

VYDÁVÁ
ČESKÁ
LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
J. E. PURKYNĚ

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

REDAKCE:
Masarykův onkologický ústav Brno
Žlutý kopec č. 7
656 53 Brno

Sekretář redakce:
ing. Zdeněk Bouša

Grafická a technická úprava:
Bohuslav Havlíček

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

Vychází 6krát ročně

Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce

Podávání novinových zásilek
povoleno Oblastní správou pošt Brno
čj: P/2-3057/94
ze dne 6. 9. 1994

F 5158 Mič 46-772
ISSN 0862-495 X

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

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO

REDAKTORA:

KOZA IVAN

VÝKONNÝ REDAKTOR:

FAIT VUK

REDAKTOŘI:

BEDNAŘÍK OTAKAR
MAYER JIŘÍ
ČOUPEK PETR

SHEARD MICHAEL
KOCÁK IVO
NĚMEC JAROSLAV
ŽALOUĐÍK JAN

REDAKČNÍ RADA

ADAM ZDENĚK, Brno
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno
BEŠKA FRANTIŠEK, Ostrava
BILDER JOSEF, Brno
ČOUPEK PETR, Brno
DRBAL JOSEF, Brno
ECKHARDT SANDOR,
Budapešť
FAIT VUK, Brno
CHODOUNSKÝ ZDENĚK,
Praha
JURGA LUDOVIT, Trnava
KALLAY JOZEF, Bratislava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava
KLAŠTERSKÝ JAN, Brusel
KLENER PAVEL, Praha
KOCÁK IVO, Brno
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

KOVAŘÍK JAN, Brno
KOZA IVAN, Bratislava
LAGINOVÁ VIERA, Bratislava
MAYER JIŘÍ, Brno
MECHL ZDENĚK, Brno
NĚMEC JAROSLAV, Brno
ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
PLEŠKO IVAN, Bratislava
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
REJTHAR ALEŠ, Brno
SIRACKÝ JÁN, Bratislava
SPURNÝ VLADIMÍR, Brno
UJHÁZY VILIAM, Bratislava
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
VYZULA ROSTISLAV, Brno
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
ŽALOUĐÍK JAN, Brno

Přehled

Žaloudík J., Taláč R., Vagunda V., Hajdúch M., Janíček P., Coufal O., Ondrák M., Kocák J., Vyzula R. Sarkomy měkkých tkání- přehled novějších diagnostických a léčebných postupů	143
---	-----

Kubáčková K., Prausová J., Hoch J., Několik poznámek k molekulární genetice kolorektálního karcinomu	151
---	-----

Původní práce

Štourač P., Kadaňka Z. Paraneoplastické neurologické syndromy – protilátkový profil a jeho atypické varianty	155
---	-----

Hájek R., Žáčková D., Penka M., Krahulcová E., Kořístek Z., Vinklárková J., Adler J., Janovská E., Indrák K., Faber E., Doubek M., Klabusay M., Oltová A., Kuglík P., Dvořáková D., Bourková L., Dušek L., Mareschová I., Mayer J., Vorlíček J. Autologní transplantace s podáním interleukinem 2 aktivovaného štěpu periferních kmenových buněk nemocným s chronickou myeloidní leukemií	159
--	-----

Novotný J., Kleibl Z., Vedralová J., Kolářová M., Petruželka I., Janků F., Matouš B. Expresí onkogenu C-ERBB-2 a mutace onkogenu K-RAS u nádorů slinivky břišní, korelace s klinickým průběhem a patologickými charakteristikami	167
--	-----

Informace

- Spojení dvou pharmaceutických společností PLIVA a LACHEMA	170
- knihy	154, 158, 171

Onkologické společnosti	172
--------------------------------------	-----

CONTENTS**Reviews**

Žaloudík J., Taláč R., Vagunda V., Hajdúch M., Janíček P., Coufal O., Ondrák M., Kocák L. Soft-tissue Sarcomas: an Overview of the Newer Diagnostic and Therapeutic Approaches	143
---	-----

Kubáčková K., Prausová J., Hoch J. Some Remarks to the Molecular Genetic of Colorectal Cancer	151
--	-----

Original Papers

Štourač P., Kadaňka Z. Paraneoplastic Neurological Syndromes – Antibodies Profile and its Atypical Variants	155
--	-----

Hájek R., Žáčková D., Penka M., Krahulcová E., Kořístek Z., Vinklárková J., Adler J., Janovská E., Indrák K., Faber E., Doubek M., Klabusay M., Oltová A., Kuglík P., Dvořáková D., Bourková L., Dušek L., Mareschová I., Mayer J., Vorlíček J. Autologous Transplantation Using Interleukin 2 Activated Peripheral Blood Stem Cell Graft in Chronical Myeloid Leucaemia Patients	159
---	-----

Novotný J., Kleibl Z., Vedralová J., Kolářová M., Petruželka I., Janků F., Matouš B. C/ERBB/2 Expression and K/RAS Mutations in Pancreatic Cancer. Correlation With Clinical Course Pathological Characteristics	167
--	-----

Information

- Amalgamation PLIVA and LACHEMA	170
- books	154, 158, 171

Oncological societies	172
------------------------------------	-----

SARKOMY MĚKKÝCH TKÁNÍ - PŘEHLED NOVĚJŠÍCH DIAGNOSTICKÝCH A LÉČEBNÝCH POSTUPŮ

SOFT-TISSUE SARCOMAS: AN OVERVIEW OF THE NEWER DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPROACHES

J.ŽALOUDEK, R.TALÁČ, V.VAGUNDA, M.HAJDÚCH, P.JANÍČEK, O.COUFAL, M.ONDRÁK, I.KOCÁK, R.VYZULA

UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM BRNO : CHIRURGICKÁ KLINIKA FN BRNO-BOHUNICE,
ORTOPEDICKÁ KLINIKA FN U SV. ANNY, ODDĚLENÍ KLINICKÉ ONKOLOGIE FN BRNO-BOHUNICE
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO, LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY FN OLOMOUC

Souhrn: Přehledná práce shrnuje hlavní morfologické a subcelulární parametry pro diferenciální diagnostiku, stratifikaci a prognostiku sarkomů měkkých tkání. Chirurgické metody léčby jsou nahlíženy především z hlediska svých limitací a potřeby kombinovaných postupů, včetně použití některých méně obvyklých přístupů jako jsou intersticiální brachyterapie a předoperační intraarteriální chemoterapie, případně individualizace chemoterapie podle prediktivních testů blíže charakterizujících vlastnosti daného sarkomu.

Klíčová slova: sarkomy měkkých tkání, subcelulární diagnostika, kombinovaná léčba

Summary: Principal morphological and subcellular parameters for differential diagnosis, stratification and prognostication of soft-tissue sarcomas are reviewed. Surgical methods are envisaged in their limitations and weak points in order to stress the need for combined therapeutic approaches. Pre-operative intraarterial chemotherapy, interstitial brachytherapy and individualized chemotherapy based on predictive testing may represent few newer approaches to enhance still rather low effectivity of the treatment of soft-tissue sarcomas.

Key words: soft-tissue sarcoma, subcellular diagnostics, combined therapy

Úvod

Sarkomy měkkých tkání jako nádory mesenchymálního původu nejsou v onkologické praxi ve srovnání s epitelialními nádory časté, vždy jsou však vnímány jako onemocnění velmi závažné, nezřídka provázené diagnostickými a terapeutickými rozpaky. Především býváme znovu a znovu překvapováni primárním nádorem značné velikosti a lokální pokročilosti, diagnostickým prodloužením způsobeným až již vinou pacienta samotného, lékaře prvního kontaktu, který na tuto diagnózu nemyslí, nebo skrytou lokalizací a asymptomatickým průběhem nádorové choroby. I na klinických pracovištích trvá někdy diagnostika zbytečně dlouho nebo je primární operace neadekvátní a zakládá již od počátku podmínky pro recidivu onemocnění. Nemocný s recidivou, či spíše residuem nádoru, zjištěným krátce po primární operaci, se může pokládat za poškozeného stejně jako ten, který absolvoval rozsáhlou mutilující operaci, třeba amputaci končetiny, a krátce poté je mu zjištěna plicní diseminace nádorového onemocnění. Diagnostika i léčba sarkomů měkkých tkání prodělává v posledních letech celou řadu změn směrem k cílenějším individualizovaným přístupům.

Morfologická klasifikace

Sarkomy měkkých tkání jsou morfologicky velmi pestrou paletou maligních nádorů vycházejících z mesenchymálních, především pojivových tkání. Podle klasifikace WHO jsou děleny do zhruba 40 morfologických jednotek a dále v podskupinách do více než 80 histopatologických entit (1,2). Zvláště mezi patology přetrvává tendence dále v sarkomech rozlišovat nové podjednotky a již beztak široké spektrum dále dělit podle nově morfologicky

definovaných detailů (3-11). Protože však jde o nádory s relativně nízkou incidencí, mají jak klinici tak patologové mimo vysoce specializovaná pracoviště jen málo příležitostí nabytí dostatek zkušeností s celým tímto spektrem nádorů jak z hlediska diferenciálně diagnostického, tak především prognostického a terapeutického. Není v praxi reálné srovnávat účinnost léčebných alternativ ve vztahu k tolika histopatologickým typům a podtypům a podrobná klasifikace se tak stává poněkud samoučelnou. Léčebné postupy nejsou u sarkomů měkkých tkání vedeny ani tak histotypem, nýbrž spíše stupněm malignity vyjádřeném histopatologickým gradingem (3,12,13).

Řešení pro klinika málo přehledné situace je spíše v opačném, tedy integrujícím přístupu, podobném jaký byl použit u maligních lymfomů. Po několika klasifikacích lymfomů se dospělo v klasifikaci nazvané Working Formulation pro klinické účely k praktickému dělení na lymfomy o vysokém (high-grade) a nízkém (low-grade) stupni malignity, kterým odpovídá také odlišná léčebná strategie. Navíc toto jednoduché dělení poskytlo nové, biologicky zajímavé, avšak i klinicky užitečné poznatky. Lymfomy s nízkým stupněm malignity hůře odpovídají na léčbu cytostatiky a jsou paradoxně hůře léčitelné než lymfomy s vysokým stupněm malignity. Tyto závěry klasifikačního zjednodušení nikterak nemění ani nejnovější podrobná klasifikace REAL, stavějící již na objektivnější fenotypizaci se zařazením CD markerů (14). Je zapotřebí, aby podobným procesem prošla i klasifikace sarkomů měkkých tkání.

Sarkomy měkkých tkání přitom již v současné klasifikaci zohledňují nejen anatomický rozsah a velikost nádoru, nýbrž i jeho grading (histopatologický stupeň malignity) jako paramet

určující stadium onemocnění, což je u solidních nádorů výjimečně progresivní přístup. Plnému využití tohoto parametru však brání skutečnost, že grading je v praxi uváděn v patologickém popisu pouze u poloviny případů a zčásti je tento popis zatížen chybou subjektivní nebo také objektivní při vysoké heterogenitě subpopulací v nádoru (15). O průběhu onemocnění zřejmě rozhodují subpopulace s nejvyšší malignitou, které však mohou být i minoritní a unikát běžnému histopatologickému hodnocení omezeného počtu preparátů připravených z obvykle objemných nádorů. Histopatologický grading koreluje s intervalem bez známek onemocnění i celkovou dobou přežití (6,13,16,17). Nevíme dosud s jistotou zda grading nádoru disponuje k vyšší či nižší účinnosti radioterapie nebo chemoterapie. Je ovšem nepravděpodobné, že by sebelepší parametr dosáhl sám o sobě potřebné prediktivní síly pro individualizaci léčby a obešel se bez dalších znaků nutných pro aplikace klinicky relevantní multivariační analýzy na jednotlivé klinické případy.

Na požadavku standardizovaného stanovení histotypu i gradingu sarkomu měkkých tkání je nutno trvat jako na základních podmínkách jejich klasifikace, avšak s vědomím jejich limitací a možných nepřesností i chyb, které přináší každé subjektivní hodnocení fenotypu (18). Ve skandinávské studii komisionální revize histopatologických diagnóz sarkomů měkkých tkání byla při týmovém přehlednutí preparátů přehodnocena plná třetina případů a v 5 % diagnóza maligního tumoru dokonce změněna na benigní (19).

Molekulární patologie v diferenciální diagnostice sarkomů měkkých tkání

Informace získávané cytogenetickými s a molekulárními metodami se zatím v diagnostice sarkomů měkkých tkání uplatňují pouze v upřesňování standardní morfologické klasifikace, tedy nikoli v kvalitativně novém členění sarkomů jak by se logicky nabízelo (20). Z metodického hlediska jsou zatím používány pro diferenciální diagnostiku ponejvíce imunohistochemie a standardní karyotypové analýzy, nověji pak in situ hybridizace pro detekci amplifikace či delece jednotlivých genů, RT-PCR pro detekci transkriptů mRNA a kvantitativní metody cytometrické obrazové analýzy DNA nebo exprese specifických proteinů (21). Značný kvalitativní posun lze brzy očekávat od aplikací komparativní genomové hybridizace v genových DNA mikročipech, které zohlední nejen hlavní změny v panelu klíčových genů jako nový způsob charakterizace jednotlivých histotypů, nýbrž i rozdíly mezi různými morfologickými stupni malignity, primárními nádory, rekurencemi a metastázami. Současná onkologie pracuje pouze s několika parametry a obvykle nezkoumá váhu jednotlivých znaků v prediktivních modelech. Multifaktoriální hodnocení vyžaduje kromě laboratorního zajištění také zázemí pro zpracovanou biostatistickou mnohorozměrnou analýzu dat. Bez ní by pouhé přidávání dalších parametrů v budoucnu mohlo být nečitelné a samoúčelné.

V současné morfologické klasifikaci sarkomů měkkých tkání existují především následující diferenciálně diagnostické problémy, které pomáhá řešit imunohistochemie (22) a ještě účinněji cytogenetická detekce specifických translokací (20,23,24).

a) Diferenciální diagnostika sarkomů z malých kulatých buněk
Jde především o odlišení Ewingova sarkomu (ES) a periferního neuroektodermálního tumoru (PNET), případně dalších nádorů z malých okrouhlých buněk jako jsou desmoplastický malobuněčný nádor a rhabdomyosarkom. Skupina ES/PNET je charakterizována především pozitivitou antigenu CD99 (20). Desmoplastický malobuněčný nádor exprimuje epiteliální markery cytokeratiny, svalové proteiny jako je desmin i neurální marker neuron specifickou enolázu. Jsou však známy i nezařaditelné typy s pozitivitou CD99 a negativitou cytokeratinů jako je například abdominální nádor z modrých buněk u dětí. Celou tuto skupinu je proto lépe charakterizovat specifickými cytogenetickými alteracemi. V 85 % případů se vyskytuje translokace t(11;22)(q24;q12), což je historicky první translokace popsaná u solidních nádorů (25). Tato translokace vede k juxtapozici genů EWS chromosomu 22 a genu FLI-1 chromosomu 11. Podle umístění juxtapozice v rámci

jednotlivých intronů a exonů lze rozlišit asi 9 typů chimerických EWS/FLI-1 transkriptů. K dalším méně častým translokacím skupiny ES/PNET patří t(21;22)(q22;q12) se vznikem chimerického genu EWS/ERC nebo translokace t(7;22)(p22;q12) s fúzí genů EWS a ETV1 (26). Alveolární sarkomy jsou v 90 % nositeli translokace t(2;13)(q35;q14) (27). Tato translokace vede k zlomu genu PAX3 na chromosomu 2 a jeho juxtapozici do oblasti vlivu dosud málo probádaného transkripčního faktoru FKHR (ALV) na chromosomu 13. PAX3 je součástí fylogeneticky konzervovaného homeoboxu transkripčních faktorů (28). Na rozdíl od alveolárních rhabdomyosarkomů tuto specifickou traslokaci postrádají rhabdomyosarkomy embryonální, které zase charakterizuje delece části chromosomu 11 (29).

Popsány jsou však i nádory nesoucí cytogenetické znaky jak alveolárního tak embryonálního rhabdomyosarkomu, ovšem s přítomností již zmíněné translokace typické pro celou skupinu ES/PNET t(11;22)(q24;q12) (30). Malobuněčný desmoplastický tumor s predilekcí výskytu u mladých mužů, který se vyznačuje rychlým šířením po serozách, je charakterizován specifickou translokací t(11;22)(p13;q12), již dochází ke vzniku fúzního produktu EWS/WF1 (31). Ačkoli specifické translokace se ve skupině malobuněčných sarkomů vyskytují ve vysokém procentu případů, není tato specifita absolutní. Typická translokace skupiny ES/PNET t(11;22)(q24;q12) byla totiž nalezena také u některých polyfenotypických sarkomů (32).

b) Odlišení synoviálního sarkomu od ostatních vřetenobuněčných sarkomů

Mezi synoviální sarkomy lze rozlišit méně častou bifazickou variantu s přítomností vřetenitých i epiteloidních buněk a častější výhradně vřetenobuněčný monofazický typ. Společně jsou synoviosarkomy charakterizovány translokací t(X;18)(p11;q11) přítomnou v 90 % případů (33). Klonování této translokace vedlo k objevu dvou nových genů s dosud neznámou funkcí SSX na Xp11 a SYT na 18q11 (34). Bifazické synoviosarkomy obvykle nepředstavují diagnostický problém. Naproti tomu častější monofazické synoviosarkomy mohou být snadno zaměněny za jiné vřetenobuněčné typy sarkomů jako jsou fibrosarkomy, leiomyosarkomy nebo maligní schwannomy. Ani imunohistologické rozlišení není často možné. Navíc málo diferencovaný kulatobuněčný synoviosarkom může být neodlišitelný od kulatobuněčných nádorů skupiny ES/PNET, včetně pozitivitu antigenu CD99. Užitečný tedy může být cytogenetický průkaz specifické translokace t(X;18)(p11;q11) metodou FISH. Tato metoda tak é pomohla odhalit nádory s charakteristikami synoviosarkomu v tak netypických lokalizacích jako jsou srdce a plíce (35,36).

c) Diferenciální diagnostika myxoidních sarkomů

Pro tuto skupinu je charakteristická přítomnost myxoidní mezibuněčné matrix, kterou lze ovšem nalézt u řady různých typů sarkomů. Typické cytogenetické změny korelující s přítomností myxoidní matrix jsou definovány jako translokace t(12;16)(q13;p11) u myxoidního liposarkomu, která fúzuje gen CHOP chromosomu 11 s genem TLS chromosomu 16 (37), a translokace t(9;22)(p22;q12) u extraskelálního myxoidního chondrosarkomu, již se účastní opět již zmíněný gen EWS (38). Gen EWS zde fúzuje s genem CHN, který patří do superrodiny genů pro receptory steroidních a thyreoidních hormonů. Vzácný agresivní angiomyxom, který se vyskytuje převážně v oblasti pánve, nese rovněž specifickou translokaci 12q12-15 (39).

d) Další chromosomální a molekulární aberace mesenchymálních nádorů s diagnostickým významem

Typické chromosomální delece jsou nalézány u mesoteliomu, který je tak možno i z cytopunkce odlišit od reaktivních mesotelálních buněk (40). Jde především o delece del(1p), del(3p) a del(22q) a spolehlivě se zde může uplatnit metoda FISH (21). Obtížné může být odlišení sarkomů ze světlých buněk a metastáz epiteloidního maligního melanomu v měkkých tkáních. V těchto případech je možno využít detekce translokace

t(12;22)(q13;q12), typické pro sarkomy (41). Zvláštní kategorií mesenchymálních nádorů představují poměrně časté stromální sarkomy digestivního traktu. Molekulárně jsou charakterizovány mutací onkogenu c-kit kódujícího receptor pro tyrosin kinázu, delecí 14q a expresí antigenu CD34, který je společný jak fibroblastoidním buňkám stromálních sarkomů tak kmenovým hematopoetickým buňkám (42-44)

Heterogenita cytogenetických znaků a jejich neúplná specifita ve vazbě na histotyp znovu podtrhuje předpoklad, že další klasifikační drolení sarkomů by pokračovalo i při zařazení cytogenetických parametrů. Proto je třeba hledat spíše integrující znaky, které by dokázaly sarkomy měkkých tkání řadit do několika málo skupin podle klinicky relevantních charakteristik (rychle a pomalu rostoucí, rychle a pomalu metastazující, citlivé

Tabulka 1: Přehled známých histotypově specifických translokací sarkomů měkkých tkání (podle Singera 1999)

Histotyp	Translokace	Fúzní produkt
Ewingův sarkom / PNET	t(11,22)(q24;q12) t(21,22)(q12;q22) t(7,22)(p22;q12)	EWS-FL11 EWS-ERG EWS-ETV1
Synoviální sarkom	t(x,18)(p11;q11)	SYT-SSX
Desmoplastický malobuněčný sarkom	t(11,22)(q13;q12)	EWS-WT1
Myxoidní/ kulatobuněčný liposarkom	t(12,16)(q13;p11) t(12,22)(q13;q11-12)	CHOP-TLS CHOP-EWS
Alveolární rhabdomyosarkom	t(2,13)(q35-37;q14) t(1,13)(p36;q14)	PAX3-FKHR PAX7-FKHR
Sarkom z jasných buněk	t(12,22)(q13-14;q12-13)	EWS-ATF1
Dermatofibrosarkom	t(17,22)(q22;q13)	PDGFB-COL1A1
Myxoidní chondrosarkom	t(9,22)(q31;q12)	EWS-TEC

a rezistentní k danému typu léčby).

Molekulární prognostické a prediktivní faktory

Prognostickými označujeme faktory předpovídající průběh onemocnění, prediktivními pak znaky předpovídající pravděpodobnou odpověď nádoru na určitý typ léčby. Oba pojmy bývají někdy zaměňovány nebo mylně interpretovány, proto na terminologickou stránku upozorňujeme již v úvodu odstavce. Standardními prognostickými faktory sarkomů měkkých tkání klinicko-patologického hodnocení jsou stadium, histopatologický grading, histotyp, velikost nádoru, jeho lokalizace a kvalita primární operace (2,4,17,45-49). V multivariální analýze se ukázaly být nejvýznamnější faktory pro dosažení úplnosti resekce, respektive nezávislémi indikátory rizika lokální recidivy, kategorie T z TNM klasifikace, lokalizace nádoru a přítomnost nekrózy v nádoru před léčbou (50). Velikost nádoru ovlivňuje především riziko lokálních recidiv, zatímco histologický grading koreluje s intervalem do výskytu metastáz a celkovým přežíváním nemocných (16). Protože jsou však zhoubné nádory především „onemocněním DNA“ s dysregulací molekulárních mechanismů, je další pokrok v diagnostice a léčbě nádorů závislý především na posunu v poznání na molekulární a buněčné úrovni.

Nejdále se používání molekulárně biologických prognostických markerů u solidních nádorů zatím dostalo v prognostice neuroblastomů, kde je využíváno průkazu ztráty heterozygosity krátkého raménka chromosomu 1 a amplifikace onkogenu N-myc, obvykle metodou FISH (28,55). Takovéto vymezení prognostických molekulárních markerů není zatím u sarkomů měkkých tkání chybí.

Snad nejdále se v tomto směru dostalo použití hrubé analýzy obsahu DNA flow cytometrií, respektive DNA ploidity. DNA aneuploidní sarkomy dospělého věku mají horší prognózu (51,52). Například v podskupině sarkomů ze světlých buněk byly výsledky u nádorů s aneuploidním DNA profilem horší až osmkrát (53). K podobným závěrům o horší prognóze DNA aneuploidních sarkomů došla také u sarkomů s vysokým gradingem skandinávská studie a další u retroperitoneálních

sarkomu bez zohlednění gradingu (54). Jiné práce však takto významný unifaktoriální přínos DNA ploidity zpochybňují (56). Naše vlastní výsledky ukazují, že prognostický význam DNA ploidity je v univariální analýze nevýznamný. Kategorizace sarkomů podle obsahu DNA na diploidní a aneuploidní však ve vícefaktorové analýze zvýrazňuje prognostický význam celé řady parametrů jako jsou mitotická aktivita, exprese p53, bcl2, Pgp nebo úroveň apoptózy právě v některé kategorii s vyšším či nižším stupněm genomové instability vyjádřeným DNA ploiditou (57).

Určitou záhadou je dosud obrácený vztah mezi DNA ploiditou a prognózou u některých nádorů dětského věku ve srovnání s homologními malignitami dospělých. Dětské rhabdomyosarkomy, podobně jako dětské neuroblastomy mají horší prognózu jsou-li DNA diploidní (58). Detailní analýza genotypických rozdílů mezi sarkomy dětského a dospělého věku ve vztahu k jejich různému chování a různé citlivosti k léčbě dosud v literatuře víceméně chybí. Snad jediná publikovaná práce srovnávající rozdíly v kinetických parametrech sarkomů dětského a dospělého věku dochází k zajímavým závěrům, jejichž validita je však omezena velmi malým souborem (59). Podle této studie je poměr proliferace a apoptózy (tedy dělení a zániku buněk) sarkomů dětského a dospělého věku obrácený. U dětí činil tento poměr 0,4+0,15/6,6+0,8 %, zatímco u dospělých 15,9+3,7/0,5+0,08 %, což lze vyjádřit průměrnými proliferace-apoptotickými indexy 0.06 u dětí versus 4,3 u dospělých. K podobným závěrům o disociaci mitózy a apoptózy u sarkomů dospělého věku ve srovnání ze zachovanou úrovní apoptózy a nižší mitotickou aktivitou u dětských sarkomů jsme však došli recentně i v naší dosud nepublikované studii srovnávající 40 sarkomů dospělého a 21 sarkomů dětského věku napříč histotypy (57). Relativně zachovalá schopnost apoptózy u dětských nádorů ve srovnání s dospělými by mohla být interpretována jako důvod vyšší chemosenzitivity dětských nádorů a chemorezistence nádorů dospělých. Tato hypotéza, jakkoli zní logicky, však vyžaduje teprve důkladného ověření standardizovanými metodami detekce proliferace i apoptózy. Je také nutno lépe pochopit vztah mezi proliferací a apoptózou. Při analýze proliferace-apoptotických parametrů metodou hlavních komponent jsme v našem souboru našli disociaci mitotické aktivity a úrovně apoptózy pouze u dospělých, zatímco u dětských sarkomů jsou oba parametry v úzké korelaci (57).

Významným regulátorem buněčného cyklu je produkt supresorového genu p53, který zajišťuje, aby do buněčného cyklu nevstupovaly buňky s defektní DNA. Při jeho mutaci nebo inaktivaci interferujícími produkty onkogenu jako mdm2, nebo virovými proteiny dochází k neregulované replikaci buněk s defektní DNA a tedy i k snížení účinnosti chemoterapie a radioterapie (60). U chondrosarkomů jde dysfunkce proteinu p53 především na vrub exprese blokujícího onkoproteinu mdm2 (61). U sarkomů měkkých tkání byla nalezena rovněž přímá korelace dysfunkčního p53 s horších léčebných výsledků i vyšší malignity neléčených nádorů (62). Již méně je známo, že p53 je také účinným inhibítozem angiogeneze. Jedním z předpokládaných účinků genové terapie směřující k restituci funkce p53 bude tedy rovněž blokáda angiogeneze a tedy konverze maligních buněk z proliferujícího do dormantního stavu jak již bylo experimentálně prokázáno u myšího fibrosarkomu (63).

I fyziologický protein p53 však může být inaktivován produktem onkogenu mdm2. Tato dysfunkční interakce P53/MDM-2 je zároveň spojena se zvýšenou produkcí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru VEGF a přispívá k neoangiogeneze u velké části zhoubných nádorů. Může být ovšem i sama o sobě zúčastněna v mechanismech maligní transformace endoteliálních buněk jak bylo zjištěno u angiosarkomů, kde až v 80% případů zvýšená produkce proteinu MDM2 koreluje s dysfunkcí a overexpresí proteinu P53 a nadprodukcí VEGF (64).

Prognosticky nepříznivou hodnotu má u sarkomů také amplifikace onkogenu c-myc (65). Nepodařilo se dosud nalézt korelaci mezi metastatickým potenciálem sarkomů a expresí

specifických genů s předpokládaným vztahem k metastazováním jakým je například gen nm23 (66).

V současné době jsou v popředí pozornosti spíše faktory regulující novotvorbu cév v nádoru, která je základní podmínkou pro jeho makroskopický růst a progresi onemocnění, včetně zakládání hematogenních metastáz. Sarkomy měkkých tkání patří k dobře vaskularizovaným nádorům a jejich lokální růst do obvykle značných rozměrů je nesporně na neoangiogenezi vysoce dependentní (67). Bylo zjištěno, že charakteristiky neoangiogeneze sarkomů a karcinomů jsou výrazně odlišné. Zatímco u epitelálních nádorů se novotvořené kapiláry shlukují ve stromatu a nádor má tak vaskularizovanou a avaskulární dvoukompartimentovou strukturu, jsou kapiláry v sarkomech rozmístěny zcela homogenně mezi nádorovými buňkami a nádor má tak z hlediska cévního zásobení jednotnou monokompartimentovou strukturu (68). Rozdíl v denzitě kapilár a expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) mezi sarkomovou a karcinomovou složkou jsou popsány u děložního karcinosarkomu. Jak hustota kapilár, tak produkce VEGF, byly signifikantně vyšší v epitelální karcinomové složce než v sarkomové subpopulaci, což pravděpodobně souvisí s vyšším metastazováním karcinomové komponenty tohoto bifázického nádoru (69).

Dalším faktorem je účast krevní koagulace a krevních destiček ve stimulaci nádorové neoangiogeneze (70). Na jedné straně bylo prokázáno, že koagulační faktory jsou v nitru nádorů aktivovány a růstové faktory destiček jako je PDGF (platelet-derived growth factor) k angiogenezi výrazně přispívají, na druhé straně lze nikoli vzácná pozorování vývoje sarkomu v místě rozsáhlejších nebo opakovaných kontuzí měkkých tkání vysvětlit i promočním účinkem produktů déle se hojícího hematomu v terénu již stigmatizovaném vrozenými nebo získanými genovými alteracemi.

VEGF je jedním z nejsilnějších induktorů angiogeneze a mitogenu endoteliálních buněk. Z experimentů na modelu fibrosarkomu vyplývá, že působí především v časných fázích nádorového růstu na periférii dosud jen difuzí živého nádorového mikroložiska a kromě stimulace endoteliálních buněk také blokuje apoptózu nádorových buněk (71). Produkce VEGF je regulována celou řadou onkoproteinů a anti-onkoproteinů. Jak již bylo uvedeno výše, například ztráta regulační schopnosti a dysfunkce již zmíněného anti-onkoproteinu p53 mutací nebo inaktivací jiným proteinem působí na produkci VEGF stimulačně a napomáhá i touto cestou progresi nádoru (64). Na druhé straně řada farmakologických inhibitorů angiogeneze, které postupně pronikají do klinických aplikací, redukuje metastazování nejen snížením cévní novotvorby, nýbrž také zprostředkovaně zvýšením apoptózy migrujících nádorových buněk (63,72). Nízkomolekulární inhibitor receptoru 2 pro VEGF nazvaný SU5416 redukoval růst nádorových xenotransplantátů neurogenních sarkomů až na polovinu (73). V této inhibici angiogenetických účinků VEGF jsou již využívány také specifické monoklonální protilátky (74,75). Angiogenezi stimuluje pochopitelně i řada dalších růstových faktorů, například bazický fibroblastický růstový faktor bFGF (76).

Jako indikátorů denzity kapilár v nádoru a stupně nádorové angiogeneze je však užíváno markerů endoteliálních, antigenu CD31 a faktoru VIII, avšak nejčastěji markeru CD34. Imunohistologické vyšetření diferenciačního antigenu CD34 dává poměrně nepřehlednější, dobře rozlišující barvení endotelií, a stává se oblíbeným standardem pro takzvaný vaskulární grading nádorů (77). Není bez zajímavosti, že pomocí markeru CD34 byly identifikovány i cirkulující endoteliální buňky. Předpokládalo se, že jde o endotelie uvolněné z kapilár. Protože však tyto cirkulující buňky exprimují jak receptor 2 VEGF, který je přítomen na endoteliích formovaných kapilár, tak i marker hemopoetických kmenových buněk AC133, pokládá se nově za prokázané, že jde o primitivní mesenchymální endoteliální prekursor (78). Není však dosud jasné, zda tyto cirkulující kmenové buňky endotelu hrají také roli v nádorové neoangiogenezi.

Podle Chiby koreluje denzita novotvořených kapilár dobře s overexpresí p53, což je v souladu s již uvedenou účastí

dysfunkčního p53 v neoangiogenezi, a také inverzní korelace s apoptózou podporuje představu o nádorové vaskularizaci jako nepříznivém prognostickém faktoru (79). Nedořešena zůstává především standardizovaná kvantifikace nálezů označených endotelií. Je známa korelace stupně oxygenace, proliferací aktivity a citlivosti chemoterapii (80). Není však dosud jasné, zda morfologické hodnocení stupně vaskularizace znamená automaticky také vyšší stupeň oxygenace a může být tedy potenciálním prediktorem odpovědi sarkomů k radioterapii.

Klinicky velmi perspektivní oblastí je detekce stupně vaskularizace v sarkomech, ovšem i jiných nádorech, pomocí ultrazvukové techniky Power-Doppler nebo dynamickou kontrastní magnetickou resonancí (DCE MRI, dynamic contrast-enhanced magnetic resonance) (81,82). Tyto metody hodnotí na rozdíl od morfologických mikroskopických vyšetření nikoli pouze hustotu cév v nádoru, ale skutečný krevní průtok nádorem. Toto funkční hodnocení je cennější, protože bylo prokázáno, že řada imunohistochemicky nalezených kapilár je nezralých, neprůchodných a nepřispívá ve skutečnosti k cévnímu zásobení nádoru a jeho oxygenaci.

Bylo prokázáno, že sarkomové buňky dovedou efektivně tlumit případnou protinádorovou imunitní reakci infiltrujících lymfocytů expresí Fas ligandu, který interakcí s Fas receptorem (CD95) lymfocytů v nich indukuje apoptózu (83). Samotná exprese Fas ligandu sarkomovými buňkami však ještě nemusí znamenat funkčnost Fas receptorem mediované cesty spouštění apoptózy jak ukazuje u Ewingova sarkomu ve své práci Koutný (84). Již dříve však byla pozorována relativní absence lymfocytárního infiltrátu v sarkomech měkkých tkání spojená také s negativitou antigenů hlavního histokompatibilního komplexu MHC v nádorových buňkách, které jsou nezbytné pro rozpoznání nádorových buněk lymfocyty i jejich případnou cytotoxickou aktivitu (85,86).

Samostatnou kapitolou v predikci léčebného efektu je predikce chemoresistence a chemosenzitivity sarkomů měkkých tkání. Nepřímými markery volně asociovanými s chemoresistencí jsou znaky se vztahem k nádorové cytokineticé jako je proliferací index, mitotická aktivita, ovšem i zvýšená exprese jednotlivých regulatorů cyklu jako je cyklinu D1. Například fibrosarkomy se zvýšenou expresí cyklinu D1 zároveň zvýšeně exprimují dihydrofolátreduktázu (DHFR) a jsou tudíž resistantní k methotrexátu (87). Podobně volně asociovanými biomarkery jsou znaky zvýšené instability genomu jako DNA profil nebo geny reparace DNA. U sarkomů měkkých tkání však v souvislosti chemoterapií zůstávají prakticky neprostudovány. Kusuzaki (88) pozoroval odpověď na chemoterapii u osteosarkomů, jejich flowcytometrický DNA profil se změnil z aneuploidního na diploidní, zatímco DNA progredujících nádorů zůstal nezměněn. Nepřímým markerem chemoresistence je aktivita P-glykoproteinové membránové pumpy, respektive exprese produktu MDR1 genu Pgp (p170) (89). Korelace lze však hledat pouze pro cytostatika s větší komplexní molekulou, která jsou tímto systémem z buněk odstraňována jako jsou antracykliny, taxany nebo inhibitory topoizomeráz. Aktivita glykoproteinové detoxikační pumpy Pgp dobře koreluje u chondrosarkomů s gradingem (90). U chemoresistentních rhabdomyosarkomů byla naopak zjištěna inverzní korelace exprese Pgp a některých onkogenů ovlivňujících proliferaci a diferenciaci jako je c-myc (91). U buněčných linií rhabdomyosarkomu se zvýšenou expresí P-glykoproteinu se podařilo podařilo zvýšit citlivost na původně málo účinný vincristin, doxorubicin a etoposid chemosenzibilizátory interferujícími s P-glykoproteinovou pumpou verapamilem nebo cyklosporinem (92). Přímé testování chemoresistence, respektive chemosenzitivity v primokulturách sarkomových explantátů je zkoušeno v různých modifikacích od šedesátých let (99-101).

Nebyl dosud klinicky využit potenciál isotopového zobrazení clearance Tc99-MIGI nádorovým ložiskem, která patrně dobře odráží funkci detoxikační pumpy nádorových buněk vcelku, aniž by bylo nutno ji vyšetřovat morfologicky na mikroskopické úrovni (93).

Jak proliferací-apoptotický index, DNA profil, tak i významné

regulační geny (p53, bcl-2, myc), indikátory angiogeneze a metastatického potenciálu, testy chemoresistence, i faktory nádorové imunosuprese, jsou potenciálně klinicky využitelnými prognostickými a prediktivními biomarkery sarkomů měkkých tkání. Posouvají naše současné, převážně patologicko-anatomické poznání do oblasti patofyziologické, která nabízí více možností pro efektivnější využití stávajících léčebných metod i vyvíjení nových terapeutických postupů. Perspektivu však mají především kombinace biomarkerů, které byly ověřeny jako independentní v multivariační analýze a to v kontextu s klinicko-patologickou klasifikací, kterou by měly v dohledné době doplňovat. Levine (98) například zjistil, že americká varianta klinicko-patologické klasifikace AJCC sarkomů měkkých tkání dosáhne značně vyšší prognostické síly, je-li doplněna o flow cytometrické vyšetření DNA profilu, proliferační aktivitu protilátky proti antigenu Ki67 a exprese produktu MDR1 genu polychemoresistence Pgp (p170) v nádorech imunohistochemicky.

Přestože studií aplikujících jednotlivé biomarkery pro diagnostiku i predikci léčebného efektu u sarkomů měkkých tkání postupně přibývá, chybí dosud komplexněji pojaté analýzy většího počtu parametrů - pokusem stratifikovat sarkomy do několika skupin podle markatních cyklokinetických a cytogenetických rozdílů, které by implikovat i odlišné léčebné postupy. Samotný histologický grading zjevně pro tuto stratifikaci nestačí, je příliš subjektivní, vyžaduje zkušenost obtížně u vzácnějších nádorů získatelnou v krátké době nebo na jednom pracovišti, v histologických vyšetřeních je rutinně stanovován jen v polovině případů, má prognostickou, nikoli prediktivní hodnotu a ve skutečnosti se jeho aplikace na zlepšení léčebných výsledků příliš neprojevila.

Léčebné možnosti u sarkomů měkkých tkání.

Základem léčby sarkomů měkkých tkání zůstává chirurgický výkon. K radikální operaci by mělo být v současné době přistupováno výhradně plánovitě se znalostí nálezu počítačové tomografie a angiografie, které ozřejmí typ růstu sarkomu (expanzivní, infiltrativní), jeho vztahů k okolním strukturám a možnosti zachování dostatečného lemu zdravé tkáně při resekci i zdroje a vydatnosti cévního zásobení.

Součástí předoperačního vyšetření by měla být také histologická verifikace a identifikace typu sarkomu tru-cut (core) biopsií. Probaturní excise vhodné nejsou, dosažení nádoru nemusí být snadné, hrozí implantace nádorových buněk zincidovaného nádoru v operačním poli, u cévnatých nádorů je biopsie spojena s nepříjemným krvácením, navíc otevření kapsuly sarkomu i pooperační infiltrát a jizvení často ztěžují následnou radikální operaci. Tru-cut biopsie je obvykle reprezentativnější pro nádor jako celek včetně míry nekrotizace v centru než excise odebraná s velkou částí reaktivní fibrosní reakce na okraji nádoru (102). Tenkojehlová aspirace pro cytologické vyšetření je u sarkomů měkkých tkání pro typizaci nespolehlivá, vyžaduje hodnocení zkušeným specialistou a lze ji snad využít pouze pro základní odlišení maligního a benigního ložiska (103).

Předoperační biopsie slouží především k průkazu maligního nádoru, zároveň však také pro zjištění histotypu, gradingu a dalších parametrů s prognostickým významem, podle nichž lze volit léčebnou taktiku. Dostí zásadně se proto liší indikace předoperační biopsie u sarkomů končetinových, lokalizovaných ve stěně břišní či hrudní a sarkomů retroperitonea, případně vnitřních orgánů. U končetinových sarkomů s podezřením na sarkom podle CT, sonografie a angiografie by tru-cut biopsie měla být provedena vždy, neměli bychom se spoléhat na to, že ložisko bude nejprve odstraněno a verifikováno dodatečně z resekovaného tumoru (104). Kromě rozsahu nádoru může i typ sarkomu přispět k volbě rozsahu operace od prosté exstirpace přes kompartmentovou resekci až po amputační výkon. Sarkomy hrudní nebo břišní stěny obvykle více operačních alternativ nenabízejí, rozsah výkonu se však může lišit, jde-li o liposarkom nebo maligní fibrosní histiocytom již proto, že rekonstrukční fáze výkonu nemusí být snadná a předoperační histologický náález může přispět k adekvátnímu rozsahu resekce. Histologická verifikace sarkomů retroperitonea

a vnitřních orgánů před operací je indikována pouze relativně, může být obtížná nebo i riziková u vysoce vaskularizovaných ložisek. Navíc upřesnění histotypu a gradingu obvykle neovlivní operační možnosti, které jsou limitovány spíše aktuálními anatomickými vztahy nádoru.

Od původně převažujících amputačních výkonů pro sarkomy končetin se těžiště operací přesunulo ke končetině zachovávajícím výkonům, ať již jde o blokové kompartmentové resekce muskulofasciálních anatomických celků nebo exstirpaci nádoru s dostatečným lemem zdravé tkáně. Nejsou vyloučeny ani rekonstrukční výkony na cévách či skeletu, jsou-li z hlediska zachování onkologické radikality smysluplné a mohou-li zamezit mutilujícím následkům operace (105).

Na druhé straně nemají rekonstrukční výkony jen technické hranice. Vždy by měly být zvažovány s ohledem na pravděpodobnost dosažení dobrého funkčního i onkologického výsledku a také s dokonalou znalostí moderních protetických možností. Právě u končetinových lokalizací sarkomů se nejvíce osvědčuje užší součinnost chirurgů s ortopedy, případně cévními a plastickými chirurgy.

Sarkomy měkkých tkání metastazují do lymfatických uzlin nepoměrně méně často než nádory vycházející z epitelálních tkání. Četnost metastazování sarkomů do uzlin se udává do 15%. Přesto je nutno na možnost uzlinových metastáz myslet, zvláště v případech kdy zvažujeme amputační výkon. Při pochybnostech klinického, sonografického, CT nebo lymfografického vyšetření je jistější provést disekci axily nebo inguiny a náález histologicky ověřit. Při zjevných metastázách je plně indikovaná standardní exenterace axily nebo inguiny. V případě inguinálních metastáz je vždy třeba ověřit také retroperitoneální ilické uzliny v rozsahu ilioinguinální disekce. Postižení ilických uzlin obvykle na inguinální navazuje, je diskretnější, hůře vyšetřitelné, při zanedbání a nezvládnutelné progresi však prakticky neléčitelné a spojené s těžkou symptomatologií cévních a lymfatických blokády.

Resekce sarkomů hrudní a břišní stěny je obvykle spojena s rekonstrukčními problémy, nezřídka je nutno využít lalokových plastik nebo umělého materiálu (105). Resekce sarkomů retroperitonea a pánve mají svá specifika případ od případu a patří k obtížným a špatně plánovatelným výkonům jak břišní chirurgie tak urologie. Často vyžadují resekci přilehlého orgánu, případně rekonstrukci kontinuity digestivního nebo močového traktu. Cévnaté formy sarkomů s venosními pletenými houbovitého charakteru mohou při preparaci způsobit velmi obtížné stavitelné krvácení, především ve fázi, kdy objemný nádor nelze ještě odstranit a jeho masa brání v přístupu k vyživujícím cévám. Novotvořené cévy sarkomů mají stěnu křehkou, defektní a nádorovou tkáň prostupují spíše jako sinusoidy než jako plnohodnotné cévní řečiště. Také ohraničené a méně vaskularizované sarkomy mohou představovat vážný problém, jsou-li lokalizovány v radixu mesenteria a ohrožuje-li jejich resekce cévní výživu střevních kliček.

Zajištění lůžka po resekci sarkomu pooperační radioterapií je doporučovaným postupem u sarkomů s nižším stupněm diferenciací, nádorů infiltrativně rostoucích a při nejistotě o radikalitě operace nebo kontaminaci lůžka nádorovými buňkami (106, 107). Je vhodné, vyznačí-li chirurg nejvíce rizikovou oblast v lůžku nádoru po resekci kovovými svorkami, podle nichž lze radioterapii účinněji cílit. Problematické může být po-operační ozáření lůžka nádoru právě u sarkomů retroperitonea, pánve a dutiny břišní. Sarkomy patří k nádorům vysoce radioresistentním. Jejich účinná léčba zářením vyžaduje aplikovat vysoké dávky, které mohou bezprostředně nebo následnými změnami poškodit přilehlé struktury, zvláště střevo, močovody, žlučové cesty a podobně. Následná postradiační fibrosní reakce v důsledku vysoké lokální dávky záření často ztěžuje nejen detekci, ale zejména reoperaci případných lokálních recidiv, které jsou u sarkomů dosti časté.

Novější metodou lokálního zajištění operované oblasti je intersticiální brachyradioterapie, kterou lze snadno uplatnit u končetinových a nástěnných, nikoli však u nitrobřišních lokalizací sarkomů (108,109). Lůžkem nádoru jsou na způsob Redonových

drénů peroperačně protaženy speciální katetry na jednom konci zatavené ve vzdálenosti asi 15 mm od sebe, vykrývající celou oblast s potřebnou prostorovou geometrií, které jsou po uzavření rány fixovány ve své pozici navlečenými plastovými kroužky. Za 4-5 dnů po operaci je po výpočtu potřebné dávky zahájeno ozařování iridiovými zrny zaváděnými na vypočtenou dobu instalovanými katetry do rány metodou afterloadingu. Ozařování je prováděno obvykle dvakrát denně po dobu 7-8 dní, poté jsou katetry odstraněny. V dosud takto ozařovaných 9 případech jsme nepozorovali žádné závažnější komplikace a zatím ani výskyt recidivy sarkomu v ozařovaném lůžku, i když doba sledování je pro celkové zhodnocení zatím nedostatečná.

Intersticiální brachyterapie je poměrně zavedenou metodou po resekci sarkomů v dětské onkologii, kde má především odvrátit nutnost amputací končetin u pokročilejších sarkomů (110,111). Ojedinelé byl jako zdroj pro brachyterapii úspěšně použit také neutronový zářič californium 252 (112). Dobrý lokální efekt byl zaznamenán také při kombinaci brachyradioterapie a standardní teleradioterapie (113). U sarkomů měkkých tkání dospělých závisí rozvoj aplikací brachyterapie především na soustředění pacientů s touto diagnózou do center vybavených afterloadingem, avšak zejména funkční spolupráci chirurgů či ortopedů a radioterapeutů přímo na operačním sále, respektive již při plánování taktiky léčby (114). Podobně je i intraoperační teleradioterapie prováděna jen výjimečně na speciálně vybavených pracovištích (115).

Z dalších lokálních pomocných metod lze připomenout také kryochirurgickou destrukci neresekabilních ložisek, ať již pro paliaci nezvládnutelného exofytu nebo i jako peroperační doplnění operace v oblasti, kde resekce již není možná nebo hrozí poškozením velkých cév či nervů. Kryodestrukce může být nenáročnou a účinnou paliací, na zevním exofytu ji lze provádět bez znecitlivění, dobře staví difusní kapilární krvácení. V peroperačním použití je výhodou, že nepoškozuje stěnu velkých cév ani v případě, je-li zavzata přímo do sférického úseku zmražené tkáně (iceballu). Neporoučuje ani nervové pochvy, takže axony v nich vedené mohou snadno regenerovat a nervový defekt může být pouze přechodný. Na druhé straně je však účinek standardních u nás užívaných kryochirurgických přístrojů limitován objemem tkáně pouze asi 3 cm do hloubky, výkony lze však při zevních aplikacích po odloučení nekrozy opakovat. Vpichové vícečetné kryody novějších kryochirurgických aparatur jsou schopny zajistit zmrazení i podstatně větších objemů tkáně, nejsou však mimo nádory jater a prostaty zatím širěji využívány.

Použití jiných koagulačních technik jako jsou elektrokoagulace, radiofrekvenční koagulace nebo laserová koagulační a evaporační není dosud u sarkomů měkkých tkání rozpracováno již proto, že nejsou-li tyto nádory soustředěny na specializovaném pracovišti, chybí obvykle také širší zkušenosti s indikací speciálních metod.

Systémová pooperační chemoterapie sarkomů je zjevně v neselektovaném podání nedostatečně účinná. Meta-analýza studií adjuvantní chemoterapie sice prokázala její přínos pro zlepšení výsledků dvouletého i pětiletého celkového přežití, kritéria ani režimy však nejsou dosud standardizovány. Je to obtížné také s ohledem na vysokou heterogenitu jak histogenetického, tak lokalizačního spektra těchto nádorů. Obecně převládá souhlas s indikací adjuvantní chemoterapie u sarkomů málo diferencovaných a infiltrativně rostoucích (116).

Zlepšení výsledků by snad mohla přinést chemoterapie stratifikovaná do skupin podle prediktorů chemorezistence. Známým, nicméně dosud málo využívaným nepřímým markerem chemorezistence vůči cytostatikům s velkou molekulou jako jsou antracykliny, inhibitory topoizomeráz, taxany a vinca alkaloidy, je aktivace transmembránové detoxikační pumpy reprezentované expresí produktu MDR genu P-glykoproteinu (p170) (117). Chemorezistenci sarkomů lze však predikovat také s využitím moderních isotopových vyšetření in vivo jako je 99mTc-MIBI scintigrafie (118). Radiofarmakum hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technecium (Tc-MIBI) se v nádorech akumuluje a jeho eliminace z nádoru závisí na aktivitě P-glykoproteinové pumpy (119). Při dynamickém vyšetření

eliminace Tc-MIBI z nádoru byla prokázána dobrá korelace s odpovědí na léčbu antracykliny (93,118).

Další možností predikce efektu chemoterapie je aplikace přímých MTT testů chemorezistence in vitro v primokulturách jak je u nás zavedl pro klinický výzkum Hajdúch. Z jeho výsledků u našich 22 pacientů se sarkomy měkkých tkání vyplývá vysoký stupeň rezistence in vitro k doxorubicinu (80%), který je u sarkomů měkkých tkání nejčastěji klinicky užívaným cytostatikem. Naopak nízká rezistence pro aktinomycin D (0%), topotecan (0%), bleomycin (25%), cisplatinu (35%) ukazuje na potřebu individualizovaného přístupu na rozdíl od dosavadní paušalizace léčebných režimů (57). V experimentech i klinické praxi se již objevily zprávy odpovídající uvedeným výsledkům a poukazující například na dobré výsledky topotecanu (116, 120, 121, 122) nebo cisplatinu (124) u sarkomů. Je také potvrzována dobrá korelace mezi chemorezistencí in vitro a odpovědí in vivo (125). V naší skupině bylo 17 z 22 sarkomů citlivých alespoň na jedno testované cytostatikum, nicméně 5 (23%) vykazovalo polychemorezistenci na všechna testovaná cytostatika (57).

Předoperační regionální intraarteriální chemoterapie, která je proveditelná pouze u sarkomů končetin, případně jiných lokalit s definovaným a přístupným arteriálním zdrojem, nabízí jak možnost redukce a devitalizace nádorového ložiska tak i ověření citlivosti k danému cytostatiku in vivo (126-128). Výsledek této léčby zatím neumíme předpovědět z histologických charakteristik nádoru ani z úrovně vaskularizace nádoru. U jedné třetiny jsme ovšem pozorovali určitou regresí, výjimečně až výraznou nekrotizaci nádoru, které částečně ovlivnily i rozsah operačního výkonu. Naše omezené zkušenosti však vycházejí pouze z intraarteriální aplikace doxorubicinu, aniž jsme zkoušeli jiná cytostatika, která se v testech in vitro zdají být i účinnější.

Regionální chemoterapii lze dosáhnout v oblasti nádoru výrazně vyšších koncentrací cytostatika, takže jde vlastně o jakousi formu místně omezené vysokodávkované chemoterapie, která je prostě těžké systémové toxicity známé z celkové vysokodávkované chemoterapie vyžadující podporu hemopoetickými buňkami. Přesto je však do značné míry limitována jako systémová chemoterapie individuální primární nebo sekundární chemorezistencí nádoru (129).

Zlepšených výsledků regionální chemoterapie končetinových sarkomů doxorubicinem bylo dosaženo izolovanou hypertermickou perfuzí zvyšující teplotu v tumoru během působení cytostatik až na 40,5 st. C (126). Snaha kombinovat předoperační intrarteriální chemoterapii s předoperační radioterapií (10 x 3,5 Gy) sice umožnila vyhnout se amputaci až v 90% případů, byla však následována značnou morbiditou což poněkud znehodnocuje výsledky záchranných operací (128). V regionálním podání již byla u sarkomů zkoušena také genová terapie aplikací supresorového genu p53 na adenovirovém vektoru (130). U velké části sarkomů je protein p53, označovaný za strážce genomu, mutovaný nebo jinak dysfunkční, což jednak umožňuje vstupovat do cyklu buňkám s alterovaným genomem a jednak brání jejich přirozené eliminaci apoptózou. Tato situace je velmi nepříznivá pro účinky chemoterapie. Nádorové buňky s genomem poškozeným podáními cytostatiky nejen nezanikají, ale mohou generovat i nové agresivnější populace. Regionální podání adenoviru nesoucího funkční gen p53 vychází z představy možné reparace funkce p53 v nádorových buňkách in situ a vytvoření lepších podmínek pro následnou chemoterapii. Perspektivním přístupem se zdá také selektivní regionální aplikace combretastatinu, nového typu anti-angiogenních látek působících rychlé zhroucení cytoskeletu endoteliálních buněk, kolaps a uzávěr cévního řečiště v perfundované oblasti.

Organizační opatření

Je nesporné účelné soustřeďovat malignity s nízkou incidencí, v tomto případě sarkomy měkkých tkání, na pracoviště nebo do péče týmů, které mohou zajistit komplexní přístup a kvalifikované rozhodování, dále zkvalitňované průběžně rozvíjenou zkušeností celé kooperující skupiny odborníků. V brněnském regionu pracuje taková skupina již celá desetiletí. Vznikla zásluhou již zesnulého doc.Bozděcha při I.ortopedické klinice FN u sv. Anny v úzké součinnosti s onkology prim. Mechlem a prim. Konečným z

Onkologického ústavu na Žlutém kopci. V posledních dvou letech doznala pod vedením doc. Janíčka z I. ortopedické kliniky rozšíření, zintenzivnila svou činnost a kromě ortopedů, chemoterapeutů, radioterapeutů, všeobecných a hrudních chirurgů se na její práci podílejí také patologové, radiodiagnostici a dětské onkologové prakticky ze všech brněnských onkologických a onkochirurgických pracovišť. Indikační komise se schází každé 3 – 4 týdny a i přes relativně nízkou incidenci sarkomů ve srovnání s ostatními maligními nádory je na každé schůzce řešeno kolem dvaceti až třiceti případů odesílaných prakticky z celé Moravy. Dalším nezbytným krokem takto koncipované kooperace v počítačovém věku je přechod na parametrický onkologický záznam jak je navržen na internetových stránkách Univerzitého onkologického centra pod názvem SOR2000 (smart oncological record), aby zkušenosti mohly být zpracovány a vyhodnocovány v zájmu optimalizace léčby a zlepsování jejich výsledků. To je ostatně vlastním smyslem existence a práce onkologických kooperativních skupin. Dalším nezbytným úkolem kooperativní skupiny je přispívat k řešení kontroverzí, nejasností a indikací nově zaváděných metod, které se na diagnostické i terapeutické úrovni vyskytují, a právě tomuto cíli má přispět i následující přehled.

Závěr

Zatím bohužel platí, že o celkové léčebné taktice u nemocných se sarkomy měkkých tkání rozhodují nejvíce lokální podmínky, zkušenosti a možnosti pracovišť, a relativně méně celková koncepce léčby těchto závažných onemocnění, která by byla vedena prognostickými parametry a prediktory léčebného efektu, a využívala celého spektra léčebných možností. Podobně jako u jiných onkologických diagnóz zatím chybí jednotný parametrický onkologický záznam, který by umožňoval hodnotit léčebné výsledky a srovnávat různé postupy. Sarkomy měkkých tkání jsou relativně méně časté a umožňují soustředění do několika komplexně vybavených center, jejichž příkladem může být činnost brněnské skupiny pracovišť pro diagnostiku a léčbu sarkomů měkkých tkání soustředěných v rámci Univerzitého onkologického centra (<http://www.uoc.muni.cz>).

Zejména pokrok v oblastech subcelulární diagnostiky a analýzy výsledků léčby je náročnějším i naléhavějším úkolem než nahodilá a nesystémová aplikace dílčích terapeutických novinek.

Práce byla podpořena granty IGA MZ CR NM14-3 a MSMT CR J07/98-141100003.

Literatura:

- Weiss SW, Sobin LH.: Histological typing of soft tissue tumours. 2nd edition: WHO International Classification of Tumours. Springer Verlag, Berlin, Germany 1994
- Trojan M, Contesso G, Coindre JM et al.: Soft tissue sarcomas of adults: study of pathological prognostic variables and definition of a histopatho
- Angervall L, Kindblom LG, Merck C.: Myxofibrosarcoma, a study of 30 cases, *Acta Pathol Microbiol Scand(A)*, 85, 1977, 127-140
- Angervall L, Kindblom LG, Rydholm A et al.: The diagnosis and prognosis of soft tissue tumors. *Semin Diagn Pathol*, 3, 1986, 240-258
- Brooks JJ: The significance of double phenotypic pattern markers in human sarcomas. A new model of mesenchymal differentiation. *Am J Pathol*, 125, 1986, 113-123
- Costa MJ, Weiss SW.: Angiomatoid malignant fibrous histiocytoma. A follow-up study of 108 cases with evaluation of possible histologic predictors of outcome. *Am J Surg*, 14, 1990, 1126-1132
- Fletcher CDM.: Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: fact or fiction? A critical reappraisal based on 159 tumors diagnosed as pleomorphic sarcomas. *Am J Surg Pathol*, 16, 1992, 213-228
- Meis JM: „Dedifferentiation“ in bone and soft tissue tumors: a histological indicator of tumor progression. In: *Pathol Annual 1991, Part I* (eds.: Rosen PP and Fechner RE) Appelton and Lange, Norwalk 1991, 37-62
- Meis JM, Enzinger FM: Chondroid lipoma: a unique tumor simulating liposarcoma and myxoid chondrosarcoma. *Am J Surg Pathol*, 17, 1993, 1103-1112
- Santa Cruz DJ, Kyriakos M.: Aneurysmal fibrous histiocytoma of the skin. *Cancer*, 47, 1981, 2053-2061
- Weiss SW, Enzinger FM.: Myxoid variant of malignant fibrous histiocytoma. 39, 1977, 1672-1689.
- Costa J, Wesley RA, Glatstein E et al.: The grading of soft tissue sarcomas: results of a clinicohistopathological correlation in a series of 163 cases. *Cancer*, 53, 1984, 530-541
- Guillou L, Coindre JM, Bonichon F et al.: Comparative study of the National Cancer Institute and French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group grading system in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*, 15, 1997, 350-362
- Adam Z, Doubek M, Mayer J, Vorlíček J: REAL klasifikace maligních lymfoproliferativních nemocí, jejich imunofenotypické znaky a klinická charakteristika. *Klinická onkologie*, 11, 1998, Suppl., 2-16
- Coindre JM, Trojan M, Contesso G.: Reproducibility of a histopathologic grading system for adult soft tissue sarcoma. *Cancer*, 58, 1986, 306-309
- Cany L, Stoeckle E, Coindre JM et al.: Prognostic factors in superficial adult soft tissue sarcomas: analysis of a series of 105 patients. *J Surg Oncol*, 71, 1999, 4-9
- Singer S, Corson JM, Gonin R et al.: Prognostic factors predictive of survival and local recurrence for extremity soft tissue sarcoma. *Am Surg*, 219, 1994, 165-173
- Association of directors of anatomic and surgical pathology: Recommendation for reporting soft tissue sarcomas. *Am J Clin Pathol*, 111, 1999, 594-598
- Meis-Kindblom JM, Bjerkehaug B, Böhling T et al.: Morphologic review of 1000 soft tissue sarcomas from the Scandinavian Sarcoma Group Register. *Acta Orthop Scand (Suppl 285)*, 70, 1999, 18-26
- Busam KJ, Fletcher CDM.: The clinical role of molecular genetics in soft tissue tumor pathology. *Cancer Meta Rev*, 16, 1997, 207-227
- Xiao S, Renshaw A, Cibas ES et al.: Novel fluorescence in situ hybridisation approaches to solid tumors. *Am J Pathol*, 147, 1995, 896-904
- Talati A, Pervaz S: Soft tissue sarcomas: pattern diagnosis or entity. *JPM A J Pak Med Assoc*, 48, 1998, 272-275
- Singer S: New diagnostic modalities in soft tissue sarcoma. *Semin Surg Oncol*, 17, 1999, 11-22
- Dockhorn-Dworniczak B, Schafer KL, Blasius S et al.: Assessment of molecular genetic detection of chromosome translocations in the differential diagnosis of pediatric sarcomas. *Klin Padiatr* 209, 1997, 156-164
- Aurias A, Rimbaut C, Buffe D et al.: Translocation involving chromosome 22 in Ewing's sarcoma: a cytogenetic study of four fresh tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 12, 1984, 21-29
- Jeon IS, Davis JN, Braun BS et al.: A variant Ewing's sarcoma translocation(7;22) fuses the EWS gene to the ETS and ETV1. *Oncogene*, 10, 1995, 1229-1234
- Noguera R: Cytogenetics and tissue culture of small round cell tumors of bone and soft tissue. *Semin Diagn Pathol*, 13, 1996, 171-183
- Shapiro DN, Sublett JE, Li B et al.: Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Research*, 53, 1993, 5108-5112
- Scrabble H, Witte D, Shimada H et al.: Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chrom Cancer*, 1, 1989, 23-35
- Thornor P, Squire J, Chilton-MacNeill S et al.: Is the EWS/FLI-1 fusion transcript specific for Ewing's and peripheral primitive neuroectodermal tumor? *Am J Pathol*, 148, 1996, 1125-1138
- Biegel JA, Conrad K, Brooks JJ: Translocation (11;22)(p13;q12): primary change in intraabdominal desmoplastic small round cell tumor. *Genes Chromosome Cancer* 7, 1993, 119-121
- Argatoff LH, O'Connell LX, Mathers JA et al.: Detection of EWS/WT1 gene fusion by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the diagnosis of desmoplastic small round cell tumor. *Am J Surg Pathol*, 20, 1996, 406-412
- Limon J, Mrozek K, Mandahl A et al.: Cytogenetics of synovial sarcoma: presentation of ten cases and review of the literature. *Genes Chromosome Cancer*, 3, 1991, 338-345
- Clark J, Rocques PJ, Crew AJ et al.: Identification of novel genes SYT a SSX involved in t(X;18)(p11.2;q 11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet*, 7, 1994, 502-508
- Iyengar V, Linenberger AS, Kerman S et al.: Synovial sarcoma of the heart. Correlation with cytogenetic findings. *Arch Pathol Lab Med*, 119, 1995, 1080-1082
- Roberts CA, Seemayer TA, Neff JR et al.: Translocation (X;18) in primary synovial sarcoma of the lung. *Cancer Genet Cytogenet*, 88, 1996, 49-52
- Crozat A, Aman P, Mandahl A et al.: Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in myxoid liposarcoma. *Nature* 363, 1993, 640-644
- Enzinger FM, Shiraki M: Extraskletal myxoid chondrosarcoma. An analysis of 34 cases. *Huma Pathol* 3, 1972, 421-435
- Bernitzke S, Van de Ven W, Bullerdiek J: Cytogenetic and molecular analysis of aggressive angiosarcoma. *Am J Pathol*, 147, 1995, 580-585
- Granados R, Cibas ES, Fletcher JA.: Cytogenetic analysis of effusions from malignant mesothelioma. A diagnostic adjunct to cytology. *Acta Cytol*, 38, 1994, 711-717
- Bridge JA, Seekantaiah C, Neff R et al.: Cytogenetic findings in clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses. Malignant melanoma of soft parts. *Cancer Genet Cytogenet*, 52, 1991, 101-106
- El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M, Knuutila S, Andersson LC: DNA copy number losses in chromosome 14: an early change in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 56, 1996, 3230-3233
- Katenkamp D, Mentzel T, Kosmehl H: CD34 detection—an immunohistochemical contribution to differential diagnosis of soft tissue tumors. *Pathologie* 17, 1996, 195-201
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y et al.: Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279, 1998, 577-580
- Plaet BEC, Muntinghe FLH, Molenaar WM et al.: Clinical outcome of patients with previously untreated soft tissue sarcomas in relation to tumor grade, DNA ploidy and karyotype. *Int.J.Cancer (Pred.Oncol.)*, 74, 1997, 396-402
- Markhede G, Angervall L, Stener B.: A multivariate analysis of the prognosis after surgical treatment of malignant soft tissue tumors. *Cancer*, 49, 1982, 1721-1733
- Heslin MJ, Lewis JJ, Nadler E et al.: Prognostic factors associated with long-term survival for retroperitoneal sarcoma: implications for management. *J Clin Oncol*, 15, 1997, 2832-2839
- Gustafson P: Soft tissue sarcoma: epidemiology and prognosis in 508 patients. *Acta Orthop Scand*, 65, 1994 (Suppl 259) 1-31
- Rydholm A, Rooser B.: Surgical margins for soft tissue sarcoma. *J Bone Joint Surg (Am)*, 69, 1987, 1074-1078
- Sastre-Garau S, Coindre JM, Leroy A et al.: Predictive factors for complete removal of soft tissue sarcomas: a retrospective analysis in a series of 592 cases. *J Surg Oncol*, 65, 1997, 175-182
- Bauer HK, Kreibitz A, Tribukait B.: DNA content prognostic in soft tissue sarcoma: 102 patients followed for 1-10 years. *Acta Orthop*
- Alho A, Skjeldal S, Melvik JE et al.: The clinical importance of DNA synthesis and aneuploidy in bone and soft tissue tumors. *Anticancer Res* 13, 1993, 2383-2387

53. el-Naggar AK, Garcia GM: Epithelioid sarcoma: flow cytometric study of DNA content and regional DNA heterogeneity. *Cancer*, 74, 1994, 3227-3233
54. Alvegard TA, Berg NO, Baldetrop B et al.: Cellular DNA content and prognosis of high grade soft tissue sarcoma: the Scandinavian Sarcoma Group Experience. *J Clin Pathol*, 8, 1990, 538-547
55. Stock C, Ambros IM, Mann G et al.: Detection of 1p36 deletions in paraffin sections of neuroblastoma tissues. *Genes Chromosom Cancer* 61, 1993, 1-9
56. Calonje E, Fletcher CDM: Immunohistochemistry and DNA flow cytometry in soft tissue sarcomas. *Hematol Oncol Clin North Amer*, 9, 1995, 657-675
57. Žaloudík J et al.: Biomarkery pro optimalizaci léčby sarkomů měkkých tkání. Závěrečná zpráva grantového projektu NM14-3 IGA MZ ČR. Brno 2000
58. Shapiro DN, Parham DM, Douglas EC et al.: Relationship of tumor cell ploidy to histologic subtype and treatment outcome in children and adolescent with unresectable rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol*, 9, 1991, 159-166
59. Kihara S, Nelsen-Cannarek A, Kirsch WM et al.: A comparative study of apoptosis and cell proliferation in infantile and adult fibrosarcomas. *Am J Clin Pathol*, 106, 1996, 493-497
60. Levine AJ: The p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*, 326, 1992, 1350-1352
61. Blasenbren S, Baretton GB, Bender C et al.: TP53 gene aberrations in chondromatous neoplasms: correlation with immunohistochemical p53 accumulation and MDM2 expression. *Verh Dtsch Ges Pathol*, 82, 1998, 284-289
62. Drobňák M, Latres E, Pollack D et al.: Prognostic implication of p53 overexpression and high proliferation index of Ki67 in adult soft-tissue sarcomas. *J Natl Cancer Inst*, 86, 1994, 549-554
63. Holmgren L, Jackson G, Arbiser J.: p53 induces angiogenesis-restricted dormancy in a mouse fibrosarcoma. *Oncogene*, 17, 1998, 819-824
64. Zietz, C, Rossle, M, Haas, C et al.: MDM-2 oncoprotein overexpression, p53 gene mutation and VEGF up-regulation in angiosarcomas. *Am J Pathology*, 153, 1998, 1425-1433
65. Barrios C, Castresana JS, Kreicbergs A: Clinicopathologic correlations and short-term prognosis in musculoskeletal sarcoma with c-myc oncogene amplification. *Am J Clin Oncol*, 17, 1994, 273-276
66. Royds JA, Robinson MH, Stephenson TJ, Rees RC, Fisher C: The association between nm23 gene expression and survival in patients with sarcomas. *Br J Cancer* 75, 1997, 1195-1200
67. Hashimoto M, Ohsawa M, Ohnishi A, Naka N, Hirota S, Kitamura Y, Aozasa K: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNA in angiosarcoma. *Lab Invest* 73, 1995, 859-863
68. Tomlinson J, Barsky SH, Nelson S et al.: Different patterns of angiogenesis in sarcomas and carcinomas. *Clin Cancer Res* 5, 1999, 3516-3522
69. Emoto M, Iwasaki H, Ishiguro M et al.: Angiogenesis in carcinosarcomas of the uterus: differences in the microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor between the epithelial and mesenchymal elements. *Hum Pathol*, 30, 1999, 1232-1241
70. Verheul HM, Hoekman K, Lupu F et al.: Platelet and coagulation activation with vascular endothelial growth factor generation in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* 6, 2000, 166-171
72. Zhang Y, Deng Y, Luther T et al.: Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 94, 1994, 1320-1327
71. Mori A, Arii S, Furutani M et al.: Vascular endothelial growth factor-induced tumor angiogenesis and tumorigenicity in relation to metastasis in a HT1080 human fibrosarcoma cell model. *Int J Cancer*, 80, 1999, 738-743
73. Angelov L, Salhia B, Roncari L et al.: Inhibition of angiogenesis by blocking activation of the vascular endothelial growth factor receptor 2 leads to decreased growth of neurogenic sarcomas. *Cancer Research*, 59, 1999, 5536-5541
74. Borgstrom P, Hillan KJ, Sriramarao P, Ferrara A: Complete inhibition of angiogenesis and growth of microtumors by anti-vascular endothelial growth factor neutralizing antibody: novel concepts of angiostatic therapy from intravital videomicroscopy. *Cancer Res* 56, 1996, 4032-4039
75. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara A: Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997 Oct 15; 57(20):4593-4599
76. Schweigerer L, Neufeld G, Mergia A et al.: Basic fibroblast growth factor in human rhabdomyosarcoma cells: implications for the proliferation and neovascularization of myoblast-derived tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 1987, 842-846
77. Hansen S, Grabau DA, Sorensen FB et al.: Vascular grading of angiogenesis: prognostic significance in breast cancer. *Br J Cancer*, 82, 2000, 339-347
78. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D et al.: Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95, 2000, 952-958
79. Chiba Y, Taniguchi T, Matsuyama K et al.: Tumor angiogenesis, apoptosis, and p53 oncogene in stage I lung adenocarcinoma. *Surg Today* 29, 1999, 1148-1153
80. Nordmark M, Hoyer M, Keller J et al.: The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 35, 1996, 701-708
81. Talač R, Horniak J, Žaloudík J et al.: Nevnavizivní stanovení perfuze jaterních metastáz kolorektálního karcinomu pomocí Power Dopplera. Miniinvasivní terapie, 3, 1998, 54-58
82. Taylor JS, Tofts PS, Port R et al.: MR imaging of tumor microcirculation: promise for the new millennium. *J Magn Reson Imaging*, 10, 1999, 903-907
83. Lee SH, Jang LL, Lee JY et al.: Immunohistochemical analysis of Fas ligand expression in sarcomas. *APMIS*, 106, 1998, 1035-1040
84. Koutny HU, Lehmbecher MM, Channock SJ et al.: Simultaneous expression of Fas and nonfunctional Fas ligand in Ewing's sarcoma. *Cancer Res*, 58, 1998, 5842-5849
85. Mechtersheimer G, Staudter M, Majdic O, Dorken B, Moldenhauer G, Moller P: Expression of HLA-A,B,C, beta 2-microglobulin (beta2-m), HLA-DR, -DP, -DQ and of HLA-D-associated invariant chain (Ii) in soft-tissue tumors. *Int J Cancer* 46, 1990, 813-823
86. Swanson PE, Wick MR: HLA-DR (Ia-like) reactivity in tumors of bone and soft tissue: an immunohistochemical comparison of monoclonal antibodies LN3 and LK8D3 in routinely processed specimens. *Mod Pathol* 3, 1990, 113-119
87. Hochhauser D, Schnieders B, Ercikan-Abali E et al.: Effect of cyclin D1 overexpression on drug sensitivity in a human fibrosarcoma cell line. *J Natl Cancer Inst*, 88, 1996, 1269-1275
88. Kusuzaki K, Hashiguchi S, Hirata M et al.: Response of DNA ploidy to chemotherapy in primary and metastatic lesions in human osteosarcomas. *Cancer Lett*, 138, 1999, 159-165
89. Nakanishi H, Myoui A, Ochi T et al.: P-glycoprotein expression in soft-tissue sarcomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, 123, 1997, 352-356
90. Rosier RN, O'Keefe RJ, Teot LA et al.: P-glycoprotein expression in cartilaginous tumors. *J Surg Oncol*, 65, 1997, 95-105
91. Prados J, Melguizo C, Fernandez A et al.: Inverse expression of mdr1 and c-myc genes in a rhabdomyosarcoma cell line resistant to actinomycin D. *J Pathol*, 180, 1996, 85-89
92. Cowie FJ, Pritchard-Jones K, Renshaw J et al.: Multidrug resistance modulation in rhabdomyosarcoma and neuroblastoma cell lines. *Int J Oncol* 12, 1998, 1143-1149
93. Soderlund V, Larsson SA, Bauer HCF et al.: Use of 99m-MIBI scintigraphy in the evaluation of the response of osteosarcoma to chemotherapy. *Eur J Nucl Med*, 24, 1995, 511-515
98. Levine EA, Holzmayer T, Bacus S et al.: Evaluation of newer prognostic markers for adult soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol*, 15, 1997, 3249-3257
99. Kern DH, Weisenthal LM: Highly specific prediction of antineoplastic drug resistance with an in vitro assay using suprapharmacologic drug exposures. *J Natl Cancer Inst*, 82, 1990, 582-584
100. Dendy PP, Bozman G, Wheeler TK.: In vitro screening test for human malignant tumors before chemotherapy. *Lancet*, 2, 1970, 68-72
101. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdara AF et al.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47, 1987, 936-942
102. Barth RJ, Merino MJ, Solomon D et al.: A prospective study of the value of core needle and fine needle aspiration in the diagnosis of soft tissue masses. *Surgery*, 112, 1992, 536-543
103. Kilpatrick SE, Geisinger KR: Soft-tissue sarcomas: the usefulness and limitations of fine needle aspiration biopsies (review). *Am J Clin Pathol*, 110, 1998, 50-68
104. Varma DGK: Optimal radiologic imaging of soft tissue sarcomas. *Semin. Surg Oncol*, 17, 1999, 2-10
105. Langstein HN, Robb GL: Reconstructive approaches in soft tissue sarcomas. *Semin Surg Oncol*, 17, 1999, 52-65
106. Wylie JP, O'Sullivan B, Catton C: Contemporary radiotherapy for soft tissue sarcoma. *Semin Surg Oncol*, 17, 1999, 33-46
107. Calais G: Role of radiotherapy in soft tissue sarcoma. *Cancer Radiotherapy* 1, 1997, 457-461
108. Chaudhary AJ, Laskar S, Badhwar R: Interstitial brachytherapy in soft tissue sarcomas. The Tata Memorial Hospital experience. *Strahlenther Onkol*, 174, 1998, 522-528
109. Koizumi M, Inoue T, Yamazaki H et al.: Perioperative fractionated high-dose rate brachytherapy for malignant bone and soft tissue tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43, 1999, 989-993
110. Nag S, Martinez-Monge F, Ruymann F et al.: Innovation in the management of soft tissue sarcomas in infants and young children: high-dose-rate brachytherapy. *J Clin Oncol*, 15, 1997, 3075-3084
111. Nag S, Fernandes PS, Martinez-Monge R et al.: Use of brachytherapy to preserve function in children with soft tissue sarcomas. *Oncology*, 13, 1999, 361-369
112. Fontanesi M, Zalupski M, Chuba P et al.: Californium 252 in the treatment of soft tissue sarcoma. In: Wierzbicki JG (ed.): *Isotope for 21st Century Radiotherapy*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands 1997, 203-207
113. O'Connor NJ, Pritchard DJ, Gunderson JJ.: Integration of limb-sparing surgery, brachytherapy and external beam irradiation in the treatment of soft tissue sarcomas. *Clin Orthop Relat Res*, 289, 1993, 73-80
114. Pisters PWT, Harison LB, Leung DHY et al.: Long term results of a prospective random trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*, 14, 1996, 859-868
115. Sindelar WF, Kinsella TJ, Chen PW: Intraoperative radiotherapy in retroperitoneal sarcomas. Final results of a prospective randomized trial. *Arch Surg*, 128, 1993, 402-410
116. Patel SR, Benjamin RS: New chemotherapeutic strategies for soft tissue sarcomas. *Semin Surg Oncol*, 17, 1999, 47-51
117. Hoffmann J, Schmidt-Peter P, Hansch W, Naundorf H et al.: Anticancer drug sensitivity and expression of multidrug resistance markers in early passage human sarcomas. *Clin Cancer Res*, 5, 1999, 2198-2204
118. Fujii H, Nakamura K, Kubo A et al.: 99mTc-MIBI scintigraphy as an indicator of the chemosensitivity of anthracyclines in patients with breast cancer. *Anticancer Res*, 18, 1998, 4601-4605
119. Caner B, Kitapci M, Aras T et al.: Increased accumulation of hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium in osteosarcoma and its metastatic lymph nodes. *J Nucl Med*, 32, 1991, 1977-1978
120. Van Oosterom AT, Verweij J: New drugs for the treatment of sarcomas. *Hematol Oncol Clin North Amer*, 9, 1995, 909-925
121. Bramwell VH, Eisenhauer EA, Blackstein M et al.: Phase II study of topotecan in patients with recurrent metastatic soft tissue sarcoma. *Ann Oncol*, 6, 1995, 847-849
122. Thompson J, George EO, Poquette CA et al.: Synergy of topotecan in combination with vincristine for treatment of pediatric solid tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 5, 1999, 3617-3631
123. Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K et al.: Cisplatin specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 45, 2000, 199-206
124. Pawlik CA, Houghton PJ, Stewart CF et al.: Effective schedules of exposure of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma xenografts to topotecan correlate with in vitro assays. *Clin Cancer Res*, 4, 1998, 1995-2002
126. Rossi CR, Vecchiato A, Foletto M et al.: Phase II study on neoadjuvant hyperthermic-antiblastic perfusion with doxorubicin in patients with intermediate or high grade limb sarcomas. *Cancer*, 73, 1994, 2140-2146
127. Wanebo HJ, Temple WJ, Popp MB et al.: Preoperative regional therapy for extremity sarcoma. A multicenter update. *Cancer*, 75, 1995, 2299-2306
128. Nijhuis PH, Pras E, Sleijfer DT et al.: Long-term results of preoperative intra-arterial doxorubicin combined with neoadjuvant radiotherapy, followed by extensive surgical resection for locally advanced soft tissue sarcomas of the extremities. *Radiother Oncol*, 51, 1999, 15-19
129. Pisters PWT, Patel SR, Varma DGK et al.: Preoperative chemotherapy for stage IIIB extremity soft tissue sarcoma: long-term results from a single institution. *J Clin Oncol*, 15, 1997, 3481-3487
130. Milas M, Feig B, Yu D et al.: Isolated limb perfusion in the sarcoma bearing rat: a novel preclinical gene delivery system. *Clin Can Res* 3, 1997, 2197-2204

NĚKOLIK POZNÁMEK K MOLEKULÁRNÍ GENETICE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

SOME REMARKS TO THE MOLECULAR GENETIC OF COLORECTAL CANCER

KUBÁČKOVÁ K.¹⁾, PRAUSOVÁ J.¹⁾, HOCH J.²⁾

¹⁾ ONKOLOGICKO-RADIOTERAPEUTICKÉ ODDĚLENÍ FAKULTNÍ NEMOCNICE V MOTOLE, PRAHA

²⁾ I. CHIRURGICKÁ KLINIKA FAKULTNÍ NEMOCNICE V MOTOLE

Souhrn: Kolorektální karcinom (KRK) je jedním z největších zdravotních problémů v rozvinutých zemích, neboť představuje druhé místo v úmrtnosti na zhoubné nádory a to jak u mužů tak i žen. Přestože etiologie KRK jako i u ostatních zhoubných tumorů není známa, bylo prokázáno několik faktorů, které souvisejí se vznikem KRK. Kromě faktorů zevního prostředí a stravovacích návyků, důležité místo v etiopatogenezi zaujímají genetické faktory, ať již hereditární či nehereditární. Z hereditárních onemocnění je nejvíce prostudována familiární adenomatosní polyposa s APC genem a hereditární nepolypózní kolorektální karcinom s patognomickými mutacemi na chromosomech 2p a 3p, s přítomností mikrosatelitové instability. U sporadicky se vyskytujícího kolorektálního karcinomu hraje významnou úlohu p53 - tzv. strážce genomu. Mimo mutace tohoto supresorového genu jsou popisovány i mutace na chromosomech 5q a 18q a další genetické změny jako amplifikace a změny methylace DNA. Kolorektální karcinom v dnešní době představuje nejlépe prostudovaný proces z pohledu molekulární genetiky, který otvírá i možnosti pro výzkum genetických změn dalších onemocnění.

Klíčová Slova: FAP, HNPCC, p53, APC gen, amplifikace, methylace.

Summary: Colorectal cancer is a significant health problem in the developed countries, it is the second leading cause of cancer death in both males and females. Although the specific etiology, like in other tumors, is unknown, some environmental, dietary and genetic, as well as hereditary and nonhereditary factors are considered to play an important role in the development of CRC. The two best defined inherited diseases are Familial Adenomatous Polyposis (FAP) with APC gene mutation and Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC) with specific mutation on chromosomes 2p and 3p with microsatellite instability (MSI). Mutation of the p53 gene, guardian of the genome, seems to be a critical step in the progression of sporadic CRC. Not only mutation of this suppressor gene but also mutations on chromosome 5q and 18q has been identified together with either genetic changes such as amplification and methylation of DNA. Colorectal cancer is one of the best characterized tumors from molecular genetic point of view and serves as a model for the study of genetic abnormalities for many other neoplasms.

Key Words: FAP, HNPCC, p53, APC gene, amplification, methylation.

Adenomy a adenomatosní polypy jsou považovány za prekursorovou lézi s charakteristikami nekontrolovatelného buněčného dělení a poruchou jejich diferenciační procesů. Většina KRK nevzniká de novo, ale na bázi těchto lézí postupnou akumulací těchto změn. Díky jejich poměrně lehké dostupnosti pro biotické vyšetření, můžeme sledovat vývoj přes dysplastické slizniční změny až po invazivní karcinom. Molekulární biologie KRK je v současnosti jedna z nejvíce prostudovaných a stala se vzorem pro výzkum dalších nádorů (1).

Rodinný výskyt CRC byl prokázán až u 15 % nemocných.

HEREDITÁRNÍ FORMY KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Familiární adenomatosní polyposa (FAP)

FAP představuje asi 0.5% výskytu všech KRK s maximem výskytu mezi 20-30 rokem.

Jediný gen APC (adenomatosní polyposis coli), lokalizovaný na 5q21-22, je zodpovědný za výskyt FAP. Tento supresorický gen byl poprvé klonován a sekvencován v roce 1991.

Příčinou funkční inaktivace proteinu APC genu jsou mutace a delece, které nacházíme u 2/3 rodin s FAP a Gardnerovým syndromem (2).

Kromě klasické FAP, byla popsána její mírnější forma, tzv. AAPC (attenuated APC), s mutacemi vyskytujícími se

především v prvních čtyřech exonech. AAPC je charakterizována přítomností nižšího počtu adenomatosních polypů (obvykle méně než 100) (3). U jedinců s AAPC dochází k vývoji KRK asi o 15 let později než u nemocných s APC, ale o 10 let dříve než u sporadického KRK.

Stejně mutace APC byly popsány i u Gardnerova syndromu (nádory měkkých tkání, osteomy, pozdní anomálie, kongenitální hypertrofie retinálního pigmentového epitelu). Jedná se tedy o stejný syndrom, ale s jiným fenotypem, který je ovlivněn genetickými či zevními vlivy.

Také u některých jedinců s Turcotovým syndromem (střevní polyposa spojená s mozkovými nádory) byly prokázány zárodečné mutace v APC.

Při diagnóze u dětí ve věku 12-13 let z rodin s prokázanou FAP je dáována přednost genetickému vyšetření před invazivní sigmoidoskopii. Endoskopie zůstává vyhrazena pro jedince, kde nebyla mutace diagnostikována. Profylaktická kolektomie zůstává jednoznačnou indikací u jedinců s FAP.

Nemocní s FAP mají také vyšší riziko vzniku nádorů štítné žlázy, tenkého střeva, žaludku a mozku (4).

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) HNPCC, autosomálně dominantně dědičné onemocnění je zodpovědné za výskyt 2-4% CRC.

Klinicky rozlišujeme Lynchův syndrom I, s výskytem

vícečetných KRK v časném věku v několika generacích, a Lynchův syndrom II, který se kromě střevních karcinomů vyznačuje časným výskytem karcinomů ovaria, pankreatu, hepatobiliárního traktu, endometria.

Až u 90 % jedinců nesoucích specifické mutace pro HNPCC dojde k vývoji kolorektálního karcinomu. Karcinomy spojené s touto diagnosou jsou často špatně diferencované a produkují extracelulární mucin. Pro diagnosu HNPCC existuje několik klinických kritérií, nejpřísnější jsou kritéria Amsterodamská (výskyt KRK u tří příbuzných v první linii a u nejméně dvou dalších jedinců v různých generacích, u všech musí dojít ke vzniku KRK před 50 rokem) (5). Asi 10 % nemocných s KRK má v první linii příbuzného s KRK. Genetickým podkladem tohoto syndromu jsou mutace na chromosomu 2p (hMSH2) a 3p (hMLH1). Produkty těchto genů patří do skupiny proteinů, které jsou zodpovědné za poznání chybného párování basí při replikaci DNA a podílejí se na jejich reparaci. Nosiči těchto mutací mají typický fenotyp, nazývaný mikrosatelitovou instabilitou, která je charakterizována multifokálním rozšířením či naopak zkrácením krátkých opakujících se sekvencí DNA s defektním párováním basí. Mluví se o fenotypu s replikační chybou (replication error phenotype - REP+). Tento REP+ byl diagnostikován u 77 % nemocných s kolorektálním karcinomem u HNPCC, v nižším procentu je vázán i na výskyt dalších solidních tumorů u HNPCC. Předpokládá se, že mutovaný fenotyp je zodpovědný za rychlou malignizaci existujících adenomů. Karcinomy vzniklé u tohoto syndromu se však vyznačují lepší prognosou. Při rychlé malignizaci adenomů zůstávají zachovány nádorové receptory pro T-lymfocyty a nedochází k alteraci imunitního systému (6). V dnešní době je již možná genetická diagnosa určením mutací hMSH2 a hMLH1.

U členů rodin s NHPCC, kde byla prokázána patologická mutace, je indikován intenzivní screening, včetně profylaktické chirurgické intervence (subtotální profylaktická kolektomie). Zahájení totální koloskopie je indikováno ve věku 20 až 25 let 1x za 2 roky, od 30 let 1x ročně. U žen je dále od 30 let věku doporučována 1x ročně endometriální curetage, prevence ovariálního karcinomu transvaginální ultrasonografií a stanovení onkogenního markru CA 125. Ženám by mělo být doporučováno časně těhotenství s následnou profylaktickou abdominální hysterektomií a oboustrannou ovariectomií ve věku 35-40 let. I po profylaktické ovariectomii zůstává určité riziko vzniku peritoneálního cystadenokarcinomu. U jedinců těchto rodin bez prokázané mutace je na místě screeningový program určený pro zdravou populaci. Právě při této diagnose se ukazuje obtížnost genetického testování. Některé geny mohou uniknout detekčním testům nebo se mohou objevit nové mutace odlišných genů u jiných členů v příbuzenstvu. Ne všechny detekovatelné alterace sekvencí zodpovědných genů musí vést k vývoji zhoubného nádoru. Abychom mohli chybnou sekvenci považovat za příčinu vzniku nádoru, je nutné mít dostatečnou jistotu o změně funkce genu s mutovanou sekvencí. Pro členy rodin s neprokázanou mutací hMSH2 a hMLH1 je možno provést další genetické testování, např. detekce mikrosatelitové instability. Je nutné mít na paměti, že genetické testování a interpretace jeho výsledků je mnohem komplexnější proces než u zavedených diagnostických postupů (7).

NEHEREDITÁRNÍ KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

Zevní faktory

Na základě současných znalostí se dá předpokládat, že velká většina KRK nemá jednoznačně dědičný podklad. Přesto se objevilo několik studií, které počet dědičných KRK odhadují na 15 %-90 %. K takovémuto číslu však chybí identifikace zodpovědných genetických faktorů a nelze opomenout ani zevní faktory (strava s vysokým obsahem tuku, červené maso, nízký obsah vlákniny).

MOLEKULÁRNÍ GENETIKA

KRK jsou považovány za genetické onemocnění s klíčovými změnami v genech a jejich proteinech, které kontrolují buněčný cyklus, růst buněk, apoptózu, buněčné signalizace a reparace. Nejčastější alterace se vykytují v protoonkogenech/onkogenech a tumorsupresorových genech. Akumulace mutací v těchto strukturách jsou kauzální příčinou nádorové progresy právě u KRK.

ONKOGENY

První velký zlom v molekulární genetice KRK nastal objevením mutací ras genu. Ras mutace jsou prokázány asi u 10 % adenomů menších než 1 cm v průměru. Produkt ras genu, je p21, regulační protein proliferace, který katalyzuje hydrolýzu GTP na GDP (8). Později byly identifikovány tři typy tohoto genu- K-ras, H- ras a N-ras. Mutace K-ras a N-ras se nacházejí až u 50 % kolorektálních adenomů větších než 1 cm a u 50 % KRK. K jeho mutacím dochází nejspíše během progresy adenomů, jelikož nebyl prokázán u polypů menších než 1 cm. Ras mutace hrají určitou roli při vývoji některých kolorektálních karcinomů. Některé studie předpokládají vývoj tumorů i bez přítomnosti ras mutací, ale též chybění progresy tumorů při jejich přítomnosti. Jestliže dojde k odstranění mutací rekombinantní technikou, nádorové buňky ztrácejí svoji tumorigenicitu, což potvrzuje jeho významné místo ve vývoji kolorektálního karcinomu, i když do dnešní doby ne zcela objasněné místo.

TUMOR SUPRESOROVÉ GENY

Tumor supresorové geny mohou být inaktivovány různými způsoby, jako např. bodovou mutací, translokací a delecí. K inaktivaci funkce nemusí však docházet pouze na úrovni genu. Inaktivován může být i protein. (např. vazbou na virové antigeny, či některé endogenní proteiny). Metoda srovnání tumorálních alel s alelami nenádorové tkáně vede k identifikaci delecí označovaných jako ztrátu heterozygosity (LOH). Nejčastěji jsou postiženy chromosomy 5q, 8p, 17p a 18q, jejich ztráta byla identifikována u 50 %, 73 % a 75 % KRK.

Chromosom 17p: p53

p53 supresorový gen, nazývaný strážce genomu, je nejčastěji se vyskytující alterovaným genem u solidních nádorů.

Gen p53 je lokalizovaný na krátkém raménku 17. chromosomu a kóduje 53-kd fosfoprotein, který je regulátorem buněčného cyklu a můžeme o něm mluvit jako o faktoru regulujícím transkripci. Divoký typ (tedy přirozený, v přírodě se vyskytující), nikoli mutovaný p53, je účinným inhibitorem růstu transformovaných buněčných kultur.

Nejčastější vlastností divokého p53 je schopnost se vázat sekvencně specifickým působem na DNA.

Při poškození DNA p53 prostřednictvím dalších regulačních proteinů zastaví buněčný cyklus a dá čas k opravě DNA. Pokud oprava DNA není možná, indukuje apoptosu.

P53 se podílí na regulaci řady proapoptotických genů (např. bax, bik, bclXs, bad).

Zvýšená exprese proteinu p53 je imunohistochemickými metodami identifikovatelná u 30 % až 70 % nádorů a koreluje s horší prognosou. Citlivější diagnostickou metodou se jeví sekvenování cDNA. Přestože se mutace p53 mohou vyskytovat v celé délce genu, nejčastěji k nim dochází na vazebných místech pro DNA, v oblasti kódované exony 5-8, a označovanou jako evolučně zachovalá doména, s evolučně zachovanými regiony. Zde se nachází až 82 % „missense“ mutací, které na rozdíl od jiných typů mutací, mají širší distribuci. Důsledkem těchto mutací je syntéza abnormálního proteinu s novými onkogenními vlastnostmi a prodlouženým poločasem. Přítomnost bodových mutací p53 je spojena s agresivnějším růstem tumoru (12). Více jak 50 % kolorektálních karcinomů má inaktivovaný protein p53. Mutovaný p53 ztrácí svoji transkripční aktivitu a je dokonce schopen tlumit aktivitu divokého p53.

Studie dále potvrdily, že p53 není nezbytně nutný pro funkci normálních buněk. Naproti tomu může mít důležitou funkci v buňkách vystavených stresu (hypoxie, záření X, lékové poškození DNA). Hypoxie byla prokázána jako silný fyziologický induktor p53. Hypoxický stav se často nachází v tumorech a zde může indukovat expresi p53 a jím zprostředkovanou apoptosu. Zároveň bylo prokázáno, že buňky neexprimující p53 jsou životaschopnější (4).

V současné době probíhá již několik studií, nahrazujících mutovaný p53 divokým typem nemutovaného p53, který je transportován intracelulárně pomocí retrovirových či adenovirových nosičů.

Vzhledem ke slabému „bystander effect“ (definovaný jako schopnost transdukovaných buněk zabíjet okolní netransdukované buňky) je nutné zahájit genovou léčbu p53 u časných stádií nádorů a její aplikaci v krátkých časových intervalech opakovat (14).

Chromosom 18q:

Jedním z genů tohoto chromosomu je DCC (Deleted in Colorectal Cancer), jehož velmi nízká až chybějící exprese byla prokázána v 88 % KRK.

DCC protein lze považovat za membránový protein, jehož extracelulární složka se vyznačuje výraznou homologií s adhesivními molekulami. Dle studií in vitro se předpokládá, že exprese DCC je nutná pro buněčnou adhezi a ztráta DCC vede až k vývoji invazivního karcinomu. Výsledky publikovaných studií svědčí pro tumor-supresorovou funkci DCC.

Další z genů lokalizovaných na tomto chromozomu čeká ještě na objasnění své funkce v karcinogenezi - jedná se o DPC4 (deleted in pancreatic cancer), který kóduje skupinu proteinů označovaných jako MAD homologs, které jsou součástí signální cesty zprostředkované TGF-beta (transforming growth factor). TGF-beta potlačuje růst normálních buněk, nádorové buňky jsou rezistentní k tomuto růstovému faktoru. Jeden ze skupiny těchto MAD proteinů - JV 18-1/MAR2, lokalizovaný na 18q21, představuje třetí supresorový gen tohoto chromozomu (4).

Chromosom 5q: APC gen

Mutace genu APC (adenomatosis polyposis coli) představují jen první krok v tumorigenezi.

Mutace APC se vyskytují se stejnou frekvencí jak u benigních malých tumorů tak u karcinomů. Na rozdíl např. od mutací p53 a ras, které jsou přítomny pouze u progredujících tumorů, APC mutace byly také nalezeny v aberantních střevních kryptách. Více jak 63% tumorů má dvě genetické alterace na APC lokusu. Mutace APC jsou spojeny s časnými stádii karcinogeneze u kolorektálního karcinomu (15,16). Různá poloha mutace APC odpovídá různému počtu polypu.

Nemocní se stejnými mutacemi mohou mít různé klinické projevy, např. u některých jedinců dojde k vývoji osteomu a u jiných, se stejným typem a polohou mutace, se tumor nevyskytne. APC má důležitou úlohu nejen v karcinogenezi FAP, ale i sporadického KRK, kde byl identifikován až u 80 % tumorů.

Jeden z možných mechanismů účinku je vazba APC na beta-kateniny.

Kateniny jsou skupinou cytoplasmatických proteinů, která se váže na cadheriny patřící do skupiny adhesivních molekul. APC svoji vazbou na katenin-cadherin komplex plní svoji tumor-supresorovou úlohu. V nedávné době byla prokázána ještě jedna funkce kateniny, a to jako transkripčního aktivátoru společně s DNA-vazebnými proteiny z členů rodiny Tcf (T cell factor) (17).

Divoký typ APC je schopen suprimovat tuto signální cestu beta-katenin-Tcf komplexu. Tyto mechanismy jsou pouze jedním z možných cest jeho účinku. APC je dlouhý gen, obsahující 15 exonů, s nejdelším dosud popsaným exonem. O APC genu se hovoří jako o drahokamu s mnoha plochami, z nichž však jen některé pro nás září (20).

OSTATNÍ GENETICKÉ ZMĚNY

MCC (mutated in CRC) je další gen, který byl identifikován na chromozomu 5q21 a jehož somatické mutace se vyskytují u sporadického CRC. Jeho význam pro tumorigenezi není přesně znám, ale vzhledem k blízkosti lokalizace na stejném chromozomu jako APC, je pravděpodobná podobná aktivita.

Amplifikace krátkých úseků genomu často aktivují onkogeny u solidních tumorů. Byli popsány izolované amplifikace genů c-myc, c-myc, NEU, cyclinu. Předpokládá se, že přispívají k progresi především pokročilých karcinomů.

Metylace je nejčastější kovalentní modifikace DNA a je zodpovědná za kontrolu exprese genů a kondenzaci chromosomů. V genomu nádorových buněk se můžeme setkat jak s hypometylací, především v časných stádiích karcinogeneze a u malých adenomů, tak i s hypermetylací. Hypometylace může způsobit expresi dříve tichých, spících genů, které jsou zodpovědné za buněčnou invazi nebo růst metastáz. Naopak zvýšená metylace může vést k „utišení“ genů potlačujících růstovou aktivitu. Snížená metylace DNA může vést ke kondenzaci aberantních chromosomů, jejich ztrátám, tedy procesům, které jsou považovány za nejčastější mechanismy inaktivace supresorových genů (4).

SOUČASNÝ POHLED NA GENETICKÝ MODEL TUMORIGENEZE U CRC

Mutace APC s následným klonálním růstem jednotlivých buněk jsou nezbytné pro nastartování vývoje adenomů. U malých nádorů je nutná inaktivace obou alel APC, ale zda je nutné k tomuto procesu ještě mutací dalších genů, není známo. Malý polyp, který je důsledkem těchto mutací, může zůstat v klidu po desítky let. Mutace v jediné buňce tohoto polypu může však vést k její malignizaci (nejčastěji K-ras genu). Jestliže se v buňce nakumuluje více mutací, všeobecně se předpokládají mutace čtyř různých genů, nabývá schopnosti invazivního růstu a metastazování.

Ne všechny tumory potřebují ke svému vzniku a růstu zmíněnou kaskádu. Např. jen polovina KKR má mutovaný ras. Předpokládá se, že je třeba dalších genetických změn k vývoji malignity. Existují práce, které předpokládají minimálně sedm genetických změn, mutací jednoho onkogenu a šesti mutací inaktivujících tři tumor-supresorové geny.

Také pořadí vzniku mutací má vliv na tumorigenezi. Např. nemocní s mutovanou p53 v zárodečných buňkách nevyvinou polyposu, přestože mutace p53 se nachází až u 80 % KKR. Mutovaný p53 není schopen sám o sobě být zodpovědný za vznik neoplasie.

U řady nádorů byla popsána zvýšená exprese některých genů, jejíž příčina není objasněna. Mohou být vlastním aktivátorem tumorigeneze nebo důsledkem abnormálního růstu. Některé geny s vyšší expresí slouží jako mediátory biologického efektu již mutovaných, dříve zmíněných genů.

Humánní buňky vyvinuly několikastupňový ochranný mechanismus, který musí být na mnoha místech porušen, aby mohl být nastartován nádorový proces.

20-40 let trvá než se z drobného polypu přes celou kaskádu mutací různých genů vyvine invazivní karcinom.

Je nutno neustále mít na paměti, že nádor není jednotná statická entita, ale jedná se o několik buněčných subpopulací s různou schopností metastazovat, rozdílnou chemo- a radiosenzitivitou, s rozdílnými biologickými a biochemickými vlastnostmi. Nádory jsou geneticky heterogenní.

Tento stručný přehled základních dat týkající se molekulární genetiky kolorektálního karcinomu dává pouhý náhled do složitosti života nádorových procesů, aniž by chtěl, třebaže podvědomě, upozorňovat na terapeutický skepticismus, před kterým většina onkologů čas od času stává, ale spíše vyzvednout nutnost pokory před nesmírností toho, co částečně můžeme a snažíme se ovlivňovat.

Literatura:

1. Bosman F. T.: Molecular Pathology of Colorectal Cancer. Cytogenetic Cell Genet 1999; 86:112-117.
2. Hall N. R., Bishop, D. T.: Molecular and Genetic Basis of Colorectal Cancer, In: Kurzrock R., Talpaz : Molecular Biology in Cancer Medicine, (M Dunitz) 1995, 273-293.
3. Spirio L., Olschwang S., et al: Alleles of the APC Gene: An Attenuated Form of Familial Polyposis. Cell 1993; 75: 951-957.
4. Kinzler K. W., Vogelstein B.: Colorectal Tumors, p. 565-587, in Genetic Basic of Human Cancer, Editor B. Vogelstein, K. W. Kinzler, McGraw-Hill New York, 1998.
5. Wijnen J. T., Vasen H. F. A., et al: Clinical Findings With Implications For Genetic Testing in Families With Clustering Of Colorectal Cancer. NEJM 1998; 339: 511-518.
6. Syngal S., Fox E., Li Ch., et al: Interpretation of Genetic Test Results for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. JAMA 1999; 282: 247-253.
7. Lynch H. T., Smyrk T., Lynch J. F.: Overview of Natural History, Pathology, Molecular Genetics and management of HNPCC. Int. J.Cancer 1996; 69, 38-43.
8. Shirasawa S., Furuse M., et al: Altered Growth of Human Colon Cancer Cell Lines Disrupted at Activated Ki-ras. Science 1999; 260:85-88.
9. Lane D. P.: P53, Guardian of the Genome. Nature 1992; 358:15-16.
10. El-Deiry W. S., Tokino T., Veculescu V. E. et al.: WA1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression. Cell 1993; 5: 817-825.
11. Chang F., Syrjanen S., Syrjanen K.: Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene in Clinical Oncology. J Clin Oncol 1995; 13:1009-1022.
12. Tortola S., Marcuello E., Gonzalez. I. et al.: P53 and K-ras Gene Mutations Correlate with Tumor Aggressiveness But Are Not Routine Prognostic Value in Colorectal Cancer. J Clin Oncol 1999; 17:175-1381.
13. Kressner U., Inganas M., Byding S. et al: Prognostic Value of p53 Genetic Changes in Colorectal Cancer. J Clin Oncol 1999; 17:593-599.
14. Rizk N., Chang M. Y., Kouri C. E. et al: The Evaluation of Adenoviral p-53 Mediated Bystander Effect in Gene Therapy of Cancer. Cancer Gene Therapy 1999; 6.: 291-301.
15. Powell S. M., Zilz N. et al: APC Mutations Occur Early During Colorectal Tumorigenesis. Nature 1992; 359:235-237.
16. Fearon E. R., Vogelstein B.: A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. Cell 1990; 61:759-767.
17. Kemler R.: From Cadherins to Catenins: Cytoplasmic Protein Interactions and Regulation of Cell Adhesion. TIG 1993; 9:317-321.
18. Korinek V., Barker N. et al: Constitutive Transcriptional Activation by a beta -Catenin-Tcf Complex in APC Colon Carcinoma. Science 1997; 275:1784-1787.
19. Morin P. J., Sparks A. B. et al: Activation of - Catenin- Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in - Catenin or APC. Science 1997; 275: 1787-1790.
20. Peifer M.: Regulating Cell Proliferation: As Easy as APC. Science 1996; 272:974-975.
21. Kinzler K. W., Vogelstein B.: Lessons from Hereditary Colorectal Cancer, Cell 1996; 87:159-170.
22. Zhang H., Richards B., Wilson T. et al: Apoptosis Induced by Overexpression of hMSH2 or MLH1. Cancer Research 1999; 59: 3021-3027.
23. Sturm I., Kohne C. H., Wolff G. et al: Analysis of p53/BAX Pathway in Colorectal Cancer:Low BAX Is a Negative Prognostic Factor in Patients With Resected Liver Metastases. J Clin Oncol 1999;17: 1364-1374.
24. Steller H: Mechanisms and Genes of Cellular Suicide, Science 1995; 267:1445-1449.
25. Gryfe R., Kim H. et al: Tumor Microsatellite Instability and Clinical Outcome in Young Patients with Colorectal Cancer. The new England Journal of Medicine 2000; 342, 69-77.

knihy

ATLAS NÁDORŮ PRSU

J.Abrahánová, C.Povýšil, J.Horák a kolektiv. Grada Publishig 2000, 328 stran

Nějakou dobu se v onkologické obci proslýchalo, že doc.Abrahánová chystá jakýsi atlas mamárních nádorů. Při zvyku hledat podnětné onkologické monografie spíše v zahraniční literatuře jsem tuto snahu pouze registroval. Jak mnoho jsem se mýlil ve svém vlažném očekávání jsem zjistil již při slavnostním uvedení knihy ve Faustově domě 5. září 2000, kde svítila již svým obalem a dokonalým provedením. Do knihy jsem se začal již při cestě domů do Brna a ještě nikdy mi ta nekonečná kolizní dálnice nepřipadala tak krátká. Bylo vskutku čím listovat a do čeho se začít. Jde o takřka dokonalou harmonii grafického zpracování, fotodokumentace a bohatého textu. Spíše než atlasem by ji v zahraničí nazývali „comprehensive book of breast cancer“. Srovnávám-li v tomto kontextu například Atlas of Breast Cancer (Roger Blamey et al., Merit Publishing International) je z atlasu doc.Abrahánové a kolektivu zřejmé, že cestu do Evropy dovedeme dleždit nejen proklamacemi, ale i velmi kompetitivní knižními produkty, kde se odborná úroveň snoubí s kultúrou sdělování. Nepochybuji, že anglická verze této knihy by úspěšně prošla v mezinárodní konkurenci.

Čtenář bude příjemně zaskočen především množstvím a kvalitou obrazové dokumentace, ať již jde o mamografické snímky, histologické obrazy nebo klinickou fotodokumentaci. V bohatém textu je účelně rozmístěna také celá řada nákrešů a schémat. Čtenář je seznámen s epidemiologií nádorů prsu, anatomií mléčné žlázy, možnostmi včasného zachytí mamárních nádorů (doc.Abrahánová, doc.Horák) a podrobně pak se zobrazovacími metodami v mamologii (doc.Horák). Následují kapitoly o molekulární podstatě maligní transformace mamárních buněk (prof.Štípek), nádorových

markerech (doc.Malbohan, dr.Vermousek) a genetice nádorů prsu (dr.Foretová). Za skvost mezi kapitolami knihy pokládám pojednání prof. Povýšila o histologii mléčné žlázy a jejích patologických změnách. I klinicky zaměřený pracovník je v ní vtážen do poměrně spleťtité, avšak přehledné a dokonale obrazově dokumentované mamární histopatologie takovým způsobem, že začne věřit, že se v ní skutečně orientuje. Další terapeuticky zaměřené kapitoly kromě chirurgické léčby (prof. Pařko) pocházejí již výhradně z pera doc.Abrahánové. Patří k nim stati o stagingu a prognostických faktorech jako východiscích pro terapii, postavení radioterapie v léčbě karcinomu prsu, systémová léčba časných i pokročilých stadií, dále pak i kapitoly o podpůrné léčbě a méně častých nádorech prsu.

Mám-li si v tom moři pozitivních dojmů z knihy na něco postesknout, pak jen tolik, že bych jako onkochirurg rád četl o chirurgické léčbě nádorů prsu na více než šesti stranách, protože jde o základní typ terapie aplikovaný nejméně u dvou třetin nemocných. Se zájmem bych jistě četl také o biopsiích sentinelové uzliny, ač dosud nepatří ke standardním postupům, o metodách pooperační rehabilitace a zvláště pak o možnostech rekonstrukčních výkonů po mastektomiích. Jsem přesvědčen, že i tyto doplňkové stati by přitahovaly zájem a profitovaly z vysokého grafického a fotodokumentačního standardu celé knihy.

Monografie Atlas nádorů prsu nesporně ovlivní celou generaci onkologů a všech lékařů, kteří se s nádorovými onemocněními prsu setkávají. Troufám si však tvrdit, že doc.Abrahánová a její odborní i redakční spolupracovníci při péči, kterou obsahu i formě díla věnovali, nemohli myslet jen na publikaci samotnou, nýbrž i na ty více než čtyři tisícovky žen, které každoročně s novými nálezy karcinomu prsu přicházejí, a na ty bezmála dva tisíce žen, které zhoubnému nádoru prsu v každém roce podléhají. Kniha sama neléčí, ale léčit pomáhá, zvláště v takto příkladné podobě.

J. ŽALOUDÍK

PARANEOPLASTICKÉ NEUROLOGICKÉ SYNDROMY- PROTILÁTKOVÝ PROFIL A JEHO ATYPICKÉ VARIANTY

PARANEOPLASTIC NEUROLOGICAL SYNDROMES- ANTIBODIES PROFILE AND ITS ATYPICAL VARIANTS

ŠTOURAC P., KADAŇKA Z.

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, NEUROLOGICKÁ KLINIKA

Souhrn: Úvod: Paraneoplastické neurologické syndromy jsou vzácná postižení nervového systému s významnou rolí imunity v jejich patogeneze, často u pacientů s okultním primárním tumorem. Některé autoprotilátky (anti-Yo, anti-Hu, anti-Ri) jsou asociovány jen s určitými nádory a neurologickými syndromy. Cíl studie: Charakterizace a zhodnocení atypického společného výskytu některých paraneoplastických autoprotilátek u jednotlivých pacientů s ohledem na klinický obraz a jejich možnou patofyziologickou úlohu. Soubor a materiál: Celkem bylo vyšetřeno 2355 vzorků sér a likvoru s podezřením na neurologické komplikace nádorového onemocnění v průběhu let 1997-1999. V těchto vzorcích byl detekován společný atypický výskyt některých autoprotilátek u 3 nemocných. Metodika: Sérum a likvor pacientů byly testovány na tkáňovém substrátu metodou nepřímé imunofluorescence a pozitivní nálezy byly potvrzovány metodou Western blot a imunohistochemicky. V pozitivních případech (3 pacienti) se jednalo o následující asociace protilátek: 1. anti-Hu a anti-CV-2, 2. anti-Hu a anti-Ri, 3. anti-Yo a ANA. U těchto nemocných byl zhodnocen klinický nále. Výsledky: U všech pacientů byl klinicky přítomen obraz paraneoplastické encefalomyelitidy, avšak v jednom případě s dominujícími projevy cerebelární degenerace. Závěry: společný výskyt různých paraneoplastických protilátek nevedl k rozšíření spektra klinických příznaků nebo atypickému průběhu onemocnění. Teoretické vysvětlení takového asociovaného výskytu je založeno na supraklonálních vlastnostech humorálního imunitního systému při jeho síťovém uspořádání.

Klíčová slova: paraneoplastické neurologické syndromy, autoprotilátky anti-Hu, Ri, Yo, CV-2, ANA, atypické asociace protilátek

Summary: Backgrounds: Autoimmune paraneoplastic neurological syndromes are rare diseases of the nervous system in patients often having an occult tumour and with important role of the immune system in the pathogenesis of the disease. Some autoantibodies (anti-Yo, anti-Hu, and anti-Ri) are associated with characteristic types of tumours and neurological syndromes. Design and subjects: The aims of the study were characterisation and evaluation of atypical occurrence of some paraneoplastic antibodies in positive patients with regard to the clinical pattern and its potential pathophysiological role. Methods and results: 2355 samples of serum and cerebrospinal fluid of patients suspicious for neurological complications of oncological disease were investigated during 1997-1999. Serum and cerebrospinal fluid were tested on tissue substrate by the method of indirect immunofluorescence and positive samples were confirmed by Western blot and immunohistochemistry. The exceptional atypical co-occurrence of paraneoplastic antibodies in 3 patients was detected and their cases are presented. The association of antibodies (anti-Hu and anti-CV2), (anti-Hu and anti-Ri) and (anti-Yo and ANA) was found. Conclusions: Association of autoantibodies in individual cases of paraneoplastic neurological syndromes did not change the clinical pattern and course of disease. Theoretical explanation of such associated occurrence is based on supraclonal properties of humoral immune system with its network organisation.

Key words: paraneoplastic neurological syndromes, autoantibodies anti-Hu, Ri, Yo, CV-2, ANA, atypical association of antibodies

Úvod

Patogeneze většiny neurologických paraneoplastických syndromů není zcela objasněna. Zkřížená protilátková reakce vůči proteinům-antigenům exprimovaným v tumorózní tkáni a v buňkách nervového systému poukazuje na autoimunitní mechanismus. Patofyziologický význam paraneoplastických autoprotilátek nacházených v séru a likvoru byl však v experimentálním zvířecím modelu prokázán pouze u Lambertova-Eatonova myastenického syndromu, neuromyotonie a paraneoplastické retinopatie (1,2,3). Pouze u těchto tří onemocnění může být choroba navozena pasivním transferem protilátek na experimentální zvíře a v případě paraneoplastické retinopatie lze chorobu vyvolat i aktivní imunizací antigenem -recoverinem (1). U dalších

neurologických paraneoplastických syndromů s přítomností autoprotilátek spočívá jejich klinický význam především v roli indikátoru často ještě okultního tumoru. Asociaci s dalšími paraneoplastickými protilátkami anti-Ri, anti-CV-2 a ANA (antinukleární protilátky) byla nalezena v naší skupině nemocných s pozitivními anti-Yo protilátkami (5 pacientů), anti-Hu protilátkami (4 pacienti). Autoprotilátky anti-Ri byly poprvé popsány u pacientky s paraneoplastickým opsoklonem a mamárním karcinomem (4). Imunohistochemicky anti-Ri protilátky reagují s jádry neuronů centrálního nervového systému a při vyšetření imunoblotem vytvářejí 2 pásy o molekulární hmotnosti 55 a 80 kD. Anti-CV-2 auto-protilátky byly poprvé popsány skupinou francouzských autorů u různých neurologických syndromů (5,6). Anti-CV-2 protilátky se váží

na subpopulaci oligodendrocytů v oblasti mozečku, mozkového kmene a míchy. V imunoblotu anti-CV-2 protilátky reagují s proteinem o molekulární hmotnosti 66kD, avšak funkce tohoto proteinu není objasněna. Další skupinu asociovaných autoprotilátek tvořily tzv. ANA protilátky, v našem případě s vysokou koncentrací zvláště v nukleolech (antinukleolární protilátky), které jsou obecnějším markerem autoimunitního postižení. Jedná se o protilátky vyskytující se u systémových chorob pojiva (systémový lupus erythematosus, revmatoidní artritida, sklerodermie) a reagující s antigeny, které jsou normální komponentou buněčného jádra(7). Anti-Yo a anti-Hu autoprotilátky, s nimiž byly výše uvedené autoprotilátky v jednotlivých případech asociovány jsou imunologicky dobře definovány. Anti -Yo se váží na cytoplazmatické struktury Purkyňových buněk mozečku a v imunoblotu reagují s 2 proteiny o molekulární hmotnosti 34 a 62kD. Nejčastěji jsou tyto proteiny asociovány s gynekologickými tumory. Anti-Hu protilátky reagují s antigeny jader neuronů a v imunoblotu vykazují pozitivní pásy v oblasti 35-40kD molekulární hmotnosti a nejčastěji se manifestují ve spojitosti s přítomností malobuněčného karcinomu plic. Cílem práce je charakterizace protilátkového profilu a klinického obrazu u autoimunitně podmíněných neurologických paraneoplastických syndromů s ohledem na atypickou koincidenci těchto autoprotilátek a jejich možný patofyziologický význam.

Soubor nemocných a metodika

V neuroimunologické laboratoři Fakultní nemocnice v Brně-Bohunicích bylo v letech 1997-1999 vyšetřeno 2355 vzorků séra a likvoru u nemocných s podezřením na paraneoplastický syndrom. Ve dvou skupinách pacientů s pozitivními paraneoplastickými protilátkami anti-Hu nebo anti-Yo byly zjištěny tři vzorky séra a likvoru, které vykazovaly atypickou asociaci výše uvedených paraneoplastických autoprotilátek s dalšími protilátkami anti-Ri, anti-CV-2 a ANA. Klinický obraz těchto pacientů byl srovnán s literárně dostupnými popisy a zhodnocen s ohledem na atypickou asociaci jednotlivých paraneoplastických autoprotilátek (Yo+ANA), (CV2+Hu), (Hu+Ri) v séru a likvoru. Klinické údaje o pacientech byly získávány kromě přímého vyšetření telefonickou a písemnou informací od ošetřujícího lékaře. Screeningová databáze sérových a likvorových vzorků byla testována metodou nepřímé imunofluorescence a pozitivní vzorky byly potvrzeny metodou Western blot. Metoda nepřímé imunofluorescence: sérum a likvor pacientů byly testovány na substrátu fixované myší tkáň (mozeček, ledvina, žaludek) obsahující neurony centrálního nervového systému a neurony myenterického plexu (fy MeDiCa USA). Vzorky byly naředěny v poměru 1:60 v mikrocentrifugačních tubách fyziologickým roztokem obsahujícím boviní albumin, 0,02 % Na₂SO₄ a absorpční substrát „Guinea pig acetone powder“ (fy Sigma). Vzorky byly centrifugovány 15 minut při 12 000 rpm a supernatant v dávce 40 µl byl nanesen na mikroskopické sklo obsahující tkáňový substrát preinkubovaný s boviním albuminem. Po promytí následovala inkubace s primární protilátkou třídy IgG (anti-human biotinylated IgG, Vector Laboratories, USA) a po opakovaném promytí opět inkubace se sekundární protilátkou (fluorescein anti-human IgG Vector Laboratories, USA). Po zamontování do fixačního média byly substráty zhodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu se stanovením pozitivit specifických antineuronálních autoprotilátek označovaných anti-Yo, anti-Hu, anti-Ri, anti-CV-2, ANA.

Výsledky

1. Pacientka M. S. 62letá, léčena pro diabetes mellitus, kuřačka po dobu 10 let. V listopadu 1998 byl zjištěn bronchogenní karcinom a následovala chemoterapie. V lednu 99 se objevilo vertigo, hrubý horizontální nystagmus I. stupně, lehká ataxie

na horních končetinách, výrazná ataxie na dolních končetinách a pozitivní Babinského příznak. CT mozku bylo bez ložiskových strukturálních změn. Klinický obraz odpovídal více ložiskovému postižení, tedy paraneoplastické encefalomyelitidě, s dominujícími příznaky cerebelární degenerace, avšak nepřekračoval svým rozsahem spektrum příznaků udávaných ve spojitosti s pozitivitou anti-Hu. Při imunofluorescenčním vyšetření byly diagnostikovány autoprotilátky třídy IgG označované jako anti-Hu. Při imunohistochemickém vyšetření a při vyšetření Western blotem byly kromě positivity anti-Hu prokázány ještě paraneoplastické autoprotilátky anti-CV-2. Neurologická terapie byla symptomatická, pacientka zemřela v důsledku progresu nádorového onemocnění v červenci 1999.

2. Pacient K.N., 63letý, dříve kuřák. Léčil se pro chronickou bronchitidu, hypertenzi a vertebrogní syndrom. V září 1999 se objevilo vertigo, diplopie a nauzea. V průběhu následujících týdnů se přidaly dysfágie, dysarthrie a váhový úbytek. Objektivní neurologické vyšetření prokazovalo pravostrannou ptózu se stočením bulbu nazálně a postižení postranního smíšeného systému. Postupně stav progredoval, přidal se i palloocerebelární syndrom. V souhrnu nález odpovídal paraneoplastické encefalomyelitidě. Na CT byl prokázán plicní tumor s lymfadenopatií v oblasti pravého hilu. MR mozku vykazovalo jen známky mírné mozkové atrofie. Při imunofluorescenčním vyšetření séra a likvoru byly prokázány paraneoplastické autoimunitní protilátky anti-Hu a konfirmačním vyšetřením Western blotem byla navíc prokázána asociace s autoprotilátkami anti-Ri. Pacient zemřel v důsledku progresu nádorového onemocnění.

3. Pacientka Z.O., 39letá. V r. 1996 se po porodu objevily diplopie a vertigo. Za 2 týdny poté se přidaly abnormální choreatické pohyby horních končetin, ataxie, mentální změny progredující až do obrazu demence a kvadruparimetické symptomatologie. Postupně progredující neurologické příznaky vedly k selhávání vitálních funkcí a v listopadu 1996 došlo k exitu. CT mozku bylo opakovaně provedeno s negativním nálezem. Klinicky šlo o paraneoplastickou multifokální encefalomyelitidu. V sekčním nálezu byl prokázán mikroadenokarcinom ovarií. V séru a likvoru byly detekovány metodou nepřímé imunofluorescence paraneoplastické autoprotilátky anti-Yo a ANA navíc s predilekční koncentrací v jadérku. Tento nález byl potvrzen i metodou Western blot.

Diskuze

U pacientky č.1 s asociovanými protilátkami anti-Hu a anti-CV-2 byl klinický obraz charakterizovaný především neo-palloeocerebelárním syndromem, nystagmem, vertigem a pyramidovou symptomatologií při malobuněčném karcinomu plic. Takováto kombinace neurologických příznaků kmenového a mozečkového postižení se nachází u pacientů s pozitivitou anti-Hu protilátek v rámci tzv. paraneoplastické encefalomyelitidy a to ve spojitosti s několika typů tumorů, jako jsou např. malobuněčný karcinom plic, karcinom prostaty, maligní melanom a neuroblastom u dětí (8). Anti-CV-2 autoprotilátky se podobně jako anti-Hu vyskytují také u různých neurologických paraneoplastických syndromů (subakutní mozečková degenerace, limbická encefalitida, retinopatie a senzitivní polyneuropatie)(9). Při pozitivitě anti-CV-2 protilátek byl často udáván přítomný mozečkový syndrom (50 %), takže v našem případě nelze vyloučit patofyziologický podíl na dominujícím mozečkovém postižení. Podobná rozmanitost neurologických syndromů a jejich asociace s různými typy tumorů se rovněž nachází u nově objevených paraneoplastických autoprotilátek označených anti-Ma(10). Pacienti s nádory prsu, tlustého střeva, varlete a příušní žlázy měli neurologickou symptomatiku zahrnující postižení mozečku, mozkového kmene

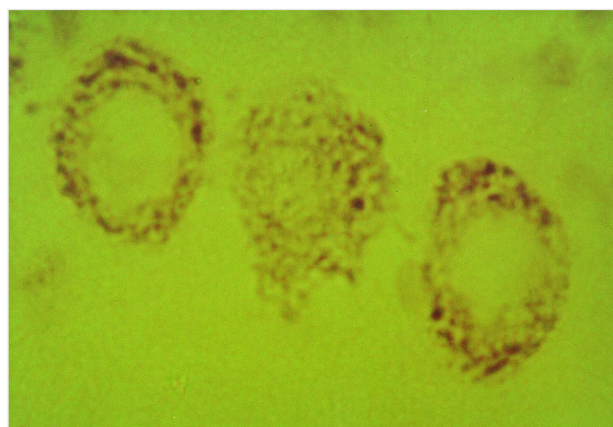
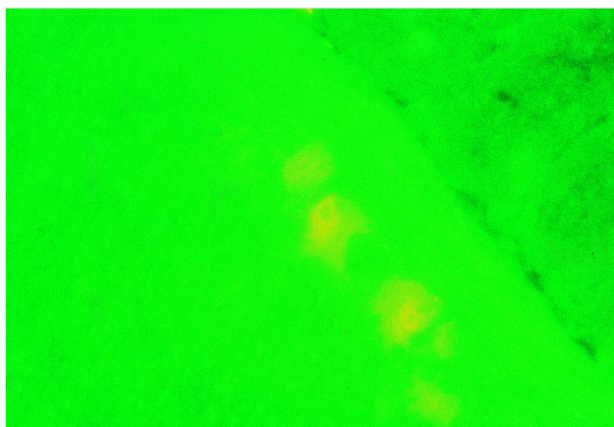
a pyramidové dráhy a současně přítomné protilátky reagující s antigenem anti-Ma. Souhrnně lze říci, že výše uvedená asociace anti-Hu a anti-CV2 autoprotilátek nerozšířila klinické spektrum příznaků obvykle nacházených u anti-Hu pozitivních pacientů. U pacienta č.2 s asociací protilátek anti-Hu a anti-Ri byly v klinickém obraze přítomny vertigo, diplopie se stočením bulbu nazálně, nauzea, dysartrie, dysfagie, pallescerebelární syndrom a Babinského příznak, tedy rovněž kombinace příznaků charakteristická pro výraznější postižení v rámci paraneoplastické encefalomyelitidy. Výskyt anti-Ri autoprotilátek bývá nejčastěji asociován se syndromem opsoklonus-myoklonus. Opsoklonem se rozumí krátké, rychlé, konjugované oční pohyby různé frekvence a amplitudy ve všech směrech tzv. "dancing eyes". Často bývá opsoklonus doprovázen myokloniemi trupu, končetin a rovněž ataxií (11). V případě našeho pacienta nebyly příznaky jako opsoklonus, myoklonus pozorovány a ataxie v důsledku postižení mozečku je v souladu s projevy uvedené anti-Hu paraneoplastické encefalomyelitidy.

V případě pacientky č.3 se jednalo z hlediska neurologického zřejmě o nejrozmanitější symptomatiku a také nejtěžší průběh z výše uvedených pacientů. Objevilo se u ní vertigo, diplopie, dále ataxie, abnormální choreatické pohyby horních končetin a postupně progredující změny kognitivních funkcí až do obrazu demence. Přítomnost anti-Yo protilátek bývá provázána klinicky výše uvedenými příznaky včetně rigidity, myoklonie a tremoru ,

atypickým symptomem byly mentální změny. Klinicky šlo opět o obraz paraneoplastické encefalomyelitidy.

Rovněž u této pacientky nebyly pozorovány změny ve smyslu asociace dalších autoimunitních chorob s typickou přítomností antinukleárních protilátek jako jsou lupus erytematodes, sklerodermie apod.

Analogické situace nacházíme v oblasti neuroimunologie, kde se rovněž vyskytuje více typů autoprotilátek u jednotlivého pacienta resp. diagnózy. Jejich patofyziologická role není objasněna, ale bývají u jednotlivých klinických jednotek charakteristicky přítomné. Jedná se např. o konstantní přítomnost virově specifických protilátek proti neurotrofním virům (spalničky, zarděnky, varicella) u roztroušené sklerózy mozkomíšního bez současně přítomnosti antigenu resp. virového genomu v organismu při vyšetření polymerázovou řetězovou reakcí (12). Současná představa vysvětlující takovýto nález je založena na tzv. nespecifické aktivaci B-buněčných klonů , kdy dochází k syntéze antivirových či (auto)-protilátek bez přítomnosti virového či jiného příslušného autoantigenu. Podobně takováto antivirová oligoklonální reakce je přítomna u některých dalších autoimunitních chorob jako jsou systémový lupus erytematodes, Sjogrenův syndrom, Wegenerova granulomatóza s postižením CNS (13). Možnost nespecifické aktivace B-buněčných klonů vyplývá z uspořádání imunoglobulinových idiotypů vytvářejících tvarově



Legenda k obrázkům

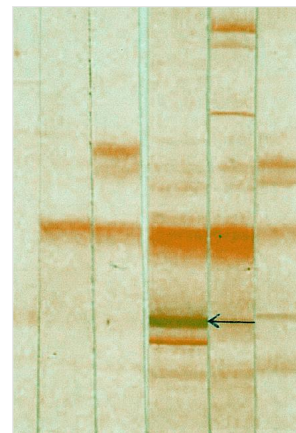
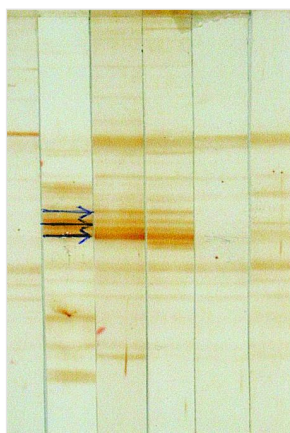
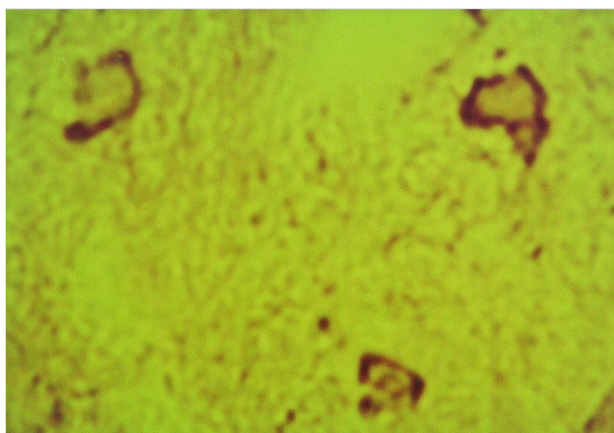
Obr. č. 1: Řez hladkou svalovinou myšního žaludku s pozitivním imunofluorescenčním nálezem paraneoplastických antineuronálních IgG autoprotilátek (anti-Hu) v jádrech a cytoplasmě neuronů plexus myentericus.

Obr. č. 2: Řez tkání myšního mozečku s pozitivním imunohistochemickým průkazem paraneoplastických antineuronálních IgG autoprotilátek (anti-Yo) v cytoplasmě Purkyňových buněk mozečku. Antigeny jader Purkyňových buněk s paraneoplastickými protilátkami nereagují.

Obr. č. 3: Řez tkání myšního mozkového kmene s pozitivním imunohistochemickým průkazem paraneoplastických antineuronálních IgG autoprotilátek (anti-CV-2) lokalizovaných v oligodendrocytech

Obr. č. 4: Immunoblot s přítomností anti-Hu paraneoplastických protilátek o mol. hmotnosti 35–40kD. Pozitivní vzorky jsou označeny šipkou ve 3 a 4 pásu.

Obr. č. 5: Immunoblot s přítomností anti-Yo paraneoplastických protilátek o mol. hmotnosti 62 kD. Pozitivní vzorek označen šipkou ve 4 pásu zleva.



komplementární sítě s funkčními důsledky vyplývajícími z takového uspořádání. Vlastnosti vyplývající z uspořádání imunologických sítí jsou zásadní pro pochopení otázek, které nejsou řešitelné klonálně-selektivní teorií, jako jsou např. vnitřní lymfocytární aktivita, produkce přirozených protilátek u neimunizovaných zvířat, principy imunologické tolerance a autoimunity. Dosavadní imunologický výzkum se koncentroval především na regulaci klonální imunitní odpovědi, spíše než na supraklonální vlastnosti imunitního systému, které vyplývají z jeho síťové organizace (14). Z výše uvedeného lze uzavřít, že i asociace několika paraneoplastických autoprotilátek je možným důsledkem takového síťového uspořádání humorální imunity. Z nově se objevujících poznatků vyplývá, že do takové sítě je nutno zahrnout i vazby k cytologické složce imunity, především anti-Hu T specifické lymfocyty z podskupiny Th1 helper lymfocytů.

Závěr

Výskyt asociovaných paraneoplastických autoprotilátek u neurologických paraneoplastických syndromů je sice málo častým klinicko-laboratorním korelátem, ale má svoji analogii u některých dalších autoimunitních postižení nervového systému, jako jsou skleróza multiplex a jiná systémová onemocnění. Z hlediska klinického jsme nezjistili rozšířený komplex příznaků, který by odrážel asociaci takových protilátek, ale považujeme za důležité na tuto možnost upozornit a současně uvádíme klinický obraz těchto pacientů. Z hlediska patofyziologického předpokládáme, že výskyt těchto autoprotilátek je umožněn tzv. nespecifickou stimulací, která je odrazem supraklonálních vlastností humorálního imunitního systému s jeho síťovým uspořádáním.

Práce byla sponzorována grantem IGA MZ ČR č. 4254-3

Literatura:

1. Geryl I, Chanaud N, Anglade E. Recoverin is highly uveitogenic in Lewis rats. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 1994;35:3342-3345.
2. Lang B, Newsom-Davis J. Immunopathology of the Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *Springer Semin Immunopathol* 1995;17:3-15.
3. Newsom-Davis J, Mills KR. Immunological associations of acquired neuromyotonia (Isaac's syndrome). Report of five cases and literature review. *Brain* 1996; 119, 453-469.
4. Budde-Steffen C, Anderson NE, Rosenblum MK, Graus F, Ford D, Synek B, Wray SH, Posner J. An antineuronal antibody in paraneoplastic opsoclonus. *Ann.Neurol.*1988; 23: 528-531.
5. Honnorat J, Antoine JC, Derrington E, Agüera M, Belin MF. Antibodies to a subpopulation of glial cells and a 66kDa developmental protein in patients with paraneoplastic neurological syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 61:270-278.
6. De la Sayette V, Bertran F, Honnorat J, Schaeffer S, Iglesias S, Defer G. Paraneoplastic cerebellar syndrome and optic neuritis with anti- CV-2 antibodies. *Arch. Neurol.* 1998; 55: 405-408.
7. Tan EM. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunology and medicine. *Adv. Immunol.* 1982; 23:167.
8. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK et.al. Anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis/ sensory neuronopathy. *Medicine* 1992; 71:59-72.
9. Kaiser R. Paraneoplastische neurologische Syndrome. *Nervenarzt* 1999; 70:688-70.
10. Pohl K, Pritchard J, Wilson J. Neurological sequelae of the dancing eye syndrome. *Eur.J.Pediatr.* 1996;155:244.
11. Dalmau J, Gultekin H, Voltz R. et.al. Ma-1, a novel neuron and testis specific protein is recognized by the serum of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Brain* 1999;122,27-39.
12. Godec M.S, Asher DM, Murray RS, Shin ML, Greenham LW, Gibbs CJ and Gajdusek DC. Absence of measles, mumps and rubella viral genomic sequences from multiple sclerosis brain tissue by polymerase chain reaction. *Ann.Neurol.*1992; (82), 401-404.
13. Graef T, Henze T, Reiber H. Polyspezifische Immunreaktion im ZNS bei Autoimmunerkrankungen mit ZNS-Beteiligung. *Z. Aertzl. Fortbild.* 1994; (88) 587-591.
14. Varela JF, Countinho A. Second generation immune networks. *Immunology Today* 1991; Vol.12, No.5.159-166.
15. Jaecckle KA. Autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes: Closer to the Truth? *Ann.Neurol.*1999;45,143-144.

knihy

CHILDHOOD LEUKEMIAS

Ching-Hon Pui (Ed.)

Cambridge University Press, Cambridge 1999. 567 str., 197 obrázků (včetně barev.), 86 tab., ISBN 0-521-58186-1, cena 115,- GBP

Monotematické dílo věnované problematice dětských leukémií sestavil editor z Dětské výzkumné nemocnice v Memfisu za přispění dalších 42 odborníků z pěti zemí, převážně z USA. Monografie je rozdělena do čtyř částí s 28 kapitolami.

První část se třemi kapitolami podává přehled o historii onemocnění a všeobecných otázkách. Sleduje se vývoj názorů na dětskou leukémii od první poloviny 19. stol, kdy byla tato nemoc definována, až do současnosti. Dále je popsána diagnostika a klasifikace s dělením na akutní a chronické leukémie a na jednotlivé subtypy specifikované se zřetelem na morfolologii a cytochemii. Je zařazen přehled myelodysplastických syndromů, epidemiologie leukémií a soubor rizikových faktorů, které se patrně u vzniku leukémie uplatňují. Druhá část je vyhrazena buněčné biologii a patologii. Devět kapitol pojednává o anatomii a fyziologii hematopoéze, hemopoetických růstových faktorech a regulaci hematopoéze, imunofenotypizaci, cytogenetice a molekulární genetice akutní leukémie, molekulární genetice akutní lymfo-blastické leukémie a akutní myeloidní leukémie; dále jsou zde úvahy o apoptóze, jež poskytují rámec k vývoji nových léků, ale i k chemorezistenci při léčbě. Popisované děje jsou doloženy autentickou dokumentací a vysvětlujícími obrazy a grafy. Je vložena příloha s vyhodnocením krevních elementů reprodukcovaných na barevných tabulkách a doprovázených stručným popisem a grafickým značením.

Třetí část tvoří 19 kapitol věnovaných léčbě. V pojednání o farmakokinetice a farmakodynamice je podrobně charakterizována řada chemoterapeutik: metotrexát, 6-merkaptopurin, cytarabin, antracykliny, asparagináza, glukokortikoidy, vinkristin aj. V dalších kapitolách se popisuje léčba akutní lymfoblastické leukémie, akutní myeloidní leukémie a myelodysplastických syndromů, dále adoptivní buněčná imunoterapie, transplantace kostní dřeně, genový transfer a testování antileukemických léků. Čtvrtá část knihy se šesti kapitolami je vyhrazena pro komplikace a podpůrnou péči. Podrobně jsou probrány akutní i pozdní komplikace v průběhu léčby nebo po jejím ukončení, zvláště pak pestré infekční komplikace. Hematologická a podpůrná péče užívá nutriční podporu, profylaxi před infekcí s podáváním antibiotik a různých transfuzních prostředků. Onemocnění leukémií přináší s sebou také četné psychosociální problémy; rovněž ošetrovatelská služba musí čelit obtížným úkolům. Text je přehledně uspořádán, za každou kapitolou je bohatá citovaná literatura až se stovkami položek. Monografie poskytuje poučení jak o klasických postupech diagnostiky a léčby tak i moderních imunologických a genových metodách. Prezентuje nové pohledy do patobiologie dětské leukémie, jež stimulovaly pokrok v diagnostických metodách, strategiích hodnocení rizika a vývoji léčebných metod přizpůsobených specifickým generickým subtypům nemoci. Je zajímavá především pro pediatrii, hematologii, onkologii, imunologii a praktiky, kteří participují na ošetrování nemocných. Adresa nakladatelství: Cambridge University Press, The Edinburgh Building, Shaftesbury Road, Cambridge CB2 2RU, UK."

V.R., V.H.

AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE S PODÁNÍM INTERLEUKINEM 2 AKTIVOVANÉHO ŠTĚPU PERIFERNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK NEMOCNÝM S CHRONICKOU MYELOIDNÍ LEUKEMIÍ

AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION USING INTERLEUKIN 2 ACTIVATED PERIPHERAL BLOOD STEM CELL GRAFT IN CHRONICAL MYELOID LEUKEMIA PATIENTS

^{1,3}HÁJEK R., ¹ŽÁČKOVÁ D., ³PENKA M., ¹KRAHULCOVÁ E., ^{1,2}KOŘÍSTEK Z., ²VINKLÁRKOVÁ J., ²ADLER J.,
²JANOVSKÁ E., ⁴INDRÁK K., ⁴FABER E., ¹DOUBEK M., ¹KLABUSAY M., ⁵OLTOVÁ A., ⁶KUČLÍK P.,
¹DVOŘÁKOVÁ D., ³BOURKOVÁ L., ⁷DUŠEK L., ^{3,7}MAREŠCHOVÁ I., ¹MAYER J., ¹VORLÍČEK J.

¹INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO

²TKAŇOVÁ BANKA FN BRNO

³ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE FN BRNO

⁴HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA FN OLOMOUC, ČR

⁵ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY FN BRNO

⁶KATEDRA GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY
BRNO

⁷UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM LÉKAŘSKÉ FAKULTY MASARYKOVY UNIVERZITY BRNO

Souhrn: Úvod: V letech 1997 a 1998 jsme připravili ke klinickému použití protokol buněčné imunoterapie - aktivaci autologního transplantátu periferních kmenových buněk (PKB) interleukinem 2 (IL-2) využíjící "ex vivo" nespecifickou stimulaci imunokompetentních buněk (NK a T buněk štěpu). Interleukin 2 (IL-2) je jedním ze základních imunomodulačních cytokinů. IL-2 stimuluje proliferaci T buněk a NK buněk (Natural Killer) in vitro i in vivo. Jeho klinický přínos u hematologických malignit zatím nebyl zcela ujasněn. Pro klinickou experimentální práci jsme vybrali diagnózu CML, u které lze léčebný účinek velmi přesně monitorovat a imunoterapie zde má zásadní význam. Metody a nemocní: Ke dni 31.5.1999 bylo 8 nemocným s CML v chronické či akcelerované fázi

podán IL-2 aktivovaný autologní štěp ve fázi I/II klinické studie. Sběr PKB byl proveden po podání mobilizačního chemoterapeutického režimu mini ICE (idarubicin, cytosin-arabinosid, etoposid) s následnou transplantací s využitím busulfanu 12-16 mg/m², jako přípravné vysokodávkované chemoterapie. Po podání IL-2 aktivovaného štěpu následovala měsíční imunoterapie (IL-2 0,5 x 10⁶ IU/m²/den a GM-CSF 75g/m²/den, vše s.c.) a nejméně 6-ti měsíční léčba interferonem alfa. Z 8 zařazených nemocných podstoupilo 5 transplantaci a 3 nemocným byl podán aktivovaný štěp bez busulfanu, pro nemožnost získat štěp periferních kmenových buněk. Výsledky: Časná peritransplantační mortalita byla 0 % (0/5), sběr štěpu úspěšný u 71 % nemocných (5/7), doba do sběru štěpu s mediánem 22,0 dne (19-25), doba do přijetí štěpu s mediánem 15 dní (11-18), ale u jednoho nemocného musel být podán záložní štěp (přijetí den +95). Tolerance transplantační procedury i následné imunoterapie byla velmi dobrá. U 5 z 8 nemocných došlo ke zlepšení stavu onemocnění. U všech nemocných ve fázi akcelerace došlo k přesunu do chronické fáze. U dvou nemocných bylo pozorované zlepšení cytogenetického nálezu. Závěr: Vybraný vysokodávkovaný chemoterapeutický režim i následná imunoterapie byly dobře tolerovány. Přijetí štěpu může být problematické u výrazně předlčených nemocných. Zvolený léčebný postup nevedl k navození kompletní cytogenetické remise, ale u nemocných došlo ke zlepšení a stabilizaci onemocnění na úrovni chronické fáze nejméně po dobu 6 měsíců po provedení transplantace. Nelze rozhodnout, zda hlavním přínosem bylo provedení autologní transplantace, podání imunoterapie nebo jejich kombinace.

Klíčová slova: CML, IL-2, imunoterapie, transplantace

Abstract: Efficacy of a protocol of adoptive immunotherapy using IL-2 activated autologous graft followed with IL-2 and GM-CSF immunotherapy was investigated. Interleukin 2 (IL-2) can generate non-specific cytotoxic effectors like Natural Killer (NK) cells. Protocol was activated in patients with chronic myeloid leukemia, in which treatment response can be monitored on molecular level and immunotherapy plays fundamental role in the treatment. Methods and Patients: 8 patients (pts.) with late chronic phase (CP) or accelerated phase (AP) of CML received IL-2 activated graft. Mini ICE (idarubicin, Ara-C, etoposid) was used before PBSC collection, busulphan 12-16 mg/m² was used as myeloablative regimen. One-month immunotherapy (IL-2 0,5 x 10⁶ IU/m²/day/s.c/days 2-28; GM-CSF 75g/m²/day/s.c/days 7-28) was followed 6-months interferon alpha therapy (3x3MU/wk). 3 pts. received IL-2 activated back-up only due to insufficient PBSC collection. Results: Early transplant related mortality was 0 % (0/5), collection of autologous graft was successful in 71 % pts., median of the time to graft collection was 22,0 days (19-25), neutrophil engraftment occurred on day 15 (median) (range 11-18) in 4 pats. One pt. required back-up infusion with engraftment on day +95. Toxicity of chemotherapy (mini-ICE, busulphan) was acceptable; toxicity of immunotherapy was minimal. 5 of 8 patients improved their disease (from AP to CP), two cytogenetic responses (1/1; major/minor) were observed. Conclusion: Autologous transplantation followed with low dose immunotherapy had acceptable toxicity and stabilized disease in chronic phase in patients with late chronic phase or accelerated phase of CML. Engraftment and graft collection could be problems in these patients. Based on these results we can not decide if more important for improvement of patients is responsible transplantation procedure or immunotherapy.

Key words: CML, IL-2, immunotherapy, transplantation

Úvod

Jediným léčebným postupem s možností kompletního vyléčení nemocných s chronickou myeloidní leukémií (CML) je v současnosti alogenní transplantace kostní dřeně (TKD) nebo

převod alogenních periferních kmenových buněk (PKB) (1). Přibližně v 75 % indikací není nalezen vhodný dárce nebo je alogenní transplantace kontraindikovaná z jiných důvodů. Vlastní provedení alogenní transplantace je poměrně rizikovou

procedurou s vyšší mortalitou ve skupině nepřibuzenských dárků (2, 3). Zkouší se řada experimentálních léčebných postupů s cílem najít léčebnou strategii s kurativním potenciálem a případně nižší toxicitou. Perspektivní se zdají metody modulující reakci štepů proti hostiteli (graft versus host disease - GVHD), protokoly využívající nemyeloablativní režimy (4). Léčebná účinnost autologní TKD nebo autologního převodu PKB je limitovaná kontaminací štepů nádorovými progenitory a především nepřítomností reakce štepů proti nádoru. Výsledky doposud publikovaných nerandomizovaných studií naznačují, že časné zařazení autologní TKD by mohlo být přínosem oproti standardní léčbě (5). Bohužel má ale většina přežívajících nemocných známky relapsu onemocnění (6). Prodloužení života bude způsobeno především snížením nádorové masy vysokodávkovanou léčbou a následným zpomalením přirozeného vývoje onemocnění. Ke kompletní eliminaci nádorových buněk, kterou je v některých případech vidět po alogenní transplantaci, však nedochází. Existuje řada prací snažících se o snížení nebo odstranění nádorových progenitorů ze štepů u nemocných s CML podstupujících autologní TKD. Postupy "in vivo" čištění štepů (předtransplantační indukční a mobilizační chemoterapie) i manipulace se štepem „ex vivo“, by měly vést k získání maximálně čistého štepu při udržení dostatečné kvality štepu pro časné a kvalitní přijetí transplantátu. Smysluplnost takového úsilí není jasná a neexistuje žádná randomizovaná studie prokazující přínos takového postupu pro zlepšení výsledků transplantační léčby (6, 7, 8). Je téměř jisté, že vysokodávkovaná chemoterapie není schopna kompletně eradikovat nádorové hematopoetické kmenové buňky. Autologní TKD však může vytvořit dobrou startovací pozici pro zesílení léčebného efektu imunoterapie tím, že uvádí chorobu do stavu minimální zbytkové choroby. Tato situace se dnes obecně považuje za stav, při kterém může mít nemocný podstupující autologní transplantaci největší užitek z imunoterapie vzhledem k limitované schopnosti imunitního systému eradikovat nádor. Nepřímým důkazem je pozorování obnovy citlivosti CML na INF po provedení autologní TKD a zpravidla použití nižší dávky INF po autologní TKD, než při zahájení léčby (6). Existuje dostatečné množství vědeckých podkladů pro tvrzení, že CML je nádorovým onemocněním, kde má reakce štepu proti leukémii (graft versus leukemia effect - GVL) klíčovou roli v léčbě onemocnění (9) a kde má reakce GVL na léčebné odpovědi větší podíl než vysokodávkovaná chemoterapie, podaná v rámci transplantačního režimu. Stimulace autologní GVHD, respektive autologního GVL efektu, je dnes ověřenou skutečností na zvířecích modelech i v klinických studiích u různých experimentálních nádorů, včetně leukémie. Autologní efekt GVHD lze vyvolat cyklosporinem (10), IL-2 (11), aktivací LAK (lymfokiny aktivovaní zabíječi) buněk pomocí IL-2 (12), převodem autologního štepu kultivovaného s cytokiny (13). Klinické studie probíhají. Přínos takového postupu není zatím v klinické praxi jasně prokázán. Je prokázána cytotoxická aktivita aktivovaných NK buněk u CML (14). O specifických T lymfocytech, schopných cíleně ničit buňky CML mechanismem omezeným na HLA komplex, jsou rozporuplné informace (15). Byla prokázána specifická aktivita T lymfocytů proti proteinu p210. Využití aktivovaných autologních T lymfocytů proto může mít své opodstatnění (16). Je ověřené, že peptidy připravené z povrchu leukemických buněk mohou sloužit jako specifické antigeny pro stimulaci specifické protinádorové T-buněčné léčebné odpovědi (17). V této době běží klinické studie s INF nebo s INF a IL-2 jako udržovací léčbou u CML po provedení autologní TKD, studie zkoušející vyvolat autologní reakci štepu proti leukémii pomocí aktivovaných LAK a NK buněk získaných z periferní krve (8, 18). Interleukin 2 je zkoušen v léčbě řady hematologických malignit a v proběhlých klinických studiích nebyl prokázán jeho zásadní léčebný efekt (19, 20). V této práci popisujeme naše výsledky fáze I/II klinické studie,

ve které jsme u nemocných s CML využili kombinace autologní transplantace IL-2 aktivovaným štepem PKB s okamžitou krátkodobou jednoměsíční imunoterapií pomocí GM-CSF a IL-2 a následnou udržovací léčbou INF. Onemocnění CML bylo vybráno záměrně jako vhodný model pro sledování účinnosti experimentální léčby ze tří důvodů: (1) imunitní mechanismy u této choroby hrají významnou roli, jak lze pozorovat z léčebného účinku alogenní reakce štepu proti leukémii po převodu dárcovských T buněk; (2) CML je onemocněním s možností velmi přesného hodnocení účinnosti léčby a dynamiky onemocnění. Díky charakteristické chromosomální translokaci t (9;22), vedoucí ke tvorbě chimerického genu bcr-abl, je CML ideálním modelovým nádorovým onemocněním pro testování experimentální léčby s možností monitorování zbytkového nádorového onemocnění (21); (3) autologní TKD je dnes intenzivně zkoušenou metodou i u této diagnózy a její kombinace s imunoterapií by mohla být dalším přínosem pro léčbu nemocných s CML, kteří nemají vhodného dárce.

METODY A NEMOCNÍ

Výběr nemocných: Z 10 nemocných s CML v chronické fázi nebo ve fázi akcelerace byli vyřazeni dva nemocní pro rozvoj blastického zvratu. Z následujících 8 nemocných prošlo celým protokolem 5 nemocných. Těm nemocným byl podán záložní aktivovaný štep kostní dřeně bez myeloablativní chemoterapie z důvodu nemožnosti sběru dostatečného štepu PKB. Základní

Tabulka 1: Charakteristika nemocných ve studii a průběhu stimulačního režimu

Nemocný	Doba do mobilizace (M)	Předělá léčba	Stádium (CHF/AF)	Dny do zahájení sběru	Dny sběru	Léčebná odpověď	Ph (%) ve štepu
1	24	HU, INF, ARA-C	AF	23	3	AF	40,6%
2	30	HU	AF	19	2	CHF	100%
3	66	HU, INF	AF	*	*	CHF	100%
4	57	Busulfan, HU, INF	CHF	22	5	CHF	64,20%
5	39	HU, INF, ARA-C, Mitoxantron, Daunorubicin	CHF	21	2	AF	47,60%
6	40	HU, INF	CHF	25	6	PHR	+
7	66	INF, ARA-C, IDA, Mitoxantron	AF	*	*	AF	+
8	41	HU, INF	CHF	*	*	CHF	+

* sběr štepu nezahájen, + nehodnoceno

AF = fáze akcelerace, CHF = fáze chronická, PHR = parciální hematologická remise, HU = hydroxyurea, INF = interferon

data o těchto nemocných včetně reakce na stimulační léčbu jsou uvedena v tabulce 1. K mobilizaci byl použit režim mini ICE (idarubicin 8mg/m² den 1-3; cytosin-arabinosid 800mg/m² den 1-3; etoposid 150mg/m² den 1-3) a G-CSF. U 5 nemocných s dostatečným štepem PKB a s využitím přípravného režimu busulfanem 12 mg/m² pro nemocné v AF a busulfanem 16 mg/m² ve fázi chronické byla provedena autologní transplantace. U jednoho nemocného byla vzhledem k preexistujícímu poškození jater použita dávka 8mg/m² busulfanu. U všech 8 nemocných byl podán IL-2 aktivovaný štep s následnou měsíční imunoterapií IL-2 0,5 x 10⁶ IU/m²/den ode dne +1 do dne +28. Standardní dávka GM-CSF byla 1 amp. á 400 µg/den ode dne +7, do přijetí štepu a následně GM-CSF 75µg/m²/den do dne +28. Před podáním IL-2 aktivovaného štepu byla vedle standardního postupu při podávání transplantátu použita profylaxe paracetamolem (paralen), antihistaminikem (dithiaden) a dolsinem. V průběhu imunoterapie IL-2 byl podáván paralen. Po měsíční imunoterapii IL-2 + GM-CSF následovala 6 měsíční imunoterapie interferonem alfa 5 x 3 MU týdně podkožně, umožnil-li to krevní obraz. Poté byli nemocní převedeni na léčbu

podávanou před vstupem do studie asrovnávali jsme dávkování hydroxyurey (vtalir) s původní dávkou dostačující ke stabilizaci onemocnění.

Kultivace autologního štěpu s IL-2: Veškeré manipulace (mimo rozmrazování, přepouštění a centrifugace) se standardně provádějí za aseptických podmínek v laminárním boxu (Flow box CLEAR AIR II B). Zamrazovací vak (dále jen ZV) s koncentrátem kostní dřeně (KD) nebo PKB, kryoprezervovaný v roztoku obsahujícím 10 % DMSO, je rozmražen ve vodní lázni o 40 °C. Obsah ZV je promíchán s promývacím roztokem (50 ml 20 % lidského albuminu, 250 ml Hanksova roztoku, DNase v koncentraci 1000 IU/ml a 3 ml heparinu) po dobu 3-5 min. Centrifugace (JOUAN GR4 22) probíhá při teplotě 4 °C, 530g, 15 min. Vak je po centrifugaci umístěn do plazmaextraktoru a je odtáženo maximum plazmy. Postup se opakuje podruhé s použitím promývacího roztoku stejného složení, ale již při vyšší teplotě (centrifugace: 20 °C, 530g, 15 min.). Vždy byly změřeny ztráty buněk v odtáženém supernatantu. Postup krátkodobé kultivace buněk s IL-2 je modifikací publikované metodiky (22). Sediment buněk je smíchán se 100 ml kultivačního media (X-VIVO™ 10, Bio Whittaker, Maryland, USA) a buněčná suspenze je rovnoměrně rozdělena do připravených kultivačních vaků (LIFECCELL, Tissue Culture Flask BAXTER) v koncentraci $2,5 \times 10^6$ leukocytů/ml média pro štěp kostní dřeně nebo 10×10^6 leukocytů/ml média pro štěp periferních kmenových buněk. Kultivační vaky obsahují X-VIVO 10 médium a následné reagents: L-glutamin v koncentraci 4,4 mmol/100 ml (L-glutamin 200 mmol/l) (SIGMA CHEMICAL Co), heparin v koncentraci 50 UI/ml (HEPARIN 10 ml, 5000 UI/ml, LÉČIVA) a DNase v koncentraci 1000 IU/ml štěpu (pro preklinické účely DNase I, Boehringer Mannheim; pro klinické použití rekombinantní DNase PULMOZYME 2,5 mg; Hoffmann - La Roche LTD). Interleukin 2 (PROLEUKIN® 18 x 10⁶ IU rh IL 2/1,2 ml, CHIRON B.V.) je přidán v koncentraci 6 000 IU/ml roztoku. Vaky jsou důkladně promíchány a uloženy na 24 hodin do inkubátoru s teplotou 37 °C a 5 % CO₂ (CO₂ inkubátor CELLSTAR model QWJ 700 SVBA; QÜEUE Systems Inc. USA). Za 24 hodin jsou odebrané předepsané bezpečnostní kontrolní odběry. Obsah kultivačních vaků je přepuštěn do 600 ml transfer vaků (maximálně 500 ml na jeden transfer vak) s následnou centrifugací (20 °C, 530g, 15min.). Postupně je ze všech zcentrifugovaných transfer vaků v plazmaextraktoru odtážen supernatant. Sediment ze všech transfer vaků je resuspendován ve 150 ml Hanksova roztoku a suspenze buněk je po zhodnocení bezpečnostních odběrů neprodleně podána. Ze všech kultivačních vaků jsou provedeny v den -1 (před přidáním IL-2) a za 24 hodin tyto odběry: krevní obraz včetně automatického diferenciálního rozpočtu leukocytů (Analyzátor ABBOT CELL-DYN 3500 systém, ABBOTT DIAGNOSTICS), koncentrace CFU – GM kultivačně, odběr na flowcytometrické vyšetření, mikrobiologické vyšetření (hemokultura OXOID), vyšetření vitality a cytogenetické vyšetření. Ze všech kultivačních vaků je před zkoncentrováním buněk provedeno mikrobiologické mikroskopické vyšetření (barvení dle Gramma). Po zkoncentrování je ověřena ztráta buněk v supernatantu.

Flowcytometrické vyšetření štěpu pro zjištění kontaminace buňkami CML: K analýze kmenových buněk u CML jsme použili kombinaci značených monoklonálních protilátek anti-CD34 PE (Becton-Dickinson, U.S.A.) a anti-HLA-DR FITC (Caltag, U.S.A.). Stanovujeme subpopulace CD34⁺HLA-DR⁺ a CD34⁺HLA-DR⁻. V subpopulaci CD34⁺HLA-DR⁺ dle literatury převládají Ph pozitivní buňky (23).

Flowcytometrické vyšetření aktivovaného štěpu: Postup zpracování vzorků je totožný s výše uvedenou metodikou. Použili jsme protilátky anti-CD3 FITC, CD25 PE, CD38 PE, CD69 PE a HLA-DR PE (Caltag, U.S.A.). Stanovujeme expresi znaků aktivace na CD3⁺ na lymfocytech v kombinacích: CD3⁺25⁺, CD3⁺38⁺, CD3⁺69⁺, CD3⁺HLA-DR⁺.

Flowcytometrická analýza typů imunokompetentních buněk ve štěpu: Postup při zpracování vzorků je identický s postupem uvedeným v úvodní metodice. Použili jsme monoklonální protilátky anti-CD3 FITC, CD4 PE, CD8 FITC, CD56 PE (Caltag, U.S.A.). Hodnotili jsme následující subpopulace: T lymfocyty CD3⁺, T pomocné CD3⁺4⁺, T cytotoxické CD3⁺8⁺, NK buňky CD3⁺CD56⁺ (24).

Flowcytometrická analýza progenitorových buněk ve štěpu: Metodika zpracování vzorků je shodná. Ke značení jsme použili monoklonální protilátku anti-CD34 PE (Becton-Dickinson, U.S.A.) a hodnocení jsme prováděli dle Milánského protokolu (25).

Cytogenetické vyšetření a vyšetření metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH): Materiál pro cytogenetické vyšetření nemocných s CML byl získán standardní aspirací kostní dřeně a vzorek autologního štěpu byl odebrán ze štěpu před kultivací s IL-2. Buňky jsou kultivované v médiu RPMI 1640 (Sigma) s 30 % fetálního telecího séra při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Na poslední hodinu kultivace je přidán kolcemid. Fixace mitotických preparátů je provedena standardním způsobem: suspenze buněk je vystavena hypotonii 0,075 M KCl po dobu 15 minut s následnou fixací směsí metanol-ledová kyselina octová. Fixace se opakuje 3x. Technika FISH byla prováděna pomocí dvoubarevných LSI bcr/abl DNA sond firmy VYSIS značených fluorochrómy SpectrumGreen/SpectrumOrange dle firemního protokolu. Hybridizační signály byly hodnoceny u 200 interfázních buněk a analyzovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX60, doplněného Č/B integrující CCD kamerou (COHU 9410). Fluorescenční obrazy byly snímány a zpracovány pomocí software LUCIA-FISH-4.21 (Laboratory Imaging, s.r.o. Praha).

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) k detekci

CML buněk: Sekvenci bcr/abl genu lze využít jako leukemického markeru k odlišení maligních CML buněk od zdravé populace leukocytů na úrovni DNA. Ze vzorků 2×10^6 buněk štěpu aktivovaného IL-2 nebo vzorku kontrolního (bez aktivace IL-2) byla nejprve izolována celková RNA pomocí afinitního systému QiaGen (QiaGen, U.S.A.) a po extrakci transkribována reverzní transkriptázou MuLV (Perkin-Elmer). Pro sledování kvantitativních změn v expresi fúzního genu bcr/abl po inkubaci s IL-2 byla použita modifikovaná semikvantitativní metoda PCR (sQ-RT-PCR), která vychází z metody komparativní PCR, kde je současně s translokovaným úsekem sledovaného genu bcr/abl, amplifikován i endogenní interní standard, kterým je část exonu 2 sekvence abl genu lokalizována mimo zlomové místo. Znamená to, že jsme jako cílovou sekvenci pro PCR použili rozdílnou sekvenci stejného genu abl se stejným vazebným místem pro jeden primer ze dvou použitých párů primerů a s rozdílnou délkou amplifikovaného úseku. Amplifikace s Taq-DNA polymerázou probíhala v 30 cyklech v cyklu Perkin-Elmer 9600 a produkty byly hodnoceny elektroforeticky v 8 % polyakrylamidovém gelu po obarvení ethidium bromidem. Kvantifikace byla prováděna denzitometricky pomocí dokumentačního a analyzačního systému KS- 4000 (Ultra-Lum, Inc., U.S.A.).

Kultivace CFU-GM (colony-forming unit- granulocyte, macrophage) byla prováděna na oddělení klinické hematologie na imobilizačním médiu 0,33 % agaru (Gibco). Kompletní médium tvoří Iscova modifikace Dulbeccova média (SIGMA), 20 % fetální telecí sérum, 2 % penicilin, streptomycin a jako zdroj růstových faktorů slouží 5 % kondicionované médium 5637. Nasadili jsme 2×10^5 leukocytů na miskou (Falcon 35 mm) a z jednoho vzorku jsou kultivovány 3 misky. CFU-GM jsme hodnotili po 14-denní inkubaci v řízené atmosféře (5 % CO₂, 37C, inkubátor JUAN IG 150) pomocí inverzního mikroskopu (Olympus CK 2). Klony obsahující více jak 40 buněk jsme počítali jako kolonie.

Bioptické vyšetření kůže bylo prováděno pro případ subklinických GVHD změn v den +14.

Klinické monitorování a hodnocení

Úspěšné přihojení štěpu bylo definováno jako dosažení $\text{Gran} > 0,5 \times 10^9/\text{L}$ a trombocytů $> 50 \times 10^9/\text{L}$. Dostatečná kvalita autologního štěpu byla definována následujícími kritérii: štěp bez makroskopických sraženin nebo lze mikrosraženinu odfiltrovat; negativní mikrobiologická kultivace v den -1 aktivace; negativní výsledek barvení dle Gramma v den 0; ztráty buněčnosti po koncentraci štěpu menší než 2 %; vitalita buněk před koncentrací štěpu větší než 85 %; hodnota CD34^+ buněk v den 0 z vaku $> 2,0 \times 10^6/\text{kg}$; hodnota CFU-GM před zamražením je $> 5,0 \times 10^4/\text{kg}$ a hodnota CFU-GM po rozmražení $> 1,0 \times 10^4/\text{kg}$. V případě, že nedošlo k přihojení štěpu do dne +21 s parametry přihojení $\text{Leu} > 1,0 \times 10^9/\text{l}$ a trombocytů $> 20 \times 10^9/\text{l}$ bez nutnosti substituce, byl podán záložní štěp.

Hodnocené parametry studie byly: přihojení štěpu, toxicita transplantační léčby dle kritérií SWOG, imunogenní potenciál aktivovaného štěpu hodnocený (1) klinicky vývojem manifestní autologní GVHD, (2) laboratorně pak dle flowcytometrických známek aktivace štěpu a aktivace imunokompetentních buněk organismu a (3) u vybraných nemocných byly odebrané a zamražené vzorky pro cytotoxické testy s radioaktivním chrómem ^{51}Cr . Pro případ subklinické manifestace GVHD byla v den +14 nemocným provedena biopsie kůže. Výsledné hodnocení bylo zaměřeno na dosaženou léčebnou účinnost hodnocenou srovnáním stavu onemocnění před vstupem do studie, provedením mobilizace, transplantace a v pravidelných intervalech po ukončení imunoterapie. Byla porovnávána též intenzita potřebné cytoredukční léčby před vstupem do studie a po 6 měsíční léčbě interferonem, po které byli nemocní užívající před vstupem do studie hydroxyureu (6x) převedeni zpět na tento lék.

Kritéria pro stanovení léčebné odpovědi byla:

Pro definici fází onemocnění byla užitá obecně platná kritéria – chronická fáze (26, 27), akcelerovaná fáze (28, 29) a blastický zvrst (30). Léčebná odpověď pak byla definována jako kompletní hematologická remise (CHR) v případě, že leukocyty byly pod $10 \times 10^9/\text{l}$, trombocyty v rozmezí 150 až $450 \times 10^9/\text{l}$, v diferenciálním krevním obraze nebyly přítomny žádné granulocytární prekursor, buněčnost kostní dřeně byla redukována a všechny klinické symptomy včetně splenomegalie regredovaly. Pro označení léčebné odpovědi jako parciální hematologické remise (PHR) bylo nutno, aby počet leukocytů nepřesáhl $20 \times 10^9/\text{l}$, či aby jejich počet klesl pod 50 % výchozí hodnoty, aby došlo k redukcí trombocytózy a splenomegalie o 50 % a v případě perzistující splenomegalie byl krevní obraz ve fyziologickém rozmezí. V případě nesplnění kritérií kompletní či parciální hematologické remise nebylo dosaženo žádné léčebné odpovědi (31). Jako kompletní cytogenetická remise byl hodnocen stav, kdy došlo ke ztrátě Ph pozitivních metafází, jako velká cytogenetická remise stav, kdy zůstalo 1-34 % Ph pozitivních metafází, v případě malé cytogenetické remise 35-65 % Ph pozitivních metafází, v případě minimální cytogenetické remise 66-95 % Ph pozitivních metafází a jako žádná cytogenetická odpověď byla hodnocena přítomnost 96-100 % Ph pozitivních metafází (32).

Statistická analýza dat

K celkové prezentaci výsledků byly použity běžné sumární statistiky vyjadřující tvar rozložení hodnocených parametrů (aritmetický průměr, medián, rozptyl). Prezentované statistické údaje byly získány souhrnem dat ze všech kultivovaných štěpů u 8 nemocných s CML. Analýza dat zahrnuje základní popisné zpracování flow-cytometrických dat. Kromě parametrů získaných v periferní krvi jsou analyzována data ze sternální punkce. Hodnoty v grafu 1. představují průměrné odhady doplněné směrodatnými odchylkami získané po zpětné transformaci z původně transformovaných procentických hodnot (transformace funkcí arcsin). I přes značnou variabilitu odhadů, způsobenou především malou velikostí vzorku, je zřetelná tendence většiny

Cd markerů k nárůstu hodnot v různých fázích monitorovaného časového vývoje. Statistická významnost pozorovaných změn je vyjádřena označením písmenem – varianty označené a nebo b se od sebe statisticky významně liší (ANOVA test s následujícím testováním kontrastů).

Výsledky

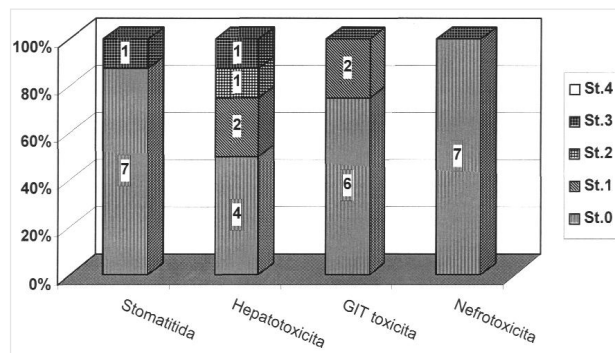
Ke dni 31. 9. 1999 bylo vyhodnoceno 8 nemocných, z nichž 5 nemocných podstoupilo kompletní léčbu dle protokolu studie a 3 nemocným (s nemožností získat kvalitní štěp) byl podán IL-2 aktivovaný štěp po neúspěšné mobilizaci (2 nemocní), respektive po podání ne-mobilizačního režimu mini ICE (1 nemocný).

Získání autologního štěpu PKB, toxicita a účinnost stimulačního režimu: Základní data o výtěžnosti štěpu jsou uvedena v tabulce 2. Doba od stanovení diagnózy do provedení mobilizace byla u všech nemocných delší než 2 roky (medián 40,5 měsíce; rozptyl 24-66 mēs.), čemuž odpovídala

Tabulka 2: Parametry štěpu před zamražením

	průměr	rozptyl
$\text{CD34}^+ \times 10^6/\text{kg}$	14,6	3,05–49,45
$\text{CFU-GM} \times 10^4/\text{kg}$	54	12,46–117,03
Pozitivita Ph (%)	63	41–100
Úspěšnost sběru 71% (5/7)		

Tabulka 3: Toxicita stimulačního režimu (SWOG kritéria)



i předléčenost nemocných. Přesto byla úspěšnost sběru 71 % (5/7). Časový interval do zahájení sběru štěpu byl 22,0 dne (medián; rozptyl 19-25 dnů) s délkou sběru štěpu od 2 do 6 dnů. Tato část protokolu byla z hlediska organizačního i zátěže pro nemocného nejobtížnější. Přesto u 2 nemocných (č. 2, 6) proběhlo toto období bez komplikací. Přehled pozorovaných nežádoucích účinků hodnocených podle kritérií SWOG (South West Oncology Group) nepřesáhl stupeň III (tabulka 3). Kontaminace štěpu byla i přes použití režimu mini ICE značná (průměr 63 %; rozptyl 41-100 %). U třech nemocných došlo ke zlepšení stavu onemocnění po chemoterapii mini-ICE (z AP do chronické fáze), u jednoho nemocného bylo dosaženo parciální hematologické remise.

Ex vivo manipulace se štěpem: Flowcytometrická analýza štěpů před i po manipulaci byla podobná jako u štěpů KD vyšetřovaných v přípravné preklinické fázi protokolu (8). V tabulce 4 jsou srovnání vybraných parametrů štěpu ze dne -1 a dne 0 (24 hodin po zahájení kultivace) s návratností CD34^+ buněk v 82,5 % a CFU-GM v 51 %.

Průběh a účinnost transplantační léčby s využitím IL-2 aktivovaného štěpu s následným blokem imunoterapie IL-2 + GM-CSF: V průběhu klinické studie žádný z nemocných nezemřel. V tabulce 5 jsou základní údaje o průběhu transplantace a léčebné účinnosti hodnocené 1 měsíc po provedení transplantace. Doba do přihojení štěpu byla 15,0 dne

Tabulka 4: Parametry štetu před a po kultivaci s IL-2

Medián (n=5)	Ly+Mo/kg (x 10 ⁸)	CD34 ⁺ /kg (x 10 ⁶)	CFU-GM/kg (x 10 ⁴)	Vitalita buněk
Den -1 (rozptyl)	1.57 (0,18–0,42)	3,12 (0,66–8,91)	83 % (0,37–54,27)	(80–95)
Den 0 (rozptyl)	0.24 (0,10–0,27)	1.29 (0,23–2,44)	1,60 (0,15–12,37)	96 % P (95–98)
Návratnost	103,9 %	82,5 %	51,3 %	–

p = p < 0, 05, Ly = lymfocyty, Mo = monocyty

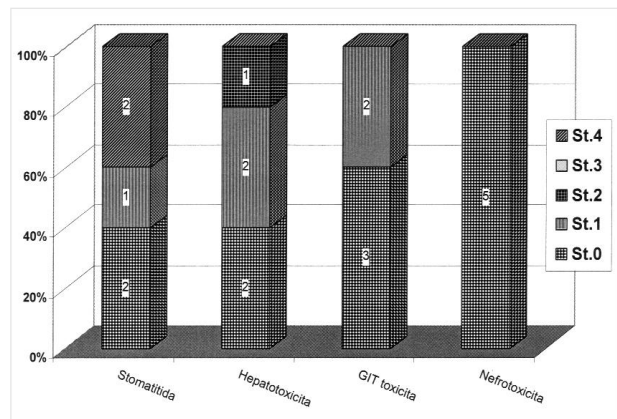
Tabulka 5: Hodnocení průběhu transplantace a imunoterapie (IL-2 + GM-CSF)

Nemocný	Doba do přijetí štetu (dnů)	Počet dnů v leukopenii < 1.0	Komplikace	Horečky nad 38 °C (dnů)	Léčebná odpověď	Spotřeba krevních derivátů ERY/TR
1	95	53	mukositida I, febrilní neutropenie	14	CHF	25/7
2	18	8	febrilní neutropenie	2	CHF	2/3
3	*	*	bez komplikací	0	CHF	0/0
4	11	0	febrilní neutropenie	4	CHF	0/2
5	14	6	kožní reakce po s.c. podání IL2, febrilní neutropenie	7	CHF	5/1
6	16	5	mukositida IV, kanylová sepse	2	CHF	6/8
7	*	*	febrilní neutropenie	2	AF	2/2
8	*	*	febrilní neutropenie, zánětlivé morfy na kůži	4	CHF	0/4

* štep podán bez Busulfanu

AF = fáze akcelerace, CHF=chronická fáze

Tabulka 6: Toxicita Busulfanu (SWOG kritéria)



(medián; rozptyl 11-18 dní). Data nemocného č. 1 nebyla do hodnocení zahrnuta vzhledem k malému počtu transplantací a době do přijetí 95 dnů, s nutností podání záložního štetu kostní dřeně. Tolerance transplantace byla velmi dobrá. Jen u dvou nemocných se objevila mukositida IV. stupně dle SWOG kritérií. Četnost všech monitorovaných toxicit je obsahem tabulky č. 6. Reakce na léčbu byla hodnocena po ukončení měsíčního bloku imunoterapie (IL-2+GM-CSF), která kromě ojedinělých teplot do 38 st.C (2/8) a lokální kožní reakce s bolestivostí (1/8) při aplikaci IL-2, byla nemocnými snášena zcela bez potíží.

Vyhodnocení parametrů aktivace: Ve shodě s námi dříve již provedenými srovnávacími měřeními aktivace štetu na podkladě flowcytometrické analýzy, jsme nezjistili signifikantní změny při aktivaci štetu pomocí IL-2 (data nejsou

ukázána). Vliv na tyto výsledky může mít krátkodobost kultivace. V grafu 1 je analyzován vývoj vybraných flowcytometrických parametrů v potransplantačním průběhu (den +14 až 6 měsíců). Hodnocení markerů aktivace (CD25, CD69, HLA-DR) monitorovaných na CD3⁺ buňkách bylo problematické. Jen pro hodnoty CD25⁺ a CD3⁺CD25⁺ byly nalezeny významné změny s vrcholem v den +28, tj. v době ukončení měsíční potransplantační imunoterapie. Dynamika vzestupu podtypů T lymfocytů měla časovou závislost s maximem vzestupu pomocných (CD4⁺) T lymfocytů v den +14 a +28 a maximem vzestupu cytotoxických (CD8⁺) T lymfocytů v den +60 a +90. Dynamika NK buněk (CD3⁺CD56⁺) měla charakteristický vývoj při použití IL-2 s dosažením maximálního zvýšení počtu NK buněk v 3. měsíci od provedení transplantace (den +90). Hodnoty CD34⁺HLA-DR⁺ buněk měly klesající tendenci, která nebyla vzhledem k velkým rozptylům statisticky významná. Opačný trend měly hodnoty CD34 buněk. Testy cytotoxicity nebyly hodnoceny, respektive pro tento test nebylo možno získat při použití zamražených vzorků reprodukovatelné výsledky.

Průběh, účinnost a tolerance léčby interferonem alfa:

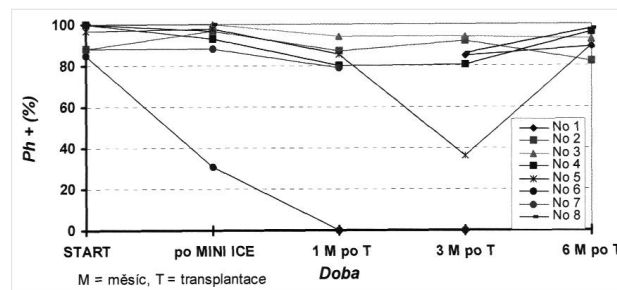
Zahájení 6-ti měsíční imunoterapie interferonem bylo možné zahájit do 1 měsíce po ukončení bloku IL-2/GM-CSF u 4 z 8 nemocných, u dvou nemocných bylo možné zvýšit dávku na 5x3 MU týdně a u 1 nemocného byla dávka redukována na 2x3 MU týdně pro trombocytopenii. V průběhu studie jeden nemocný na vlastní žádost přerušil na 2 měsíce léčbu. U dvou nemocných nebylo až do 4. měsíce možné zahájit léčbu IFN pro přetrvávající trombocytopenii, respektive leukopenii. Celkové hodnocení účinnosti léčby je shrnuto v tabulce 7. Pozorovali jsme snížení Ph pozitivitu v průměru 95 % (rozptyl 85 % - 100 %) před zahájením studie na 65 % (rozptyl 0 % - 94 %) při hodnocení ve 3. měsíci po podání aktivovaného štetu. Dynamiku vývoje Ph pozitivitu u jednotlivých nemocných je znázorněna v grafu 2. U 5 z 8 nemocných došlo ke zlepšení stavu onemocnění a vždy se jednalo o konverzi AF do fáze chronické. U jednoho nemocného došlo k dosažení malé

Tabulka 7: Celkový přehled léčebné odpovědi

Číslo pacienta	Před S (vstup)	Před T (po S)	1 M po T	3 M po T	6 M po T
1	AF	AF	CHF	CHF	CHF
2	AF	CHF	CHF	CHF	CHF
3	AF	CHF	CHF	CHF	CHF
4	CHF	CHF	CHF	CHF	CHF
5	AF	AF	CH	MCR	CHF
6	CHF	PHR	CR	CR	X
7	AF	AF	AF	CHF	X
8	HF	CHF	CHF	X	PHR

S = stimulace, T = transplantace, M = měsíc, X = nehodnoceno, AF = fáze akcelerace, CHF = fáze chronická, PHR = parciální hematologická remise, (M)CR = (malá) kompletní cytogenetická remise

Graf 2: Vývoj pozitivitu PH chromozomu v průběhu léčby



cytogenetické remise a u jednoho nemocného ke kompletní cytogenetické remisi. Nemocní se vstupní CHF zůstali v této fázi nadále. Ze srovnání dávky hydroxyurey potřebné k udržení srovnatelného počtu leukocytů u zatím 3 zhodnocených nemocných vyplývá, že došlo ke snížení potřebné dávky hydroxyurey (z 1500 g na 500 mg; 1300 mg na 600 mg; 500 mg na 0; počítány průměrné dávky na den v průběhu 3 měsíců), což je v souladu se zklidněním onemocnění podle laboratorních ukazatelů.

Diskuse

Interleukin 2 patří mezi standardní imunomodulační látky a aktivace LAK buněk je klinicky testována po dvě desetiletí. Zatímco v *in vitro* experimentu nebo na zvířecím modelu, byl efekt IL-2 nebo LAK buněk pozorován, klinický efekt u hematologických malignit nebyl doposud jednoznačně prokázán a IL-2 našel své indikační místo v současnosti jen v léčbě maligního melanomu a renálního karcinomu (33). Aktivace štetu s IL-2 je zkoušena od začátku 90-tých let a její přínos není přesně stanoven (20). Klinické studie probíhají. Cílem této klinické studie bylo využití vhodného klinického modelu, který umožňuje změřeni i minimální léčebné odpovědi na úrovni zbytkového nádorového onemocnění pomocí cytogenetického vyšetření, případně PCR vyšetření.

S ohledem k limitacím statistických závěrů, z důvodu malých čísel, nedokážeme u nemocných s CML jasně definovat parametry bezpečného štetu. Z klinického hlediska považujeme za rizikovou skupinu pro nedostatečné přihojení štetu skupinu nemocných s CML, s delší dobu trvající akcelerací choroby, neboť marker CD34⁺ může být přítomen i na populaci nádorových buněk (23) a podobně tomu může být i při hodnocení CFU-GM (34). U dlouhodobě léčených nemocných s CML bude s postupem času nedostatečné množství progenitorových buněk a standardní parametry kvality štetu PKB (CD34⁺ a CFU-GM) mohou selhat právě proto, že řada leukemických buněk bude zahrnutá do výpočtu celkového množství. Proto byl u každého nemocného vyžadován sběr záložního štetu. Optimální je odběr štetu časné po stanovení diagnózy. Tam, kde byl štep odebrán časné po diagnóze a u nemocných dobře reagujících na léčbu, lze očekávat i bezproblémové použití aktivovaného štetu, třebaže při následné manipulaci se štetem dochází k redukci CD34⁺ buněk i CFU-GM. O výše uvedeném nás přesvědčilo i pozorování u druhého nemocného s klinickým použitím štetu, jehož hodnoty CD34⁺ buněk po aktivaci ($0,3 \times 10^6/\text{kg}$), byly hluboko pod hranici našich bezpečnostních pravidel (počet CD34⁺ buněk $> 2,0 \times 10^6/\text{kg}$; CFU-GM $> 5 \times 10^4/\text{kg}$ nemocného), a přesto došlo k rychlému a nekomplikovanému přihojení štetu. V průběhu kultivace může změnit povrchový membránový CD34⁺ protein svou expresi, aniž by se jednalo o poškození a zmenšení počtu progenitorových buněk. Naše výsledky týkající se kvality kultivovaného štetu považujeme za srovnatelné s jinými pracovišti (35- 38) a umožnily nám zahájit klinickou část programu.

Třebaže vlastní aktivace pomocí IL-2 kvalitu štetu zásadně neovlivňuje, v řadě novějších protokolů je okamžité podání IL-2 po podání štetu odkládáno až na dobu, kdy je štep přihojen, a to především z bezpečnostních důvodů. Kumulace vlastních nežádoucích účinků IL-2 a obecných komplikací souvisejících s provedením transplantace, může být pro nemocného velmi nebezpečná (22). V našem klinickém protokolu bylo použito nízké imunomodulační dávky IL-2 v kombinaci s nízkou dávkou GM-CSF (Leucomax, Schering-Plough). GM-CSF je dnes považován za velmi perspektivní imunomodulační látku zvyšující expresi antigenu na povrchu nádorových buněk a usnadňující zpracování antigenu imunokompetentními buňkami (39, 40). Až na ojedinělé subfebrilie a mírnou lokální bolestivost po aplikaci IL-2 podkožně, byla tato kombinace tolerována bez jiných vedlejších účinků, třebaže aplikace IL-2 byla zahájena již druhý den po podání aktivovaného

autologního štetu.

Projevy aktivace imunitního systému byly diskrétní. Výjimkou je vzestup hodnot pro receptor IL-2 (CD25⁺) a jeho exprese na CD3⁺ buňkách, jehož dynamika časově souvisí s podáváním IL-2. Podobně došlo k statisticky významnému nárůstu NK buněk s časovým opožděním při podávání imunoterapie a maximem v období druhého a třetího měsíce po transplantaci, tak jak bylo pozorováno v jiných pracích (18). Pozorovanou rozdílnou dynamiku pomocných (CD4⁺) a cytotoxických (CD8⁺) lymfocytů v potransplantačním období a při podávání imunoterapie nemůžeme srovnat s podobnou dynamikou T buněk u kontrolního souboru bez imunoterapie, což je největší limitací pozorovaných nálezů, respektive jakýchkoliv obecnějších závěrů. Je pravděpodobné, že i v tomto případě měla podávaná imunoterapie vliv na vzestup CD8⁺ subpopulace T lymfocytů s maximem v období mezi 2. a 3. měsícem po transplantaci.

U výrazně předlžených nemocných v této studii lze považovat snahu o získání "čistého štetu" po mobilizačním režimu mini ICE za nemožnou, třebaže je tento považován za jeden z nejlepších režimů ke snížení kontaminace. Kontaminace štetu leukemickými progenitory s mediánem 71 %, bez získání čistého štetu, je v souladu s jinými sděleními a předlžeností nemocných delší než 3 roky (41). I když přínos nádorových buněk ve štetu pro relaps onemocnění byl v malém procentu již prokázán (42), považujeme tento problém za okrajový, neboť pro relaps onemocnění je rozhodující zbytkové nádorové onemocnění v organismu, jak lze odvodit od četných relapsů i po alogenních transplantacích.

Statistická analýza dat byla provedena pro 8 autologních štetů (5x PKB, 3x KD). Klinické studii předcházelo srovnání kvality kontrolních a aktivovaných štetů, které potvrdilo publikované údaje o tom, že IL-2 nemá vliv na kvalitu štetu při krátkodobé kultivaci (8, 43, 44). Zhodnocení redukce počtu jednotlivých typů buněk, CD34⁺ markeru a CFU-GM při krátkodobé kultivaci nám umožnilo nastavit orientační cílové vstupní hodnoty pro sběr štetu. Vzhledem k malému počtu měření nemají výsledky prediktivní sílu a nejsme na základě vstupních parametrů štetu schopni potvrdit bezpečnost štetu pro přihojení.

Několik studií již prokázalo rozdílnost v expresi antigenu HLA-DR, což může přispět k rozlišení zdravých primitivních kmenových buněk (CD34⁺ HLA-DR⁻) a bcr/abl pozitivních primitivních kmenových buněk (CD34⁺ HLA-DR⁺) u nemocných s CML (23). V grafu 1 je vidět dynamika CD34⁺ buněk a dle literatury pravděpodobných zdravých primitivních kmenových buněk (CD34⁺ HLA-DR⁻) ve vzorcích z kostní dřeně. V korelační analýze jsme nepotvrdili negativní korelaci CD34⁺ HLA-DR⁻ buněk a Ph pozitivních buněk hodnocených metodou FISH.

Vlastní výsledky týkající se toxicity režimů považujeme za uspokojivé. Tolerance imunoterapie po transplantaci byla výborná. Následné nasazení interferonu bylo tolerováno hůře. Dávku 5×3 MU IFN týdně bylo možno podat jen ve 2 případech, a to jen krátkodobě s následnou redukcí na dávku 3×3 MU IFN týdně. Jeden z nemocných léčbu pro nižší počet trombocytů přerušil. Zlepšení klinického stavu onemocnění, ve srovnání se stavem onemocnění před zahájením léčby, bylo prokazatelně dosaženo u všech nemocných a udržovací dávku hydroxyurey bylo možno snížit u všech ze 3 předběžně hodnocených nemocných. To podporuje tvrzení, že použití vysokodávkované chemoterapie s podporou autologního štetu nemá kurativní potenciál, ale může stabilizovat onemocnění v chronické fázi, vrátit tudíž onemocnění o krok zpět a zpomalit jeho přirozený vývoj do blastické krize (45).

Přínos IL-2 a kombinované imunoterapie (IL-2 + GM-CSF) zůstává problematický. Je pravděpodobné, že za pozorované projevy kožního GVHD při podobných studiích u jiných onkologicky nemocných, může spíše vyšší dávka použitého IL-2, než obecná aktivace imunokompetentních buněk s projevem GVHD. To podporuje i naše pozorování u jiné diagnózy (mnohočetný myelom), kde jsme rovněž nepozorovali žádné

Graf 1: Vývoj vybraných flowcytometrických parametrů v potransplantačním období

Výskyt buněk (%) (průměrné hodnoty doplněné směrodatnými odchylkami)

Časový profil analýz (dny; 6M – 6. měsíc)

projevy GVHD. Iz tohoto důvodu jsme od rutinního provádění kožní biopsie upustili. Zda je větším přínosem použití imunoterapie nebo chemoterapie, jsme v této studii nedokázali zodpovědět z důvodů krátkého časového intervalu mezi podáním myeloablativní léčby a imunoterapie.

Závěr

V průběhu let 1998 - 1999 jsme klinicky testovali jeden z protokolů adoptivní buněčné terapie - aktivaci autologního štěpu hematopoetických buněk pomocí IL-2. Po zvládnutí preklinické metodiky a ověření bezpečnosti štěpu, jsme přešli ke klinickému zkoušení. Vybraný vysokodávkovaný chemoterapeutický režim i následná imunoterapie byly dobře tolerovány. Podání štěpu bylo u všech nemocných, kromě jednoho, bezpečné, s dlouhodobým přihojením štěpu. Přihojení štěpu může být problematické u výrazně předlčených nemocných. Přesto se zdá být u nemocných ve fázi akcelerace provedení autologní TKD s následnou imunoterapií přínosné. Chronickou myeloidní leukémií je možno vyléčit dle současných poznatků jen alogenní transplantací. Autologní TKD se zdá možnou alternativou léčby pro nemocné, kteří

nemohou být alogenně transplantováni. Přínos takového postupu pro nemocné s CML musí potvrdit randomizované studie. Z experimentálních postupů může být perspektivní kombinace intenzivní imunoterapie navazující na autologní TKD. Tato následná krátkodobá imunoterapie byla při nízkých dávkách cytokinů velmi dobře tolerována. Tento léčebný postup vedl ke zlepšení u 5 z 8 nemocných a stabilizaci onemocnění u dalších 2 nemocných. Krátkodobost monitorování (6 měsíců po provedení transplantace) omezuje význam tohoto zjištění. Využití podobných postupů u méně předlčených nemocných s CML, by mohlo přinést další zlepšení léčebné účinnosti a přispělo by k bezpečnosti celé procedury především snížením rizika nedostatečného přihojení štěpu.

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR 4710-2, MŠMT VZ J07/98-141100003, MŠMT J07/98-6700008

Literatura:

1. Mughal T.I., Goldman J.M.: Chronic myeloid leukaemia: A therapeutic challenge. *Ann Oncol.* 1995, 6, s. 637 - 644.
2. Horowitz, M.M., Rowlings, P.A., Passweg, J.R. et al.: Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International bone marrow transplant registry. *Bone Marrow Transplantation*, 17, 1996, 3, s. 5 - 6.
3. Lamparelli, T., van Lint, M.T., Gualandi, F., Occhini, D. et al.: Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia (CML) from unrelated donors and sibling donors: Single center experience. *Bone Marrow Transplant* 1997, 20, s. 1057-1064.
4. Mayer J, Krahulová M., Kořístek Z., Kubešová H., Freiburger T. et al. Alogenní transplantace periferních kmenových krevetvorných buněk po nemýeloablativním režimu. *Čas.Lék. Čes*, 138, 1999, 20, s.624-627.
5. McGlave, P.B., De Fabritiis, A. et al: Autologous transplants for chronic myelogenous leukaemia: Results from eight transplant groups. *The Lancet*, 1994, 343, s. 1486 - 1488.
6. Bhatia R., Verfaillie C.M., Miller J.S. and McGlave P.B.: Autologous transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 1997, 89, 8, s. 2623- 2634.
7. Hájek R., Krahulcová E., Penka M., Mayer J.: Autologní transplantace kostní dřeně u nemocných s chronickou myeloidní leukémií. *Klinická Onkologie* (v tisku)
8. Barnett MJ, Eaves CJ, et al.: Autografting with cultured marrow in chronic myeloid leukemia: results of a pilot study. *Blood* 84, 1994, 3, s. 724 -732.
9. Cullis, J.O., Barrett, A.J., Goldman, J.M.: Graft vs. leukaemia reactions in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer*, 28A, 1992, 12, s.2069-2074.
10. Jones, R.J., Hess, A.: Autologous graft-versus-host disease. In: Spitzer T., Mazumder A: *Immunotherapy and Bone Marrow Transplantation*. Armonk, NY Futura Publishing, 1995, s. 59 - 69.
11. Massumoto, C., Benyunes M.C., et al.: Close simulation of acute graft-versus host disease by interleukin-2 administered after autologous bone marrow transplantation for hematologic malignancy. *Bone Marrow Transplant*, 1996, 17, s. 351 - 356.
12. Benyunes M, Massumoto C, Higuchi C. et al: Interleukin-2+ - lymphokine-activated killer cells as consolidative immunotherapy after autologous bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia: A preliminary report. *Bone Marrow Transplant*, 1993, 12, s. 159-163.
13. Verma, U.N., Charak B.S., et al.: Interleukin-2 in Bone Marrow Transplantation. In: Buckner D (ed): *Technical and biological components of marrow transplantation*. Kluwer Ac. Publishers, Boston, 1995, s. 315 - 332.
14. Scheffold, C., Brandt, K., et al.: Potential of autologous immunologic effector cell for bone marrow purging in patients with chronic myeloid leukemia. *Bone marrow transplant.*, 1995, 15, s. 33 - 39.
15. Lewalle, P., Hensel, N., et al.: Helper and cytotoxic lymphocyte responses to chronic myeloid leukemia: implications for adoptive immunotherapy with T cells. *Brit J. Hematol.*, 92, 1996, s. 587 - 594.
16. Bocchia M., Koronstved T., Xu Q. et al.: Specific human cellular immunity to bcr-abl oncogene-derived peptides. *Blood* 1996, 87, s. 3587 -3590.
17. Buzyn A., Kemula M., Connan F., et al.: CML patient in hematologic remission can mount a cytotoxic T cell response in vitro against the natural peptides eluted from his CML cells. *Bone Marrow Transplant* 1998, 21 (Suppl. 1), abstr. 229.
18. Miller, J. S., J. Tessmer-Tuck, et al.: Low dose subcutaneous interleukin-2 after autologous transplantation generates sustained in vivo natural killer cell activity. *Biology of Blood and Marrow Transpl* 3, 1997, s. 34- 44.
19. Faber E. IL-2 v léčbě hematologických malignit Zpravodaj klinické farmakologie a farmacie LFUPa FN Olomouc 10, 1996, 2, s. 23-30.
20. Mazumder A.: Experimental evidence of interleukin-2 activity in bone marrow transplantation. *Cancer Journal From Scientific American*, 3, 1997, Suppl 1, s. 37-42.
21. Miyamura, K., Barrett, A.J., Koda, Y., Saito, H.: Minimal residual disease for bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia and implications for graft-versus-leukemia effect: a review of recent results. *Bone Marrow Transplant*, 14, 1994, s. 201 - 209.
22. Meehen, K.R., Badros A., Frankel S.R., Cahill R. et al.: A pilot study evaluating interleukin-2 activated hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. *J Hematotherapy* 1997, 6, 457 - 464.
23. Verfaillie C.M., Miller, W.J., Boylan, K. and McGlave P.B.: Selection of benign primitive hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia on the basis of HLA-DR antigen expression. *Blood*, 79, 1992, s. 1003 - 1010.
24. Lotzová E., Savary C.A., Schachner J.R. et al.: Generation of cytotoxic NK cells in

- peripheral blood and bone marrow of patients with acute myelogenous leukemia after continuous infusion with recombinant interleukin - 2. *Am J Hematology* 37, 1991, s. 88-99.
25. Siena S., Bregni M., DiNicola M., Peccatori E. et al.: Milan protocol for clinical CD34 cell estimation in peripheral blood for autografting in patients with cancer. *Hematopoietic Stem Cells. The Mulhouse Manual*. AlphaMed Press., Dayton, 23-31 (1994).
 26. Galton, D.A.G.: Chemotherapy of chronic myelocytic leukemia. *Semin Hematol* 6, 1969, s. 323-343.
 27. Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M. et al.: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75, 1990, s. 555-562.
 28. Atkinson, The EBMT Data Book, Therapeutic decision making in marrow transplantation for chronic myeloid leukemia, 1998, 73-87
 29. Kantarjian, H.M., Dixon, D., Keating, M.J. et al.: Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukaemia. *Cancer*, 61, 1988, s. 1441-1446.
 30. Larson, R.S., Wolff, S.N., Chronic myelogenous leukemia in: *Wintrobe's Clinical Hematology*, Tenth Edition, 1999, s. 2342.
 31. Kantarjian, H.M., Talpaz, M.: Long-term follow-up results of -interferon therapy in chronic myelogenous leukemia at MD Anderson Cancer Center. *Leuk. Lymphoma*, 11, 1993, s. 169-174.
 32. Talpaz, M., Kantarjian, H.M., Kurzrock, R. et al.: Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 114, 1991, s. 532-538.
 33. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, et al: Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in combination with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 622-632.
 34. Coulombel L., Kalousek DK, Eaves CJ, Gupta CM, Eaves AC: Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1983, 308, s. 1493 - 1498.
 35. Areman E.M., Kotula-Rhodes, Rajagopal C. et al.: Effect of 24-hour culture with interleukin 2 (IL-2) on progenitor cells in autologous bone marrow (ABM) and peripheral blood stem cells (PBSC) from patients with hematological malignancies. *Blood* 1996, 88; (Suppl.1), abstr. 437
 36. Beaujean F. et al.: Successful engraftment after autologous transplantation of 10-day cultured bone marrow activated by interleukin-2 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15, 5: 691-696.
 37. Klingemann HG, Eaves CJ, Barnett MJ et al: Transplantation of patients with high risk acute myeloid leukemia in first remission with autologous marrow cultured in interleukin-2 followed by interleukin-2 administration. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 389-396.
 38. Margolin KA, Van Besien K., Wright C. et al.: Immunotherapy of hematological malignancies with autologous bone marrow transplant (AMBT) using in vitro interleukin 2 (IL-2) treated bone marrow (BM). *Blood* 1995, 86 (Suppl 1): abstr. 1541.
 39. Bendall, L.J., Kortepel K., Gottlieb DJ.: GM-CSF enhances IL-2-activated natural killer lysis of clonogenic AML cells by upregulation target cell expression of ICAM-1. *Leukemia* 9, 1995, s. 677-684.
 40. Cortes J., Kantarjian H, O'Brien S, Kurzrock et al.: GM-CSF can improve the cytogenetic response obtained with interferon-alpha therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*, 12, 1998, s. 860-864.
 41. Verfaillie, C.M., Bhatia, R., Miller, W. et al: BCR/ABL-negative primitive progenitors suitable for transplantation can be selected from marrow of most early-chronic phase but not accelerated-phase chronic myelogenous leukemia patients. *Blood*, 87, 1996, 11, s.4770-4779
 42. Deisseroth A.B., Zhifei Zu, Claxton D. et al.: Genetic marking shows that Ph positive cells present in autologous transplant of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 1994, 83, s. 3068 - 3076.
 43. Aguila HL, Weissman I: Hematopoietic stem cells are not direct cytotoxic targets of natural killer cells. *Blood* 1996; 87, 4: 1225-1231.
 44. Verma UN, Bagg A., Brown E. and Mazumder A.: Interleukin 2 activation of human bone marrow in long-term cultures: an effective strategy for purging and generation of anti-tumor cytotoxic effectors. *Bone Marrow Transplant* 1994, 13, 115 - 123.
 45. Verfaillie MC, Bhatia R, Steinbuch M, DeFor et al.: Comparative analysis of autografting in chronic myelogenous leukemia: Effects of priming regimen and marrow or blood origin of stem cells. *Blood*, 92, 1998, 5, s 1820-1831.

EXPRESSE ONKOGENU C-ERBB-2 A MUTACE ONKOGENU K-RAS U NÁDORŮ SLINIVKY BŘÍŠNÍ. KORELACE S KLINICKÝM PRŮBĚHEM A PATOLOGICKÝMI CHARAKTERISTIKAMI

C/ERBB/2 EXPRESSION AND K/RAS MUTATIONS IN PANCREATIC CANCER. CORRELATION WITH CLINICAL COURSE AND PATHOLOGICAL CHARACTERISTICS

NOVOTNÝ J.¹, KLEIBL Z.^{2,4}, VEDRALOVÁ J.³, KOLÁŘOVÁ M.², PETRUŽELKA L.¹, JANKŮ F.¹, MATOUŠ B.³

¹ ONKOLOGICKÁ KLINIKA 1. LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY A VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICE

² ÚSTAV LÉKAŘSKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE 1. LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY

³ 1. ÚSTAV PATOLOGICKÉ ANATOMIE 1. LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY A VŠEOBECNÉ FAKULTNÍ NEMOCNICE

⁴ LABORATOŘ BIOLOGIE NÁDOROVÉ BUŇKY, 1. LÉKAŘSKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY

Souhrn: Východisko: Mutace onkogenu K-ras je nejběžnější genetickou odchylkou nádorů slinivky břišní, vyskytuje se u více než 80 % nádorů. Míra exprese onkogenu c-erbB-2 kolísá u těchto nádorů mezi 19 a 82 %. Soubor a cíl studie: U 32 nemocných s nádory podjaterní krajiny (28 - karcinom pankreatu, 3 - neuroendokrinní nádory, 1- karcinom Vaterské papily) byl studován vliv exprese onkogenu c-erbB-2 a mutace alely onkogenu K-ras ve vztahu k rodinné zátěži, času od vzniku prvních symptomů do diagnózy, velikosti nádoru a TNM stádiu nemoci v době operace, ke gradingu nádoru, k rozsahu operačního výkonu a k celkovému přežití. Výsledky: U vzorků nemocných s karcinomem exokrinní části pankreatu byla pozorována zvýšená exprese onkogenu c-erbB-2 ve 21,4 % (6/28) a mutace onkogenu K-ras v 56 % (13/23). U nádorů neuroektodermových nebyla nalezena ani zvýšená exprese onkogenu c-erbB-2 ani mutace onkogenu K-ras. U karcinomu Vaterské papily byla zaznamenána zvýšená exprese c-erbB-2, nikoliv však mutace alely genu K-ras. Zvýšená exprese onkogenu c-erbB-2 byla statisticky významně (log rank: $p = 0,0297$, Breslow: $p = 0,0184$) spojena se zhoršeným přežitím nemocných. Ostatní studované vztahy nedosáhly v univariální analýze statistické významnosti. Závěr: Ve studovaném souboru pacientů s karcinomem pankreatu je overexprese onkogenu c-erbB-2 nepříznivým prognostickým faktorem.

Klíčová slova: Karcinom slinivky břišní, neuroendokrinní nádory slinivky břišní, K-ras, c-erbB-2, HER2/neu, prognostický faktor

Summary: Backgrounds: K-ras mutation is the most common genetic abnormality of pancreatic cancer. C-erbB-2 expression varies between 19 to 82 %. Design and subjects: 32 tumors (28 exocrine pancreatic carcinoma, 3 neuroendocrine tumors and 1 carcinoma of Vater papilla) were analysed for the presence of c-erbB-2 expression and K-ras mutations. Correlation with family history of cancer, time from initial symptoms until diagnosis, tumor size and TNM stage at diagnosis, tumor grade, type of operation and overall survival was made. Results: In exocrine pancreatic cancer samples, c-erbB-2 overexpression was seen in 21,4 % (6/28) and K-ras mutations in 56 % (13/23) cases. Neither c-erbB-2 overexpression nor K-ras mutations were found in neuroendocrine tumors. C-erbB-2 overexpression but not K-ras mutation were present in one case of carcinoma Vater papilla. C-erbB-2 overexpression was strongly correlated with shortened overall survival (log rank: $p = 0,0297$, Breslow: $p = 0,0184$). Univariate statistical analysis did not reach statistical significance in any other parameter studied. Conclusion: In our study, c-erbB-2 overexpression is a negative prognostic factor in pancreatic cancer patients.

Key words: Pancreatic cancer, neuroendocrine pancreatic tumor, K-ras, c-erbB-2, HER2/neu, prognostic factor

Úvod

Karcinom slinivky břišní patří svou incidencí mezi osm nejčastějších maligních nádorů ve vyspělých průmyslových zemích. Střední délka přežití se pohybuje mezi třemi a šesti měsíci. Pětileté přežití je výjimečné, nepřesahuje 2 - 3 % (cit. 1). Jednou z hlavních příčin je stanovení diagnózy až v pozdních stádiích poté, co došlo k lokálnímu šíření na přilehlé orgány nebo ke vzniku vzdálených metastáz. Z dalších příčin je nezbytné zmínit vysokou chemorezistenci a radiorezistenci nádorů slinivky břišní. Ta bývá často způsobena poruchami řady regulačních genů (onkogenů, onkosupresorových genů, regulátorů buněčného cyklu, apoptózy apod.) (cit. 2). Rodina onkogenů ras se skládá ze tří genů, K-ras, H-ras a N-ras, které kódují protein o molekulové váze 21 kDa. Jedná se o protein s GTP-ázovou aktivitou účastnící se přenosu

signálů z buněčné membrány do buněčného jádra. Bodové mutace 12, 13 a 61 kodónu vedou k trvalé aktivaci transdukční kaskády a změně fenotypu buňky na maligní. Exprese mutované varianty onkogenu K-ras je u karcinomu pankreatu velmi vysoká, dosahuje 60 – 100 % (cit. 3).

Onkogen c-erbB-2 (HER2/neu) patří k rodině membránových receptorů s tyrozinkináзовou aktivitou (cit. 4). Jeho vysoká exprese je spojena s relativní chemorezistencí maligních nádorů (cit. 5). Overexprese onkogenu c-erbB-2 u nádorů slinivky břišní byla dosud studována jen okrajově, v malých souborech nemocných byla nalezena u 19 – 82 % nemocných (cit. 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Pochopení základních molekulárních událostí vedoucích ke vzniku zhoubných nádorů slinivky břišní otevírá možnosti provádět včasnou diagnostiku a léčbu pomocí léků s novými

mechanismy účinku, cíleně používanými v případě poruch určitých regulačních genů. Provedení této klinicko-patologické retrospektivní studie považujeme za základní předpoklad pro následnou prospektivní klinickou studii fáze II s novým inhibitorem farnesylacyltransferázy, a pro studii fáze I/II gemcitabin + herceptin, jejíž provedení by nebylo opodstatněné v případě, že by exprese onkogenu c-erbB-2 nebyla nalezena.

Materiál a metody

Klinické údaje 32 nemocných léčených na Onkologické klinice 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v letech 1994–1999 pro nádory podjatelní krajiny byly získány z archivovaných chorobopisů. Studované údaje zahrnovaly i) čas od vzniku prvních příznaků do diagnózy nádoru slinivky břišní, ii) rozsah primárního nádoru dle TNM klasifikace, iii) stádium nemoci v době diagnózy, iv) grade nádoru, v) rozsah provedeného operačního výkonu, vi) celkové přežití nemocných a vii) rodinnou zátěž. Operační výkon byl klasifikován v kategoriích explorativní výkon, biliární dekomprese, parciální a radikální resekce nádoru. Celkové přežití bylo počítáno v týdnech od diagnózy nádoru do úmrtí nemocného.

Po identifikaci nemocných bylo provedeno druhé čtení histologických preparátů. Části parafinových bloků byly nakrájeny na 5 µm řezy.

Detekce mutací onkogenu K-ras. U řezů nádorových tkání byla provedena deparafinace xylenem a izolace DNA pomocí DNAeasy (tm) Tissue Kit firmy Qiagene. Mutace 12 kodonu onkogenu K-ras byly detekovány analýzou délky restrikčních

fragmentů DNA (RFLP), které vznikly štepením (nemutovaná forma) nebo neštěpením (mutovaná forma) produktu dvakrát opakované polymerázové řetězové reakce (nested PCR) (cit 13). **Detekce exprese onkogenu c-erbB-2.** Řezy nádorové tkáně byly deparafinovány a rehydratovány. Inkubace s primární protilátkou proti c-erbB-2 (Dako) naředěnou v poměru 1 : 400 proběhla přes noc při 4 °C. K vlastní detekci byl použit kit LSAB2 (Dako). Jako chromogen byl použit 3,3 diaminobenzidintetrahydrochlorid. Jádra byla dobarvena hematoxylinem podle Harris. Preparáty byly odvodněny a montovány do solacrylu. Vzorky s pozitivitou méně než 30 % nádorových buněk byly považovány za negativní, vzorky ostatní za pozitivní.

Analýza získaných údajů byla provedena na statistickém softwaru SMSS. K výpočtu celkového přežití byla použita metoda podle Kaplan-Mayera, v ostatních srovnáních byly vypočteny Kendallovy a Spearmanovy korelační koeficienty.

Výsledky

Základní demografické charakteristiky studovaného souboru nemocných shrnuje tabulka 1. Pacienti s exokrinními nádory pankreatu v dobrém celkovém stavu a nemocný s nádorem Vaterské papily byli léčeni radioterapií na oblast primárního nádoru v kombinaci s 5-fluorouracilem nebo gemcitabinem. U ostatních nemocných byla prováděna podpůrná léčba zaměřená na analgetickou léčbu a zlepšení kvality života. Nemocní s neuroendokrinními nádory byly léčeny kombinacemi založenými na DTIC, interferonu alfa, etoposidu, ifosfamidu a karboplatině.

Intenzivní membránové barvení onkogenu c-erbB-2 bylo pozorováno u 6 z 28 nemocných s exokrinními nádory pankreatu. Zvýšená exprese byla zaznamenána také u karcinomu Vaterské papily, naopak negativní výsledky byly nalezeny u všech tří vyšetřovaných neuroendokrinních nádorů (tab. 2.). Mutace onkogenu K-ras byla pozorována ve 13 z 23 analyzovaných vzorků. V pěti případech se nepodařilo provést amplifikaci DNA z archivní tkáně (tab. 2.) pomocí PCR. Vzhledem k nedostatku informací byly u jedné pacientky provedeny jen některé statistické analýzy.

Rodinná anamnéza byla pozitivní na přítomnost malignity u devíti nemocných. Z nich se v pěti případech jednalo o karcinom žaludku u příbuzných prvního stupně (tab. 3.). Statisticky významná souvislost mezi rodinnou zátěží a expresí onkogenu c-erbB-2 nebo mutací genu K-ras nebyla zaznamenána (tab. 4.).

Čas od vzniku prvních příznaků do stanovení diagnózy se pohyboval v rozmezí od 1 do 104 týdnů. Průměrná doba činila 13,4 týdnů. Pokud není hodnocen nemocný s nejdelsí dobou do diagnózy, pak průměr dosahuje 10 týdnů, medián 6 týdnů. Více než tři čtvrtiny nádorů exokrinního pankreatu a všechny nádory neuroendokrinní i nádor Vaterské papily byly diagnostikovány již v pokročilých stádiích T2 a T3 (tab. 3.) a v klinických stádiích 3 a 4 dle TNM klasifikace (tab. 3.). Vztah mezi poruchou studovaných genů a rozsahem nádoru nebo stádiem nemoci nebyl nalezen (tab. 4.).

Stupeň diferenciacie nádorů byl převážně nižší, dobře diferencovaných nádorů bylo v souboru pouze 5 vzorků

Tab.1. Základní charakteristiky souboru nemocných

Počet nemocných	32
Vyšetřované nádory:	
Karcinom exokrinního pankreatu	28
Neuroendokrinní nádory	3 (2 – insulinom, 1 – karcinoid)
Karcinom Vaterské papily	1
Pohlaví (muži/ženy)	20/12
Průměrný věk v době diagnózy	59
Věkové rozmezí	29–72

Tab. 2. Četnost zvýšené exprese onkogenu c-erbB-2 a mutací onkogenu K-ras u nemocných s nádory podjatelní krajiny

Typy vyšetřovaných nádorů	Počet vzorků	Overexprese c-erbB-2		Mutace onkogenu K-ras	
		Přítomna	Nepřítomna	Přítomna	Nepřítomna
Karcinom exokrinního pankreatu	28	6	22	13	10*
Neuroendokrinní maligní nádory	3	0	3	0	3
Karcinom Vaterské papily	1	1	0	0	1

* 5 vzorků neamplifikováno

Tab. 3. Klinickopatologické charakteristiky analyzovaného souboru nemocných

Histologický typ nádoru	Pozitivní rodinná anamnéza	Stádium T			Stádium TNM				grade			Operační výkon			
		1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	Explorativní	Dekompr. esní	Parciální resekce	Radikální resekce
Karcinom exokrinního pankreatu	8	4	10	13	4	4	6	13	5	15	7	9	7	3	8
Neuroendokrinní maligní nádory	1	2	0	1	0	0	1	2	3	0	0	1	1	0	1
Karcinomy Vaterské papily	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1

Tab. 4: Statistické zhodnocení exprese onkogenu c-erbB-2 a mutací onkogenu K-ras ke sledovaným charakteristikám.

Stav genu a	K-ras	c-erbB-2	Druh statistického vyhodnocení
Pozitivní rodinná anamnéza	p = 0,798	p = 0,077	Kendall
Čas od prvních symptomů do diagnózy	p = 0,667	p = 0,319	Kendall
Velikost primárního nádoru	p = 0,486	p = 0,632	Kendall
Stádium nemoci podle TNM	p = 0,833	p = 0,142	Kendall
Stupeň diferenciace nádoru	p = 0,736	p = 0,091	Kendall
Druh operačního výkonu	p = 1,0	p = 0,094	Kendall
Celkové přežití nemocných	p = 0,8156 p = 0,8656	p = 0,0297 p = 0,0184	Log Rank Breslow

p < 0,05, statisticky významná souvislost

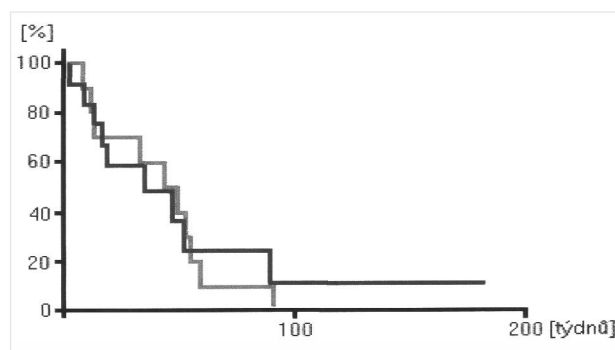
exokrinního původu (tab. 3.). Statistická analýza neprokázala souvislost mezi stupněm diferenciace nádorů a stavem studovaných genů.

Také typ operačního výkonu (tab. 3.) nebyl ve spojitosti s expresí nebo mutací analyzovaných genů (tab. 4.). Celkové přežití nemocných s karcinomy slinivky břišní s mutací a bez mutace alely onkogenu K-ras se statisticky významně nelišilo (tab. 4., graf 1). Naopak těsný vztah byl pozorován mezi expresí onkogenu c-erbB-2 a celkovým přežitím. Půlroční a jednoleté přežití u nemocných s a bez zvýšené exprese c-erbB-2 činilo 16,7 vs 85,7 % a 16,7 vs 38,1 % (tab. 4., graf 2). Všichni nemocní s nádory neuroendokrinními dosud žijí (92+, 54+, 49+ týdnů) i přes pokročilost onemocnění v době diagnózy.

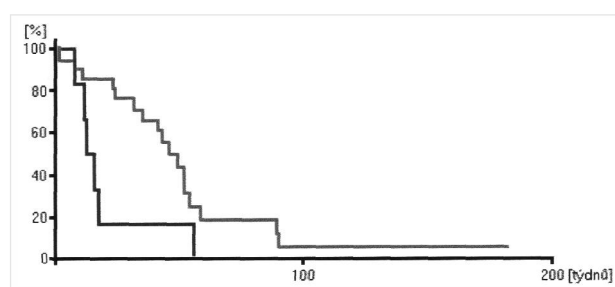
Diskuze:

Expresí onkogenu c-erbB-2 u karcinomu exokrinního pankreatu byla vyšetřována pouze v šesti dosud publikovaných studiích. Dergham (cit. 6) pozoroval overexpresi v 82 % (67/81 vzorků) a Williams (cit. 7) v 65 % (15/23). Jiní autoři uvádějí nižší expresi c-erbB-2 - Lei S (cit. 8) ve 47 % (10/21), Day (cit. 9) v 47 % (9/19), Sakorafas (cit. 10) u 20 % (4/20) a Hall (cit. 11) také pouze v 19 % (17/87). Naše výsledky 21,4 % ukazují spíše na nižší incidenci overexprese, která je srovnatelná s expresí tohoto onkogenu u jiných malignit, např. u nádorů prsu. Žádný ze tří vzorků neuroendokrinních tumorů nevykazoval pozitivitu onkogenu c-erbB-2. Naopak karcinom Vaterské papily jevil silnou pozitivitu onkogenu c-erbB-2. Různorodé výsledky exprese onkogenu c-erbB-2 mohou být způsobeny použitím nestejně specifických protilátek. Dugan (cit. 12) a Day (cit. 9) pozorovali častější expresi c-erbB-2 u nádorů s vyšším stupněm diferenciace. Tento trend jsme v našem souboru nepozorovali. Výše citované práce s výjimkou Lei S (cit. 8) popisují pouze expresi onkogenu c-erbB-2 bez klinických souvislostí. Lei S zaznamenal kratší přežití nemocných s nádory exprimující c-erbB-2 (p < 0,01). Naše práce je druhou svého druhu, která nachází statisticky významně horší celkové přežití pacientů s maligními nádory exokrinního pankreatu a overexpresi c-erbB-2. Ostatní studované parametry nedosáhly hladin statistické významnosti. Nedávno vyvinutá protilátka proti tomuto membránovému receptoru (trastuzumab) byla úspěšně testována v monoterapii i v kombinaci s cisplatinou nebo paclitaxelem u pacientů s nádory plic a prsu (cit. 14). Stanovení onkogenu c-erbB-2 u pacientů s nádory slinivky břišní otevírá možnosti k použití této protilátky v jejich léčbě. Perspektivní se jeví kombinace s gemcitabinem, dosud nejúčinnějším cytostatikem u nádorů slinivky břišní. Onkogen K-ras patří mezi často poškozené geny u většiny

Graf. 1: Celkové přežití nemocných s nádory slinivky břišní v závislosti na přítomnosti normální nebo mutované alely onkogenu K-ras. (Černá křivka- mutace alely onkogenu K-ras, šedá křivka přežití, p = 0,8156 - Log Rank test, p = 0,8656 - Breslowův test.)



Graf. 2: Celkové přežití nemocných s nádory slinivky břišní v závislosti na expresi onkogenu c-erbB-2. (Černá křivka- zvýšená exprese onkogenu c-erbB-2, šedá křivka-bez exprese onkogenu c-erbB-2, Kaplan - Mayerova křivka přežití, p = 0,0297 - Log Rank test, p = 0,0184 - Breslowův test.)



zhoubných nádorů (nádory plic, 30 %, nádory tračniku 50 %, cholangiokarcinom, 90 %). Souhrnné údaje získané u nádorů slinivky břišní analýzou 450 nádorů ukazují na 78% výskyt mutací 12 a 13 kodónu (cit. 4). Mutace 13 kodónu tvoří v tomto počtu méně než 2 % případů. I když mutace alely onkogenu K-ras nebyla v naší studii i ve studiích ostatních autorů statisticky významně spojena se žádnou ze studovaných charakteristik, je stanovení tohoto onkogenu klinicky užitečné. Vysoká prevalence poškození onkogenu K-ras ukazuje totiž na možnost využití detekce mutací v časně diagnostice nádorů slinivky břišní a v diferenciální diagnostice zvláště proti chronické pankreatitidě. Za tímto účelem někteří autoři vyšetřují mutace v biotických vzorcích získaných při ERCP (cit. 15) nebo při vyšetření ultrazvukem či počítačovým tomografem, v pankreatické šťávě (cit. 16), ve stolici nebo v séru (cit. 17). Pacienti s mutací K-ras jsou vhodnými kandidáty pro klinické zkoušky inhibitorů transdukční cesty, jejímž členem je I onkogen K-ras. Léčebně jsou studovány molekulárně genetické techniky založené na aplikaci antisense oligonukleotidů nebo farmakologické postupy inhibující farnesylacyltransferázu (cit. 18). Tento enzym je zodpovědný za vazbu onkogenu K-ras k buněčné membráně. Bez této vazby nedochází k aktivaci onkogenu K-ras a nádorová buňka tak ztrácí růstovou výhodu.

Vyšetřování onkogenů c-erbB-2 a K-ras u nemocných s nádory slinivky břišní považujeme za nezbytný předpoklad pro individualizaci léčebného přístupu k jednotlivým nemocným, jejímž cílem je dosáhnout lepších léčebných výsledků volbou správných terapeutik.

Poděkování: Podporováno grantem IGA MZ ČR 4953 – 3, výtěžkem z běhu Terryho Foxe pořádaném Ligou proti rakovině a Kanadským velvyslanectvím v Praze

Literatura

- Hall PA, Lemoine NR: Models of pancreatic cancer. In: The molecular pathology of cancer, 16, 1993, Eds.: Lemoine NR, Wright NA, s. 135 -156
- Hahn SA, Schmiegel WH: Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. Digestion 59, 1998, s. 493 – 501
- Hruban RH, van Mansfeld ADM, Offerhaus GJA, van Weering DHJ, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL: K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. Am J Pathol 143, 1993, s 545 – 554
- Hynes NE, Stern DF: The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. Biochim Biophys Acta. 1198, 1994, s. 165 - 184
- Thor AD, Berry DA, Budman DR: erbB-2, p53 and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. J NCI 90,1998, s. 1346 - 1360
- Dergham ST, Dugan MC, Arlauskas P, Du W, Vaitkevicius VK, Crissman JD, Sarkar FH: Relationship of family cancer history to the expression of p53, p21WAF-1, HER-2/neu, and K-ras mutation in pancreatic adenocarcinoma. Int J Pancreatol 21, 1997, 225-234
- Williams TM, Winer DB, Greene MI, Maguire CH Jr: Expression of c-erbB-2 in human pancreatic adenocarcinomas. Pathobiology 59, 1991, s. 46 - 52
- Lei S, Appert HE, Nakata B, Domenico DR, Kim K, Howard JM: Overexpression of HER2/neu oncogene in pancreatic cancer correlates with shortened survival. Int J Pancreatol 17, 1995, s. 15-21
- Day JD, Diguseppe JA, Yeo Ch, Lai-Goldman M: Immunohistochemical Evaluation of HER-2/neu Expression in pancreatic Adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. Hum Pathol 27, 1996, s. 119 - 124
- Sakorafas GH, Lazaris A, Tsiotou AG, Koullias G, Glinatsis MT, Golemis BC: Oncogenes in cancer of the pancreas. Eur J Surg Oncol 21,1995, s. 251-253
- Hall PA, Hughes CM, Richman PI, Gullick WJ, Lemoine NR: The c-erbB-2 protooncogene in human pancreatic cancer. J Pathol 1990, 161, 195 – 200
- Dugan MC, Dergham ST, Kucway R, Singh K, Biernat L, Du W, Vaitkevicius, VK, Crissman JD, Sarkar FH: HER- 2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival. Pancreas 14, 1997, s.229-236
- Jiang W, Kahn SM, Guillem JG, Lu SH, Weinstein IB: Rapid detection of Ras oncogenes in human tumors: applications to colon, esophageal and gastric cancer. Oncogene 4, 1989, s. 923 – 928
- Perez EA: HER-2 as a prognostic, predictive and therapeutic target in breast cancer. Canc Control 6, 1999, s. 233 - 239
- Ihalainen J, Taavitsainen M, salmivaara T, Palotie A: Diagnosis of pancreatic lesions using fine needle aspiration cytology: Detection of K-ras point mutations using solid phase minisequencing. J Clin Pathol 47, 1994, 1082 - 1084
- Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Kyogoku A, Nose H, Shimada K, Ohkura H, Ohtsu A, Yoshida S, Shimamoto Y: Detection of point mutations in the K-ras oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. Cancer 73, 1994, 1589 - 1594
- Castells A, Puig P, Mora J, Boadas J, Boix L, Urgell E, sole M, Capella G, Lluís f, Fernandez-Cruz L, Navarro S, Farre A: K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: Diagnostic utility and prognostic significance. J Clin Oncol 17, 1999, s. 578 – 594
- Lebowitz PF, Prendergast GC: non-Ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho. Oncogene 17, 1998, s 1439 – 1445

informace

SPOJENÍ DVOU PHARMACEUTICKÝCH SPOLEČNOSTÍ PLIVA A LACHEMA

Společně znamená účinněji – nejvyšší mezinárodní standard léků za přijatelné ceny.

Čas od času se můžeme setkat s názorem, že současný farmaceutický výzkum, vývoj a výroba jsou „velkým obchodem“. Jistě ano, vezmeme-li v úvahu, že zatímco ještě v roce 1960 měla celosvětová produkce léků hodnotu kolem 80 mld USD, v roce 1998 to bylo už 306 miliard USD a pro rok 2002 předpokládá IMS hodnotu celosvětové produkce léků na 406 miliard USD. Současně ale představuje i značné riziko s malou garancí konečného úspěchu. Za této situace se na farmaceutickém trhu rozbíhají v celosvětovém měřítku horečnaté závody, jež na sebe berou různé podoby -hledání optimálního portfolia, tzn. strategické zaměření výzkumu, vývoje a výroby na nejperspektivnější lékové skupiny, Urychlování výzkumného procesu, zejména využíváním biotechnologií, genového inženýrství, genomiky a kombinatorní chemie, a konečně i slučování a sdružování v podobě horizontální integrace a vytváření strategických aliancí s cílem posílit výzkumný a výrobní potenciál i kapitálový základ.

Ponechdve stínu takových šatků, jako byly fúze firem Glaxo + Wellcome a nyní GlaxoWellcome + SmithKline Beecham, Pharmacia + Upjohn nyní Pharmacia Upjohn + Monsanto, Hoechst + Marion Merrell Dow anebo Hoechst Marion Roussel + Rhone Poulenc (Aventis), Sandoz + Ciba Geigy (Novartis), Sanofi + Synthelabo, Astra + Zeneca, a konečně poslední a největší spojení Pfizer + Warner Lambert, proběhlo nedávno spojení dvou farmaceutických společností, jež jsou nám mnohem blíže – chorvatské firmy **PLIVA** a české, respektive moravské společnosti **LACHEMA**.

Akciová společnost **LACHEMA** (se závody v Brně, Blansku a Neratovicích) je jedním z našich nejvýznamnějších tradičních domácích výrobců vysoce kvalitních přípravků s téměř padesátiletou tradicí. Hlavním předmětem podnikání s více než 56% podílem na tržbách je výzkum, vývoj a výroba léčiv pro závažná civilizační onemocnění – protinádorová léčiva (cytostatika Platidium, Cycloplatin, Methotrexat, Dacarbazin, Tamoxifen, Refador), antidota (Leucovorin Ca), léčiva kardiovaskulární (Enalapril, Dobutamin, Bilocalcin) a antivirotika proti herpetickým virům a HIV (Herpesin, Azitidin). Neméně významné místo ve výrobním programu zaujímá široký sortiment diagnostických přípravků pro biochemické, mikrobiologické a hematologické laboratoře a farmaceutických substancí. V roce 1998 získala **LACHEMA** a.s. certifikát jistění jakosti dle ISO 9001 a v květnu 1999 dokončila nový pavilon pro výrobu sterilních cytostatických injekcí v hodnotě 390 milionů Kč, který obdržel po auditu inspektory SÚKL certifikát Správné výrobní praxe (GMP).

Do nedávna se ovšem firma **LACHEMA** projevovala spíše jako výrobce, který ne zcela využíval celého svého obchodního potenciálu. Právě to byl ostatně důvod, proč potřebovala a hledala silného strategického partnera. Nakonec se našel – stala se jím chorvatská firma **PLIVA**.

Firma **PLIVA** vznikla na základě společnosti Kaštel, založené již v roce 1921, a v polovině třicátých let se stala jedním z prvních světových

producentů sulfonamidů. Na jejím rozvoji se podílela řada významných osobností, nesporně nejvýznamnějším z nich však byl nositel Nobelovy ceny Vladimír Prelog, který stál v roce 1952 u zrodu Výzkumného institutu **PLIVA**. Výsledkem vlastního výzkumu a vývoje byly v následujících letech originální technologie pro výrobu vitamínů C a B, oxytetracyklinu, methacyklinu a dalších antibiotik, a v roce 1980 pak pro produkci vůbec nejúspěšnějšího a nejznámějšího přípravku firmy – azitromycinu pod firemním názvem Sumamed. Jde o makrolidové antibiotikum II. generace s výjimečně dlouhým biologickým poločasem v trvání 60 hodin a s velmi dobrou tolerancí, užívané k léčbě širokého spektra infekčních onemocnění. Jeho zcela mimořádné vlastnosti revolucionizovaly antibiotickou terapii a uvedly firmu **PLIVA** do společnosti špičkových firem s vlastními originálními preparáty. Ostatně azitromax (pod názvem Zithromax) vyrábí v licenci firmy **PLIVA** i americká společnost Pfizer.

PLIVA je dnes bezesporu největším farmaceutickým výrobcem ve střední a východní Evropě, s mimořádně silným marketingem a prodejním potenciálem. Její roční zisk činí více než 100 milionů USD při obrátu téměř 600 milionů USD. Zabývá se výrobou širokého spektra léčivých přípravků pro humánní i veterinární medicínu a agrochemikálii; výrobní program zahrnuje dále přípravky pro potravinářský průmysl, kosmetiku a osobní hygienické potřeby. Pro nás je navíc důležitá a zajímavá tím, že její léková a cenová politika jsou blízké českým poměrům.

Začlenění firmy **LACHEMA** do rodiny **PLIVA GROUP** je součástí již delší dobu probíhajícího procesu rozšiřování a internacionalizace firmy **PLIVA**. Za jeho začátek lze považovat 11. duben roku 1996, kdy akcie firmy začaly být obchodovány na londýnské burze, pokračování pak lze spatřovat v koupi polské firmy POLFA, britské společnosti MIXIS GENETICS, a konečně i ve spojení s firmou **LACHEMA**.

PLIVA GROUP koupila přibližně 66 procent akcií společnosti **LACHEMA** – 48 procent od francouzské banky Credit Lyonnais, 18 procent od společnosti II. Epic Holding – za téměř 26,5 milionu dolarů. Vstup tohoto silného strategického partnera je nesporně zárukou dalšího pozitivního vývoje společnosti **LACHEMA** a dokončení transformace společnosti na moderní farmaceutickou firmu.

Vzhledem k tomu, že **PLIVA** dává najevo zájem etablovat se na českém trhu dlouhodobě, lze předpokládat, že bude hájit zájmy českého zákazníka. Důležitou skutečností je, že spojení obou firem zajišťuje kontinuitu ve výrobě zavedených přípravků a není proto třeba se obávat žádných výpadků na trhu. Pro moravský region je podstatné také to, že zachování kontinuity výroby přípravků **LACHEMA** pomůže řešit i jeho sociální potřeby (zachování, eventuálně rozšíření pracovních kapacit). Navíc pak vstup nového strategického partnera s sebou nesporně přinese i nové investice, nové technologie a jistě i celkově nový image; **PLIVA** také může využít svého postavení na zahraničních trzích a vývozem přípravků firmou **LACHEMA** šířit dobré jméno kvalitních českých produktů. V současné éře globalizace tedy vstupují firmy **LACHEMA** a **PLIVA** bok po boku do farmaceutického světa bez hranic.

PEDIATRIC RADIATION ONCOLOGY, THIRD EDITION

Halperin, E. C., Constine, L. S., Tarbell, L. S., Kun, N. J.
Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 1999
606 str., 151 obr., 154 tab., ISBN 0-7817-1500-8, cena 135,- USD

Nakladatelství předkládá třetí vydání úspěšné knihy věnované radioterapii a onkologii dětských nádorových onemocnění, jejímiž autory jsou renomovaní autoři z několika významných onkologických pracovišť v USA. Text je členěn do 22 kapitol s poměrně jednoduchou strukturou. V úvodu je historická připomínka, přehled biologických a epidemiologických poznatků, následuje analýza histologických klasifikací a stážování, fakta o etiopatogenezi a klinické symptomatologii, popis změn, které jsou registrovány zobrazovacími metodami a dále prognostické faktory. Nejvíce pozornosti je však věnováno chirurgické léčbě, radioterapii a chemoterapii. Radioterapie je podrobně rozepsána do subkapitol, jež se týkají objemu tumorů, použitých ozařovacích technik a dávek. Jsou hodnoceny výsledky léčby v různých věkových skupinách, uvedeny komplikace a připojeny názory na pravděpodobný budoucí vývoj léčebných postupů. V závěru je seznam literatury, důležité citované práce jsou zvlášť označeny.

V první kapitole přináší autoři přehled nejčastějších fatálních nádorů dětí v USA - leukémie, lymfomů, nádorů CNS, ledvin, endokrinního systému, kostí a měkkých tkání. Zajímavá jsou kritéria hodnocení kvality života a formulace požadavků na personální zajištění v pediatrickém onkologickém centru. Druhá kapitola rozebírá problematiku leukémie, jejíž incidence tvoří v celém světě okolo třetiny všech zhoubných neoplasií; největší podíl náleží lymfoblastické leukémii. Přiměřené místo je v terapii věnováno transplantaci kostní dřeně. 3. a 4. kapitola jsou zaměřeny na nádory mozku a míchy s převládajícím výskytem astrocytomů a meduloblastomů. Obtížným úkolem je léčba retinoblastomu různými chirurgickými postupy, radioterapií i chemoterapií, při snaze zachovat zrak (5. kap.). V případě neuroblastomu doprovázeného pestrými klinickými projevy jsou zmíněny první zkušenosti se screeningem vycházejícím ze stanovení catecholaminových metabolitů, který se provádí hlavně v Japonsku (6. kap.). Žádná dosavadní léčba Hodgkinovy choroby a non-hodgkinských lymfomů není ideální, chemoterapie zatlačuje radioterapii do pozadí (7. a 8. kap.). U Ewingova sarkomu kostí přípravná aktino- a chemoterapie umožňuje provedení operace (9. kap.). U osteosarkomu, nejčastějšího maligního tumoru kostí u dětí, se radioterapie indikuje preoperačně a v případě nerezekabilních neprístupných forem (10. kap.). Typicky multimodální terapie se uplatňuje u vzácnějších vaskulárních rhabdomyosarkomu a sarkomu měkkých tkání (11. a 12. kap.). 13. kap. shrnuje zkušenosti s nefroblastomem (Wilmsovým tumorem) ledvin, 14. kap. probírá nádory jater a žlučovýchodů, 15. kap. nádory v ováriích a testech, 16. kap. je věnována aerodigestivním a mamárním nádorům endokrinního systému; hodnoceny jsou zvláště postupy v karcinomu štítné žlázy a juvenilního nazofaryngeálního angiofibromu. V 17. až 19. kap. se pojednává o vzácných neoplastických afekcích Langerhansových buněk (histiocytóze X), novotvarech kůže a následcích protinádorové léčby, především radioterapie, které mohou s odstupem po léčení ovlivnit funkci endokrinního systému, poškodit části skeletu, vyvolat změny na CNS, ledvinách, plicích a digestivním traktu, strukturách oka, v kostní dřeni a na srdci. 20. kap. se zabývá hlavně teoretickými otázkami karcinogeneze, zvláště radiační, na základě poznatků zjištěných u dětské populace v Hirošimě a Nagasaki a po černobylské havárii. V předposlední kapitole se popisuje celková anestézie u ozařovaných dětí, jež je nutná k zachování konstantní polohy dítěte při ozařování. Tematem poslední kapitoly jsou imobilizační pomůcky, které používají pro udržení stálé polohy u větších dětí.

Obsažná a podrobná monografie pokrývá kompletně problematiku nádorových onemocnění dětského věku s důrazem na radioterapii a chemoterapii. Do knihy jsou začleněny také současné představy o genetických otázkách. Kniha je bezpochyby maximálně přínosná nejen pro klinické onkology a radioterapeuty, ale i chirurgy, biologы a genetiky. Adresa nakladatelství: Lippincott Williams and Wilkins, 530 Walnut Street, Philadelphia, PA 19106-3612, USA (Lww.com). V. R., V. H.

BLADDER CANCER - BIOLOGY, DIAGNOSIS, AND MANAGEMENT

Syrgios, K. N., Skinner, D. G. (Eds.)
Oxford University Press, Oxford 1999
469 str., 60 obr. (7 barev.), 55 tab., ISBN 0-19-263038-5, cena 129,50 USD

Kniha, jež vznikla za spolupráce 51 odborníků z evropských zemí a USA, sestává z 25 kapitol s touto tematikou: chirurgická anatomie močového měchýře, epidemiologie nádorů močového měchýře, screening, zvířecí modely pro studium těchto nádorů, patologie nádorů, uroteliální nádory, biologie nádorů, úloha adhezních molekul v biologii nádorů, klinický projev, prognostické faktory při léčbě nádorů, stážování, léčba povrchových nádorů, chirurgická léčba invazivních nádorů, úloha radioterapie, integrace cytotoxické chemoterapie při léčbě invazivních nádorů, intravezikální chemoterapie, imunoterapie, nové léčebné postupy, genová terapie, lokálně indukovaná hypertermie, náhrady močového měchýře a močových cest, paliativní terapie, úloha ošetřovatelek při léčbě nádorů močového měchýře. Autoři těchto pojednání jsou zkušenými odborníky, kteří sami významně přispěli k pokroku v této oblasti.

Jelikož v krátké recenzi nelze posoudit celý obsah knihy, všimneme si blíže jen dvou náhodně vybraných kapitol, což může poskytnout představu o jiných částech textu. Pojednání o epidemiologii nádorů močového měchýře je členěno do následujících podkapitol: úvod, deskriptivní faktory, profesionální rizikové faktory, kouření, potravinové faktory, léky, urologické klinické stavy, biologické markery expozice, biologické markery genetické náchylnosti aj. Rakovina močového měchýře představuje ve Velké Británii 7,9 % všech nových případů rakoviny, v USA je to 6,3 %. S eliminací některých látek vyvolávajících vznik nádorů močového měchýře a zavedením nových chemikálií poklesl výskyt tohoto onemocnění u pracovníků v kožedělných a gumárenských provozech, ale narostl u tavičů hliníku a řidičů nákladních vozů. Kouření cigaret je příčinou 50 % nádorů močového měchýře u mužů a 20 - 30 % u žen. Kapitola o imunoterapii nádorů močového měchýře sestává z těchto podkapitol: úvod, indikace pro intravezikální terapii, imunoterapie vakcínou BCG, nádorové biomarkery v intravezikální léčbě, použití BCG u karcinomů in situ a při dalších indikacích, toxicita BCG, alternativní postupy imunoterapie. BCG je nejúčinnější intravezikální látka pro léčbu a profylaxi povrchových nádorů a nádorů in situ s průměrnou kompletní odezvou 72 %; její účinnost může být dále zvýšena vysokými dávkami vitamínů A, B6, C a E. Slibné výsledky přináší léčba interferonem-alfa, ale zatím jen v rámci experimentálních studií. Citované literatury není přemíra, za každou kapitolou je to jen několik desítek položek.

Jak uvádějí autoři v předmluvě, podnětem k napsání této knihy byla skutečnost, že zájemci o tematiku karcinomu močového měchýře jsou odkázáni na jednotlivé sekce v onkologických, urologických a chirurgických monografiích. Předložené dílo představuje komplexní aktuální přehled s důrazem na interdisciplinární a praktický přístup k tomuto onemocnění. Jsou zachycena i taková temata, jež jsou v literatuře poněkud podceňována, např. screening karcinomu močového měchýře, umělé náhrady tohoto orgánu a úloha ošetřovatelského personálu. Jelikož jsou v literatuře rozporné názory na úlohu chirurgie, radioterapie, adjuvantní a neoadjuvantní chemoterapie, je snahou autorů některé tyto rozpory blíže objasnit. Kniha je určena především klinikům, pozornost je však věnována i výsledkům základního výzkumu, které mají ulehčit analýzu klinických problémů. Je škoda, že tato velmi přínosná kniha se jako dílo napsané mnoha autory nevyhnula určitým formálním nedostatkům, jež mají na svědomí hlavně editoři. V řadě kapitol jsou podobné úvody, text poněkud trpí překrýváním, není příliš vhodné pořadí kapitol (např. pojednání o náhradách močového měchýře mělo být zařazeno za kapitolou o chirurgické léčbě), na některých místech nejsou od sebe důsledně odlišovány názvy podkapitol a odstavců různou velikostí písma aj. Adresa nakladatelství: Oxford University Press, Great Clarendon Street, Oxford OX2 6DP, UK. V. H.

onkologické společnosti

Zápis z 10. zasedání výboru ČOS konaného dne 18. 7. 2000

A) Kontrola zápisu:

1. NOR – připravuje se reorganizace vzhledem k novému regionálnímu uspořádání území ČR.
2. Urychlené vydání překladu nová verze TNM klasifikace. Stav příprav zjisti Tomková.
3. Registrační poplatek do UICC – zaplacení zkontroluje prof. Vorlíček. Výbor došel ke konsensu, že anglický název pro ČOS, který bude oficiálně používán je Czech Oncological Society.
4. Vzdělávání - dopis na Mzd s vysvětlením základních oborů, na které je možno skládat nástavbovou atestaci z klinické onkologie a zdůrazněním potřeby funkční specializace a vymezení kompetencí pro farmakoterapii v onkologii. prof. Klener, doc. Petruželka do konce července.
5. Do konce července se uskuteční jednání se zástupci SROBF (Dr. Chodounský, Dr. Stankušová). Za ČOS byly výborem delegováni prof. Klener, doc. Petruželka. Předmětem jednání budou otázky postgraduálního vzdělávání.
6. Kurzy ve spolupráci s ČLK napříště budou organizovány i v Moravsko-slezském regionu, garantem bude prof. Vorlíček. Výbor konstatoval, že spolupráce na těchto postgraduálních kurzech s Dr. Semenskou nevedla k pozitivním výsledkům a proto s ní nebudou dále spolupracovat.
7. Výbor byl seznámen s abstrakty ze III. setkání mladých onkologů a jeho průběhu a vyslovuje pochvalu organizátorům. Přebírá záštitu nad IV. setkáním s podmínkou účasti odborného garanta za ČOS. Abstrakta ze III. setkání budou zveřejněna na www.linkos.cz. Jako ocenění pro hlavní organizátory výbor doporučil sponzorování jejich účasti na ESMO 2000, které nabízí firma Galena.
8. Výbor se usnesl převzít garanci nad Ostravskými dny podpůrné péče pouze v sudé roky a nad Brněnskými dny paliativní medicíny v liché roky. V souvislosti s tím bude iniciováno jednání s prezidentem ČLK Dr. Rathem o odlišném bodovém hodnocení pro akce podporované Onkologickou společností a pro akce bez této podpory. Vyřídí Doc. Petruželka.
9. Budou zveřejněny podmínky pro reklamu na www.linkos.cz. Platby budou poukazovány na konto ČLS JEP na podúčt ČOS. Konečné schvalování obsahu inzerce bude realizovat doc. Petruželka, doc. Žaloudík (vyřídí Tomková).

- B) RNDr. Kozel prezentoval členům výboru návrh projektu firmy Galena na **podporu mladých vědců**. Jedná se o motivační grant pro uchazeče do 35 let, ve výši 3x 50 000 Kč/rok na vědecký projekt. Posuzování přihlášek projektů bude provádět výběrová komise za účasti členů výboru ČOS a zástupců firmy Galena. **Uzávěrka přihlášek je 20. 11. 2000** Podmínky pro přihlášení do výběrového řízení budou zveřejněny na www.linkos.cz.

C) Korespondence:

1. Dr. Březovský Mzd žádá výbor o posouzení žádosti Dr. Mayera o výjimku z registrace přípravku Pentacarinat, výbor doporučuje žádosti vyhovět. Dopis s vysvětlením a odkazem na neobnovenou registraci jiných preparátů pro chemoterapii (daunorubicin, thioguanin, prokarbazin, actinomycin-D) zašle prof. Klener.
2. Výbor podporuje žádost firmy SANOFI o výjimku z registrace pro přípravek Eloxatin. prof. Klener.
3. Výbor byl seznámen s dopisem doc. Kavana, v němž žádá výbor ČOS o užití spolupráci ČOS se sekci Pediatrické onkologie ČOS, zejména v oblasti poskytování léčebné péče adolescentům. Výbor se bude touto problematikou zabývat až za přítomnosti členů pediatrické sekce, kteří již na dvou výborových zasedáních absentovali.
4. Výbor ČOS jednoznačně nesouhlasí s žádostí o nákup a umístění lineárního urychlovače pro onkologické oddělení Thomayerovy nemocnice Krč, které neodpovídá dlouhodobě koncepci rozmístění radiační techniky v ČR, a plně se ztotožňuje s negativním stanoviskem Společnosti radiační onkologie JEP. Dopis na Mzd - prof. Klener.
5. MUDr. A. Malina, Mzd – pracovní návrh vyhlášky o stacionářích prostuduje a posudek podá prof. Vorlíček, do konce července.

6. Výbor ČOS obdržel výtisk časopisu CANCER FORUM, vydávaného Australian Cancer Society v rámci kooperace mezi společnostmi.
7. Janssen Cilag – výbor ČOS navrhuje pro ocenění udělované každoročně touto firmou název „**Staškova cena**“. Pro tento rok výbor navrhuje ze tří přihlášených prací na cenu nadačního fondu Dr. Paula Janssena obor onkologie – „Staškova cena“
 - Josef Koutecký, Bohuslav Konopásek: Nevhodné slovo rakovina, Makropulos 1999
 - Miroslav Kala: Maligní nádory mozku dospělého věku, Galén 1999
 - Kolcová V., Geryk E., Jechová M.: Zhoubné novotvary – Česká republika a vybrané státy, Galén 1999.udělit cenu práci MUDr. Kaly.
8. Výbor vzal na vědomí výroční zprávu Ligy proti rakovině.
9. Na žádost prof. MUDr. Hájků – koordinátora tvorby standardů ČLS - mu bude zaslán jeden z výtisků standardů onkologické péče (Tomková).
10. Výbor ČOS neschvaluje poskytnutí databáze členů ČOS nakladatelství TRITON (Tomková).
11. Výbor vzal na vědomí žádost firmy Janssen Cilag o změnu kategorizace přípravku EPREX. Vyřídí prof. Vorlíček.
12. Rozpočet na akce v roce 2001, žádané ČLS JEP vypracuje prim. Fischer do příštího zasedání výboru.

D) Přijati noví členové:

1. MUDr. Večeřová Livia, DTC a.s., Praha 4
2. PharmDr. Szabo Imrich, Aventis, Praha
3. Mgr. Fridrichová Pavla, Aventis, Praha
4. MUDr. Vítková Daniela, Aventis, Praha
5. Mgr. Čermáková Markéta, Aventis, Praha
6. MUDr. Gregorek Dan, Aventis, Praha
7. Karlas Tomáš, Aventis, Praha
8. MUDr. Gatěk Jiří, Atlas a.s. ř.T. Bati, Zlín
9. MUDr. Coufal Oldřich, chir. kl., FN Brno Bohunice
10. MUDr. Hortiková Zdeňka, sanatorium HELIOS, Brno
11. MUDr. Kettner Roman, chir.odd., SZS Mladá Boleslav
12. MUDr. Šerclová Zuzana, chir.odd., FN Bulovka
13. MUDr. Medková Vlast, onkologie, SON Trutnov
14. MUDr. Ševčík Libor, por.-gyn. kl., FNŠP Ostrava
15. MUDr. Gálová Markéta, OKO, MOU Brno
16. MUDr. Vantuchová Yveta, kožní odd., FNŠP Ostrava
17. MUDr. Dvořák Josef onkol.kl., FNHK
18. MUDr. Holakovský Jiří, I. stomatologická kl., VFN Praha
19. MUDr. Schön Jan, radioterapie, Baťova nemocnice Zlín
20. MUDr. Hoffmannová Helena, Novartis, Praha
21. MUDr. Katolická Jana, OKO II., MOU Brno

E) Různé:

1. Výbor kritizoval reklamu na přípravek PAXEN uveřejněnou ve výtisku standardů onkologické péče. Z reklamy nevyplývá omezení indikace pouze na kaposiho sarkom pro níž je přípravek registrován. S Dr. Houdkem vyřídí prof. Klener.
2. Výbor souhlasí se s spoluprací ČOS při organizaci : přednášky sir Richard Peto, *Implications of the Overview for the ATLAS trial*, v rámci konference ADJUVANTNÍ TERAPIE KARCINOMU PRSU PO ROCE 2000, konanou dne 11. října 2000 od 10,00 hod v Praze, program konference bude uveden na www.linkos.cz.
3. Onkologická společnost od tohoto zasedání bude oficiálně používat logo ČOS.
4. Výbor souhlasí se zavedením diskuse karcinoidové skupiny na www.linkos.cz o léčebných postupech.
5. Na žádost Dr. Provoznicka výbor souhlasí se spolupořádáním přednášky Dr. Lavey, 19. září 2000 v Praze.

F) Termín dalšího zasedání je stanoven na 3. října 2000.

Praha 19. července 2000

Za ČOS:

doc.MUDr. Luboš Petruželka, CSc.
vědecký sekretář

prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.
předseda