

VLIV GENETICKÉHO POZADÍ NA ÚČINNOST/TOXICITU SOUČASNÉ PROTINÁDOROVÉ CHEMOTERAPIE

INFLUENCE OF GENETIC BACKGROUND ON EFFECTIVENESS/TOXICITY OF CURRENT ANTICANCER THERAPY

MIHÁL V.¹, HAJDÚCH M.¹, JAROŠOVÁ M.²

¹DĚTSKÁ KLINIKA LFUP A FN, OLOMOUC,

²HEMATO-ONKOLOGICKÁ KLINIKA LFUP A FN, OLOMOUC

Souhrn: Klíčovým problémem současné protinádorové chemoterapie je odhad její účinnosti v eradikaci nádoru a současně míry její toxicity pro pacienta. Byla identifikována řada faktorů, které mohou ovlivnit odpověď pacienta ale i jeho nádoru na cytostatickou léčbu. Mezi nejvýznamnější patří alterace genomu nádorové buňky a farmakogenetický fenotyp pacienta. Většina dispozičních faktorů však čeká na objasnění. Na příkladech dětské akutní lymfoblastické leukémie s hyperdiploidním počtem chromozomů nebo s komplexním karyotypem autoři demonstrují vysokou vnímavost nádorových buněk na metotrexát nebo L-asparaginázu. Autoři podávají přehled syndromů genomové instability, které se vyznačují vysokou vnímavostí nemocných na léčebné postupy poškozující DNA. Na příkladě pacienta s Nijmegen breakage syndromem zdůrazňujeme význam individualizace léčebného protokolu pro prevenci letální toxicity protinádorové léčby.

Klíčová slova: farmakogenetika, akutní lymfoblastická leukémie dětí, hyperdiploidie, komplexní chromozomální změny, nemoci s charakterem genomové nestability, Nijmegen breakage syndrom

Summary: The key problem of current anticancer therapy is the prediction of its effectiveness in the eradication of tumor mass on the one hand and treatment of toxicity on the other. So far, various factors influencing the patient's and tumor's response to therapy have been identified. Among the most important of these are tumour gene alterations and the pharmacogenetic phenotype of the patient. However, the majority of the factors remain to be elucidated. Using the example of childhood acute lymphoblastic leukaemia bearing a complex karyotype or hyperdiploidy we demonstrate a higher susceptibility of these cells to L-asparaginase and methotrexate respectively. We also surmise that there is an enormous susceptibility of patients with genomic instability syndromes to various DNA damaging events. In the case of one patient suffering from Nijmegen breakage syndrome we would like to stress the importance of individualization of the cancer treatment protocol to prevent the lethal toxicity of anticancer therapy.

Key words: pharmacogenetics, childhood acute lymphoblastic leukaemia, hyperdiploidy, complex karyotype, genomic instability syndromes, Nijmegen breakage syndrome

Výsledky léčby dětské akutní lymfoblastické leukémie (ALL), nemoci vitální důležitosti, se v posledních dvou dekádách významně zlepšily (1). Více jako 95 % dětských pacientů s ALL dosahuje remise onemocnění a 70-80 % z nich má reálnou šanci na vyléčení. Léčebný trend dětské ALL doznal v průběhu uvedeného období zásadních změn. Zavedení preventivní léčby leukémie CNS, podávání některých cytostatik ve vysokých dávkách (metotrexát, cytosinarabiosid), aplikace nových kombinací cytostatik s cílem snížit riziko rezistence, rozšíření chemoterapie o cytostatika s odlišným mechanismem účinku, ale i zdokonalení podpůrné léčby, se nejvíce podílely na markantním zlepšení léčby ALL. Všechny výše uvedené léčebné úpravy byly bez ohledu na původ léčebných protokolů v relativně krátkém časovém období zapracovány do všech nových verzí jednotlivých léčebných doporučení.

Hledáním účinnějších léčebných postupů zejména v sedmdesátých letech, kdy jsme rezistentní druhy nádorů chtěli eliminovat maximálně tolerovanou agresivní chemoterapií, nejenom že nevedly k očekávaným léčebným výsledkům, ale staly se jednou z příčin sekundárních nádorů. Zejména u těch druhů rakoviny, kde agresivní chemoterapie byla kombinována s radioterapií (10-15% sekundárních nádorů u Hodgkinovy nemoci po 15-20 letech od ukončení léčby). Diagnostika a léčba ALL podle léčebných protokolů má obrovský medicínský, vědecký ale i etický význam. Jakékoliv diagnostické nebo léčebné opomenutí je nepřijatelné a často se projeví v konečném léčebném výsledku. Ku příkladu jediná

modifikace léčebného protokolu „ANZ study VI“ (záměna L-asparaginázy (L-asp) připravené z kmene *E. coli* za L-asp z *Erwinia chrysanthemia*), která měla snížit toxicitu uvedeného cytostatika, vedla ke zhoršení léčebných výsledků o 12 % (2)! Vysvětlením je zřejmě kratší biologický poločas L-asp z *Erwinie* (0,65 dne) v porovnání s L-asp z *E. coli* (1,24 dne). Poznání nových vlastností leukemické buňky a charakteristika jejího biologického chování v různých etapách nádorového procesu dovoluje rozdělit pacienty již při diagnóze onemocnění do většího počtu léčebných skupin, které se mezi sebou liší nejenom výší agresivity chemoterapie, ale i stupněm kurability. Jinými slovy, snahou je maximálně snížit nadměrné zatížení dětského organismu léčbou při zachování vysokého stupně léčebného úspěchu. Z pohledu dnešního poznání se individualizace léčebných protokolů nejeví již tak nereálným cílem.

Ke stratifikaci pacientů s ALL dnes využíváme různé vlastnosti leukemické buňky: její morfologické odlišnosti, rozdílný imunofenotyp, cytogenetické změny ve smyslu počtu chromozomů nebo jejich strukturálních abnormalit a nejnověji i znaky detekovatelné pouze metodami molekulární genetiky. Hledají se vazby mezi zdánlivě nesouvisejícími vlastnostmi a vyhodnocuje se jejich statistická významnost.

Od roku 1948, kdy Farber při léčbě hemoblastózy metotrexátem jako první chemoterapií navodil remisi onemocnění, uplynulo padesát let. Získali jsme mnoho zkušeností s chemoterapií nádorových onemocnění, ale některé nepředvídatelné účinky jednotlivých cytostatik jsme nedokázali dodnes dostatečně vysvětlit.

Interindividuální variabilita účinků chemoterapeutik se v posledních letech daří lépe interpretovat zejména studiem genetické predispozice vnímavosti pacienta na protinádorovou léčbu. Bez využití moderních technologií molekulární genetiky by pokrok v oblasti **farmakogenetiky** nebyl tak velký.

ALL je genetické onemocnění a úspěšnost léčby je pevně svázaná s genotypem nádorové buňky. V letech 1987-1994 provedl Pinkel a spol. (3) u 151 dětských pacientů s ALL pilotní studii, ve které byl výběr léčby určen v souladu s genotypem blastů, který byl stanoven pomocí DNA indexu a jiných cytogenetických a molekulárně genetických metod. Autoři navrhli cytogenetickou klasifikaci ALL, ve které určili vztah mezi genotypem nádorové buňky, biologickými a klinickými vlastnostmi dané formy ALL a stanovili i procento kurability a frekvence výskytu dané varianty onemocnění (tab.1).

Dlouho se nevědělo, proč mají děti s ALL s hyperdiploidním počtem chromozomů >52 signifikantně lepší prognózu dlouhodobého přežití než děti s jiným počtem chromozomů. Studium této varianty bylo nedávno zjištěno, že nejčastěji jsou multiplikovány (trizomie, tetrazomie) zejména chromozomy 21, 4 a 10. Pui (4) uvedl, že u dětských ALL s hyperdiploidní formou se nadpočetný chromozom 21 vyskytoval až u 87 % dětských ALL této skupiny. Podrobnou molekulárně genetickou analýzou byl nedávno na 21. chromozomu lokalizován gen pro **folátový transportér** (reduce folate carrier - *RFC*) v pozici 21q22.3. RFC protein, který je lokalizován na buněčné membráně, umožňuje aktivní vstup metotrexátu do buňky (obr.1). Membránový folátový receptor (FR), který má vysokou afinitu k MTX, ale nízkou kapacitu, se na procesu nitrobuňčného transportu MTX neúčastní nijak významně. Pasivní difúze (PD) se na vstupu do buňky uplatňuje zejména v modelu vysokodávkované chemoterapie. Význam multiplikace 21. chromozomu u dětí s ALL přispěl k objasnění některých „léčebných záhad“ u leukemických dětí s Downovým syndromem. Dördelmann a spol. (5) popsali, že až u 43 % pacientů s trizomií 21. chromozomu musela být cytostatická léčba redukována nebo přerušena, což se v konečném důsledku projevilo horším léčebným výsledkem.

Dnes již víme, že nadpočetný 21. chromozom s obsahem nadpočetného folátového transportéru, je příčinou vysoké toxicity metotrexátu, která postihuje zejména tkáň s vysokou

proliferací aktivitou (GIT a hemopoetický systém). U těchto pacientů Garré a spol. (6) popsali systémovou toxicitu MTX i po jeho nízkých dávkách, které podávali intratekálně za účelem prevence CNS leukémie. Pro děti s Downovým syndromem, které onemocněly leukémií, doporučuje Evans (7) i při podání nízkých dávek MTX použít model ochrany (leukovorine rescue) jak je užíván při aplikaci vysokých dávek MTX. Autoři na základě výše uvedeného poznání doporučují rovněž zvážit úpravu dávkování MTX: a) 1,5 g/m² pro skupinu dětské prekursorové B-ALL s hyperdiploidii >50 chromozomů, b) 2,5 g/m² pro děti se stejným imunofenotypem, ale s počtem chromozomů <50.

Vysvětlení, proč je i přítomnost nadpočetného 4. a 10. chromozomu u dětí s hyperdiploidii prognosticky významná, můžeme pro 4. chromozom hledat ve zde lokalizovaných genech regulujících buněčný cyklus a apoptózu (gen pro caspase 3 - *CASP3*, caspase 6 - *CASP6* a cyklinu A - *CCNA*). Na chromozomu 10 je lokalizován další významný gen, kontrolující proces apoptózy - *APO-1*. Kromě již výše uvedených cytostatik ze skupiny antimetabolitů patří i kortikosteroidy k základním pilířům antileukemické terapie a indukční léčba dětské ALL je zahajována ve většině protokolů právě touto skupinou léků. Geny, které programovanou smrt buňky kontrolují, se tak mohou na léčebném efektu významně podílet.

Nemoci s charakterem genomické nestability (tab.2) znamenají pro svého nositele vyšší vnímavost na iatrogenní poškození DNA (cytostatika, ozáření), které se významně podílí na zvýšené incidenci nádorů. Nijmegen breakage syndrom (NBS) má ve skupině syndromů s chromozomální instabilitou nejvyšší riziko malignity. Zatímco ataxia teleangiectasia (AT), Bloom syndrom (BS), Fanconiho anemia (FA), xeroderma pigmentosum (XP) představují pro homozygoty 20- až 40% riziko malignity, u pacientů s NBS (3) byl výskyt nádorů až 77,7 %. Že je znalost specifických charakteristik jednotlivých onemocnění této skupiny nevyhnutelná, jsme se mohli přesvědčit nedávno, když jsme hospitalizovali na našem onkologickém oddělení 10letého pacienta s tímto syndromem. NBS je autozomálně recesivní syndrom chromozomální nestability (7). Klinické projevy zahrnují: „bird like“ facies, kombinovaný imunodeficit a vývoj lymforetikulární malignity v dětství. Z laboratorních nálezů je charakteristická nízká hladina imunoglobulinů, translokace t(7;14), přítomnost chromozomálních zlomů, buněčná i chromozomální hypersenzitivita a radiorezistence syntézy DNA. Gen způsobující NBS byl objeven v roce 1998 a nazván *NBS1*, kóduje protein nibrin, jehož funkcí je oprava chromozomálních zlomů po ionizačním záření. Odhad incidence homozygotů je 1:290 000, odhad frekvence u heterozygotů je 1:100 (8). Naš pacient byl homozygot NBS, který ve věku 10 let onemocněl preT-NHL. Cytogenetickou analýzou jsme potvrdili translokaci t(7;14) (q23;q32.3) a zvýšený obsah (14%) chromozomálních zlomů (N<3%). Cytokinetickým vyšetřením ve specializované laboratoři ve Würzburgu byl potvrzen blok proliferace buněk v G2 fázi buněčného cyklu po ozáření s 1.5 Gy a rovněž molekulárně genetická analýza *NBS1* genu na 8q21 potvrdila „slovanskou“ mutaci 657del5 v homozygotním stavu (IHG Berlin, prof.Dr.K.Sperling). Léčba protokolem BFM musela být pro závažné toxické účinky chemoterapie přerušena a po konzultaci C. Weemaes z Nijmegenu změněna na speciálně upravený protokol SNWLK-ALL-9 NHR (striktní zákaz radioterapie, rtg vyšetření, použití radionuklidových technik a výrazná redukce některých skupin cytostatik). Zvýšená frekvence zejména heterozygotní formy NBS na našem území (Polsko, Slovensko, Česko) provokuje onkologa k mnohým otázkám. Jaký profit by mohl přinést screening NBS? Není vyšetření každého onkologicky nemocného dítěte před zahájením chemoterapie na nosičství heterozygotní formy NBS nevyhnutelné? Jakou roli hraje heterozygotní forma NBS ve

Tab. 1: Cytogenetická (molekulárně genetická) klasifikace ALL
Upraveno a doplněno podle: Pinkel,B. (1997) Blood, 90: 185a

Genotyp	Frekvence	Vlastnosti	Léčba	Kurabilita
Hyperdiploidie >52, trizomie 4,10, 21	25%	věk 2–10 CD10+	MTX+6MP	80% 90%
TEL-AML	20%			90%
MLL	6%	věk <1 CD10–	?	10%
E ₂ A-PBX	5%	cIg+	MTX+6MP ARA-C? Daunorubicin?	60%
BCR-ABL	5%	věk <6 hyperleukocytóza	?	20%
Hypodiploidie	6%	nespecifické	?	30%
IL3-IGM		eosinofilie carditis	?	nizká
HLF-E ₂ A	<1%	koagulopatie	?	?
TCR	15%	věk >8 hyperplazie thymu CD2,3,5,7	Cyklofosfamid, ARA-C, L-ASP, Daunorubicin, HD MTX?	60%
Neklasifikovaný	15%	–	–	–
Komplexní karyotyp	?	?	Vysoká <i>in vitro</i> citlivost na L-ASP, redukce dávky L-ASP?	velmi nízká?

Obr. 1: Schematické znázornění farmakokinetiky MTX v nádorové buňce

Legenda: RFC = reduced folate carrier, PD = pasivní difúze, FR = folátový receptor, THF = tetrahydrofolát, DHF = dihydrofolát, GARtf = glycylamid-ribonukleid transformyláza, AICARtf = aminoimidazol-karboxamid transformyláza, FPGS = folylpolyglutamát syntetáza, MTXglu = glutamylovaná forma MTX, GGH = gama-glutamyl hydroláza, TS = tymidylát syntetáza, PRPP = fosforibosyl pyropofát.

vývoji sekundární malignity a jaký podíl závažných léčebných komplikací lze připsat na účet heterozygotní formy NBS? U pacientů s NBS, diagnostikovaných na našem území, se toxické účinky chemoterapie ve všech případech významně podílely na konečném fatálním výsledku.

Již samotná identifikace nepříznivých genetických faktorů (přítomnost fúzního genu *BCR/ABL* nebo *MLL/AF4*) předurčuje bez ohledu na průkaz dalších rizikových faktorů (špatná iniciální *in vivo* odpověď na kortikoidy, věk <1 a >9 let, hyperleukocytóza >50x10⁹/l) u nejčastější formy dětské ALL z prekursorů B buněk zařazení do skupiny s vysokým rizikem.

Pacienti ze skupiny s vysokým rizikem dosahují nízké procento dlouhodobého přežití a ani vysoce agresivní chemoterapie, případně transplantace kostní dřeně nevede k vyléčení. Kromě stratifikace pacientů do rizikových skupin může přesná detekce výše uvedených aberací navíc sloužit k detekci minimální reziduální nemoci. Další neméně důležité využití cytogenetické charakteristiky nádorové populace budeme zřejmě stále častěji využívat k farmakogenetické stratifikaci. Kromě již výše uvedených chromozomálních

změn, které mohou být příčinou pozměněné vnímavosti pacienta na chemoterapii, se použitím vysoce specializovaných metod (fluorescenční *in situ* hybridizace - FISH, komparativní genomová hybridizace - CGH) podařilo vymezit malou skupinu dětí s ALL, která je charakterizována přítomností tzv. **komplexních chromozomálních změn**. Nosič extrémně komplexních cytogenetických změn je definován přítomností tří a více chromozomálních abnormalit. Tyto chromozomální změny, pravděpodobně následek genomové instability, se u dospělých pacientů s MDS/AML podílejí na rezistenci k chemoterapii, která se negativně podílí na celkovém léčebném výsledku (10). V dětské onkologické nemoci nebyla zatím problematika komplexního karyotypu u pacientů s ALL věnována zvýšená pozornost. Měli jsme možnost v průběhu posledních dvou let diagnostikovat 3 děti s ALL u kterých se nám podrobnou cytogenetickou analýzou podařilo odhalit přítomnost komplexního karyotypu a sledovat, i když na malém souboru, jeho některé závažné klinické projevy. V tab. 3 je uvedena stručná klinická a laboratorní charakteristika dětských pacientů. Vzhledem

Tab. 2: Nemoci s charakterem chromozomální (genomové) nestability

Nemoc	Farmako/genetická charakteristika	Lokalizace genu
Ataxia teleangiectasia (ATA)	porucha reparace DNA,	<i>ATM</i> gen - 11q22-23
Bloom syndrome (BS)	senzitivita k radiaci a mitomycinu chromozomální zlomy, fotosenzitivita	gen - 11q23
Fanconiho anemia (FA)	zlomy, reduplikace, přestavby chromozomů, fotosenzitivita	<i>FANCD</i> gen - 3pter-3p24 <i>LOUI9CRI</i> gen - 19q13- <i>FAI</i> gen - 9q22
Nijmegen breakage sy (NBS)	buněčná a chromozomální hyperradiosenzitivita, radiorezistence syntézy DNA, t(7;14), zvýšená toxicita cytostatik (alkylační látky, antracykliny)	<i>NBS1</i> gen - 8q21 (mutace 657del5)
Xeroderma pigmentosum (XP)	senzitivita k UV radiaci	<i>XPC</i> gen - 3p25
Immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies sy (ICF)	změny na chromozomech 1, 9 a 16	?
Cockayne syndrome	fotosenzitivita, UV zářením indukované DNA poškození (transkripční oblast DNA)	<i>CKN1</i> gen - 5pter
DiGeorge syndrome	chromozomální instabilita, zlomy	gen - 22q11 (delece, mikrolece)

Tab. 3: Klinicko-laboratorní charakteristika dětí s ALL s komplexním karyotypem.

	PACIENT 1	PACIENT 2	PACIENT 3
Věk	17	13	5
Pohlaví	M	Ž	Ž
Riziková skupina	MRG	HRG	SRG
FAB klasifikace	L2	L2	L2
Imunofenotyp	c-ALL	c-ALL	preB-ALL
ANB0 (x mm ⁻³)	0	49 312	6 650
ANB8 (x mm ⁻³)	0	2 623	0
BCC8 (%)	nehodnotitelné	94,7	100,0
KD7 (%)	<16	–	–
KD15 (%)	–	52	<5
KD34 (%)	<5	11	<5
LC ₅₀ L-ASP (U/ml)	1,531	0,7585	0,0098
Léčebný protokol	ALL-BFM 95	ALL-BFM 95	ALL-BFM 95
Klinický průběh	Po 5. aplikaci E.coli L-ASP: hemoragická pancreatitis, edém plic, DIC, exitus	Po 5. aplikaci E.coli L-ASP: hemoragická pancreatitis, edém plic, DIC. Nepříbuzenská TDK, aGVHD, engraftment D20, KD relaps D88, exitus.	Po 1. aplikaci E.coli L-ASP: lehký stupeň pancreatitis, pokračuje v léčbě (změna na Erwinia chrysanthemia L-ASP).
Genetická klasifikace	46,XX(60%) 57,XY,+X,+Y,+4,+del(6)(q22;q24),+der(7)ins(7;11)(p21;q13?),+9,+10,+14,der(16),t(16;17)(p13;p12?),+18,+21,+21(40%)	46,XX (10%) 46,XX, t(1;4;12;13)(p12;q23;p12;q13), t(7;11);20)(q23;q12;p12) (90%)	46,XX 45mX,-X, t(12;21;13)(p13;q12;q22), t(5;17;?)(q31;q23;?)
FISH (wcp)	X, Y, 2, 4, 6, 79, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22	2, 4, 7, 11, 12, 13, 20	X, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 212

Legenda: SRG = skupina se standardním rizikem, MRG = středním rizikem, HRG = vysokým rizikem, c-ALL = common ALL, ANB0 = absolutní počet blastů v den 0, ANB8 = v den 8, BCC8 = blast cell clearance v periferní krvi v den 8, KD7 = kostní dřev v den 7, LC₅₀ L-ASP = koncentrace L-ASP, která usmrtí 50 % blastů

k malému souboru pacientů, můžeme upozornit snad jen na skutečnost, že komplexní chromozomální změny mohou být stejně jako u dospělých pacientů s MDS/AML, nezávislým prognosticky nepříznivým znakem onemocnění. Nadále však zůstává neobjasněné, zda přítomnost mnohočetné chromozomální aberace je skutečným prognostickým parametrem nebo jenom indikátorem rychle progredující nádorové nemoci (12). Pro koincidenci komplexního karyotypu se zvýšenou toxicitou L-asparaginázy (11), máme zatím jenom hypotetickou interpretaci. Lze předpokládat, že odpověď může být ukryta, tak jako u jiných nemocí s charakterem genomové instability ve fenotypu chromozomální změny.

Chromozomální změny, které se podílejí na pozmeněné (zvýšené) vnímavosti pacienta na chemoterapii se mohou významnou měrou

podílet na ne zcela objasněných příčinách úmrtí pacientů v indukční fázi léčebného protokolu. U geneticky podmíněné vyšší vnímavosti pacienta na chemoterapii dochází i při důsledném dodržení léčebného protokolu k nadměrnému toxickému zatížení (overtreatment), které může být příčinou život ohrožující komplikace nebo sekundární malignity.

Poznání a respektování vlivu genetické predispozice pacienta na účinnost protinádorové chemoterapie povede ke zvýšení výsledného léčebného efektu.

Projekt byl financován granty IGAMZ 4132-5, MŠMT VZJ 14/98 151 100001, VS 96154 a Nadací pro výzkum rakoviny v Olomouci.

Literatura:

- Pui, C-H., Evans, W. E.: Acute lymphoblastic leukemia. NEJM 339: 605-615, 1998.
- Pui, C-H., Evans, W. E., Gilbert, J. R.: Meeting report: International childhood ALL workshop: Memphis, TN, 3-4 December 1997. Leukemia 12: 1313-1318, 1998.
- Pinkel, D.: Genetic classification of childhood acute lymphoid leukemia (ALL). Blood 90: 185a, 1997.
- Pui, C-H., Evans, W. E.: Genetic abnormalities versus drug resistance in leukemias. Leukemia 12: 266, 1998.
- Dordelmann, M., Schrappe, M., Reiter, A. et al.: Down's syndrome in childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristic and treatment outcome in four consecutive BFM trials. Leukemia 12: 645-651, 1998.
- Garré, M. L., Relling, M. V., Kalwinsky, D. et al.: Pharmacokinetics and toxicity of methotrexate in children with Down syndrome and acute lymphocytic leukemia. J. Pediatr., 111: 606-612, 1987.
- Evans, W. E., Pui, C-H., Relling, M. V.: Defining the optimal dosage of methotrexate for childhood acute lymphoblastic leukemia: new insights from the lab and clinic. ECC New Letter 7: 8-10, 1998.
- Varon, R., Vissinga, C., Platzer, M. et al.: Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is a mutated in Nijmegen breakage syndrome. Cell 99: 467-476, 1998.
- Seemanová, E., Passarge, E., Benešová, D. et al.: Familial microcephaly with normal intelligence, immunodeficiency, and risk for lymphoreticular malignancies: A new autosomal recessive disorder. Am. J. Med. Genet. 20: 639-648, 1985.
- Indrák, K., Jarošová, M., Súllovská, I. et al.: Cytogenetic findings in patients with primary myelodysplastic syndrome and their prognostic significance. (Analysis of results in 65 patients) Vnitř. Lék. 40: 577-585, 1994.
- Hajdúch, M., Mihál, V., Minařík, J. et al.: Decreased in vitro chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant diseases with a poor prognosis. Cytotechnology 19:243-245, 1996.
- Mitelman, F., Johansson, B., Mandahl, N., Mertens, F.: Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors. Cancer Genet Cytogenet 95: 1-8, 1997.