocytů ani po opakované restimulaci ozářenými neleukemickými buňkami pacienta. **Závěr:** Ukázali jsme, že anti-CD25 imunotoxin (IT), RFT5-SMPT-dgA, namířený proti α řetězci receptoru pro lidský interleukin 2 (IL-2), vede k dlouhodobé selektivní depleci aloreaktivních klonů T lymfocytů dárce při uchování jejich protileukemického potenciálu. Na základě našich výsledků byla připravena klinická studie, která byla zahájena v roce 2007 ve třech klinických centrech v České republice.

Klíčová slova: selektivní deplece, reakce štěpu proti hostiteli, imunoterapie, transplantace krvetvorných buněk

Summary

Background: Graft-versus-host disease (GVHD) is a severe complication of allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells. Donor T cells play a major role in GVHD leading to the host tissue damage, mainly the skin, liver, and gastrointestinal tract. A selective depletion using an anti-CD25 immunotoxin can eliminate harmful alloreactive T cells while preserving other donor T cells with antileukemic and antiinfectious reactivity. **Patients and Methods:** We performed 15 mixed lymphocyte reactions with clinical specimens from 12 patients with various types of leukemia (7x AML, 3x ALL, 1x CML, 1x CLL) and PBMC from 15 healthy volunteers from Transfusive station FN Brno Bohunice. **Results:** In our experiments we have demonstrated, that antileukemic (GVL) effect of donor, especially CD4⁺ T cells was well preserved (7.46%), while unfavourable alloreactive (GVH) reaction of donor T cells was completely removed. The graft-versus-host (GVH) reactivation of donor cells was negligible ever after repeated stimulation with irradiated patient's PBMC. **Conclusion:** We have shown that anti-CD25 immunotoxin (IT), RFT5-SMPT-dgA, launched against α chain for human interleukin 2 (IL-2), led to long-term selective depletion of alloreactive donor T cell clones while their antileukemic activity was well preserved. Based on our results the clinical phase I/II study was designed. This study was initiated in year 2007 in three clinical centers in Czech Republic.

Key words: lymphocyte depletion, graft-versus-host disease, immunotherapy, hematopoietic stem cell transplantation

Úvod

Alogenní transplantace hematopoetických kmenových buněk (HSCT – hematopoietic stem cell transplantation) představuje účinnou léčbu mnoha nádorových i nenádoro-

vých onemocnění, která by jinak byla nevyléčitelná (1). V současné době se uplatňuje názor, že léčebný potenciál HSCT spočívá zejména v uplatnění protinádorové aktivity dárcovských (alogenních) T lymfocytů schopných navo-

dit reakci štěpu proti leukémii (GVL - graft-versus-leukemia) (2). Nejpersvědčivější klinický důkaz o existenci GVL efektu byl podán u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) relabujících po HSCT, kteří byli léčeni dárcovskými lymfocytárními infúzemi (DLI - donor lymphocyte infusion). Kompletní remise byly pozorovány u 70-80% pacientů s CML v chronické fázi relapsu léčných DLI (3). Kompletní remise po DLI byly pozorovány u mnoha dalších nádorových onemocnění a klinická pozorování ukazují, že GVT/GVL odpovědi mohou být přítomny zejména u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML), mnohočetným myelomem (MM) a renálním karcinomem (2-5). Regrese nádorového bujení byla pozorována také u pacientů s dalšími nádorovými onemocněními (5).

I přes obrovský pokrok v péči o transplantované pacienty v posledních 20 letech, zůstává největším problémem alogenních HSCT nežádoucí reakce štěpu proti hostiteli (GVH - graft-versus-host), která je jednou z hlavních příčin morbidit a mortality v potransplantačním období (1,6). Akutní GVH nemoc (GVHD - GVH disease) je zprostředkována zejména alogenními T lymfocyty (6). Tyto aktivované T lymfocyty, charakterizované mimo jiné přítomností receptoru pro IL-2 (CD 25+) na svém povrchu, rekrutují efektorové populace buněk, které cestou dysregulované produkce cytokinů vedou v konečném důsledku k poškození příjemcových tkání, zejména kůže, jater a gastrointestinálního systému (6). Protože GVH reakce je způsobena především T lymfocyty dárce, jejich odstranění by mělo zabránit vzniku GVHD. V klinických studiích s HLA-identickými příbuznými dárce bylo ověřeno, že při snížení počtu dárcovských T lymfocytů pod $10^5/\text{kg}$ hmotnosti příjemce zpravidla nedochází k život ohrožující GVHD (7). V případě HLA-identických nepříbuzných dárce a HLA-neidentických příbuzných dárce musí být deplece T lymfocytů ještě o jeden řád větší.

Deplece dárcovských T lymfocytů však přináší nové problémy s velmi opožděnou rekonstitucí imunitního systému po transplantaci: vysoké riziko oportunních infekcí, relaps základního onemocnění a rejekce transplantátu (8,9).

Jako ideální se tedy jeví přístup, který by eliminoval pouze ty dárcovské T lymfocyty, které jsou zodpovědné za GVH reaktivitu, avšak ponechal T lymfocyty s GVL/GVT reaktivitou. Realizace této myšlenky je založena na předpokladu, že GVH a GVL/GVT jsou zprostředkovány různými klony dárcovských T lymfocytů, které lze od sebe oddělit (2,10). Jeden ze způsobů jak eliminovat GVH-reaktivní klon y dárcovských T lymfocytů spočívá v jejich aktivaci ozářenými nenádorovými buňkami příjemce v tzv. smíšené lymfocytární reakci (mixed leukocyte reaction, MLR). Klon y dárcovských T lymfocytů, které rozpoznávají příjemcovy nenádorové buňky jako cizorodé, se aktivují a exprimují na svém povrchu CD25 molekuly. Již dříve jsme ukázali, že takto aktivované CD25⁺ T lymfocyty lze velmi efektivně a specificky eliminovat pomocí anti-CD25 imunotoxinu (IT), aniž by byla výrazně poškozena zbývající populace dárcovských T lymfocytů, která si zachovává protileukemickou a protimikrobiální reaktivitu (10-13). IT je konstruován jako anti-CD25 monoklonální protilátka spojená s molekulou účinného toxinu A-řetězce ricinu (13).

V tomto článku předkládáme naše výsledky preklinických pokusů využívající anti-CD25 imunotoxin k prevenci GVH nemoci s perspektivou jejich následného využití v rámci klinické studie fáze I/II.

Materiál a metody

Soubor pacientů

Pro naše experimenty byly použity mononukleární buňky z periferní krve (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) pacientů s leukémií ve věku 5 – 63 a HLA neidentických nepříbuzných dárce ve věku 18 – 50 let.

Jednalo se o pacienty s diagnózou 7x akutní myeloidní leukémie (AML), 3x akutní lymfoblastická leukémie (ALL), 1x chronická myeloidní leukémie (CML), 1x chronická lymfatická leukémie (CLL) diagnostikované ve Fakultních nemocnicích v Olomouci a Brně.

Vstupní zpracování materiálu

V době stanovení diagnózy (9 pacientů) nebo relapsu (2 pacienti) leukémie a za podmínky minimálně 70% leukemických blastů v periferní krvi bylo pacientům na základě podepsaného informovaného souhlasu odebráno 40ml heparinizované krve. Z té pak byly gradientovou centrifugací separovány leukemické buňky, které byly řízeně zamrazeny a uchovány při -196°C do doby zpracování. Pacientům, kteří byli léčbou uvedeni do hematologické remise ($<1\%$ blastů v periferní krvi), bylo pak odebráno 40ml heparinizované krve s následnou separací PBMC. Leukemické buňky i neleukemické PBMC téhož pacienta byly použity v našich experimentech jako antigen při stimulaci GVL a GVH reaktivity dárcovských lymfocytů. PBMC zdravých dárce byly získány gradientovou centrifugací z leukocytární frakce získané z Transfúzního oddělení od zdravých dárce krve po podepsání informovaného souhlasu.

Primární smíšená lymfocytární reakce

Na začátku každého pokusu vstupovalo do pokusu 100×10^6 PBMC zdravého dárce.

Nejdříve byly v primární MLR smíchány ozářené (30Gy) neleukemické PBMC pacienta s lymfocyty zdravého dárce v poměru 1:2. Buňky byly 24 hodin kultivovány v kompletním médiu (X-VIVO 15, které obsahuje L-glutamin a 10% tepelně inaktivovaného lidského AB séra) při buňčnosti $5 \times 10^6/\text{ml}$ dárcovských PBMC. V této reakci dochází k aktivaci dárcovských klonů T-lymfocytů, které na svém povrchu exprimují molekulu CD25.

V následujících 24 hodinách bylo do MLR přidáno 10^{-8}M anti-CD25 imunotoxinu sestávajícího z molekuly monoklonální protilátky anti-CD25 a vysoce potentního A-řetězce ricinu (12), který selektivně depletoval tyto aloreaktivní klon y dárcovských lymfocytů. Společně s IT byl podán 10mM chlorid amonný, který potencuje účinek IT (11,12). Podání samotného chloridu amonného v koncentraci $\leq 10\text{mM}$ přitom nemá žádný efekt na viabilitu buněk (8, 12). Pro maximální potenciaci efektu selektivní deplece CD25⁺ aloreaktivních lymfocytů dárce bylo po 24 hodinách inkubace znovu přidáno $0,5 \times 10^{-8}\text{M}$ IT. V průběhu experimentu bylo průběžně prováděno cytometrické vyšetření exprese znaku CD25 na CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytech.

Sekundární smíšená lymfocytární reakce

Čtvrtý den kultivace byly selektivně depletované dárce-
ské lymfocyty sklizeny a tato kultura byla rozdělena na
dvě stejné části. První kultura buněk byla smíchána s ozá-
řenými (30Gy) leukemickými buňkami pacienta. V této
MLR pak docházelo k aktivaci GVL-specifických klonů
T lymfocytů dárce, které by již měly postrádat nežádoucí
GVH-reaktivitu. Reaktivace ozářenými leukemickými
buňkami pacienta byla 2x opakována v týdenních inter-
valech, tj. 10. a 17. den kultivace. Druhá kultura byla smí-
chána s ozářenými (30Gy) neleukemickými buňkami pa-
cienta tak, aby bylo možné prokázat případnou zbytkovou
aloreaktivitu selektivně depletovaných dárce-
ských lymfocytů. Reaktivace ozářenými neleukemickými buňkami
pacienta byla rovněž opakována v týdenních intervalech,
tj. 10. a 17. den kultivace.
Pomocí průtokové cytometrie pak byly charakterizová-
ny dárce-
ské lymfocyty pomocí znaků CD3, CD4, CD8,
CD25.

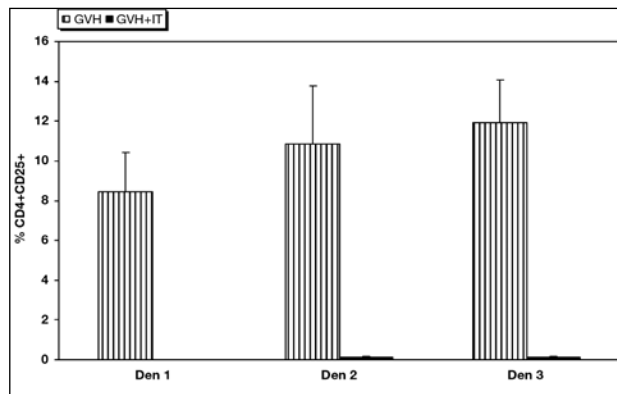
Kontrolní smíšená lymfocytární reakce

Jako kontrolní experiment mapující aktivaci aloreaktivní-
ních lymfocytů dárce byla prováděna MLR bez selektivní
deplece anti-CD25 imunotoxinem. V primární MLR byly
smíchány ozářené (30Gy) neleukemické PBMC pacienta
s lymfocyty zdravého dárce v poměru 1:2. Buňky byly
kultivovány v kompletním médiu při buněčnosti 5×10^6 /ml
dárce-
ských PBMC a následně 3x reaktivovány (tj. 4., 10.
a 17. den kultivace) ozářenými neleukemickými PBMC
pacienta. Tímto způsobem byla sledována GVH reaktivi-
ta dárce-
ských lymfocytů. V průběhu experimentu bylo
rovněž prováděno cytometrické vyšetření exprese znaku
CD25 na $CD4^+$ a $CD8^+$ T lymfocytech.

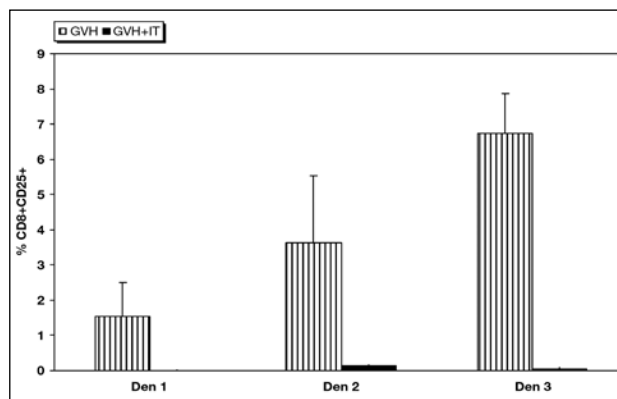
Výsledky:

Celkem bylo provedeno 15 smíšených lymfocytárních re-
akcí se vzorky klinického materiálu od 12 pacientů s růz-
nými typy leukémie (7x AML, 3x ALL, 1x CML, 1x CLL)
a PBMC od 15 zdravých dárců z TS FN Brno Bohunice.
První den byla založena kultura MLR, ve které byly
smíchány dárce-
ské PBMC s ozářenými neleukemickými
PBMC pacienta s leukémií tak, aby došlo k aktivaci
aloreaktivních dárce-
ských lymfocytů. Po 24-hodinové
kultivaci v inkubátoru byla cytometricky změřena produk-
ce znaku CD25 na $CD4^+$ T lymfocytech v kultuře GVH,
která dosahovala 6,77 – 11,02% (medián 8,46%), na
 $CD8^+$ T lymfocytech pak exprese znaku CD25 dosahova-
la 0,76 – 3,5%, (medián 1,55%). Pro navození selektivní
deplece aloreaktivity byl k MLR přidán anti-CD25 IT. Již
po 24 hodinách kultivace s IT došlo k prudkému poklesu
aloreaktivních lymfocytů dárce na 0,08 – 0,18% (medián
0,14%) u $CD4^+$ T lymfocytů a 0 – 0,31% (medián 0,14%)
u $CD8^+$ T buněk ve srovnání s kontrolní MLR bez přidání
IT: 7,87 – 12,57% (medián 10,87%) na $CD4^+$ T lymfocy-
tech, na $CD8^+$ pak 1,8 – 6,7% (medián 3,64%).
Inkubace dalších 24 hodin s čerstvě přidaným IT ješ-
tě prohloubila efekt selektivní deplece aloreaktivity
dárce-
ských lymfocytů na 0 – 0,14% (medián 0,12%)
u $CD4^+$ T lymfocytů, na $CD8^+$ 0 – 0,10% (medián 0,05%),
zatímco v kontrolní MLR došlo k dalšímu nárůstu pro-

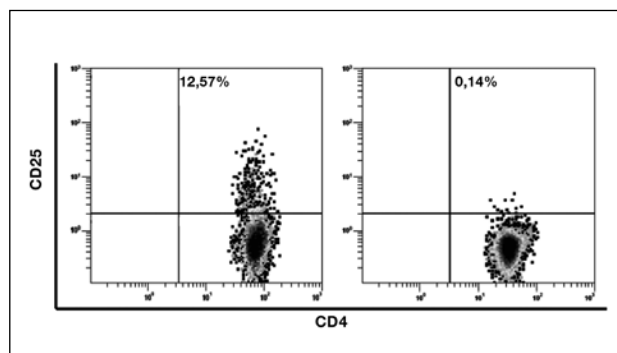
centuálního zastoupení aloreaktivních klonů dárce-
ských $CD4^+CD25^+$ T lymfocytů na 10,75 – 16,03% (medián
11,91%), u $CD8^+CD25^+$ T lymfocytů na 4,6 – 11,9% (me-
dián 6,73%), viz Obr. 1 a Obr. 2. Na Obr. 3 je znázorněna
reprezentativní flow cytometrická analýza primární MLR
u jednoho dárce.



Obrázek č. 1: Průběh primární MLR na $CD4^+ CD25^+$ T lymfocytech (medián)
GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem.



Obrázek č. 2: Průběh primární MLR na $CD8^+ CD25^+$ T lymfocytech (medián)
GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem.



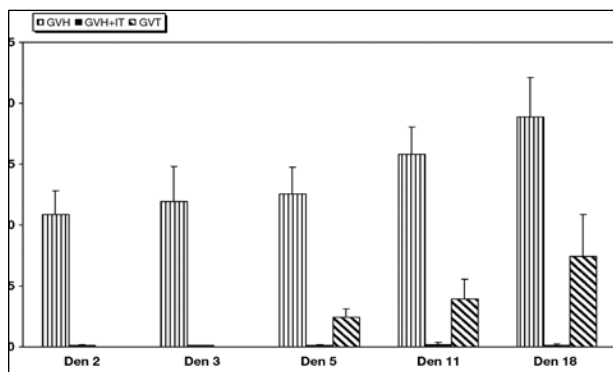
Obrázek č. 3: Flow cytometrická analýza $CD4^+CD25^+$ T lym-
focytů v primární MLR
Příklad aktivace aloreaktivních $CD3^+$ T lymfocytů v MLR bez
imunotoxinu (levý panel) a po inkubaci s imunotoxinem, kdy
jsou selektivně depletovány aloreaktivní lymfocyty dárce (pravý
panel).

Čtvrtý den od počátku kultivace byla MLR sklizena, promyta a rozdělena na dvě části obsahující stejný počet selektivně depletovaných dárcovských lymfocytů. První část byla následně stimulována ozářenými neleukemickými buňkami (kultura rGVH+IT) pro zjištění zbytkové reaktivity aloreaktivních klonů dárcovských lymfocytů. Druhá část byla stimulována ozářenými leukemickými buňkami stejného pacienta (kultura GVL) tak, aby byla navozena aktivace leukemie-specifických klonů T lymfocytů. 24 hodin po reaktivaci byla změněna produkce znaku CD25 v obou kulturách. V GVL kultuře dosahovala exprese znaku CD25 na CD4⁺ lymfocytech 0 – 7,5% (medián 2,45%), zatímco v kultuře buněk rGVH+IT 0 – 0,58% (medián 0,15%). Na CD8⁺ lymfocytech byla pozorována exprese znaku CD25 v 0 – 0,4% (medián 0,1%) u GVL a v rGVH+IT 0 – 0,19% (medián 0,11%). V kontrolní MLR došlo po reaktivaci k nárůstu populace CD4⁺CD25⁺ T lymfocytů: 10,4 – 16,4% (medián 12,58%), zvýšení exprese znaku CD25 bylo pozorováno i u CD8⁺ T lymfocytů: 6,5 – 13,1% (medián 8,19%).

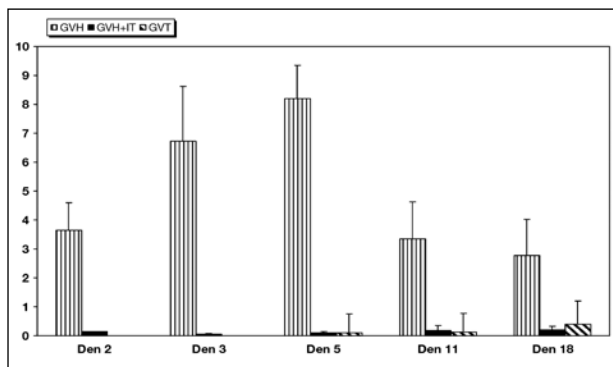
Desátý den proběhla další reaktivace obou kultur a po 24hod kultivaci následné měření na CD4⁺ T buňkách ukázalo, že v reaktivované GVL kultuře dochází podle očekávání k vyšší expresi znaku CD25 0,11 – 23,0% (medián 3,92%), kdežto v reaktivované rGVH+IT kultuře k výskytu CD25⁺ buněk nedochází téměř vůbec 0,14 – 0,34% (medián 0,17%). V GVL populaci CD8⁺ T lymfocytů dosáhlo procentuální zastoupení CD25⁺ buněk hodnot: 0,06 – 1,7% (medián 0,13%). Kontrolní reaktivovaná MLR vykázala hodnoty v CD4⁺CD25⁺ populaci T lymfocytů 8,79 – 21,2% (medián 15,81%), u CD8⁺CD25⁺ T lymfocytů pak došlo k poklesu hodnot: 2,8 – 5,9% (medián 3,35%), avšak v porovnání s buňkami v rGVH+IT 0 – 1,2% (medián 0,17%) byla exprese znaku CD25 stále významně vyšší.

Obdobných výsledků bylo dosaženo i po třetí reaktivaci, která proběhla v den 17. V reaktivované GVL kultuře bylo v den 18 naměřeno 1,1 – 9,6% (medián 7,46%) CD4⁺CD25⁺ T lymfocytů, v reaktivované GVH+IT kultuře pouze 0 – 0,23% (medián 0,14%). Kontrolní reaktivovaná MLR vykázala hodnoty u CD4⁺CD25⁺ T buněk 15,64 – 27,1% (medián 18,78%). V populaci CD8⁺ T lymfocytů byly naměřeny tyto procentuální zastoupení aktivovaných CD25⁺ lymfocytů: v GVL kultuře 0 – 1,3% (medián 0,4%), v rGVH+IT kultuře 0 – 1,1% (medián 0,21%) a v kontrolní GVH kultuře 1,6 – 5,4% (medián 2,77%).

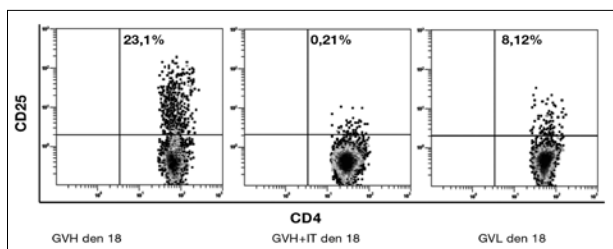
Mediány naměřených hodnot shrnují Obr. 4 a Obr. 5. Na Obr. 6 je znázorněna reprezentativní flow cytometrická analýza jednotlivých MLR u jednoho dárce. Můžeme tedy shrnout, že protileukemický (GVL) efekt dárcovských především CD4⁺ T lymfocytů byl dobře zachován (7,46%), zatímco nežádoucí aloreaktivní (GVH) reakce dárcovských buněk byla zcela potlačena, protože nedošlo k reaktivaci aloreaktivních T lymfocytů ani po opakované restimulaci ozářenými neleukemickými buňkami pacienta.



Obrázek č. 4: Průběh MLR – srovnání exprese znaku CD25⁺ na CD4⁺ T lymfocytech v jednotlivých reakcích (medián)
GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu a opakovanou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem a následnou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVL – MLR s imunotoxinem (pro navození selektivní deplece aloreaktivity) a následnou opakovanou stimulací leukemickými buňkami téhož pacienta.



Obrázek č. 5: Průběh MLR – srovnání exprese znaku CD25⁺ na CD8⁺ T-lymfocytech v jednotlivých reakcích (medián);
GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu a opakovanou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem a následnou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVL – MLR s imunotoxinem (pro navození selektivní deplece aloreaktivity) a následnou opakovanou stimulací leukemickými buňkami téhož pacienta



Obrázek č. 6: Příklad flow cytometrické analýzy CD4⁺CD25⁺ T-lymfocytů v sekundární MLR v den 18
GVH – kontrolní MLR bez imunotoxinu a opakovanou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVH+IT – MLR s imunotoxinem a následnou stimulací neleukemickými buňkami pacienta;
GVL – MLR s imunotoxinem (pro navození selektivní deplece aloreaktivity) a následnou opakovanou stimulací leukemickými buňkami téhož pacienta.

Literatura

- Horowitz MM. Uses and growth of hematopoietic cell transplantation. In: Hematopoietic Cell Transplantation. 2 ed. Thomas ED, Blume KG, Forman SJ, eds. Blackwell Science, Inc., Maiden, MA, 2000: 8-15.
- Mavroudis DA, Dermime S, Molldrem J, et al. Specific depletion of alloreactive T cells in HLA-identical siblings: a method for separating graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactions. *Br J Haematol* 1998; 101: 565-570.
- Collins RH Jr, Schpilberg O, Drobyski WR, et al. Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1997; 15: 433-444.
- Childs R., Chernoff A., Contentin N. et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343 (11):750-758
- Kolb HJ, Schmid C, Barrett AJ, Schendel DJ. Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras. *Blood* 2004; 103: 767-776.
- Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 1999; 5: 347-356.
- Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, et al. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991; 78: 2120-2130.
- de Gast GC, Gratama JW, Verdonck LF, et al. The influence of T cell depletion on recovery of T cell proliferation to herpesviruses and Candida after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1989; 48: 111-115.
- Barrett AJ, Mavroudis D, Tisdale J et al. T cell-depleted bone marrow transplantation and delayed T cell add-back to control acute GVHD and conserve a graft-versusleukemia effect. *Bone Marrow Transplant.* 1998;21:543-551.
- Amrolia PJ, Muccioli-Casadei G, Huls H et al. Adoptive immunotherapy with allodepleted donor T-cells improves immune reconstitution after haploidentical stem cell transplantation. *Blood* 2006;108:1797-1808.
- Vaclavkova P, Cao Y, Wu LK, Michalek J, Vitetta ES. A comparison of an anti-CD25 immunotoxin, Ontak and anti-CD25 microbeads for their ability to deplete alloreactive T cells in vitro. *Bone Marrow Transplant.* 2006;37:559-567.
- Chen BJ, Cui X, Liu C, Chao NJ. Prevention of graft-versus-host disease while preserving graft-versus-leukemia effect after selective depletion of host-reactive T cells by photodynamic cell purging process. *Blood* 2002;99:3083-3088.
- Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2001; 98: 3192-3204.
- Michálek J., Collins R.H., Durrani H.P., Václavková P., Ruff L.E., Douek D.C., Vitetta E.S.: Definitive separation of graft-versus-leukemia and graft-versus-host specific CD4+ T cell clones by virtue of their T cell receptor beta locus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1180-4.
- Michálek J, Collins RH, Vitetta ES. The effect of chain immunotoxin different enhancers on the ability of an anti-CD25 ricin a to deplete cells which are activated in an MLR. *Blood* 2000; 96: 312b.
- Michálek J., Collins R.H., Vitetta E.S.: Clinical-scale selective depletion of alloreactive T cells using an anti-CD25 immunotoxin. *Neoplasma* 2003; 50: 296-9.
- Montagna D, Yvon E, Calcaterra V, et al. Depletion of alloreactive T cells by a specific anti-interleukin-2 receptor p55 chain immunotoxin does not impair in vitro antileukemia and antiviral activity. *Blood* 1999; 93: 3550-3557.

Korespondenční adresa:

Mgr. Eva Matějková
Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, Masarykova univerzita, Brno
ILBIT, Pávilon A3, Kamenice 5, Brno, 625 00
ematej@med.muni.cz
549 498 448, 777 263 780

Došlo / Submitted: 31. 3. 2008

Přijato / Accepted: 20. 4. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

VÝSLEDKY SLEDOVÁNÍ SOUBORU PACIENTŮ LÉČENÝCH PRO HODGKINOVU NEMOC V LÉTECH 1971 AŽ 1996.

1. část: Dlouhodobé přežití pacientů v závislosti na klinickém stádiu onemocnění.

RESULTS OF THE MONITORING THE GROUP OF PATIENTS TREATED FOR THE HODGKIN DISEASE IN THE PERIOD OF 1971 TO 1996.

Part 1: Long-time survival in dependence of the clinical stage of the disease.

FRIDRICHOVÁ M.¹, DIENSTBIER Z.², LOUČKA M.³, SKALA E.², BLOMANNOVÁ E.².

¹ÚSTAV RADIČNÍ ONKOLOGIE FNB PRAHA

²NEMOCNICE SV. ALŽBĚTY PRAHA

³ÚSTAV MATEMATIKY VŠCHT PRAHA

Souhrn

Východiska: Autorský tým se zabýval problematikou Hodgkinovy nemoci od roku 1971. V roce 1978 byla zahájena na osmi pracovištích v ČR studie MORHO podle jednotného diagnostického a léčebného protokolu. Cílem práce je zhodnocení dlouhodobých léčebných výsledků studie MORHO. **Soubor pacientů a metody:** Bylo léčeno 370 nemocných. Léčba spočívala v kombinaci záření a chemoterapie COPP a od roku 1988 alternací COPP a ABVD. Terapie byla modifikována podle klinických stádií a histologického typu a věku pacientů. U nemocných nad 50 let se léčba redukovala po dekádách vždy o jeden cyklus chemoterapie. **Výsledky:** Z klinické studie vyplývá, že nemocní ve stádiu IIA, IIB a IIIA přežívají 30 let v 59,29 %, 57,86 %, 60,72 %. Pacientů diagnostikovaných jako stádium IIIB žije po 30 letech 36,78 %, zatímco nemocní ve stádiích IVA a IVB přežili 10 let ve 24,51 % a 23,32 % a 20 let 8,61 % se stádiem IVB. Ženy přežívají déle než muži. Histologické typy neměly vliv na délku přežití. Celkový počet relapsů v souboru byl 55, z toho bylo 39 mužů a 16 žen. V 64 % šlo o stádium III a IV a v 73 % byly postiženy mediastinální uzliny. 42 % relapsů bylo do jednoho roku po léčbě. Po léčbě se narodilo pacientům ze souboru 75 dětí, z toho 60 léčeným ženám. **Závěry:** Léčba Hodgkinovy nemoci podle protokolu, vytvořeného skupinou odborníků účastnících se na projektu MORHO, je srovnatelná se zahraniční léčbou té doby. Znamenala výrazný posun v terapii nemoci v tehdejší Československu, zvláště sjednocení léčebného protokolu. Léčba Hodgkinovy nemoci se tak změnila z pouhé paliace ve skutečnou kurativu.

Klíčová slova: Hodgkinova nemoc, chemoterapie, radioterapie, dlouhodobé přežití

Summary

Backgrounds: This authors team has been dealing with the Hodgkin disease problems since 1971. The MORHO study started at eight working places in 1978 according to unified diagnostic and medical protocol. **Patients and methods:** 370 patients were treated. The treatment consisted in the combination of radiation and chemotherapy COPP and since 1988 in alternance of COPP and ABVD. Therapy was modified with accordance to clinical stages and patient's histological type and age. Treatment of the patients over 50 was reduced in decades of one chemotherapy cycle less. **Results:** Results from the clinical study are – patients with the stage IIA, IIB and IIIA survive 30 years in 59,29%, 57,86% and 60,72%. Patients diagnosed as stage IIIB survive after 30 years 36,78%, while patients in stages IVA and IVB survived 10 years 24,51% and 23,32% and 20 years 8,61% in stage IVB. Women survived longer than men. Histological types had no influence to the length of survival. The total number of relapses in the group was 55. There were 39 men and 16 women from that. 64% was in stage III and IV and in 73% mediastinal nodules were affected. 42% of relapses was till 1 year after the treatment. After the treatment 75 children were born to the patients from the group. 60 children from that were born to the women under treatment. **Conclusion:** The success of therapy of Hodgkin's disease according to protocol created by expert group of study MORHO is comparable with results of similar studies in the world. The most important contribution of this study was unification of treatment protocol in Czechoslovakia. This study changed the formerly paliative therapy to real curative treatment.

Key words : Hodgkin disease, chemotherapy, radiotherapy, survival

Úvod

Tento soubor vznikl v 70. letech minulého století jako reakce na informace o rozvíjejících se terapeutických směrech systémového onemocnění označovaného jako Hodgkinova nemoc (HN). Začala se spolupráce tří pražských pracovišť pod vedením prof. Dienstbiera. Nové techniky radioterapie uváděl do klinické praxe prof. Zámečník.

Spolupráce se účastnily Ústav biofyziky a nukleární medicíny Fakulty všeobecného lékařství (FVL UK), Radio-terapeutický ústav a II. klinika tuberkulózy a respiračních chorob FVL UK Praha.

Od radioterapie na vysokovoltážních rentgenových přístrojích se přecházelo v 70. letech na kobaltové ozařovače statické (Chisostat) a další generace s větší možností pohyblivosti hlavičky a různosti nastavení (Chis-

obalt). S rozvojem chemoterapie a dostupnosti alespoň základních cytostatik se terapeutické možnosti rozšiřovaly, úloha chemoterapie se na základě probíhajících studií dostávala z roviny paliace do roviny rovnocenné kurativní metody ve srovnání s radioterapií a posléze se stala suverénní kurativní metodou, doplňovanou radio-terapií.

Sledovaný soubor pacientů léčených pro HN vznikl od roku 1971. Do roku 1976 byla většina pacientů získána z Pneumologické kliniky. Šlo o pacienty s vyšším klinickým stádiem onemocnění. V pozdějších letech se výskyt jednotlivých klinických stádií rozšířil. Diagnostika a terapie se sjednotila podle protokolu publikovaného v r.1978 (1). Do studie nazvané MORHO se zapojilo 8 klinických pracovišť z České republiky.

Soubor obsahoval 371 pacientů, z nich bylo hodnoceno ve studii 370. Do vyšetřovacích stagingových metod byla zahrnuta 67Ga scintigrafie, CT vyšetření, radiologická i izotopová lymfografie i izotopová lymfografie (2, 3).

Desetileté výsledky publikovali Dienstbier a spol. v r. 1988 (4), kdy 72,5% nemocných bylo v kompletní remisi a 10,8% přežilo v parciální remisi.

Z pacientů zahrnutých do studie došlo u 55 nemocných k relapsu. Skupina sestávala ze 39 mužů a 16 žen, u 64% šlo o klinická stadia III a IV. Postižení mediastina bylo pozorováno u 73 %. Ke 42 % relapsů došlo do 1 roku po léčbě, u dalších 33 % do dvou let po ukončení primární terapie (5).

V České republice tato studie představovala kvalitativní zvrat v péči o nemocné s HN, což dokazují i závěry retrospektivní studie 430 pacientů léčených pro toto onemocnění v letech 1965-1974, kde pětileté přežití bylo pouze 41% (6).

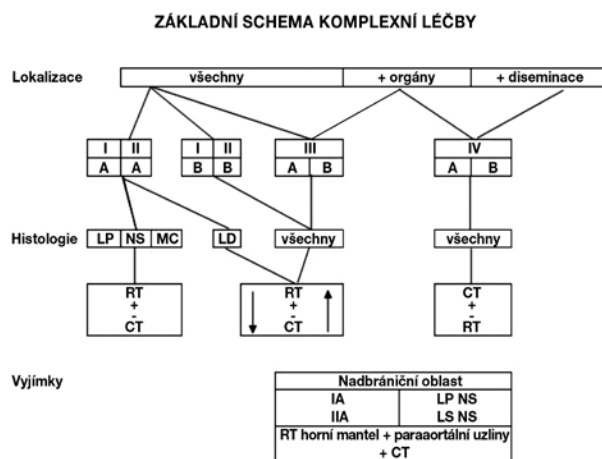
V roce 1996 byla ukončena spolupráce sdružených pracovišť, ambulance přemístěna do nemocnice sv. Alžběty a ošetřující lékaři se soustředili na dispenzární péči o dříve léčené nemocné.

Metodika

Klinická a histologická klasifikace onemocnění těchto pacientů byla stanovena podle Ann Arbor a RAY klasifikace. Nemocní byli léčeni podle jednotného protokolu. Léčba byla diferencována podle klinického stadia a B symptomatologie. Protokol byl modifikován v r.1988.

Původních 6 cyklů se podle věku (nad 50 let) snižovalo po dekádách o 1 cyklus chemoterapie.

Aplikovali jsme COPP kombinaci (cyklofosamid, vin-kristin, prokarbazin, prednison) a od r. 1988 alternativně COPP a ABVD (adriamycin, bleomycin, vinblastin, dacarbazin). Radioterapie probíhala do roku 1985 na kobaltovém ozařovači, později na lineárním urychlovači 4-6 MeV a aplikovaná dávka nepřesahovala 40 Gy. U pacientů do 40 let věku, zejména u žen, byla indikována radioterapie v oblasti podbráničních uzlin pouze limitovaným polem, pokrývajícím pouze paraaortální a splenické uzliny do umbilikální roviny. Schematicky je znázorněna léčba podle protokolu publikovaného v roce 1978 (1).



Schema: Základní schema léčby

Statistické zpracování

Statistická analýza se soustředila na zhodnocení doby přežívání u jednotlivých skupin pacientů. Hlediska třídění byla klinické stádium, pohlaví, věk a příčina úmrtí. Hledisko věku bylo hodnoceno orientačně aritmetickým průměrem a rozpětím souboru.

Ostatní skupiny pacientů vytrženy podle uvedených kritérií byly zpracovány standardně Kaplan-Meierovou metodou a následnou konstrukcí křivek přežití.

Výhodou Kaplan - Meierovy metody konstrukce křivek přežití je procedura tzv. cenzorování, která umožňuje zahrnout do studie i ty případy, kdy pacient přestal být z nejrůznějších důvodů sledován v období mezi dvěma po sobě následujícími úmrtími, avšak v tomto období k jeho úmrtí nedošlo. Podmíněná pravděpodobnost přežití v daném časovém úseku je pak vztažena ke skutečnému počtu osob, které jsou v tomto intervalu právě sledovány. Cenzorované případy ovlivňují křivku přežití tak, že se postupně snižuje počet osob v riziku. Horizontálně orientovaná čára stupňovité křivky tak obsahuje body odpovídající okamžikům, v nichž byl pacient ze studie vyřazen.

Signifikanční odlišnost ve skupině křivek přežití jsme posuzovali zobecněným log-rank testem na hladině významnosti 5%. Na stejné hladině významnosti je testována rozdílnost každé dvojice křivek přežití Cox-Mantelovým testem (8). Kritický obor obou zmíněných testů je odvozen od χ^2 rozdělení pravděpodobnosti. V tabulkách a komentářích grafů je tedy výsledek testu signifikantní, tj. křivky přežití se od sebe liší tam, kde je uvedena hodnota $p < 0,05$.

Podíl přežívajících pacientů f byl stanoven z Kaplan-Meierových křivek přežití jejich vyrovnáním exponenciálou podle rovnice

$$f = Ae^{-Bt}$$

a ze známých parametrů A , B pak byly vypočteny doby přežití pro hodnoty času $t = 60, 120, 240$ a 360 měsíců. K výpočtům byl použit programový produkt STATISTICA 7.0 (9).

Výsledek

Celý soubor je charakterizován v následujících tabulkách a přežívání nemocných je uvedeno v jednotlivých tabulkách a grafech. Základní údaje o datovém souboru a jeho členění jsou v tab.1 a 2.

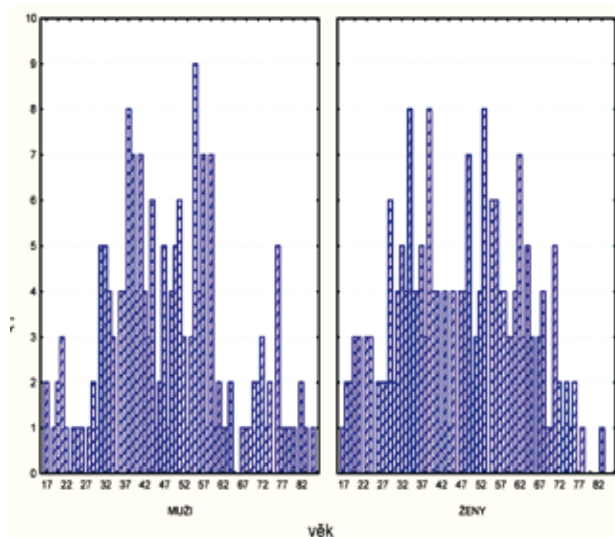
soubor pacientů	celkem	ženy	muži	přeživající	zemřeli
počet	370	172	198	191	179

Tabulka č. 1: Výchozí soubor pacientů

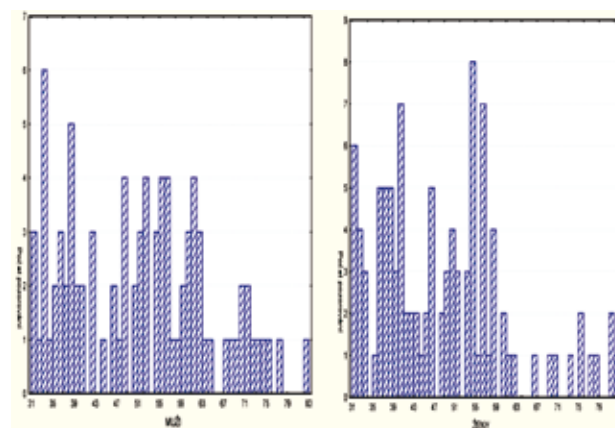
Klin. stádium	ženy	muži	Celkem	Klin. stádium	ženy	muži	Celkem
I A	2	8	10	II A	64	46	110
I B	3	2	5	II B	25	22	47
I	5	10	15	II	89	68	157
III A	38	43	81	IV A	5	7	12
III B	20	46	66	IV B	15	24	39
III	58	89	147	IV	20	31	51

Tabulka č. 2: Četnostní struktura souboru tříděného podle pohlaví a klinických stádií.

Pro možnost srovnání věkového složení uvádíme i histogramy původního a redukovaného souboru přeživajících sledovaných pacientů.



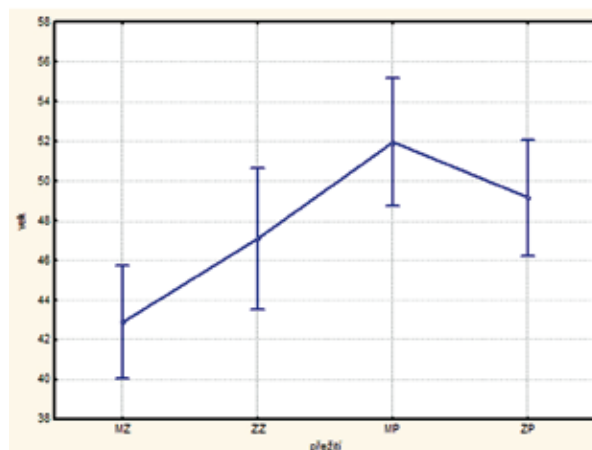
Graf č. 1: Histogram věku v době diagnózy pro celý soubor



Graf č. 2: Histogram věku v době diagnózy dlouhodobě přeživajících nemocných (muži, ženy)

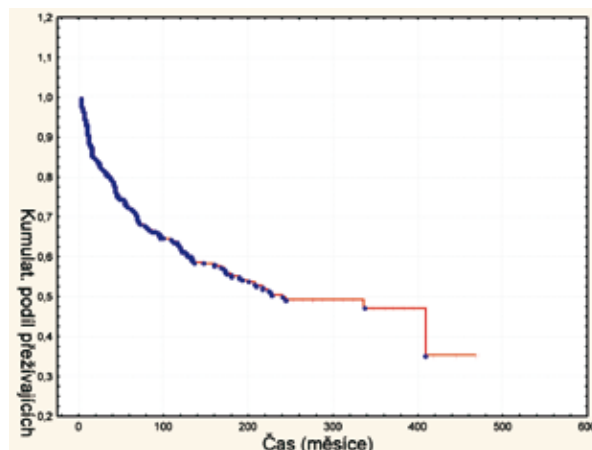
U přeživajících pacientů je redukována věková kategorie nemocných do 31 let, s větším zastoupením vyšších věkových kategorií (49-61 let) u mužů.

Křivka přežití nemocných celého souboru je na grafu 4.

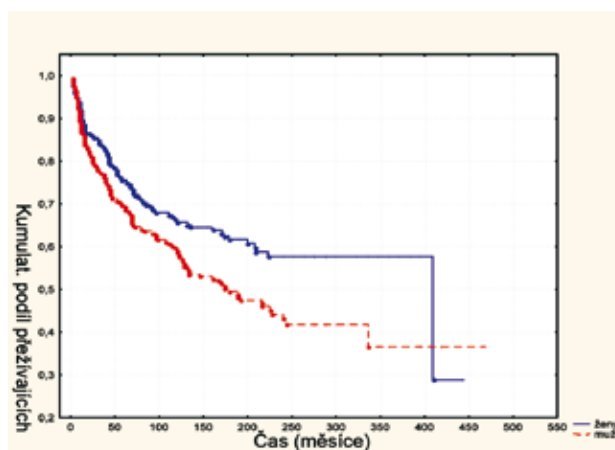


Graf č. 3: Analýza rozptylu věku pacientů

Výsledky jednofaktorové analýzy rozptylu vzhledem k úrovním (MP - žijící muži, ZP - žijící ženy, MZ - zemřelí muži, ZZ - zemřelé ženy) faktorů přežití - pohlaví. Vliv faktoru (pohlaví - přežití) je významný, $p = 0,000363$.



Graf č. 4: Křivky přežití celého souboru

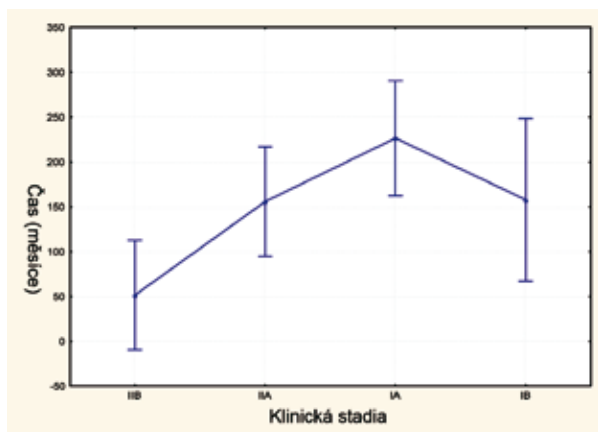


Graf č. 5: Křivka přežití všech nemocných souboru podle pohlaví; $p = 0,01069$

Na grafu 5 je křivka přežití celého souboru podle pohlaví. Pacienti s klinickým stádiem I, jsou narozeni v rozmezí let 1928-1950, v době diagnózy jim bylo od 28 do 74 let.

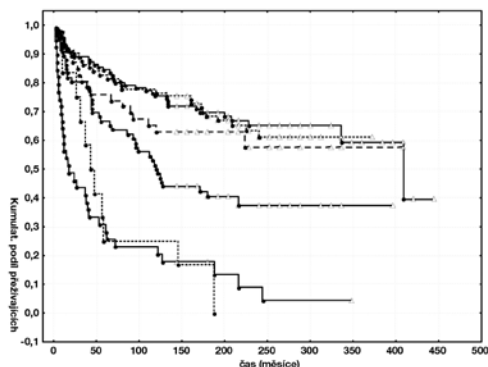
původní práce

Doba od stanovení diagnózy do současnosti je v rozmezí 10 – 39 let. Věkové rozložení a malý počet pacientů se odrazilo v křivkách přežití. Využili jsme proto možnosti znáhodnění výběru dat ve skupinách IIA a IIB a soubor vzniklý spojením s případy IA a IB tak vytvořil konzistentní datový základ splňující podmínky pro aplikaci metody ANOVA (8). Několikrát opakováním této procedury jsme došli k závěru, že se délka přežití pro skupinu IA významně odlišuje ve skupině IIB ($p = 0,0034$). Jiné odlišnosti se ve znáhodněných souborech nepodařilo prokázat



Graf č. 6: Typický výsledek metody ANOVA ve znáhodněném souboru

1. Kumulativní podíl přeživajících v klinických stádiích IIA až IVB podle Kaplan-Meiera je znázorněn na grafu 7. Plná kolečka znamenají ukončený stav, trojúhelníčky cenzorovaný údaj.



Graf č. 7: Přežití nemocných podle klinických stádií IIA až IVB

	Muži			Ženy		
	II	III	IV	II	III	IV
II	XXX	0,08664	0,00000	XXX	0,78605	0,00000
III	-	XXX	0,00011	-	XXX	0,00000
IV	+	+	XXX	+	+	XXX

Tabulka č. 3: Výsledky Cox - Mantelova testu porovnávající křivky přežití podle klinických stádií a pohlaví
Nad hlavní diagonálou (pole XXX) tabulek je uvedena p - hodnota testu, pod ní je pak statistický resultát. (+ odlišnost, - shoda).

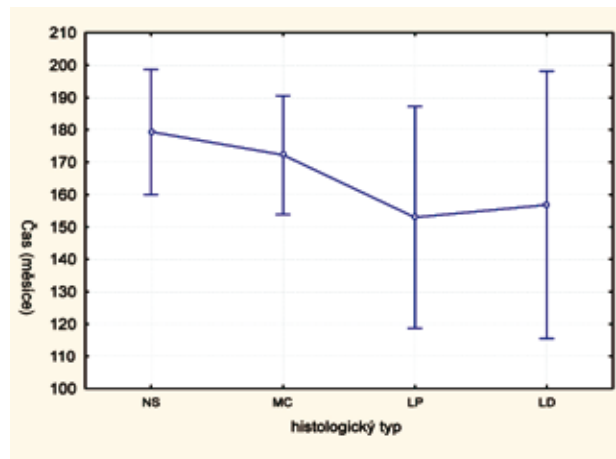
V tabulce 3 jsme vyjádřili statistickou významnost přežívání u klinických stádií v souboru členěném podle pohlaví.

Tabulka 4 přibližuje statistickou významnost klinického stádia a B symptomatologie.

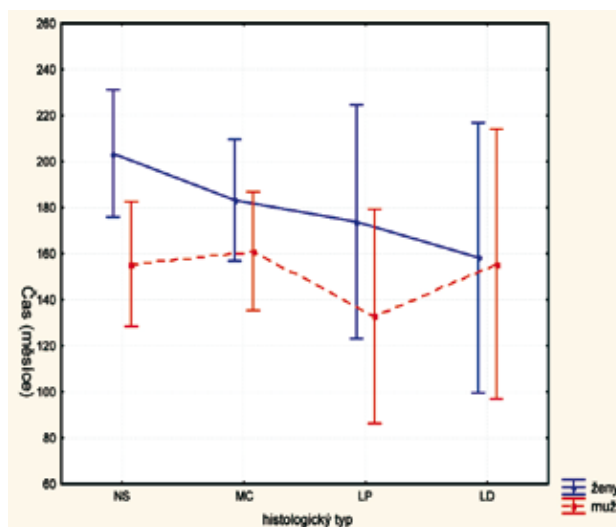
	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IVA	IVB
IIA	XXXX	0,12486	0,73134	0,00008	0,00000	0,00000
IIB	-	XXXX	0,19339	0,11910	0,00065	0,00000
IIIA	-	-	XXXX	0,00106	0,00000	0,00000
IIIB	+	-	+	XXXX	0,01210	0,00001
IVA	+	+	+	+	XXXX	0,60600
IVB	+	+	+	+	-	XXXX

Tabulka č. 4: Statistická významnost rozdílů přežití mezi klinickými stádii A a B. Signifikantní rozdíl je u stádia IIIB, IVA a IVB.

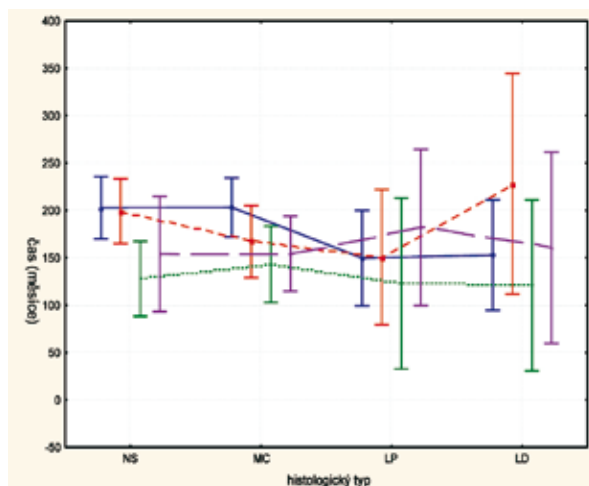
Na grafu 8 jsou ilustrovány výsledky současného vlivu faktoru „histologický typ“ na přežití aplikací metody MANOVA. Ukazuje se, že riziko úmrtí se pro jednotlivé histologické typy neliší ani v jednom z nich. Naděje na přežití nezávisí tedy na stanoveném histologickém typu. Stejnou situaci odráží srovnání histologických typů pro obě pohlaví. Ačkoli graf 5 potvrzuje rozdílnost délky přežití pacientů a pacientek, jednotlivé intervaly spolehlivosti se na grafu 9 překrývají. To nás vede k závěru, že výsledky MANOVA pro faktory „pohlaví“ a „histologický typ“ vykazují shodu naděje na přežití pro všechny kombinace úrovní těchto faktorů.



Graf č. 8: ANOVA pro histologické kategorie – jednorozměrná; $p = 0,51967$



Graf č. 9: MANOVA pro histologické typy - vliv pohlaví; $p = 0,68710$



Graf č. 10: MANOVA pro klinická stadia a histologické typy; $p=0,73770$

Histologické typy významně neovlivnily dobu přežití, rozhodující bylo klinické stadium.

Současné působení faktorů „histologický typ“ a „klinické stadium“ není významné, jak potvrzuje graf 10. Znamená to, že podrobné třídění podle těchto hledisek nemá prognostickou váhu na rozdíl od selekce skupin IIA, IIB, IIIA a IIIB, kde poslední z nich je významně odlišná.

Zůstává skutečností, že 30 let po léčbě pro HN z našeho souboru přežívá s klinickým stádiem IIA 59,29%, IIB 57,86%, IIIA 60,72% a IIIB 36,78% nemocných. Pacienti s klinickým stádiem IV přežívají 10 let bez klinické symptomatologie ve 24,51% a s B symptomatologií ve 22,32%.

	muži			ženy		
Přežití	II	III	IV	II	III	IV
5	79,17	71,86	37,75	85,19	80,53	14,68
10	66,02	61,14	31,91	73,42	71,63	9,34
20	58,52	41,55	5,09	64,28	63,7	9,76
30	51,6	0	0	63,7	63,7	0

Tabulka č. 5: Přežívání pacientů podle pohlaví a klinického stádia

Přežití	II		III		IV	
	A	B	A	B	A	B
5	84,29	76,07	81,79	66,8	25,06	27,78
10	75,01	62,87	76,44	50,01	24,51	22,32
20	65,0	57,86	61,08	36,78	0	8,61
30	59,29	57,86	60,72	36,78	0	0

Tabulka č. 6: Podíl přežívajících pacientů podle klinických stádií bez ohledu na pohlaví

Diskuse

V Československu, podobně jako ve světě, do sedmdesátých let minulého století, byla chemoterapie u Hodgkinovy nemoci užívána paliativně.

Pro radioterapii se používaly vysokovoltážní rentgenové přístroje a později kobaltové ozařovače. Retrospektivní studie z českých pracovišť zjistila pětileté přežití u 41% ze 430 pacientů, léčených v letech 1965 až 1974 (6). Proto tým, který iniciovali Dienstbier a Zámečník, přistoupil k vypracování léčebné-

ho protokolu, který umožnil spolupráci 8 pracovišť v České republice.

Protokol vycházel z prací De Vity a spol. (10). Z devizových důvodů byli lékaři nuceni volit místo MOPP (nitrogen mustard, oncovin, prokarbazin, prednison) kombinaci COPP. Na základě prací Bonadonny a spol. (11) protokol pozměnili střídáním kombinací COPP a ABVD. Ozařovací schéma volili podle zkušeností Kaplana a spol. (12). U mladých nemocných se snažili zachovat možnost fertility užitím techniky involved field (ozařovat v indikovaných případech podbrániční paraaortální uzliny pouze do výše umbilikální roviny).

Léčebné výsledky potvrdily správnost tohoto postupu. Velmi si ceníme i 75 dětí, které se narodily v rodinách léčených pacientů. Podrobně se problematice fertility budeme věnovat v další publikaci.

Bonadonna a spol. (13) sledovali v letech 1973 – 1990 v randomizované studii léčebné výsledky MOPP a ABVD chemoterapie s ozářením nebo bez následného ozáření. ABVD proti MOPP kombinaci snížilo riziko progresu a úmrtí. Pozorovali však zvýšené riziko sekundárních nádorů, zejména pak při následném extenzivním ozařování. Kumulativní riziko bylo 22,2%.

V naší studii jsme se rovněž setkali se sekundárními nádory, ale v menší míře.

Rozbor příčin úmrtí je vhodný proto, že kombinovaná radiochemoterapie se v literatuře spojuje s vedlejšími kardiiovaskulárními komplikacemi, které se rovněž vyskytly v našem souboru.

Samostatné sdělení (3 díl publikace) bude analyzovat příčiny úmrtí v našem souboru.

Gustavson a spol. (14) se pokusili o souhrnný přehled užívané radioterapie u HN. Zjistili, že u časných stádií v 80% a u pokročilých v 60% - 70%, zejména u mladých lidí, má dlouhodobý terapeutický účinek. Po 15 až 20 letech jsou úmrtí způsobena hlavně sekundárními nádory a kardiálními komplikacemi.

Údaje o terapeutických výsledcích při ozáření technikou „involved field“ (IF) nebo „extended field“ (EF) se zcela neshodují.

Hoskin a spol. (15) uvádí, že u stádií I a IIA ozáření IF má o 11% vyšší riziko relapsů, než EF, ale doba přežití a riziko malignit během 25 let jsou stejné.

Anselmo a spol. (16) uzavírá, že v kombinaci s ABVD chemoterapií byla účinnost IF a EF stejná bez rozdílné akutní toxicity.

Foltz a spol. (17) nezjistili rozdíl v léčebných výsledcích ve věkové skupině 16 až 21letých proti 22 až 45letým, pokud byli léčeni dle stejného protokolu.

Ferre a spol. (18) zjistili, že věk nad 45 let je rizikovým faktorem úmrtí, relapsu a sekundární malignity.

Nordijk a spol. (19) léčili pacienty klinického stádia I a II v randomizované studii, kombinací EBVP (epirubicin, bleomycin, vinblastin, prednison) a IF – radioterapie a MOPP/ABV hybrid a IF- radioterapie. EBVP kombinace je méně účinná. Pro naši studii je zjištění autorů zajímavé proto, že se věk, B symptomatologie, počet „involved“ polí a poměr mediastina k rozměru hrudníku neukázaly jako významné faktory v přežití.

Huang et al. (20) analyzovali soubor 295 pacientů léčených v roce 1970 – 2000. Léčili je CT a následně IF-RT.

Přežití bylo po 5 letech 63,5 %, po 10 letech 55,8 % a po 20 letech 47,1 %. Prognosticky nepříznivý byl věk nad 45 let, B symptomatologie a stádia III a IV. U histologického typu NS byly lepší klinické výsledky u stádií I a II než III a IV.

Závěr

Naše studie umožňuje upozornit na shodu v dlouhodobém přežívání nemocných s HN u stádií IIA, IIB a IIIA. Třicet let přežívá u stádia IIA 59,29 %, u IIB 57,86 %, a u IIIA 60,72 %.

Ze statistického hlediska jde o náhodné odchylky této veličiny. U stádia IIIB je třicetileté přežití 36,78 %. Nemocní klasifikovaní jako IVA přežili 10 let ve 24,51 % a IVB v 22,32 %.

Ve věkové skupině přežívajících při srovnání s histogramy celého souboru je redukována kategorie do 31 let a je vyšší zastoupení starších věkových kategorií 49 – 61 let u mužů. Dlouhodobě přežívá více žen.

Složení souboru nemocných bylo ovlivněno tím, že pacienti přicházeli zejména z pneumologických klinik s častějšími tumory mediastina. Spolupráce osmi pracovišť z České republiky se ukázala velmi prospěšná a přinesla zvrát léčebného přístupu. Nešlo o randomizovanou studii, ale o zavedení ověřených postupů do léčebné praxe.

Výzkum přinesl v posledních 50 letech nové možnosti diagnostiky i léčby Hodgkinovy nemoci. Dlouholeté rozbor, jakým je i naše studie, mají význam pro orientaci nových randomizovaných studií.

Literatura

- Dienstbier Z., Foltýnová V., Zámečník J.: Protocol of the complex diagnosis and therapy of Hodgkin's disease. *Antitumor Drug Ther. Rep.* 1978, 4, 75 – 88.
- Dienstbier Z., Bechyně M., Černá J., Režný Z.: Scintigraphic Methods in Diagnosis of Morb. Hodgkin, *Eur. J. Nucl. Med.*, 1987, 3, 11 – 14.
- Dienstbier Z. et al. *Morbus Hodgkin 1 – 168*, monografie Liga proti rakovině, 1996.
- Dienstbier Z., Heřmanská Z., Vacková L., Melínová E., Skala E., Zámečník J.: Dlouhodobé přežití u Hodgkinovy nemoci – soubor nemocných po 10 letech od primární léčby. *Prak. Lék.* 1995, 75, 9, 409 – 412.
- Dienstbier Z., Heřmanská Z., Zámečník J., Melínová L., Vacková B., Skala E., Srbová D.: Relaps Hodgkinovy choroby. *Vnitřní lék.* 1995, 41, 12, 816 – 821.
- Zámečník J., Kubec V., Černá T., Dienstbier Z. et al: Maligní lymfom granulom. Retrospektivní studie u souboru 430 nemocných. *Čas. lék. českých 1980*, 119, 46, 1233 – 1236.
- Dienstbier Z., Zámečník J., Heřmanská Z., Beška F.: Protocol of the complex diagnosis and therapy of Hodgkin's disease. *Antitumor Drug Ther. Rep.* 1978, 4, 75 – 88.
- Belle G.H., Fischer L.D., Heagerty P.J., Lumpley T.: Biostatistics. A methodology for the Health Science. Sec. Ed. John Wiley ... Sons Inc. 2004.
- STATISTICA Systém Reference StatSoft Inc.
- De Vita V.T., Serpick A., Carbone P.P.: Combination chemotherapy in the treatment of advanced Hodgkin's Disease. *Ann. Intern. Med.* 1970, 73, 881 – 895.
- Bonadonna G., Zucali R., Monfardini S., et al: Combination chemotherapy of Hodgkin's disease with adriamycin, bleomycin, vinblastine and imidazole carboxamide versus MOPP. *Cancer* 1975, 36, 252 – 259.
- Kaplan H.S., Evidence of tumoricidal dose level in the radiotherapy of advanced Hodgkin's disease: *Ann. Intern. Med.* 1970, 13, 881 – 895.
- Bonadonna G., Viviani S., Bonfante V., Gianni A.M., Valagussa P., Survival in Hodgkin's disease patients – report of 25 years of experiences at the Milan Cancer Institute *Eur. J. Cancer* 2005, 41, 998 – 1006.
- Gustavson A., Osterman B., Cavallin – Stahl E.: A systematic overview of radiation therapy effects in Hodgkin's lymphoma. *Acta Oncol.* 2003, 42 (5-6), 589 – 604.
- Hoskin P.J., Smith P., Maughan T.S. et al: Long term results of randomised trial of involved field radiotherapy vs extended field radiotherapy in stage I and II Hodgkin lymphoma. *Clin. Oncol. (RColl Radiol.)* 2005, 17 (1) 47 – 53.
- Anselmo A.P., Cavalieri E., Osti F.M. et al: Intermediate stage Hodgkin's disease: preliminary results on 210 patients treated with four ABVD chemotherapy cycles plus extended versus involved field radiotherapy. *Anticancer Res.* 2004, 24 (6), 4045 – 50.
- Foltz L. M., Song K.W., Connors J.M.: Hodgkin's lymphoma in adolescents. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24 (16), 2520 – 6.
- Ferre C., Mounier M., Casasnovas O., et al.: Long term results and competing risk analysis of H89 trial in patients with advanced-stage Hodgkin lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA): *Blood* 2006, 107 (12), 4636 – 42.
- Noordijk E. M., Carde P., Dupont N. et al: Combined-modality therapy for clinical stage I or II Hodgkin's lymphoma: long term results of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer H7 randomized controlled trials. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24 (19), 3128 – 35.
- Huang H. Q., Juang W. Q., Wang W. et al.: Clinical results of 295 patients with Hodgkin's disease treated by chemotherapy – predominant comprehensive modality. *Ai Zheng* 2002, 21 (12) 1345 – 9.

Korespondenční adresa:

MUDr. Fridrichová Michaela

Budínova 2, 180 81 Praha 8 - Libeň

e-mail: fridrichova.michaela@seznam.cz

Došlo / Submitted: 13. 12. 2007

Přijato / Accepted: 26. 3. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

SOUČASNÝ STAV TESTOVÁNÍ CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ EX VIVO V MASARYKOVĚ ONKOLOGICKÉM ÚSTAVU V BRNĚ

ACTUAL STATE OF EX VIVO CHEMORESISTANCE TESTING OF MALIGNANT TUMORS IN MASARYK MEMORIAL CANCER INSTITUTE BRNO

POPRACH A.¹, MICHALOVÁ E.², PAVLÍK T.³, LAKOMÝ R.¹, VYSKOČIL J.¹, NĚMEČEK R.¹, ŽALOUDEK J.⁴, VYZULA R.¹, KOCÁK I.¹, KOCÁKOVÁ I.¹

¹ KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

² ODDĚLENÍ ONKOLOGICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

³ INSTITUT BIostatistiky A ANALÝZ, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO

⁴ ODDĚLENÍ CHIRURGICKÉ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn

Testování chemorezistence nádorů *ex vivo* přináší výsledky, které mohou být aplikovány při rozvaze o podání chemoterapie. V srpnu 2006 byl na našem pracovišti (Masarykův onkologický ústav) stanoven protokol o provádění testu chemorezistence a definovány skupiny diagnóz a stádií onemocnění, u kterých se bude test provádět. Jedná se o metastazující maligní melanom, sarkom měkkých tkání primární a/nebo recidivující či metastatický, renální karcinom primární nebo metastatický, relabující karcinom ovaria a tzv. „skupina diagnóz na přání klinika“. V období od září 2006 do listopadu 2007 bylo odebráno k testování chemorezistence celkem 25 vzorků maligního melanomu (u 9-ti z nich byly získány reprodukovatelné výsledky), 29 vzorků sarkomu (výsledky získány u 11-ti odběrů), 36 vzorků renálního karcinomu (výsledky získány u 20-ti z nich) a 16 vzorků ovariálního karcinomu (výsledky získány u 11-ti vzorků). *Ex vivo* zachycená citlivost k určitému cytostatiku nemusí ještě nutně znamenat citlivost nádoru *in vivo*, zatím však nebyla zaznamenána situace zjištěné rezistence *ex vivo* a následné citlivosti nádoru *in vivo*. Obecným problémem při aplikaci výsledků chemorezistence je polyklonálnost solidních tumorů, složitost metabolismu člověka a nejistota kultivace právě maligních buněk a nikoliv např. buněk stromálních, benigních. Řádnému statistickému zhodnocení a klinické aplikaci výsledků testu chemorezistence na našem pracovišti zatím brání malý počet hodnotitelných vzorků.

Klíčová slova: chemorezistence, MTT test, cytostatika, maligní melanom, sarkom měkkých tkání, renální karcinom, karcinom ovaria

Summary

Chemosensitivity assay results may play a role in cancer management decision process. Since August 2006 testing chemoresistance has been tested according to a protocol that was designed for this reason in our institute (Masaryk Memorial Cancer Institute). Five groups of different types of cancer in particular clinical stages were defined for chemosensitivity testing with: 1. metastatic malignant melanoma, 2. soft tissue sarcoma (STS), either primary or recurrent/metastatic, 3. primary or metastatic renal cancer, 4. recurrent ovarian cancer and 5. other diagnosis „on clinician's request“. In the period from September 2006 to November 2007, 25 samples of malignant melanoma (reproducible results in 9 cases), 29 samples of STS (relevant data in 11 cases), 36 samples of renal cancer (relevant results in 20 samples) and 16 samples of ovarian cancer (reproducible results in 11 cases) were acquired. Sensitivity to certain chemotherapy agent observed *ex vivo* does not necessarily mean that the cancer would also be sensitive to the same agent *in vivo*, however, *ex vivo* resistance with following *in vivo* sensitivity of the tumour has not been observed to date. The cultivation of malignant cells is very uncertain in solid tumours, which consist of several malignant cell multiclones (benign/stromal cells may out-grow malignant cells). This cultivation uncertainty as well as the unique complexity of human metabolism makes clinical application of chemoresistance testing at least very questionable. The small number of successfully evaluated samples has not yet provided us to carry out proper statistical evaluation and clinical application.

Keywords: chemoresistance, MTT test, cytostatics agents, malignant melanoma, soft tissue sarcoma, renal carcinoma, ovarian carcinoma

Úvod, metoda a výsledky

Testování chemorezistence vzorků *ex vivo* za pomoci tetrazoliového testu (MTT test) probíhá v Masarykově onkologickém ústavu v Brně (MOÚ) již po dobu několika let. V srpnu 2006 byl ustanoven protokol a byly určeny diagnózy v určitých stádiích, u kterých se bude MTT test provádět. Ve spolupráci s Institutem biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity v Brně byly určeny tzv. kritické scénáře, které umožní

lepší statistické zpracování výsledných klinických dat. V neposlední řadě došlo k optimalizaci vlastního zpracování vzorků nádorů a hodnocení získaných laboratorních dat.

Stanovení citlivosti k vybraným chemoterapeutikům je nyní prováděno u následujících 5-ti skupin diagnóz:

1.) Metastazující maligní melanom u pacientů s předpokladem podání chemoterapie, u nichž je k dispozici ložisko nebo výpotek vhodný k vyšetření.

2.) Sarkom měkkých tkání primární a/nebo recidivující či metastatický, opět u pacientů s předpokladem podání chemoterapie.

3.) Renální karcinom primární nebo metastatický.

4.) Karcinom ovaria. Zde se původní požadavek omezující provádění MTT testů pouze u relabujícího karcinomu postupně změnil na testování vzorků u všech patientek s karcinomem ovaria, u nichž se předpokládá podání chemoterapie (tj. od stádia FIGO IIIa a výše).

5.) Zvláštní skupinu tvoří „diagnózy na přání klinika“. Do této skupiny se řadí vzorky pacientů, u nichž si okolnosti v průběhu léčby vyžádaly stanovení citlivosti k vybraným chemoterapeutikům. (Blíže bude zmíněno v další části článku.)

Metoda stanovení chemorezistence *ex vivo* začíná odběrem dostatečného množství materiálu (co největší objem nádorové tkáně, nebo až 500 ml výpotku - ascites, flui-dothorax). Vzorek je dále upravován za sterilních podmínek s cílem získat suspenzi obsahující $0,5-1 \times 10^6$ uvolněných živých buněk v 1 ml. Suspenze je barvena roztokem Trypan Blue (Invitrogen Corp.) a počítáním buněk v Bürkerově komůrce (Meopta) je hodnocen počet živých izolovaných buněk (živé buňky nejsou barveny a v mikroskopu se jeví světle žluté; do mrtvých buněk barva proniká a jsou tedy modré). Buňky jsou následně kultivovány s cytostatiky v 96-ti jamkové desce po dobu tří dnů při 37°C s 5 % CO_2 . Každé cytostatikum je hodnoceno v šesti sestupných koncentracích v duplikátu vždy v přítomnosti negativní (samotné kultivační médium) a pozitivní kontroly (kultura buněk bez cytostatika). Pro každou diagnózu bylo zvoleno spektrum testovaných cytostatických látek a jejich preference a to pro případ, že množství izolovaných buněk není dostačující pro hodnocení všech cytostatik.

Maligní melanom: 1. dakarbazin, 2. cisplatina, 3. karmustin, 4. bleomycin, 5. vinblastin, 6. karboplatina.

Renální karcinom: 1. 5-fluorouracil, 2. gemcitabin, 3. vinblastin, 4. karboplatina.

Karcinom ovaria: 1. paklitaxel, 2. cisplatina, 3. karboplatina, 4. topotekan, 5. gemcitabin, 6. doxorubicin.

Sarkom měkkých tkání: 1. doxorubicin, 2. cisplatina, 3. etoposid, 4. docetaxel, 5. vinkristin, 6. dakarbazin.

Po skončení kultivace je do každé jamky přidán roztok substrátu MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) (Sigma-Aldrich Inc.) nebo WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát), který je u živých buněk redukován na temně červenohnědý formazan. Intenzita zbarvení je finálně hodnocena spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm (MTT) nebo 450 nm (WST-1). Reakce probíhá na mitochondriální membráně živých buněk a hodnota absorbance tedy odpovídá množství buněk přežívajících v prostředí účinné látky. Získaná data pro každé cytostatikum jsou následně vyhodnocena v programu Chemorezist 1.0 a znázorněna jako křivka dávkové závislosti, z níž lze odečíst hodnotu efektivní koncentrace smrtící 50 % buněk (EC_{50}). Z grafu lze rovněž odečíst, jaký podíl populace přežívá i nejvyšší hodnocenou (terapeuticky nepoužitelnou) koncentrací cytostatika. Vlastní interpretace nálezů je pak udávána v číselné podobě a to:

- Rezistentní: $\text{EC}_{50} > 1/16 \times \text{maximální hodnocená koncentrace použitého cytostatika } (c_{\text{max}})$

- Částečně citlivý: $\text{EC}_{50} = 1/16 - 1/32 \times c_{\text{max}}$
- Citlivý: $\text{EC}_{50} < 1/32 \times c_{\text{max}}$ nebo též citlivost celé populace buněk

Podrobnosti o metodě přináší článek Michalová a kol. (1). Hlavním úskalím testu chemosensitivity u solidních nádorů je větší či menší polyklonálnost buněčné populace ve vzorku a tedy určitá nejistota, zda je skutečně finálně hodnocena metabolická aktivita pomnožených maligních buněk a nikoliv například fibroblastů nebo jiných mezenchymálních či epiteliálních buněk. Vzhledem k faktu, že vzorky pocházejí většinou od pacientů s pokročilým solidním tumorem, je jasné, že hodnocená nádorová populace je již značně početná a tudíž i heterogenní (2). Došlo tedy již ke klonální divergenci a nádor je složen z mnoha různých více či méně agresivních klonů v odlišných fázích buněčného cyklu. V literatuře se uvádí dělení buněk nádorové populace do tří skupin: 1. buňky diferencované, které ztratily další reprodukční potenciál, 2. buňky se schopností dělit se, nacházející se v určité fázi buněčného cyklu a 3. buňky schopné dělit se, ale spočívající ve fázi G0 buněčného cyklu (3, 4). Dle obecného předpokladu působí chemoterapie především na dělící se buňky, vliv na klidové buňky s potenciálem dělení není znám. Tyto buňky jsou však vystaveny mutagenním vlivům cytostatik a vzhledem ke klidovému stavu unikají přímému testování. Navíc MTT testem není možno rozeznat, zda v rámci kultivace nádorových buněk s cytostatiky došlo jen k inhibici buněčného metabolismu nebo k definitivní nevratné destrukci buňky. Požadavek na co možná největší uniformitu buněk solidních nádorů v kultivačním médiu je zatím technicky nemožný, ale i bezpředmětný. Pokud by se izolačním krokem podařilo zachytit jen jeden určitý klon z mnoha jiných, byl by výsledek testu zatížen značnou selekcí uvnitř populace a v žádném případě by neodrážel skutečné vlastnosti nádoru jako celku. Polyklonálnost jako obecná vlastnost solidních tumorů tedy představuje limitaci MTT testu. Na druhou stranu se zřejmě již každý onkolog ocitl v situaci, kdy zvažoval výběr cytostatik a jejich kombinací u pacienta a v takové chvíli by uvítal výsledky MTT testu, které by mohly pomoci alespoň přibližně směřovat jeho další léčebné úsilí. Diagnózy, u kterých je na MOÚ citlivost k chemoterapeutikům stanovována, byly vybrány na základě jejich obecné rezistence vůči chemoterapii a tedy omezené možnosti vybrat z obecně doporučených schémat kombinací cytostatik (karcinom ovaria je sice nádor primárně chemosenzitivní, ale jeho recidiva již většinou citlivost vůči chemoterapii ztrácí).

Maligní melanom

Maligní melanom je onemocnění chemorezistentní, v počátečních stádiích dosahuje výborných výsledků důsledné chirurgické řešení. Ve fázi diseminace má však onemocnění velmi špatnou prognózu a je téměř vždy fatální. Medián přežití nemocných se pohybuje mezi 6-ti a 9-ti měsíci, 1-2 % případů přežívá do 5-ti let. V rámci paliativních režimů se jako nejúčinnější jeví imunochemoterapie kombinující cisplatinu, vinblastin a dakarbazin (CVD) s interferonem alfa a interleukinem-2. Její response rate (RR), neboli míra odpovědi na léčbu, se pohybuje mezi 18 % (5) až 48 % (6), resp. 64 % (6), medián přežití pak kolí-

sá mezi 9-ti, resp. 12-ti měsíci (5, 6). Druhou používanou kombinací cytostatik je bleomycin, vinkristin, lomustin a dakarbazin (BOLD). Její účinnost je menší, RR 20 % (6), medián přežití 3 měsíce. V monoterapii se často používá dakarbazin (RR cca 20 %), fotemustin (RR až 24 %) a ve vybraných případech temozolomid (RR 17 %) (6). Od září 2006 do listopadu 2007 bylo v MOÚ odebráno k MTT testu celkem 25 vzorků maligního melanomu (2 výpotky, 23 vzorků uzlinových nebo orgánových metastáz), jen u 9-ti se však podařilo získat výsledek citlivosti k vybraným cytostatikům. K cisplatině byla prokázána úplná citlivost u 4 vzorků (44 %), 4 vzorky byly k cisplatině rezistentní, 1 vzorek nebyl hodnocen. Citlivost ke karboplatině byla detekována u 1 vzorku, rezistence pak u 1 vzorku, u 7 vzorků nemohla být citlivost ke karboplatině vyhodnocena. Výsledky citlivosti k dakarbazinu (hodnoceno celkem 8 vzorků), karmustinu (6 vzorků), bleomycinu (8 vzorků) a vinblastinu (2 vzorky) prokázaly rezistenci všech testovaných vzorků. Výsledky potvrzují fakt, že maligní melanom je onemocněním chemorezistentní, jeho buňky jsou navíc *ex vivo* obtížně kultivovatelné.

Citlivost stanovená *ex vivo* se však nepotvrdila *in vivo* u pacienta (30 let) s maligním melanomem diseminovaným do plic, jater a uzlin. Dle výsledku MTT testu byl vzorek odebraný z uzlinové metastázy velmi citlivý ke karboplatině, citlivý k cisplatině a melfalanu. Pacient po odstranění primárního nádoru (primum bylo v oblasti hýždě, Breslow 2 mm, ale stádium IIIA - pozitivní regionální uzliny) absolvoval adjuvantní imunoterapii interferonem alfa, při které došlo po 10-ti měsících k progresi do výše uvedených orgánů. Do 1. linie paliativní chemoterapie byl indikován režim kombinující cisplatinu, vinblastin, dakarbazin a interleukin-2 s efektem progresu onemocnění. Následně byla indikována 2. linie paliativní chemoterapie v režimu bleomycin, vinkristin a lomustin, opět s efektem rychlé progresu. Pacient posléze do 1 měsíce exitoval.

Sarkom měkkých tkání

Dalším testovaným druhem nádoru je sarkom měkkých tkání (soft tissue tumour / sarcoma - STT/STS). i v případě této diagnózy je na prvním místě operační řešení, pokud je možné. Operace by se však měla provádět na pracovišti s dostatečnými zkušenostmi, jež zaručí výkon radikální, ale i bezpečný pro pacienta. Bohužel i tento typ nádoru je často diagnostikován již lokálně pokročilý nebo až ve stádiu diseminace. V takových případech je operace vyloučena nebo má pouze paliativní charakter. Problematika adjuvantní či paliativní chemoterapie je předmětem řady studií. Obecně se předpokládá benefit adjuvantní chemoterapie u pacientů s STT uloženými v hloubce, většími než 5 cm a s vysokým histologickým gradem. Nejčastěji užívanými cytostatiky jsou doxorubicin a ifosfamid (7, 8, 9, 10). Výsledky paliativní chemoterapie jsou špatné, medián přežívání pacientů se pohybuje mezi 7-11-ti měsíci (9). Solitární metastázy jsou odstraněny chirurgicky, pokud je to možné. Z nejčastěji užívaných cytostatik v případě diagnózy STT lze jmenovat především doxorubicin (jeho podání je ale limitováno kardiotoxicitou, liposomální forma je indikována jen u Kaposiho sarkomu), ifosfamid nebo cyklofosfamid, dakarbazin, vinkristin a cisplatinu. Response rate udávaný při monoterapii doxorubi-

cinem je okolo 20 %, při použití ifosfamidu pak 18 % (7). Režim MAID (doxorubicin, dakarbazin, ifosfamid+mesna) dosahuje v některých studiích RR až 32 %, režim ifosfamid + doxorubicin pak 17 % (9). Nevýhodou režimu MAID je však jeho toxicita. Dříve často užívaný režim CYVADIC (vinkristin, doxorubicin, dakarbazin a cyklofosfamid) je ale přibližně stejně „účinný“ (9). Účinnost druhé či další paliativní linie chemoterapie je u STT ještě nižší (zde je třeba podotknout, že míra odpovědi na chemoterapii záleží i na histologických subtypech STT a lokalizaci tumoru) (8, 9). Výše uvedený výčet odpovědí na cytostatickou léčbu umožňuje přihlídnout k výsledkům MTT testu při podání chemoterapie s paliativním účelem od 2. linie, v určitých případech i v rámci 1. linie. V období 09/2006 – 11/2007 bylo v laboratoři chemorezistence MOÚ zpracováno celkem 29 sarkomů, u 11 vzorků se podařilo plně nebo částečně zhodnotit citlivost k vybraným cytostatikům (citlivost k některým cytostatikům nemohla být vyhodnocena pro nestandardní průběhy křivek dávkové odpovědi v programu Chemorezist). Testovány byly nejčastěji vzorky primárních nádorů (15 vzorků) a na druhém místě recidiva tumoru (14 vzorků). Paradoxně byla u 3 vzorků (27 %) prokázána úplná citlivost k cisplatině (RR monoterapie cisplatinou se udává mezi 10-13 %) (10), 1 vzorek byl částečně citlivý (9,1 %), 4 vzorky byly k cisplatině rezistentní u 2 vzorků (18 %) byla prokázána úplná citlivost k vinkristinu, 3 vzorky byly k vinkristinu rezistentní (27 %). Všechny 9 vyhodnocených vzorků byly rezistentní k doxorubicinu (82 %). Stejně tak u docetaxelu a dakarbazinu nebyla u žádného hodnoceného vzorku zaznamenána částečná nebo úplná citlivost. Citlivost k oxazafosforinům není možné v rámci MTT testu stanovit (oxazafosforiny jsou teprve až v těle metabolizovány na účinnou látku fosforaminomustard).

Modelovým případem využití výsledku MTT testu byl pacient (věk 40 let) se sarkomem levé horní končetiny. Před příchodem na naše pracoviště byl pacient opakovaně operován pro recidivující tumor předloktí, nádor byl opakovaně histologicky hodnocen jako nízké diferencovaný sarkom, diferenciálně diagnosticky maligní melanom. Dlužno podotknout, že pacient dlouhodobě odmítal radikální zákrok typu amputace. V dubnu 2005 byl pacient poprvé operován v MOÚ, výsledky histologického vyšetření byly opět nejednoznačné: nízké diferencovaný sarkom, maligní melanom. Velmi brzy došlo u pacienta k recidivě onemocnění a byla opět provedena exstirpace. Vzorek nádorové tkáně byl poslán do referenční patologické laboratoře, kde bylo vysloveno podezření na non-hodgkinský lymfom. Pacient následně absolvoval 2 cykly chemoterapie v režimu CHOP (cyklofosfamid, vinkristin, adriamycin + prednison) s efektem progresu. V červnu 2005 byla provedena tru-cut biopsie, histologický nálezn byl definitivně uzavřen jako nízké diferencovaný sarkom. Pacient posléze absolvoval hypertermickou perfúzi s melfalanem a následně intraarteriální aplikaci doxorubicinu s embolizací. V září 2005 došlo k progresi tumoru a znovu byl proveden pokus o co možná nejradikálnější exstirpaci (pacient stále odmítal amputaci). Vzorek byl hodnocen pomocí MTT testu s výsledkem úplné rezistence k doxorubicinu, cisplatině, etoposidu, docetaxelu, vinkristinu a dakarbazinu. Za dva měsíce byl pacient znovu operován pro recidivu tumoru, dle 2. MTT testu byl však nádor nově citlivý k vinkristinu a cisplatině, stále však rezistentní k doxorubicinu, etoposidu a docetaxelu. V období od prosince 2005 do února 2006 pacient podstoupil radioterapii, LD 60Gy.

Následně bylo indikováno podání celkem 6 sérií „adjuvantní“ chemoterapie v režimu vinkristin a melfalan. Efektem po 6-ti sériích chemoterapie byla sice lokálnígrese, ale zjevná recidiva onemocnění nebyla ještě po 3 sériích této chemoterapie patrná, pacient jinak v roce 2005 každé 2 měsíce podstupoval operační výkon. V červnu 2006 byl znovu proveden pokus o co nejradikálnější exstirpaci nádoru. Dle 3. MTT testu byl vzorek stále hodnocen citlivým k vinkristinu, částečně citlivým k cisplatině, nově však citlivým k topotekanu a stále rezistentním k doxorubicinu, docetaxelu a etoposidu. Od června 2006 do srpna 2006 byla provedena intersticiální brachyterapie, LD 30Gy. V září 2006 se však objevila nová recidiva onemocnění a pacient konečně svolil k amputaci končetiny. Vzorek nádoru byl opětovně vyšetřen MTT testem (již po 4.) a byl shledán plně citlivý k cisplatině (citlivost k vinkristinu nebyla testována), rezistentní k etoposidu, doxorubicinu, dakarbazinu a docetaxelu. V listopadu 2006 byly diagnostikovány plicní metastázy, které byly inoperabilní a jejich histologická verifikace nebyla možná. Vzhledem k výbornému stavu pacienta (KI, neboli Karnofski index, 100 %) a věku byla indikována paliativní chemoterapie v režimu MAID (dakarbazin, ifosfamid+mesna, doxorubicin nebyl pro předléčenost tímto cytostatikem a jeho předešlému efektu podán). Efekt po 3 sériích chemoterapie byl klasifikován jako stabilizace onemocnění (SD) dle kritérií RECIST. Po 6-ti sériích chemoterapie však došlo k progresi onemocnění. V další onkologické rozvaze bylo přihlédnuto k trvajícímu dobrému stavu pacienta, jeho přání se dále léčit a výsledkům MTT testu. Byla indikována paliativní chemoterapie v režimu cisplatin v kombinaci s etoposidem. Po 3 sériích chemoterapie byla zaznamenána výrazná parciální remise (PR) a po 6-ti sériích stabilizace onemocnění. Pacient je až do dnešní doby sledován, nadále ve stabilizované fázi onemocnění (trvá zatím 6 měsíců). Jednalo se tedy o pacienta s chemo-rezistentním onemocněním, opakovaně hodnoceným v rámci MTT testu, který se dostal do stabilizace díky chemoterapii podané s vysokou paliativním záměrem, jejíž složení bylo ovlivněno i výsledky MTT testu.

Karcinom ledviny

Zhoubný nádor ledviny představuje onemocnění rezistentní k chemoterapii, jeho incidence v České republice má rostoucí charakter, viz Graf č. 1 (18).



Graf č. 1: Vývoj incidence zhoubného nádoru ledviny v České republice.

Udávány RR užívaných cytostatik (vinblastin, 5-fluorouracil) se pohybuje mezi 5-10 % (11, 12). Imunoterapie je v případě diagnózy sice účinnější, přesto jsou výsledky léčby málo příznivé (RR interferonu alfa 15 %, pacienti po nefrektomii s plicními metastázami mají RR až

30 %, interleukin-2 má RR 15-20 %, kombinovaná imunochemoterapie dle Atzpodierna - tedy interferon alfa + interleukin-2 + 5-fluorouracil má udávaný RR až 30 %) (13, 14, 15). Základem léčby karcinomu ledviny je tedy opět chirurgické odstranění tumoru, nicméně i toto onemocnění velmi často recidivuje nebo je již zachyceno ve stádiu vzdálené diseminace. Novinkou v léčbě tohoto onemocnění je použití zástupců takzvané biologické léčby - sunitinibu a sorafenibu. Jedná se o inhibitory mnoha receptorových tyrozinkináz (multitarget therapy), které se podílejí na růstu tumoru, angiogenezi a metastazování. V dnešní době jsou indikovány po selhání cytotoxické léčby. RR je u sunitinibu až 36 %, time to progression (TTP) pak 38 týdnů, u sorafenibu jsou výsledky podobné (16, 17). Posloupnost léčby – operace → imunoterapie → biologická léčba vedla ke snížení podávání cytostatik u této diagnózy. Pacienti jsou po selhání biologické léčby jen zřídka ve stavu, který by umožňoval podání cytostatik. Diagnóza karcinomu ledvin byla vybrána k testování chemorezistence *ex vivo* v době, kdy léčba sunitinibem a sorafenibem ještě nebyla schválena. Ve sledovaném období (od 09/2006 do 11/2007) bylo testováno celkem 36 vzorků karcinomu ledviny (30 vzorků primárního nádoru, 5 vzorků metastázy, 1 výpotek), u 20 z nich byl získán reprodukovatelný výsledek. Úplná citlivost byla zaznamenána u 3 vzorků (15 %) k 5-fluorouracilu, u 4 vzorků (20 %) ke gemcitabinu a 5 vzorků (25 %) k vinblastinu. 2 vzorky (10 %) byly částečně citlivé ke gemcitabinu, rezistence byla prokázána u 11 nádorů (55 %) k 5-fluorouracilu, u 6 vzorků (30 %) ke gemcitabinu a 5 vzorků (25 %) k vinblastinu. Výsledky v zásadě potvrdily rezistenci karcinomu ledviny k chemoterapii, překvapující je pouze poměrně četná zaznamenaná citlivost k vinblastinu, u jehož použití není RR udáváno vyšší než 10 % (11, 12).

Karcinom ovaria

Incidence onemocnění karcinomu ovaria v České republice ukazuje Graf č. 2 (18).



Graf č. 2: Vývoj incidence zhoubného nádoru vaječníku v České republice.

Vzhledem k anatomické lokalizaci vaječníku je tento nádor diagnostikován často (až v 80 %) ve stádiu III nebo IV. Základní léčebnou modalitou je chirurgický zákrok (vzhledem k často zjišťované pokročilosti onemocnění je často možný jen řádně provedený debulking). Podávání cytostatik (především paklitaxelu, karboplatiny, cisplatin a cyklofosfamidů) má na počátku léčby velmi dobrý

efekt, značné procento pacientek však posléze recidivuje (19). Do první linie paliativní chemoterapie je indikována kombinace paklitaxelu s platinovým preparátem. Zdá se, že není rozdíl v počtu odpovědí na léčbu a přežíváním pacientek při podání cisplatiny nebo karboplatiny (20, 21). Kombinace paklitaxelu s karboplatinou se však vyznačuje nižší gastrointestinální toxicitou (22). Response rate kombinace paklitaxelu s platinovým cytostatikem je 73 %, medián přežívání pacientek pak 35 měsíců (20, 21). Pětileté přežívání se pohybuje od 20 % (III. stádium), do 5-7 % (IV. stádium) (23, 24, 25). V případě recidiv onemocnění se situace stává problematictější, prognóza záleží do značné míry na době, kdy došlo k relapsu po 1. linii chemoterapie. Pokud dojde k recidivě do 6-ti měsíců od ukončení primární chemoterapie, hovoří se o nádorech rezistentních k paklitaxelu a platině. Odpovědi na léčbu v dalších liniích jsou velmi nízké (přibližně 20 %) a prognóza onemocnění je nepříznivá. V těchto případech se zvažuje aplikace cytostatik typu topotekanu, gemcitabinu nebo etoposidu. Recidiva po 1 roce od ukončení 1. linie chemoterapie umožňuje návrat k preparátům již jednou použitým (nádor je citlivý k paklitaxelu a platině), míra odpovědi a přežívání pacientek je vyšší. Pacientky, které recidivují od 6-ti měsíců do 1 roku po primární chemoterapii, tvoří určitý přechod mezi výše uvedenými skupinami. Jejich šance na léčebné odpovědi jsou vyšší nežli u první skupiny, nezdá se však, že existuje rozdíl mezi účinností cytostatik užitých v 1. linii nebo zcela jinými cytostatiky (23). Na našem pracovišti bylo od 09/2006 do 11/2007 odebráno celkem 16 vzorků karcinomu vaječníku (9 vzorků primárního nádoru, 7 vzorků recidivy tumoru – z toho 2 vzorky solidních metastáz, 5 vzorků ascitu), pouze u 11-ti byl získán reprodukovatelný výsledek citlivosti, resp. rezistence. Ani jeden vzorek nebyl citlivý *ex vivo* k paklitaxelu, 2 (18 %) byly částečně citlivé, 4 (36 %) rezistentní, citlivost 5 (45,5 %) vzorků k paklitaxelu nemohla být hodnocena. U platinových derivátů karboplatiny / cisplatiny byly zjištěny následující výsledky: citlivost celé populace buněk: 0 / 3 (0 / 27 %), částečná citlivost: 0/0, rezistence: 5 / 4 (45 / 36 %), 6 vzorků (54,5 %) nemohlo být zhodnoceno u karboplatiny, u cisplatiny pak 4 (36 %). Dále byla zjištěna úplná citlivost 2 vzorků k topotekanu (18 %) a 2 k doxorubicinu (18 %), žádný vzorek nebyl citlivý k gemcitabinu. Překvapující rezistence vzorků k preparátům podávaným standardně v první linii chemoterapie je zřejmě ovlivněna malým souborem pacientů. K výsledkům získaným MTT testem se našim pracovišti přihlíží až při indikaci druhé linie paliativní chemoterapie. Do 1. linie chemoterapie je indikován, pokud to stav pacientky dovoluje, režim paklitaxel + platinový derivát (ve volbě mezi karboplatinou a cisplatinou je možné odvolat se na výsledky MTT testu, rozhodující je však především stav pacientky, její interkurence, přání event. ambulantního podání chemoterapie, atd.). Pacientka v zásadě dostane 2. linii chemoterapie až po absolvování první linie, kdy je populace nádorových buněk změněna zkušeností s paklitaxelem a platinou. Jen málokdy se nám zatím daří získat vzorek nádoru před podáním druhé linie chemoterapie (např. Z ascitu, hrudního výpotku, či z operace recidivy tumoru), abychom určili aktuální citlivost buněk vystave-

ných cytostatikům 1. linie chemoterapie, které mohly do jisté míry vlastnosti buněk ovlivnit. Naše dosavadní zkušenosti dokazují dlouho známou věc, že ani u diagnózy karcinomu ovária neznamena citlivost prokázaná *ex vivo* zaručenou citlivost nádoru *in vivo*.

Příkladem je pacientka se serózním papilárním karcinomem ovaria, iniciačně stádium IIIC. Pacientka prodělala operaci a následně 6 cyklů chemoterapie v režimu paklitaxel a karboplatina s efektem kompletní remise. Za 8 měsíců byla zjištěna recidiva - maligní ascites, postižení peritonea. Ascites byl punktován a výsledky histologie byly shodné s dříve diagnostikovaným karcinomem ovaria. Dle výsledků MTT testu byly buňky citlivé k paklitaxelu, topotekanu a doxorubicinu, rezistentní pak ke karboplatině, cisplatině a gemcitabinu. Pacientka následně absolvovala 2 cykly paliativní chemoterapie v režimu topotekan v monoterapii s efektem rychlé progresse.

Závěr

Vzhledem k dosud nízkému počtu vyhodnocených případů, u nichž bylo srovnáváno laboratorní vyšetření s klinickým průběhem onemocnění a aplikovanou terapií, jsou získané výsledky stále pouze na úrovni kasuistik. Sběr dat u výše uvedených skupin diagnóz probíhá teprve od září 2006 a informace o výsledcích léčby si vyžádají delší časový interval. Vzhledem k faktu, že většina linií standardní chemoterapie zahrnuje aplikaci dvou nebo i více cytostatik, bude testován i vliv vybraných kombinací cytostatik na nádorové buňky *ex vivo*. Jisté možnosti přináší aplikace výsledků MTT testu u skupiny diagnóz „na přání klinika“. Zahrnuje pacienty s nejrůznějšími diagnózami, u kterých již byly vyčerpány možnosti standardní terapie, ale jejichž stav ještě dovolí podání 2., 3., nebo n-té linie paliativní chemoterapie. V těchto případech pak výsledek MTT testu může klinikovi dát určitý směr k výběru cytostatika, ať již v minulosti podaného nebo nového, nikoliv paušálně indikovaného u dané diagnózy, pokud to indikační kritéria v rámci hrazení péče dovolí.

Dále se rozvíjí testování výpotků- ascitu nebo fluidothoraxu, tyto vzorky jsou dobře dostupné, testování se provádí dle techniky uvedené v práci Krásná a kol. (26). Nezanebatelné je také to, že řada pacientů často přichází s výpotkem jako primomaniestace maligního onemocnění a jsou tak testovány „chemonaivní“ buňky.

Velkým problémem metody MTT testu je již zmíněná polyklonálnost solidních tumorů. Není také možno s jistotou říci, zda buňky testované v rámci MTT testu jsou nádorové nebo benigní (např. fibroblasty). Diskutabilní je taktéž, do jaké míry je možno modelovat obecnou, ale i individuální složitost metabolismu člověka v podmínkách *in vitro* / *ex vivo*.

Doposud jsme nezaznamenali situaci, že by se *ex vivo* prokázaná rezistence k určitému cytostatiku projevila citlivostí nádoru *in vivo*, častěji jsme byli svědky *ex vivo* citlivosti, která se bohužel následně *in vivo* nepotvrdila. Výsledky MTT testu citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům pak představují v myšlení onkologa jen orientační data, vlastní podání cytostatik musí být indikováno na základě doporučených postupů, v nichž

hlavní roli hraje „evidence based medicine“, tedy medicína založená na důkazech. Metoda stanovení citlivosti nádorových buněk *ex vivo* je kontroverzní vzhledem k výše zmíněným limitacím a získané výsledky jsou pochopitelně zdrojem nedůvěry. V případě onkologických pacientů a to zejména těch, kteří nereagují na standardní aplikovanou terapii však představuje naději na vytvo-

vání potenciálně účinné látky a tím i naději na vyšší úspěšnost léčby.

Poděkování:

Tato práce byla podpořena z finančních zdrojů MZ ČR pro výzkumný záměr MOÚ MZOMOU2005 s názvem „Funkční diagnostika zhoubných nádorů“.

Literatura

- Michalová E., Poprach A., Němečková I. et al. Predikce citlivosti nádorových buněk k chemoterapeutikům *ex vivo* – úskalí a limity vlastních metod. *Klinická onkologie*, 2008, v tisku.
- Klener P. et al. Etiologie a patogenese nádorového procesu. In: Klener P. et al. (eds). *Klinická onkologie*, 1. vydání Praha, Galén, 2002, s. 62-65.
- Baker F.L., Sanger L.J., Rodgers R.W. et al. Cell proliferation kinetics of normal and tumor tissue in vitro: quiescent reproductive cells and the cycling reproductive fraction. *Cell Prolif*, 1995; 28 (1), s. 1-15.
- Talač R., Žaloudík J., Hajdúch M. et al. Hodnocení lékové rezistence in vitro a její klinické implikace. *Klinická onkologie*, 2000, 13 (Speciál 2), s. 2-3.
- Keihholz U., Goey S.H., Punt C.J. et al. Interferon alfa-2a and interleukin-2 with or without cisplatin in metastatic melanoma: a randomized trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncology*, 1997, 15 (7), s. 2578-2579.
- Balch C.A.M., Atkins M.B., Sober A.J. Cutaneous Melanoma. In: DeVita V.T., Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 7th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, s. 1798-1803.
- Benjamin R.S., Legha S.S., Patel S.R. et al. Single-agent ifosfamide studies in sarcomas of soft tissue and bone: the M.D. Anderson experience. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1993, 31 (Suppl 2), s. 174-179.
- Tierney J.F., Mosseri V., Stewart L.A. et al. Adjuvant chemotherapy for soft-tissue sarcoma: review and meta-analysis of the published results of randomised clinical trials. *Br J Cancer*, 1995, 72 (2), s. 469-475.
- Brennan M.F., Singer S., Maki R.G. Sarcomas of the Soft Tissues and bones. In: DeVita V.T., Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 7th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, s. 1624-1631.
- Thigpen J.T., Blessing J.A., Beecham J. et al. Phase II trial of cisplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced or recurrent uterine sarcomas. *J Clin Oncol*, 1991, 9 (11), s. 1962-1966.
- Yagoda A., Abi-Rached B., Petrylak D. Chemotherapy for advanced renal carcinoma: 1983-1993. *Semin Oncol*, 1995, 22 (1), s. 42-60.
- Motzer R.J., Russo P., Systemic therapy for renal carcinoma. *J Urol*, 2000, 163 (2), s. 408-417.
- Atzpodien J., Kirchner H., Hanninen E. et al. Interleukin-2 in combination with interferon-alpha and 5-fluorouracil for metastatic renal cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 1993, 29A (Suppl 5), s. S6-S8.
- Tourani J.M., Pfister C., Tubiana N. et al. Subcutaneous interleukin-2 and interferon alfa administration in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of SCAPP III, a large, multicenter, phase II, nonrandomized study with sequential analysis design-the Subcutaneous Administration Propeukin Program Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 2003, 21 (21), s. 3987-3994.
- Muss H.B. Interferon therapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol*, 1987, 14 (2 Suppl 2), s. 36-42.
- Motzer R.J., Hutson T.E., Tomczak P. et al. Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 2007, 365 (2), s. 115-124.
- Escudier B., Eisen T., Stadler W.M. et al. Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 2007, 356 (2), s. 125-134.
- Dušek L., Mužík J., Kubásek M. et al. Český národní webový portál epidemiologie nádorů [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2008-2-25]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861
- Cwierka K., Hajdúch M., Pilka R. et al. Chemoterapie ovariálního karcinomu s ohledem na stanovení in vitro chemosenzitivity - vybrané kazuistiky. *Klinická onkologie*, 2000, 13 (Speciál 2), s. 58-59.
- Stuart G., Bertelsen K., Mangioni C. et al. Updated analysis shows a highly significant improved overall survival (OS) for cisplatin-paclitaxel as first line treatment of advanced ovarian cancer: Mature results of the EORTC-GCCG, NOCOVA, NCIC CTG and Scottish intergroup trial. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1998, 17, s. 361a.
- Piccart M.J., Bertelsen K., Stuart G. et al. Is cisplatin-paclitaxel the standard in first-line treatment of advanced ovarian cancer? The EORTC-GCCG, NOCOVA, NCI-C and Scottish intergroup experience. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1997, 16, s. 352.
- Ozols R.F., Bundy B.N., Fowler J. et al. Randomized phase III study of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel in optimal stage III epithelial ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group trial. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1999, 18, s. 365a.
- Karlan B.Y., Markman M., Eifel P.J. Ovarian Cancer, Peritoneal Carcinoma and Fallopian Tube Carcinoma. In: DeVita V.T., Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 7th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005, s. 1364-1388.
- Klener P. et al. Nádory Vaječníků a vejcovodů. In: Klener P. et al. (eds). *Klinická onkologie*, 1. vydání Praha, Galén, 2002, s. 481-488.
- Kalábová, R., Čechovský, P. Maligní nádory vaječníků. In Adam Z. et al. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. Praha: Grada Publishing, 2002, s. 213-221.
- Krásná L., Matoušková E., Janoušek M. et al. Využití buněk získaných z maligních výpotků k vedení léčby pacientů s pokročilým nádorem. *Klinická onkologie*, 2000, 13 (Speciál 2), s. 43-48.

Korespondenční adresa:

A. Poprach
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
e-mail: poprach@mou.cz

Došlo / Submitted: 23. 4. 2008

Přijato / Accepted: 30. 4. 2008

Auтори deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

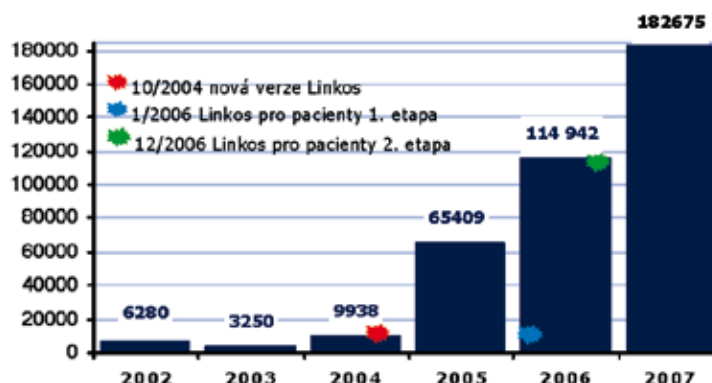
Internetové stránky České onkologické společnosti ČLS JEP www.linkos.cz
Zpráva o stavu a rozvoji v roce 2007. Pro jednání Výboru ČOS dne 29.4.2008 zpracovala PhDr. Petra Nováková.

LINKOS 2007 - NÁVŠTĚVNOST

VÝVOJ NÁVŠTĚVNOSTI A SROVNÁNÍ ROKU 2003 S VÝSLEDKY ROKU 2007 (2003 je posledním rokem staré verze)

	2003	2007	1Q 2008
Návštěv* denně (průměr)	9	500 po-pá 700	850 po-pá >1000
Návštěv* za měsíc (průměr)	271	15 223	25 437
Návštěv* za rok (absolutní počet)	3250	182 675	76 312 pouze 1 Q

*návlstěva měřena dle metodiky IFABC



NÁVŠTĚVNOST STOUPA O 5 500 %

- V TOP žebříčku Na vrcholu - sekce Zdraví je v období leden – listopad 2007 Linkos **12. nejnavštěvovanější web se zdravotnickou tematikou**. Hodnoceno je 1147 zdravotnických webů registrovaných Na Vrcholu.
- **Nejvíce požadavků** (největší návštěvnost) na Linkos přicházelo v roce 2007 **od poskytovatelů péče** (cca 30 %) a **z nemocnic** (11%). Nemocnice odkud byl Linkos navštěvován nejčastěji (od 1 do 11 návštěv denně): FNŠP Ostrava, cuni.cz, FN Motol, NMSKB Praha (FARENET), FN Olomouc, MOU Brno, FN Hradec Králové, VFN Praha, MU Brno, FN Bulovka, FN Plzeň, FN USA Brno, Nemocnice Liberec, ÚVN, LF UK Praha, FTN Praha, MN Ústí nad Labem, ÚVN, FNKV. Ostatní nemocnice následují, přístupy z nich již nejsou každodenní.
- Vyhledávače: v roce 2007 byla provedena optimalizace vnitřních faktorů pro vyhledávače (SEO), výsledkem byl **růst počtu návštěv z vyhledávačů**. 64% všech návštěvníků přivedlo na linkos hledání výrazů přes vyhledávače (nejčastěji: Seznam, Google, Centrum, Atlas, Tiscali, Yahoo).
- **Nejčastěji hledaná spojení**, která přivedla návštěvníky z vyhledávačů na Linkos: *rakovina kůže, leukemie, lymfom, rakovina kostí, melanom, rakovina tlustého střeva, rakovina jater, rakovina hrtanu, linkos, rakovina močového měchýře*.

**NEJVÍCE
NÁVŠTĚVNÍKŮ
PŘICHÁZÍ NA LINKOS
PŘES VYHLEDÁVAČE A
HLEDÁ DIAGNÓZY**

Mezi nejnavštěvovanější části
v roce 2007 patří:

- část s přehledem diagnóz, odbornými články a léčebnými možnostmi v části pro pacienty
- kalendář kongresů a konferencí, Zásady cytostatické léčby ČOS a Databáze navržených léčebných postupů v části pro odborníky.
- Mezi často navštěvované patří také přehled pracovišť onkosítě na obou částech.
- Z diagnóz je největší zájem o informace o leukemii, lymfomu, zhoubných nádorech tlustého střeva, melanomu a zhoubných nádorech prsu.
- Z léčebných metod se nejvíce návštěvníci zajímají o radioterapii, řešení nežádoucích účinků, farmakoterapii a onkochirurgii.

	Část pro odborníky	Část pro pacienty
1.	úvodní stránka s novinkami	úvodní stránka s novinkami
2.	Kalendář kongresů a konferencí	přehled diagnóz s odbornými články
3.	Přehled pracovišť onkosítě	Léčebné možnosti
4.	Zásady cytostatické léčby ČOS	Prevence
5.	Databáze AISLP	Věková specifika
6.	Databáze navržených postupů	Leukemie
7.	Klinická onkologie	Přehled pracovišť onkosítě
8.	Nabídka a poptávka zaměstnání	Co musíte vědět ...
9.	Přehled randomizovaných studií	Lymfom
10.	NOR	Radioterapie
11.	Kontakty	Rady pro nemocné léčené chemoterapií
12.	Databáze konf. abstrakt	Psychoonkologická poradna

Linkos má tisíce stran, zde uvádíme 12 nejnavštěvovanějších v obou částech

LINKOS PRO ODBORNÍKY V ROCE 2007

Kromě pravidelně doplňovaných informací a databází (konferenční abstrakta, kalendář akcí, knihy, časopisy, postupy, novinky v evropské onkologii, Z kongresů, odkazy, zápisy, kurzy...) bylo uvedeno několik nových částí a služeb. Nejrozsáhlejší je online verze časopisu Klinická onkologie s kompletním archivem od roku 1988, možností vyhledávání, online formuláři a upozorněním na nové číslo.

**LINKOS JE AKTUALIZOVÁN
4-5X TÝDNĚ**

NOVÉ SLUŽBY PRO ODBORNÍKY 2007:

- **Leden:** na konci každého měsíce zveřejňován stav hlásivosti do NOR
- **Březen:** volební část včetně aktualizace adresáře členů ČOS
- **Duben:** Online verze časopisu **Klinická onkologie** (e-ISSN: 1802-5307)
- **Květen:** Na stránkách Psychoonkologické sekce zveřejněna část **Pomoc sestrám** s Online poradnou pro onkologické sestry
- **Srpen:** zasilání novinek z Linkos
- **Září:** online verze časopisu Onkologické sekce České Asociace sester – **Onkologická péče** (e-ISSN: 1802-7407)
- **Září:** Rozcestník k informacím pro **onkologické sestry**
- **Září:** **Kurzy a semináře** jako samostatný oddíl v kalendáři odborných akcí.

ROZVOJ DATABÁZOVÝCH APLIKACÍ:

- Databáze tuzemských **konferenčních onkologických abstrakt** obsahuje cca 2200 příspěvků z více než 30 akcí
- Databáze onkologických **časopisů** (205), **knih** (200), **léčebných postupů** (260), **randomizovaných studií** (2500), **odborných akcí** a **členů** průběžně aktualizovány.

INTERAKTIVNÍ PRVKY:

- Zasilání přehledu novinek na Linkos e-mailem
- Upozornění na nové číslo online verzí časopisů
- Žádost o přidání konference, kurzu, semináře
- Nabídka/poptávka pracovního místa
- Přidání nebo oprava záznamu o pracovišti
- Upozornění na novou knihu
- Přidání nebo oprava údajů v adresáři
- Možnost přihlásit se k podpoře NOP ČR
- Online poradna pro onkologické sestry

LINKOS PRO PACIENTY A JEJICH BLÍZKÉ V ROCE 2007

TEMATICKÉ A AUTORSKÉ POKRYTÍ:

- Autorský kolektiv odborných textů tvoří přes 60 lékařů
- Od zveřejnění nových sekcí na přelomu roku bylo pro Linkos napsáno a publikováno dalších 12 článků. Celkově je pro pacienty zpracováno přes 50 témat. Jsou pokryty všechny hlavní diagnózy a léčebné metody.

INTERAKTIVNÍ PRVKY:

- Návštěvníci posílají žádosti o přidání výkladů onkologických pojmů do slovníčku. Slovníček je doplňován každý týden, nyní obsahuje výklad 550 pojmů.
- Průběžně je využívána Psychoonkologická poradna. Dotazy jsou odpovídány členy Psychoonkologické sekce ČOS.
- Možnost přihlásit se k podpoře NOP ČR.
- Na stránkách není samostatná lékařská poradna, pacienti jsou přesměrováni s medicínským dotazem na Onkologickou poradnu prof. MUDr. Jiřího Vorlíčka, CSc. na serveru iDnes.

NOVÁ TÉMATA 2007

- Nádorové onemocnění pochvy
- Transplantace krvetvorných buněk
- Idiopatická myelofibróza
- Co víte o nádorech varlat?
- Zhoubné nádory jícnu
- Specifika péče o mladé dospělé se ZN
- Maligní pleurální mezoteliom
- Nádory srdce a osrdečníku
- Nádorová onemocnění u dospívajících
- Karcinomu žaludku
- Onkologická péče u nemocných vyšší věkové skupiny
- Transplantace jater

LINKOS V ROCE 2008

PLÁN ROZVOJE:

- Zpracování vzácnějších diagnóz a dalších léčebných metod v části pro pacienty a aktualizace stávajících témat
- Upgrade, restrukturalizace a optimalizace linkos.cz
- Nová koncepce anglické části
- V rámci překonání doménového jména a rozporu mezi terminologicky správně psanými texty pro pacienty a terminologicky chybným vyhledáváním týmiž („rakovina“), pokračovat v optimalizaci pro vyhledávače.

VÝZVA UŽIVATELŮM:

- V rámci optimalizace vnějších faktorů pro vyhledávače, žádáme o umístění odkazu vedoucího na Linkos na weby onkologických klinik a oddělení, patientských organizací, lékařských portálů a ostatních webů s onkologickou tematikou.
- Žádáme výrobce léčiv o upozornění na důležité změny registrace léčiv (změna indikace, nová registrace, zrušení registrace) pro účely aktualizace databáze v části pro pacienty.

VÝZNAMNÉ POKROKY V KLINICKÉ ONKOLOGII DOSAŽENÉ V ROCE 2007

CLINICAL CANCER ADVANCES:
AN ANNUAL REVIEW – 2007.

PŘIPRAVIL: MUDR. MAREK SVOBODA.

KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE.
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV.

American Society of Clinical Oncology (ASCO) v lednu letošního roku zveřejnila zprávu „Clinical Cancer Advances 2007“, shrnující nejvýznamnější výsledky a události, kterých bylo v roce 2007 dosaženo v oblasti klinického výzkumu, léčby a prevence nádorových onemocnění (1). Společnost ASCO tak činí již třetím rokem, a cílem nové tradice je demonstrovat pozitivní výsledky a upozornit na nezbytnost adekvátní politické a finanční podpory, bez kterých by stávající pokrok v boji s nádorovými onemocněními nebyl udržitelný. Zpráva obsahuje celkem 24 významných výsledků, ze kterých bylo odbornou redakční radou označeno 6 za „hlavní pokroky“. Následující text přináší jejich výčet. Text byl významně upraven a v některých případech doplněn o data z příslušných studií.

Hematologické malignity

- **oxid arzenitý (As_2O_3 , tzv. arzenik) v léčbě pacientů s akutní promyelocytární leukémií (APL).** V roce 2007 byly prezentovány výsledky multicentrické klinické studie III. fáze, která prokázala, že přidání As_2O_3 ke standardní léčbě vede k signifikantnímu prodloužení přežití u dospělých pacientů s nově diagnostikovanou APL.
- **dasatinib v první linii protinádorové léčby u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML).** Výsledky klinické studie II. fáze prokázaly, že denní podávání dasatinibu u nepředléčených pacientů s CML v chronické fázi vede již po třech měsících léčby k navození klinické i cytogenetické kompletní remise u 81%, respektive 73% pacientů. Cytogenetická remise byla po půl roce léčby prokázána u 95% pacientů.
- **kombinace lenalidomidu a bortezomibu v léčbě mnohočetného myelomu.** Klinická studie I. linie prokázala vysokou účinnost terapie založené na současném podávání lenalidomidu a bortezomibu u předléčených pacientů s mnohočetným myelomem.

Karcinom prsu

- **skríníng karcinomu prsu pomocí magnetické rezonance (MR).** Na základě výsledků klinických studií zveřejnila v roce 2007 společnost ACS (American Cancer Society) indikační kritéria použití MR k časné detekci karcinomu prsu. Roční vyšetření MR mají podstoupit ženy, které mají v průběhu života riziko vzniku karcinomu prsu 20% a více. Jedná se o ženy: a) s prokázanou mutací BRCA1 nebo BRCA2 genu, b) s příbuznou prvního stupně, která je nositelkou mutace genu BRCA1 nebo

BRCA2, c) mající uvedené riziko stanovené na základě použití uznávaných kalkulatorů rizika vzniku karcinomu prsu, d) léčené radioterapií na oblast hrudníku ve věku mezi 10 a 30 lety, e) nositelky nebo příbuzné v prvním stupni s nositeli mutací genu TP53 nebo PTEN.

- **potvrzení spojitosti mezi sestupným trendem v incidenci karcinomu prsu a poklesem užívání hormonoterapie (hormone replacement therapy, HRT).** Dvě publikované studie potvrdily uvedenou spojitost u žen starších padesáti let, u kterých pozorovaly významné snížení incidence karcinomu prsu exprimujících estrogenové receptory.
- **hypofrakcionovaná radioterapie může být u pacientek s časným karcinomem prsu stejně efektivní jako konvenční postup.** Klinická studie III. fáze START prokázala, že u pacientek s karcinomem prsu (pT1-3 a pN0-1) léčených adjuvantní radioterapií je aplikace 41,6 Gy (nebo 39 Gy) ve 13 frakcích stejně tak účinná, jako aplikace stávajících 50 Gy v 25 frakcích. Ve srovnávaných ramenech nebyly zaznamenány rozdíly v toxicitě léčby ani v incidenci „lokoregionálních“ relapsů v průběhu pěti let.

Primární nádory CNS

- **bevacizumab a irinotekan v léčbě maligních gliomů.** Klinická studie II. fáze prokázala u pacientů s maligními gliomy významný klinický benefit z kombinované terapie založené na aplikaci bevacizumabu a irinotekanu ve srovnání se standardní léčbou.
- **význam radioterapie u pacientů starších 70 let s glioblastoma multiforme.** Klinická studie prokázala delší celkové přežití uvedených pacientů ve srovnání s ramenem omezeným na podpůrnou léčbu. Pacienti léčení radioterapií žili o 12 týdnů déle. Na straně druhé mezi oběma rameny nebyl rozdíl ve výskytu nežádoucích účinků léčby, ale ani v kvalitě života.

Nádory zažívacího traktu

- **sorafenib prodlužuje přežití u pacientů s hepatocelulárním karcinomem.** Klinická studie III. fáze prokázala delší celkové přežití u pacientů s hepatocelulárním karcinomem léčených sorafenibem ve srovnání s placebem (10,7 vs 7,9 měsíců).
- **použití cetuximabu k léčbě karcinomu tlustého střeva.** Výsledky studie CRYSTAL zahrnující více než 1200 pacientů prokázaly, že přidání cetuximabu k režimu FOLFIRI (fluorouracil, leukovorin, irinotekan) v I. linii léčby metastatického karcinomu tlustého střeva (zařazení pouze EGFR+ karcinomy) vedlo ke zvýšení léčebné odpovědi (46,9% vs. 38,7%), k prodloužení času do progresu onemocnění (8,9 vs 8 měsíců) a k vyššímu počtu pacientů s radikální resekci jaterních metastáz. prezentované na ASCO Meeting 2007.
- **strava s vysokým obsahem tuků vede u karcinomu tlustého střeva k vyššímu výskytu recidiv.** Až 3,5x vyšší riziko rekurence onemocnění nebo úmrtí na progresi onemocnění prokázala studie u pacientů s karcinomem tlustého střeva III. klinického stádia léčených adjuvant-

ní chemoterapií, kteří neupravili svoji životosprávu a přijímali stravu s vysokým obsahem tuků.

Nádory močového ústrojí

- **bevacizumab v léčbě karcinomu ledviny.** Výsledky klinické studie III. fáze (AVOREN) zahrnující 649 pacientů prokázaly, že přidání bevacizumabu k interferonu alfa-2a v první linii léčby metastatického onemocnění zvyšuje odpověď na léčbu (30,6% vs. 12,4%; $p < 0.0001$) a prodlužuje dobu do progresu choroby (10,2 vs. 5,4 měsíců; $p < 0.0001$).

Gynekologické nádory

- **neopodstatněnost zevní radioterapie v adjuvantní léčbě časného adenokarcinomu endometria.** Výsledky randomizovaných studií prokázaly, že adjuvantní radioterapie nemá pro pacientky s adenokarcinomem těla děložního diagnostikovaným v časném stádiu (IA,B,C a IIA dle FIGO) žádný benefit (neprodlužuje ani celkové přežití, ani nesnižuje riziko relapsu onemocnění), je však spojena s významným rizikem vzniku akutní i pozdní toxicity.

Nádory hlavy a krku

- **význam HPV viru v kancerogenezi nádorů hlavy a krku.** Kromě požívání alkoholických nápojů a kouření je infekce lidskými papilomaviry (HPV) dalším nezávislým nepříznivým faktorem vzniku karcinomů hlavy a krku, jak prokázala klinická studie publikovaná v New England Journal of Medicine v roce 2007. Význam tohoto zjištění narůstá s vědomím toho, že nejčastěji se jednalo o HPV-16, proti kterému jsou již v současnosti komerčně dostupné ochranné vakcíny. Další studie prokázala, že pacienti s HPV-pozitivními nádory hlavy a krku mohou mít lepší prognózu onemocnění ve srovnání s HPV-negativními karcinomy.
- **použití cetuximabu v kombinaci s chemoterapií prodlužuje přežití pacientů s nádory hlavy a krku.** Uvedený výsledek prokázala multicentrická studie III. fáze, ve které byla pacientům s recidivujícím nebo s metastatickým spinocelulárním karcinomem hlavy a krku podávána v I. linii protinádorové léčby chemoterapie na bázi platinových derivátů společně s cetuximabem, nebo bez cetuximabu. Do studie bylo zařazeno 442 pacientů, medián celkového přežití byl 10,1 vs 7,4 měsíců, a to ve prospěch ramene s cetuximabem.
- **Axitinib v léčbě pokročilého karcinomu štítné žlázy.** Axitinib (dosud neregistrované léčivo), nízkomolekulární inhibitor tyrosinkinasové aktivity receptorů VEGF 1, 2 a 3 (vascular endothelial growth factor receptor) a receptoru PDGF (platelet-derived growth factor receptor), prokázal protinádorovou aktivitu u pacientů s metastatickým nebo inoperabilním karcinomem štítné žlázy, jejichž onemocnění bylo refrakterní k léčbě radiojodem, nebo kteří tuto léčbu nemohli podstoupit nebo u nich nebyla indikována. Více než 80 % karcinomů bylo folikulárních nebo papilárních. Předchozí léčbu radiojodem prodělalo 70 % pacientů, zevní radioterapii 45 % a chemoterapii 15 % pacientů. Parciální odpověď na monoterapii axitinibem dosáhlo 22 % pacientů a dal-

ších 50 % pacientů vykazovalo po dobu 4 až 13 měsíců stabilizaci onemocnění.

Bronchogenní karcinom

- **profylaktická radioterapie mozku snižuje riziko vzniku mozkových metastáz u pacientů s pokročilým (extenzivní stádium) malobuněčným plicním karcinomem.** Klinická studie čítala celkem 286 pacientů, kteří odpověděli na předchozí chemoterapii. Pacienti byli randomizováni do ramene s profylaktickým ozářením mozkovny (ať již 20 Gy/5 frakcí nebo 30 Gy/12 frakcí), nebo bez ozáření. Profylaktické ozáření mozkovny signifikantně snížilo riziko vzniku mozkových metastáz ve srovnání s ramenem bez radioterapie (HR=0.27, CI: 0.16-0.44, $P < 0.0001$). Kumulativní incidence symptomatických metastáz mozkových byla po roce sledování 14.6% vs 40.4% ve prospěch pacientů, kteří podstoupili radioterapii. Profylaktické ozáření mozkovny vedlo rovněž k prodloužení celkového přežití. Jednoho roku se dožívalo 27,1% pacientů s ozářenou mozkovnou vs s 13,3% pacientů bez radioterapie ($P = 0.0218$).

Sarkomy

- **použití imatinibu v adjuvantní léčbě GISTu (gastrointestinal stromal tumors).** Adjuvantní podávání imatinibu pacientům s primárně operabilním GISTem, jehož velikost přesahovala minimálně 1 cm, vedlo ke snížení rizika relapsu onemocnění. Za rok studie zrelabovalo v rameni s imatinibem 3% pacientů, zatímco v rameni s placebem 17% pacientů. Rozdíly byly nejvíce patrné u pacientů s tumorem přesahujícím iniciálně velikost 10 cm. S ohledem na krátkou dobu trvání studie není možné řádně vyhodnotit výsledky podávání imatinibu na celkové přežití pacientů.

Nádory v dětském věku

- **snížení relativní intenzity dávky cytostatické léčby u pacientů s neuroblastomem.** Výsledky klinické studie III. fáze prokázaly, že u dětí s neuroblastomem středního rizika (intermediate risk) lze dosáhnout minimálně stejně dobrých léčebných výsledků (tříleté celkové přežití u více než 90% pacientů) i při použití chemoterapie s nižší intenzitou dávky cytostatik (méně cyklů, kombinace 2 nebo 3 cytostatik, se záměnou cisplatiny za karboplatinu) ve srovnání s historickou kontrolou.
- **vynaložení již relativně malých investičních prostředků vede ke zlepšení léčby dětských nádorů v zemích s nízkým příjmem obyvatelstva.** K tomuto zjištění dospěla studie organizovaná a podporovaná UICC (International Union Against Cancer), NCI (National Cancer Institute) a farmaceutickou společností Sanofi-Aventis.

Dispenzarizace onkologických pacientů

- **dopad onkologické léčby v dětství na zdravotní stav pacientů.** Studie publikované v roce 2007 v časopisech JAMA a NEJM upozornily, že více než dvě třetiny pacientů léčených v dětství pro nádorová onemocnění mají v dospělosti závažné zdravotní problémy zahrnující: sekundární nádory, ICHS, onemocnění plic a endokrinní poruchy. Obě studie měly podobný interval, ve kterém byly následky protinádorové léčby zjišťovány, a to 17 let od její aplikace.

- **pacienti po léčbě dětské leukémie a mozkových tumorů mají zvýšené riziko cévní mozkové příhody.** Z výsledků jedné z předchozích studií, studie CCSS – Childhood Cancer Survivor Study, vyplynulo, že zvýšené riziko cévní mozkové příhody mají pacienti, kteří podstoupili ozařování na oblast CNS (profylakticky nebo terapeuticky).
- **diskontinuita dispenzarizační péče dětských onkologických pacientů v dospělosti.** Opět výsledky CCSS studie, které upozornily, že v rámci dispenzarizace pacientů po onkologické léčbě v dětském věku nebyla prováděna některá vyšetření, která by dokázala včas zachytit např. srdeční onemocnění (echokardiografie), karcinom prsu (mammografie) a další.

Prevence nádorů

- **kyselina acetylsalicylová (ASA) v prevenci kolorektálního karcinomu.** Výsledky 3 nezávislých studií prokázaly, že pravidelné dlouhodobé užívání ASA (např. 300mg /denně po dobu pěti let – dávka použitá v jedné

studii) vede ke snížení rizika vzniku kolorektálního karcinomu. V jedné ze studií bylo snížení rizika dosaženo pouze u podskupiny pacientů, jejichž karcinomy expri-movaly COX-2.

Hlavní pokroky v klinické onkologii roce 2007

1. **skríníng karcinomu prsu pomocí magnetické rezonance u rizikové populace žen**
2. **význam HPV viru v kancerogenezi nádorů hlavy a krku a jeho klinický dopad**
3. **potvrzení spojitosti mezi sestupným trendem v incidenci karcinomu prsu a poklesem užívání hormonální substituční léčby (HRT)**
4. **doporučení profylaktické radioterapie mozku u pacientů s pokročilým malobuněčným plicním karcinomem**
5. **úspěšné použití sorafenibu v léčbě hepatocelulárního karcinomu**
6. **úspěšné použití bevacizumabu v léčbě karcinomu ledviny**

Literatura:

1. Gralow J, Ozos RF, Bajorin DF, et al. Clinical Cancer Advances 2007: Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention, and Screening—A Report From the American Society of Clinical Oncology. JCO 2008;26(2): 313–325.

onkologické společnosti

ZÁPIS ZE SCHŮZE VÝBORU ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI DNE 29.DUBNA 2008 V MNÍŠKU POD BRDY.

Přítomni: Vorlíček, Petruželka, Aschermannová, Petera, Příbylová, Jelínková, Fínek, Stáhalová, Cwiertka, Abrahámová, Bartoš

Omluveni: Žaloudík, Vyzula, Feltl

Host: Doc.RNDr. Ladislav Dušek, PhD., Doc. MUDr. Marián Hajdúch, PhD., PhDr. Petra Nováková

1. Hostitelka prim.MUDr. Aschermannová přivítala všechny členy výboru ČOS na zámku v Mníšku pod Brdy a seznámila výbor s jeho historií.
2. Prof. Vorlíček překontroloval plnění zápisu z minulé schůze.
3. Prof. Vorlíček informoval o dopisu ředitele ÚZIS Dr. Mazánkové ohledně mylné interpretace onkologických dat.
4. Prof. Vorlíček na doporučení výboru ČOS připraví otevřený dopis na toto téma pro informování zdravotnické veřejnosti.

5. Doc.Dušek informoval výbor ČOS o průběhu programu skríninku ca prsu, tento program je aktivně podporován VZP. Výsledky jsou velmi povzbudivé, v letošním roce je očekáváno až 80 % nově hlášených nádorů prsu ve stádiu I. a II. Dále v příloze.

6. Registry nákladné léčby - prim. Stáhalová navrhuje sběr parametrických dat implementovanou formou do NIS. Doc. Dušek vysvětlil znovu účel registrů, ale jejich implementace do NIS je t.č. neschůdná a proto musí být zachovány ve své původní podobě. Vedení registrů je odrazem funkčnosti jednotlivých KOC (KOS) jak bylo diskutováno a jejich vedení je jednou ze základních podmínek pro zařazení do onkologické sítě. Vyplňování registru Herceptin je dáno i vyhláškou VZP.

7. VZP a další pojišťovny stále nehradí náklady na indukovanou léčbu, která vzniká KOC /KOS převzetím nemocných k biologické léčbě a měla by pokrýt konkomitantně podávanou chemoterapii. Členové výboru ČOS projevují rozhořčení nad opakovaným přezíravým postojem plátců nad tímto problémem, výbor ČOS bude dále s plátcí o tomto problému jednat.

8. Doc. Dušek žádá výbor ČOS o svolení k použití loga ČOS pro projekt UJO, výbor souhlasí. Vysvětlení v příloze.
9. prof. Vorlíček: idea běhu Terryho Foxe pokračuje, v jaké formě se podobná akce uskuteční není však doposud zcela jasno, výbor ČOS bude průběžně informovat touto cestou.
10. Výbor ČOS žádá zaslat do 10.5.2008 prof. Vyzulovi návrhy na doplnění či změny Doporučených postupů (Modré knihy).
11. Prof. Petruželka předkládá Návrh doporučených postupů léčby urologických malignit Urologické společnosti, text rozešle všem členům výboru ČOS, bude projednáno na červnovém výboru ČOS.
12. Doc. Hajdúch informoval o jednáních s plátcí péče, Společností patologů ČLS JEP a Sekcí diagnostické a prediktivní onkologie ČOS ČLS JEP ohledně úhrad prediktivní onkologické diagnostiky. Tato diagnostika bude s účinností od 1.4.2008 prováděna na šesti pracovištích napříč ČR pro potvrzení stavu HER-2 pozitivního karcinomu prsu a do budoucna i dalších prediktivních markerů (např. mutace genu KRAS u kolorektálního karcinomu). Úhrada těchto výkonů bude prováděna speciálním úhradovým mechanismem, laboratoře musí nejpozději do jednoho roku získat akreditační osvědčení. Další podrobnosti a výčet pracovišť vybraných Společností patologů ČLS JEP bude zveřejněn na Fóru onkologů a plátců péče dne 16.5.2008.
13. Termín příštích Dnů prof. Staška je 28. a 29.3. 2009.
14. Výbor ČOS bere na vědomí dokument zaslaný prof. Zimou - Využití nádorových markerů v klinické praxi a bere jej jako základní dokument k diskusi nad optimální praxí ve využití onkogenních markerů mezi odbornými společnostmi.
15. Výbor ČOS souhlasí s oddělením darovaných prostředků pro portál www.linkos.cz od obecného účtu ČOS udělením zvláštního variabilního symbolu. Dr. Cwierka požádá vedoucí finančního oddělení ČLS JEP o přidělení dalšího variabilního symbolu, který pak bude uváděn na darovacích smlouvách a na všech dalších smlouvách souvisejících s chodem portálu www.linkos.cz.
16. Výbor ČOS souhlasí s úhradou faktury za distribuci Medical Tribune všem členům ČOS.
17. Prof. Petera informuje o pokračování projektu dovybavení radioterapeutických pracovišť z prostředků EU.
18. Odpověď na dopis Dr. Drbala, znojemské pracoviště není Komplexním onkologickým centrem. Prof. Petera: pro toto pracoviště schválena SROBF obměna kobaltu pouze „malým“ lineárním urychlovačem, detailní vybavení je v kompetenci jednání pracoviště s KOC - MOU Doc. Šlampa .
19. PhDr. Nováková - informace o vývoji návštěvnosti portálu www.linkos.cz a jeho rozvoji do budoucna. Výbor ČOS velice pozitivně hodnotí kvalitu a úspěšnost portálu.
20. Prim. Aschermannová předala podklady pro vyhlášku PVT (o minimálním vybavením onkologických pracovišť) na MZ ČR.
21. Výtěžek z Květinového dne rozdělí Liga proti rakovině (prof. Dienstbier) na pracoviště přímo.
22. Výbor ČOS - časopis Onkologická péče je garantován Českou onkologickou společností.
23. Dopis ředitele Nemocnice Havlíčkův Brod ohledně četnosti preventivních onkologických prohlídek, vyřídí Dr. Jelínková - řízeno vyhláškou.
24. Výbor ČOS blahopřeje prof. Žaloudíkovi ke zvolení předsedou Onkochirurgické sekce, viz příloha.
25. Noví členové ČOS: Ingrid Garajová Brno, Lenka Odvářková Nový Jičín, Ludmila Olosová Nový Jičín, Richard Fiala Praha, Petr Piskač Brno.

Příloha k bodu 5 a 8

Doc. Dušek informoval o stavu screeningových projektů v ČR. Členům výboru byla předána zpráva o velmi pozitivním vývoji mamárního screeningu včetně závěrečné zprávy o pilotním projektu zvaní, který byl organizován ve spolupráci s VZP. Projekt pilotního zvaní byl úspěšně vyhodnocen a obhájen, o dalším vývoji bude rozhodovat vedení VZP ke konci měsíce května. Projekt zvýšil účast žen v programu, a to především u zcela nově přichozích klientek. Zájemci jsou zvaní na nový web projektu www.mamo.cz, kde jsou o výše zmíněných projektech a výstupech dostupné všechny podstatné informace.

Rovněž v případě kolorektálního screeningu pokračuje datová podpora a systém je a bude rozvíjen do podoby odpovídající stavu v screeningovém programu C50. O ustavení datového auditu na screening cervixu bude probíhat jednání na MZ ČR dne 2.5. 2008, odbornou garanci zajišťuje

vedení 4eské gynekologické společnosti. ČOS bude dále průběžně informována o vývoji těchto jednání.

Doc. Dušek a prof. Abrahámová podali zprávu o úspěšné obhajobě studie proveditelnosti fúze dat NOR a PZP, která proběhla za účasti představitelů MZ ČR i PZP dne 25. 4. 2008. Projekt bude vysoce pravděpodobně pokračovat pilotními zkouškami, další rozhodnutí je nyní na MZ ČR. Projekt napomůže rozvoji infrastruktury NOR. V souvislosti s touto agendou roste požadavek na dořešení koncepčních otázek dalšího vývoje NOR. Ačkoli bylo vyřešeno alespoň částečné financování na rok 2008 a rozvíjí se i centrální informační zázemí, je nutno dbát především na

- zajištění validace sbíraných dat při přechodu na novou informační technologii
- zajištění dostupnosti datových rozhraní
- zajištění implementace datových standardů do NIS nemocnic v ČR

Výbor ČOS v této souvislosti doporučuje vedení KSR-ZIS jako provozovateli dat NOR zadat odbornou studii odpovídající zásadní otázky dalšího udržení a směřování NOR. V týmu zpracovávajícím studii musí být zastoupeny všechny angažované subjekty, včetně zástupců z řad regionálních správců dat NOR. Výbor ČOS souhlasí, aby koordinací práce na studii byl pověřen doc. L. Dušek, jak bylo předběžně navrženo.

Prof. Vorlíček a doc. Dušek informovali o nové výzvě ředitelky ÚZIS, která požaduje korektury další z mezinárodních studií publikujících údaje o přežití onkologických pacientů v EU (studie EUGLOREH). Tato studie bohužel přebírá data z již kritizovaných výstupů EURO CARE 3 a 4 a prezentuje tak velmi nízké hodnoty přežití pacientů v ČR, opět bez vazby na klinická stadia a způsob léčby. Prof. Vorlíček vyjádří se souhlasem výboru odmítavé stanovisko k takové formě prezentace českých dat formou otevřeného dopisu vedení ÚZIS. V dopise se dále konstatuje, že odborná společnost nemůže převzít odpovědnost za hlášení dat touto formou a odmítá jejich interpretaci ve vztahu ke kvalitě léčebné péče v ČR. Dílčí regionální data nerespektující klinické stadium pacienta nevypovídají o kvalitě léčebné péče v onkologických centrech a nemocnicích ČR. Dopis dále bohužel konstatuje, že opakovaným (2003 – 2007) hlášením těchto dat a zcela neetickou a zavádějící interpretací v českých médiích byla dlouhodobě poškozena pověst české onkologie a možná i otřesena důvěra pacientů v poskytovanou péči. Za tento stav nesou odpovědnost výhradně pracovníci ÚZIS a ti by také měli především usilovat o nápravu věci. Již publikovaná data ovšem nejde smazat a odvolat, výsledky jsou bez jakýchkoli korektur přebírány desítkami serverů a publikací.

Výbor ČOS dále doporučil publikování vlastních přepočítaných českých výsledků v co nejkratším možném termínu, což ovšem vyžaduje korektní validaci celopopulačních českých dat. Mimo jiné jednorázové zpřístupnění dat o identitě zdravotnických zařízení. O urychlení této věci bude s vedením KSRZIS a ÚZIS jednat prof. Abrahámová a doc. Dušek.

Prof. Petruželka, doc. Fínek a doc. Dušek představili nový vznikající projekt zaměřený na posílení komunikace mezi urology a onkology při léčbě pokročilého karcinomu prostaty (projekt UJO: „urology joins oncology“, www.ujo.registry.cz). Jde o pilotní projekt tohoto druhu, který využívá moderní informační technologie k posílení možné spolupráce obou odborných společností. Projekt již podpořil výbor České urologické společnosti. Výbor ČOS souhlasí s prezentací projektu pod hlavičkou ČOS

a s uváděním loga ČOS. O tom, zda se záměr projektu podaří, budou podávány průběžné informace. První vážná prezentace výstupů je plánována na leden 2009. Materiály prezentované na návrhu webu projektu lze doplňovat nebo případně kritizovat.

Příloha k bodu 23

Prof. Žaloudík požádal o zveřejnění výsledků voleb do Výboru Onkochirurgické sekce :

Předsedou byl pro další období jednomyslně zvolen prof. Žaloudík, místopředsedou prof. Duda, jednatelem zůstává prof. Ryska.

Prof. Žaloudík poděkoval prof. Dudovi za bezmála pětiletou záslužnou a úspěšnou činnost ve funkci předsedy a vyzvedl zejména jeho organizační práci při etablování sekce onkochirurgů na českomoravské chirurgické i onkologické scéně a ediční úsilí při překladu německé Onkochirurgie do češtiny, která se stala základním studijním materiálem pro onkologicky profilované chirurgy, ovšem sloužící pro orientaci také interním a radiačním onkologům.

Těžiště činnosti v dalším období vidí nový výbor Sekce a její předseda prof. Žaloudík v následujících úkolech:

1. dosáhnout pro onkologicky profilované chirurgy v návaznosti na novelu Zákona 95/2004 vyhláškou definované možnost funkčních certifikovaných nástavbových specializací v oboru chirurgická onkologie s návrhem modulového systému specializovaného vzdělávání;
2. dosáhnout proporcionálního a adekvátního zohlednění a ocenění chirurgické léčby v systému financování onkologické péče;
3. pojmenovat ordináře pro onkochirurgii v rámci sítě KOC a pomocí této struktury uplatňovat další vliv na odborné, edukační i ekonomické stránky onkologické péče, součástí bude zabývat se také racionálními objemy a kvalitou poskytované onkochirurgické péče;
4. úzce spolupracovat s Českou chirurgickou společností a Českou onkologickou společností, neboť členové Sekce jsou zpravidla členy obou společností;
5. dále rozvíjet kontakty v rámci WFSOS a ESSO;
6. rozšířit členskou základnu Sekce zejména o zástupce chirurgických pracovišť a KOC ze západní části republiky;
7. dopracovat některé procedurální normy Sekce a pořádat společná setkání členů nejméně dvakrát ročně, na jaře u příležitosti BOD v Brně, na podzim s využitím případných konferenčních akcí či samostatně jinde v ČR.