
klinická onkologie

6/99

ROČNÍK 12

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.mou.cz/klinicka.onkologie/onko.htm>

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLEČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO
REDAKTORA: KOZA IVAN
VÝKONNÝ REDAKTOR: FAIT VUK

REDAKTOŘI:

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

REDAKČNÍ RADA

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

OBSAH

Přehled

Hájek K., Křivánová A., Krejčí M., Doubek M., Klabusay M., Adam Z., Mayer J., Vorlíček J.
Perspektivy imunoterapie v léčbě mnohočetného myelomu 188

Michálek J., Šmarda J., Ševčíková S., Hrstková H.
Nejčastější chromozomální přestavby u dětí s akutní myeloidní leukémií a možnosti jejich sledování
na molekulární úrovni 191

Šmardová J.
FASAY: nové možnosti 196

Původní práce

Obořilová A., Mayer J., Pospíšil Z., Kořístek Z., Vorlíček J., Havranová D.
Symptomatická parenterální antipyretická léčba u onkologicky nemocných – srovnání metamizolu, diclofenacu a propacetamolu 200

Michálek J., Horvath R., Benedík J., Hrstková H.
Cytomegalovirová infekce u dětí se zhoubnými nádorovým onemocněním: od sérologie k průkazu virové DNA 206

Sdělení

Dvořák J., Hůlek P., Raupach J., Vaňásek T., Vaňásek J., Krajina A., Medková V., Stejskal J., Odrážka K., Lojík M., Mašková J.,
Šafka V., Vodňanský P., Fridrich J.
Endovaskulární brachyterapie – první technické zkušenosti 212

Zpráva

Žaloudík J.
Aktuální témata hormonální regulace nádorového růstu
6th International Congress Hormones and Cancer, Jerusalem 5.–9. 9. 1999 213

Fait V., Vagunda V.
Minimal Residual Disease in Melanoma. International Symposium on Biology, Detection and Clinical Relevance of Micrometastases,
September 17.18.1999 Homburg /Saar 215

Informace

– knihy 199, 210

Onkologické společnosti 216

CONTENTS

Reviews

Hájek R., Křivánová A., Krejčí M., Doubek M., Klabusay M., Adam Z., Maayer J., Vorlíček J.
Perspective on Immunotherapy in Multiple Myeloma 185

Michálek J., Šmarda J., Ševčíková S., Hrstková H.
The Most Frequent Chromosomal Aberrations in Children with Acute Myeloid Leukemia, Follow - UP at the Molecular Level 191

Šmardová J.
Fasay: Recent Achievements 196

Original Papers

Obořilová A., Mayer J., Pospíšil Z., Kořístek Z., Vorlíček J., Havranová D.
Symptomatic Intravenous Antipyretic Therapy in Cancer Patients - Comparison of Metamizol, Diclofenac and Propacetamol 200

Michálek J., Horvath R., Benedík J., Hrstková H.
Cytomegalovirus Infection in Children with Cancer: from Serology to Viral DNA Detection 206

Notification

Dvořák J., Hůlek P., Raupach J., Vaňásek T., Vaňásek J., Krajina A., Medková V., Stejskal J., Odrážka K., Lojík M., Mašková J.,
Šafka V., Vodňanský P., Fridrich J.
Endovascular Brachytherapy - Early Technical Experiences 212

Report

Žaloudík J.
6th International Congress on Hormones and Cancer, Jerusalem, Israel, 5. - 9.1999 213

Fait V., Vagunda V.
Minimal Residual Disease in Melanoma. International Symposium on Biology, Detection
and Clinical Relevance of Micrometastases, September 17. 18. 1999, Homburg / Saar 215

Information

– Book 199, 210

Oncological societies 216

přehled

PERSPEKTIVY IMUNOTERAPIE V LÉČBĚ MNOHOČETNÉHO MYELOMU

PERSPECTIVE ON IMMUNOTHERAPY IN MULTIPLE MYELOMA

R. HÁJEK, A. KŘTVÁNOVÁ, M. KREJČÍ, M. DOUBEK, M. KLABUSAY, Z. ADAM, J. MAYER, J. VORLÍČEK

II. INTERNÍ-HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

Souhrn: Myeloablativní chemoterapie zlepšila výsledky léčby mnohočetného myelomu, nemoc však zůstává stále nevyléčitelná. Eradikace zbytkové nemoci je jedním z klíčových kroků ke zlepšení prognózy pacientů s mnohočetným myelomem. Udržovací terapie interferonem alfa má nejednoznačné výsledky. Nové léčebné metody jako konsolidační terapie, využití monoklonálních protilátek, genové terapie, interleukinů, imunotoxinů, vakcín, aktivace dendritických buněk a indukce reakce štetu proti nádoru, jsou testovány ve fázi I/II klinických studií. Tento článek stručně shrnuje nové léčebné možnosti imunoterapie. Pokrok v adoptivní buněčné imunoterapii a v indukci reakce štetu proti myelomu jsou velice slibné. Stále však nejsme schopni převést velmi dobré preklinické výsledky imunoterapie do klinické praxe. Kombinace myeloablativní léčby s novým typem imunoterapie, jež má za úkol eradikaci nádorového onemocnění, je jednou z perspektivních variant léčby, která by mohla zlepšit současné kontroverzní postavení imunoterapie u mnohočetného myelomu.

Klíčová slova: Mnohočetný myelom-imunoterapie-adoptivní buněčná terapie-reakce štetu proti myelomu - cytokiny

Summary: Myeloablative chemotherapy has improved the results of multiple myeloma treatment but the disease remains incurable. Residual disease eradication is one of the main goals for further improvement of the prognosis of myeloma patients. Interferon alpha maintenance therapy has controversial results. New methods, such as consolidation therapy, antibody therapy, gene therapy, interleukins, immunotoxins, dendritic cells, vaccines and induction of graft-versus-tumor effect, are being tested in phase I/II clinical trials. This article briefly reviews the new treatment modalities of immunotherapy. Progress in adoptive cellular immunotherapy and progress in induction of graft versus myeloma effect are very promising. We are still not able to transfer the good preclinical results of immunotherapy into clinical results *in vivo* measured by event free and long-term survivals. Combination of myeloablative therapy followed by a new type of immunotherapy focusing on residual disease eradication evaluated in the setting of sensitive disease may be optimal. Such an approach could improve the current controversial status of immunotherapy in multiple myeloma.

Key words: multiple myeloma - immunotherapy-adoptive cell therapy - graft versus myeloma effect - cytokines

Úvod

Vysokodávkovaná chemoterapie s transplantací kmenových krvetvorných buněk je dnes považována za optimální léčebný postup u vhodných nemocných s mnohočetným myelomem (1). Ve vysokém počtu případů (30-50 %) je po provedení transplantace dosaženo kompletní léčebné odpovědi, což se projevuje i v prodloužení doby do relapsu onemocnění a celkového přežití ve srovnání se standardní léčbou. Přes nepochybný úspěch v léčbě s mnohočetným myelomem (MM) po 20 letech stagnace, se zavedením vysokodávkované léčby nedaří odvrátit relaps onemocnění. Pravidlo „vyšší dávka = lepší léčebná odpověď“ je limitováno vznikem nevladatelné nehematologické toxicity. Rutinně se zkouší podání dvou intenzivních cyklů vysokodávkované chemoterapie v rychlém sledu za sebou a řada pracovišť tento postup považuje za optimální. Předběžné výsledky francouzské studie IFM 94 zatím neukazují na zásadní rozdíl mezi podáním jednoho nebo více intenzivních cyklů (2).

Zdá se nepochybné, že ani vysokodávkovaná léčba není schopna zničit všechny myelomové buňky. V těle přežívající nádorové buňky, tzv. zbytkové nádorové onemocnění (minimal residual disease) je rozhodující pro znovuobjevení choroby. Přístupy zaměřené na eradikaci zbytkového nádorového onemocnění nebo dlouhodobé udržení stabilního počtu nádorových buněk, jsou dnes považovány za klíčové přístupy, které

mohou dále prodloužit život nemocných s myelomem a nádorem obecně.

Nové přístupy musí být postaveny na základě našich prohlubujících se znalostí o biologii myelomu (3), cytokinové síti (4) a imunoregulačních mechanismech u mnohočetného myelomu (5), jak jsou postupně objeveny.

Nové léčebné imunoterapeutické metody, jako je užití monoklonálních protilátek, imuno-genové léčby, interleukinů, imunotoxinů, vakcín a indukce efektu štetu proti nádoru, jsou testovány ve fázi I/II klinických studií. Tento článek v krátkosti shrnuje současný stav imunoterapie v léčbě nemocných s MM z klinického hlediska a shrnuje současné poznatky a nové trendy v imunoterapii, jež by mohly zlepšit současné kontroverzní postavení imunoterapie v léčbě MM.

Role interferonu alfa

Udržovací léčba interferonem alfa (IFN) je dnes standardní léčbou zbytkového nádorového onemocnění u nemocných s MM. Efekt IFN byl hodnocen v řadě studií jako součást léčby indukční nebo léčby udržovací s kontroverzními výsledky. V současnosti bylo uveřejněno 7 randomizovaných studií s použitím IFN v udržovací léčbě po standardní indukční léčbě (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Výsledky celkové analýzy dat pacientů s myelomem léčených IFN (1518 pacientů v indukční, 924 v udržovací léčbě) podpořily užití IFN jako udržovací léč-

by, nikoliv však jako součást léčby indukční (7). Z randomizovaných studií užívajících IFN jako udržovací léčbu po léčbě standardní vyplývá, že IFN má potenciál prodloužit přežití i dobu do relapsu onemocnění, v průměru však jen o měsíce. Je třeba najít silnější udržovací léčbu ke zlepšení prognózy nemocných s MM.

Imunoterapie je pravděpodobně schopna zničit limitovaný počet nádorových buněk. Proto by imunoterapie měla být teoreticky efektivnější při eradikaci zbytkové nádorové choroby - stavu, jehož je nejčastěji dosahováno díky vysokodávkovaným chemoterapeutickým režimům užívaných pro autologní či alogenní transplantaci kostní dřeně (TKD). Tato hypotéza je testována obecně v onkologii, tedy i u myelomu. První povzbudivé výsledky randomizované studie užívající IFN po autologní TKD s mediánem sledování 52 měsíců (13) ztratily na statistické významnosti po 5,5 letech sledování nemocných, protože významná část nemocných podlehlá onemocnění (14). Průkaz efektu IFN v udržovací léčbě následující po vysokodávkované chemoterapii může být prokázán v dalších probíhajících studiích. Časté relapsy ve skupině pacientů s MM léčených autologní BMT následovanou udržovací léčbou IFN však již nyní ukazují, že je nutné hledat účinnější typy udržovací léčby. Na základě kvalitně provedené metaanalýzy dat nemocných léčených IFN se dnes snaží vědci vytypovat skupinu nemocných s MM, kteří mohou profitovat z léčby IFN (7, 15). Je možné, že při eradikaci zbytkové nádorové choroby bude IFN účinnější v kombinaci jinými léčebnými postupy. První výsledky z velké srovnávací studie kombinující kortikoidy s IFN v udržovací léčbě po standardní chemoterapii jsou velmi povzbudivé. V současné době běžící randomizovaná multicentrická studie „4W“ České myelomové skupiny má podobný cíl - zhodnocení významu kombinované sekvenční léčby IFN s dexamethasonem oproti standardní udržovací léčbě IFN po provedení autologní transplantace (16).

Jiné cytokiny

Interferon gama (IFN- γ) se jeví v preklinických studiích jako silný inhibitor cytokinů myelomové proliferace (17, 18). Bylo prokázáno, že IFN- γ prakticky kompletně inhibuje IL-6 řízený růst myelomových buněk a pravděpodobně je rovněž schopen blokovat kostní resorpci (18). První klinické studie neprokázaly léčebný efekt IFN- γ u MM (19). Domníváme se, že je třeba dalšího zkoumání účinků IFN- γ v dobře organizovaných studiích, jelikož naše znalosti o účincích IFN- γ u MM in vivo jsou minimální. Role IFN- γ podaného s Cyklosporinem A při indukci reakce štetu proti nádoru je zmíněna níže.

Interleukin 4 (IL-4) je cytokin s rozmanitými stimulačními i supresivními účinky. Je produkován aktivovanými pomocnými T-lymfocyty. Byl prokázán jeho protinádorový efekt a běží již první studie s rekombinantním IL-4 u různých malignit (20). IL-4 in vitro inhibuje růst myelomových buněk a to pravděpodobně cestou exprese IL-6 (21). Vesole a spol. zdokumentoval malý klinický účinek IL-4 u pacientů s pokročilým MM (22).

Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) je jedním z růstových faktorů rutinně užívaných k ovlivnění proliferační leukopenie GM-CSF je silným specifickým stimulatorem buněk kostní dřeně. Tento cytokin je jedním z nejčastěji užívaných cytokinů při ex vivo kultivaci různých buněčných progenitorů. GM-CSF je také používán jako adjuvans po podání aktivovaných imunokompetentních buněk (23, 24, 25). GM-CSF patří vedle IL-2 k nejčastějším cytokinům zkoušeným v experimentální imuno-genové léčbě (26). **Interleukin 2 (IL-2)** je jedním ze základních imunomodulačních cytokinů. IL-2 stimuluje proliferaci T buněk a NK buněk in vitro i in vivo. Inkubace lymfocytů s IL-2 in vitro vede k proliferaci buněk označovaných jako lymphokine activated killer cells (LAK buňky), které mají popsány nespecifický protinádorový účinek v preklinickém modelu (27, 28). Zájemce o podrobnější informace o účincích IL-2 na efektorové imu-

nitní buňky odkazujeme na souhrnné práce citované v literatuře (28, 29).

Přestože byla terapie IL-2 klinicky testována v onkologii především u solidních nádorů po více než dvě dekády, klinické zkušenosti s IL-2 u nemocných s MM jsou stále omezené. U netransplantovaných nemocných byly popsány klinické léčebné odpovědi na IL-2 u MM (30). Gottlieb a spol. aplikoval IL-2 u pacientů po autologní BMT (31). IL-2 byl rovněž použit po auto-BMT u MM i jiných hematologických malignit (32). Ačkoliv byl IL-2 uveden do klinické praxe jako samostatný lék, je v současné době stejně jako jiné cytokiny, užíván v kombinaci či sekvenčně (33). Kombinovaná léčba IFN a IL-2 byla také zkoumána u hematologických malignit po ABMT s nízkou toxicitou a slibnými výsledky (34). Fáze II klinické studie podávání subkutánního IL-2 a IFN poprvé užitých u pacientů s MM byla publikována Belchem a spol. Toxicita byla podobná jako při monoterapii těmito cytokiny. I přes fakt, že nebylo dosaženo ani parciální remise onemocnění, všichni hodnocení nemocní s relabovaným MM dosáhli stabilizace onemocnění, jež přetrvávala více než jeden rok u 5 pacientů [33%] (35). Použití IL-2 v léčbě nemocných s MM reagujících na VAD v pilotní studii nepřineslo další zlepšení léčebné odpovědi (36).

Imunoterapie pomocí IL-2 může být účinnou možností ovlivnění relapsu po autologní TKD. Klinické studie užívající kombinované postupy a sekvenční aplikaci cytokinů s chemoterapií probíhají. Vzhledem k vysokému riziku nepředvídatelné těžké toxicity, jež byla v minulosti popsána, se obecně upustilo od pokusů o podávání IL-2 v nejvyšších dávkách. Specifická stimulace imunitního systému nízkodávkovaným IL-2 (32) nebo aktivace specifických imunologických efektorů ex vivo (viz níže) se jeví v současnosti jako slibnější přístupy v imunoterapii, lépe tolerované pacienty. Optimální dávka a doba podání IL-2 zatím nebyly stanoveny. Miller a spol. použil i nízkodávkovaný IL-2 ($0,25$ nebo $0,5 \times 10^6$ IU/m²/den) s.c. po dobu 84 dnů s počátkem podávání 3 měsíce po autologní BMT u karcinomu prsu a lymfomů. Dávku limitující toxicita se projevila u 50 % pacientů, všechny symptomy vymizely do týdne po přerušení IL-2. Nejlépe tolerovaná dávka byla $0,25 \times 10^6$ IU/m²/den (podáno 75 % plánované dávky). U pacientů s léčbou trvající nejméně 28 dnů byl zaznamenán více než 10násobný vzrůst cirkulujících CD56⁺/CD3⁺ NK buněk se zvýšenou cytotoxicitou, která by mohla být dále zvýšena aktivací IL-2 ex vivo (37). Jiní autoři popisují nižší toxicitu subkutánně podávaného nízkodávkovaného IL-2 po autologní BMT v dávce $0,8$ až $11,0 \times 10^6$ IU/m²/den. Imunomodulační efekt byl podobný jako po i.v. podání v dávce $0,4 \times 10^6$ IU/m²/den (38). Studium léčebného potenciálu nízkodávkovaného IL-2 v eradikaci zbytkové choroby po BMT by mohlo přinést zajímavé poznatky.

IL-6 a anti IL-6 monoklonální protilátky (MoABs): V současnosti jsou zkoušeny postupy ovlivňující IL-6 signální systém, protože IL-6 je považován za hlavní růstový faktor MM buněk (39). Myší IL-6 MoABs byl testován u pacientů s pokročilým MM (40, 41). Ačkoliv žádný z pacientů nedosáhl remise či znatelného ústupu choroby dle standardních klinických kritérií, byla u 5 pacientů dokumentována inhibice proliferace myelomových buněk in vivo. Jak zmiňují autoři práce, sledovaný efekt u pacientů se špatnou prognózou musí být hodnocen spíše dle biologického účinku než užitím standardních kritérií (40). Nedávné výzkumy prokazují, že IL-6 působí rovněž jako osteolytický faktor (42). Užití lidské protilátky anti-IL-6 by mohlo být užitečné pro jisté riziko imunizace proti myší protilátce anti-IL-6 (40). Siegel a spol. zaznamenali minimální efekt anti-IL-6 MoAB nebo IL-6 u pacientů zrelabovaných po 1 či 2 autologních BMT (osobní komunikace). Young a spol. popsali celkovou léčebnou odpověď v 50 % při užití IL-6 a chemoterapie VAD u zrelabovaných a refrakterních pacientů dříve VAD léčených. U dvou nemocných byla patrná zvýšená sensitivita na VAD terapii při současném podá-

vaní IL-6 (43). Klinické využití protilátky anti IL-6 a IL-6 čeká stále na své podrobnější zhodnocení.

Jiné protilátky užívané v imunoterapii: V klinických experimentech byly u MM zkoumány další protilátky, jako například anti-HM 1,24, anti-CD54 (ICAM-1) a anti-CD38 (ve spojení s ricinem jako imunotoxinem) (44,45,46). V klinických studiích nebyl zaznamenán žádný pozitivní efekt užití kterékoliv monoklonální protilátky u mnohočetného myelomu. Studie zkoušející podávání anti-CD 19 imunotoxin IgG-HD37-SMPT-dgA u pacientů s MM, kteří dosáhli zbytkového nádorového onemocnění intenzivní chemoterapií, stále probíhají a nová perspektivní protilátka anti CD20 čeká na vyzkoušení u MM.

Adoptivní buněčná terapie

Adoptivní buněčná terapie zahrnuje sběr buněk, zprostředkovávajících obranu příjemce, od pacienta nemocného nádorem či jiného dárce, namnožení a aktivace imunitních buněk ex vivo s následnou aplikací buněk zpět nemocnému. Během zkoumání klinického využití cytokinů jako jsou interferony, interleukiny a monoklonální protilátky je zpravidla limitujícím faktorem jejich podání toxicita. Slibnou oblastí širokého pole imunoterapie je stimulace a expanze imunologických efektorových buněk s cytokiny ve vysoké koncentraci „ex vivo“ (mimo tělo nemocného), což v praxi vede k významnému omezení toxicity ve srovnání s prostou parenterální aplikací cytokinů a pravděpodobně dochází i k výhodnějšímu využití biologických účinků cytokinů. Po uvedení L A K buněk do klinických studií v 80. letech je nyní zkoumána aktivace celé řady typů imunokompetentních buněk.

Aktivace přirozených zabíječů (NK = „natural killer“): NK buňkám je věnována velká pozornost pro jejich léčebný potenciál daný jejich schopností nespecifické lýzy nádorových kultur in vitro i in vivo. Byly zveřejněny výsledky řady preklinických studií ukazujících na významnou úlohu NK a L A K buněk v imunoterapii MM (47,48). Léčba pomocí lymfokiny aktivovaných L A K buněk byla testována v řadě studií s minimálním efektem na celkové přežití, pokud byla použita jako součást standardních léčebných postupů (49, 50). Togawa et al. použil kombinaci IL-2 s L A K buňkami u pacientů s MM (51). O použití této kombinace u MM nebyly zatím zveřejněny přesvědčivé výsledky. Nedávno byly popsány nové techniky užívané relativně homogenní populace aktivovaných NK (A N K) buněk (52). Miller a spol. uvádí, že při 3 hodinovém sběru PBSC může být nasbíráno až 4×10^{10} A N K buněk (52). Rovněž ukázali, že pokud jsou A N K buňky kultivovány pomocí rIL-2 (v dávce nejméně 1 U/ml), tak aktivita NK a L A K buněk přetrvává více než 6 dnů (52). Tento přístup může být rovněž použit k prevenci relapsu onemocnění po autologní B M T u pacientů s MM. Další studie u jiných hematologických malignit v současnosti probíhají.

Aktivace T-buněk: Je znám rostoucí počet fenotypických a funkčních alterací T- buněk u pacientů s MM (5, 25, 53). Identifikace patřičného stimulu ovlivňujícího imunitu zprostředkovanou T- buňkami by mohla přispět ke kontrole průběhu nemoci. Dnes jsou k dispozici dvě základní jednoduché metody aktivace a expanze T-lymfocytů pomocí kombinace antiCD3/IL-2 nebo protilátek antiCD3/antiCD28. Lze tak poměrně jednoduše namnožit buňky až 100 x a získat aktivované T-lymfocyty s nespecifickou cytotoxicitou (25). Stimulace mononukleárních buněk u pacientů s MM pomocí anti-CD3 protilátky je spojena s rozsáhlou expanzí aktivovaných (CD3+CD25+) T buněk, které mají zesílenou schopnost zabíjení MM buněk (54). Stimulace T-buněk pravděpodobně není efektivním způsobem pro ex vivo čištění nebo pro další manipulaci se štepem, ale tento přístup může být použit ke stimulaci protinádorových efektorových T buněk pro adoptivní imunoterapii (55). Kombinace anti-CD3 MoAbs IL-2 je efektivnější než užití samotného anti-CD3 MoAb či IL-2. Kombinace intravenózního anti-CD3 MoAb následovaného kontinu-

ální infusí střední dávky IL-2 byla použita k pokusu o prodloužení a zesílení aktivace T-lymfocytů indukovaných CD3 a to u pacientů s pokročilou hematologickou malignitou včetně 2 pacientů s MM. Toto schéma mělo jen minimální efekt u 2 pacientů s MM se stabilní chorobou. Imunoterapie byla velmi dobře tolerována, nebyla pozorována žádná výraznější toxicita (56). Lum a spol. prezentoval předběžné výsledky fáze I/II klinické studie využívající adoptivní terapii s aktivovanými T buňkami s IL-2 a GM-CSF po autologní PBSCT u karcinomu prsu. Terapie měla akceptovatelnou toxicitu a celé množství 2×10^{11} aktivovaných T buněk bylo aplikováno během 2 měsíců (25). Probíhá i další studie užívací podobný protokol u pacientů s hematologickými malignitami včetně MM a rovněž další studie užívací podobné aktivace a expanze T-lymfocytů pomocí protilátek antiCD3 a antiCD28 (57).

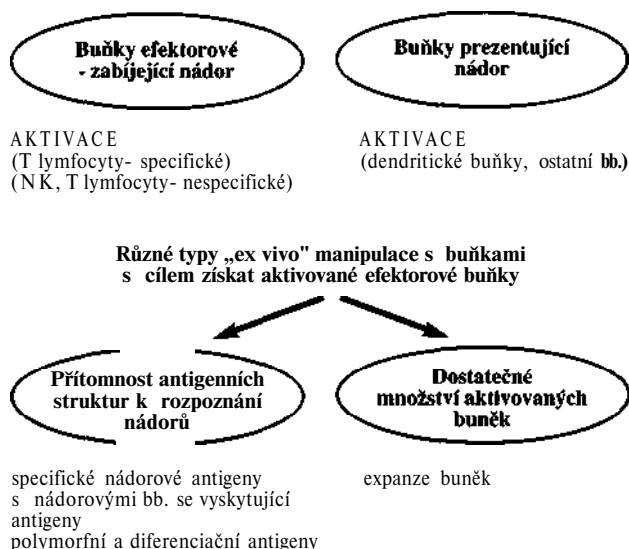
Vakcíny proti myelomovým buňkám jsou další z možností imunoterapie, jež jsou zkoumány v klinických studiích. Idiotyp (Id) myelomového imunoglobulinu lze použít jako unikátní nádorově-specifický antigen. Kwak a spol. úspěšně testoval i dárcovskou imunizaci myelomovým imunoglobulinem od budoucího příjemce štetu. Tato skutečnost by mohla posílit specifický protinádorový efekt u alogenních transplantací (58). Podobná strategie je možná i po autologní transplantaci. Před započetím léčby je třeba sběru dostatečného množství patologického imunoglobulinu (59). V současnosti již probíhají klinické studie zkoumající užití kombinace idiotypických peptidů s aktivací a expanzí buněk prezentujících antigen (24) nebo aktivací specifických T-buněk (52, 60). Massaia a spol. prokázali indukci Id-reaktivních T-buněk in vivo s použitím kožního testu u pacientů s MM po vakcinaci autologních, z nádoru pocházejících Id-peptidů, následované nízkodávkovaným IL-2 a GM-CSF (23,61). V preklinických experimentech je užívána i DNA vakcinace proti myelomovým buňkám (62).

Hlavní otázkou je, zda vůbec mají aktivované T buňky rozpoznávající specifický antigen (Id-peptid) specifický cytotoxický potenciál, jež vede ke smrti myelomových buněk v klinické praxi a zda je tento účinek dostatečný k dosažení klinického významného efektu. Jedinečné vlastnosti dendritických buněk prezentovat antigen, zmíněné níže, mohou hrát klíčovou roli v aktivaci cytotoxických T buněk.

Aktivace dendritických buněk: Dendritické buňky, v současnosti nejúčinnější buňky předkládající antigen (antigen-presenting cells), jsou schopné silně aktivovat T-lymfocyty. Klinické využití dendritických buněk bylo zahájeno až po nedávném nalezení možnosti optimální přípravy a expanze dendritických buněk v dostatečném množství a v dostatečně čisté formě. V současnosti mohou být dendritické buňky získané z CD34+ buněk užitím GM-CSF a TNF-alfa nebo IL-4 nebo je lze získat z neproliferujících prekurzorů (CD14+, CD1a-) užitím GM-CSF a IL-4 (63, 64). Kromě těchto dvou základních postupů dnes existuje řada dalších kombinací cytokinů, pomocí kterých lze kultivovat dendritické buňky. První studie s nimi začaly i u nemocných s MM. Mezi pacienty s MM a kontrolní skupinou nebyl prokázán signifikantní rozdíl ve stimulaci dendritických buněk (65). Poprvé byla použita vakcinace Id-antigenem používající dendritické buňky u pacientů s MM v roce 1996. Skupina autorů ze Stanfordu podávala Id-stimulované dendritické buňky intravenózně 3 měsíce po autologní transplantaci, následované subkutánním podáváním Id-proteinu (60). Bohlen a spol. použili dendritické buňky v kombinaci s idiotypickými peptidy a GM-CSF. Sedm pacientů s relabovaným MM dostávalo subkutánně $1-3 \times 10^7$ dendritických buněk získaných z CD 34+ progenitorů aktivovaných Id-peptidy. U 3 pacientů byl zaznamenán signifikantní pokles monoklonálního imunoglobulinu (24). První výsledky vakcinací Id aktivovaných dendritických buněk u MM jsou velmi slibné (24, 60). Kombinace dendritických buněk s ostatními metodami uvedenými výše se stávají perspektivní oblastí imunoterapie. Jednou z hlavních překážek by mohl být vznik tole-

rance T buněk. Na obrázku č. 1 jsou znázorněny různé faktory, efekторы, které jsou studovány v různých kombinacích v současných klinických studiích.

Obr. 1: Vývoj buněčné imunoterapie



Reakce štěpu proti myelomu

Navzdory velké terapeutické účinnosti alogenní transplantace, je tento přístup možnou léčebnou variantou jen u limitovaného počtu nemocných s MM. Důvodem je zpravidla vysoký věk nemocných či nemožnost najít vhodného dárce. Rovněž vysoká incidence morbidity a mortality spojená s alogenním přístupem (30-50%), především díky reakci štěpu proti hostiteli (GVHD), zabráňuje častějšímu užití této léčebné možnosti u pacientů s MM (66, 67). Přesto se zdá, že alogenní reakce štěpu proti myelomu (GVM) bude mít význam v léčbě mnohočetného myelomu podobně jako u CML (68).

Alogenní reakce štěpu proti myelomu: Bylo zveřejněno několik zpráv o možnosti dosažení alogenní GVM bez myeloablativní chemoterapie za pomoci užití infuze dárce lymfocytů (DLI-donor lymphocyte infusion): Tricot a spol. popsali 1 pacienta, který dostal malé množství DLI ($1,2 \times 10^6$ kg CD3 buněk) bez další cytotoxické terapie. Bylo dosaženo kompletní remise trvající déle než 14 měsíců (68). Verdonck a spol. uveřejnili zprávu o 2 pacientech s relapsem MM po alogenní BMT, kteří rovněž dostali DLI. U obou pacientů se projevila GVHD reakce a bylo opět dosaženo kompletní remise (69). Bertz a spol. popsali případ pacienta, který dostal celkem $6,2 \times 10^7$ kg CD3 buněk. Pro zesílení efektu T buněk bylo podáno subkutánně 6×5 milionů jednotek IFN. Po 5 dnech byl patrný ústup nádoru, k jehož úplnému vymizení došlo po 400 dnech (70). Alyea a spol. použili infúzi CD4+ buněk ($0,3-15 \times 10^8$ kg) u pacientů s relapsem MM po alogenní BMT, u kterých zaznamenali odpověď u 4 pacientů ze 7. Jeden pacient reagoval bez spojení s GVHD (71). Lokhorst a spol. popsali případ 14 pacientů. Celková léčebná odpověď byla 62% (8/13 hodnotitelných) zahrnující 30% CR a 30% parciální remise (PR). U 2 pacientů se objevila aplasie kostní dřeně a zemřeli na sepsi. Medián intervalu sledování odpovědi byl 6 týdnů (4 až 10 týdnů) s průměrným trváním odpovědi 5 měsíců (2 až 38+). U 6 pacientů byla zaznamenána odpověď po prvním podání DLI v dávce $1-3,3 \times 10^6$ kg T buněk (72). Kolb a spol. publikovali výsledky u 13 pacientů. Šest z nich bylo hodnotitelných, 33% (2 pacienti) dosáhlo CR. K posílení antigenní prezentace byla léčba DLI kombinována s GM-CSF (73). Ve třech z výše uvedených studií (70,72,68) byla pozorována těžká GVHD reakce obvyklá po aplikaci DLI u pacientů s relabovanou CML.

Možnost ovlivnění GVHD reakce může snížit vysokou mortalitu a morbiditu spojenou s touto léčebnou metodou a nabídnout léčebný potenciál GVM většímu počtu pacientů než doposud. Mechanismus vlastní odpovědi na DLI zůstává zatím nejasný. Tento fenomén by mohl aktivovat specifické cytotoxické efekторы namířené proti nádoru (CD4+ buňky, CD8+ buňky, NK buňky, antigen-předkládající buňky), ale také se může jednat jen o sekundární důsledek efektu cytokinové bouře, jež se rozvíjí během GVHD reakce. V současnosti pracuje na této problematice několik výzkumných center (71,74). Existují i další možnosti modulace a zesílení DLI léčby. DLI aktivované in vitro anebo in vivo s IL-2 úspěšně zvrátily rezistenci pacientů s CML či AML na samotné DLI (75). Zkoumání možnosti posílení terapeutického efektu DLI užitím různých cytokinů je naléhavé rovněž u pacientů s MM. V současnosti probíhá studie zkoumající efekt stupňujícího se vlivu DLI na prevenci relapsu z CR po transplantaci u hematologických malignit (76).

Tato strategie by měla být jistě studována i u nemocných s MM, u kterých je relaps choroby stále nevyhnutelný. Podání dárcovských lymfocytů má silný protinádorový efekt. Citlivé využití této metody s možností modulace reakce a v optimálním případě její oddělení od GVHD reakce, by mělo lékařům umožnit zařazovat tento postup častěji do léčebné strategie než je v současnosti možné.

Autologní reakce štěpu proti myelomu: Ojedinele byla uveřejněna zpráva o spontánní autologní GVHD následující po transplantaci se zaznamenanou GVM reakcí (77). Testovány jsou různé imunoterapeutické přístupy vedoucí k rozvoji reakce štěpu proti nádoru po autologní TKD. Interferony, cyclosporin A (CsA) a jejich kombinace (78), IL-2 (79), aktivace LAK buněk pomocí IL-2 (80) či aktivace autologního štěpu IL-2 následovaná IL-2 terapií byly již zmíněny (28, 81, 82). Cílem těchto přístupů je demonstrovat GVHD, která je spojena s reakcí štěpu proti nádoru. Autologní GVHD reakce indukovaná CsA může být zesílena přidáním interferonů (účinek IFN gama je větší než IFN alfa), které regulují expresi antigenů II. třídy hlavního histokompatibilního (HLA) systému (83). Kultivace štěpu s IL-2 může být rovněž užitečná pro ex vivo čištění štěpu (84, 85). Indukce protinádorových cytotoxických efektorů užitím IL-2 je pravděpodobně univerzální nespecifickou cytotoxickou reakcí, protože IL-2 pravděpodobně aktivuje cytotoxické efektorové buňky nezávisle na HLA systému (85). Preklinické testy neprokazují žádné nežádoucí působení aktivovaných NK buněk na hematopoetické kmenové buňky a malý nebo žádný inhibiční efekt IL-2 na kmenové buňky a ostatní progenitory (86).

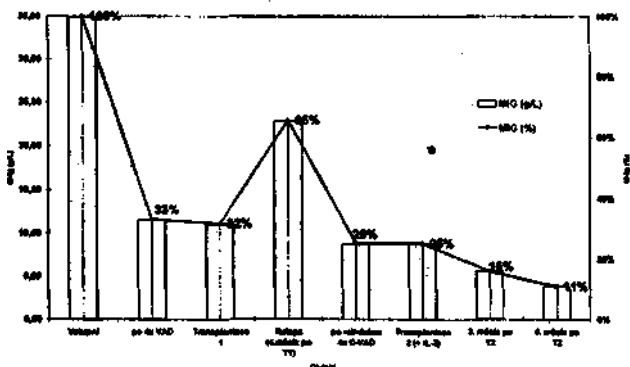
V našich ex vivo experimentech užívajících MM periferní kmenové buňky kultivované s 6000 IU IL-2/ml po 24 hodin v médiu bez séra, jsme pozorovali, ve shodě s jinými autory, nesignifikanční pokles CFU-GM i CD34+ buněk za prvních 24 hodin ve srovnání s kultivovaným štěpem bez IL-2 (tabulka 1). Klinická studie probíhá. V současnosti dostali aktivovaný štěp s následnou měsíční kombinovanou imunoterapií (IL-2/GM-CSF) dva nemocní. K přihojení štěpu došlo do 14

Tabulka 1: Preklinické výsledky kultivace štěpu s IL-2 zaměřené na ověření bezpečnosti kultivace u nemocných s mnohočetným myelomem.

Medián (n = 5)	Mo+Ly/kg ($\times 10^6$)	CD34+/kg ($\times 10^6$)	CFU-GM ($\times 10^6$)	Viabilita buněk
Před aktivací IL-2 (rozptyl)	1.54 (0.49-1.63)	8.80 (5.34-11.01)	14.20 (13.48-26.68)	85% (80-90)
Po aktivaci IL-2 (rozptyl)	0.66P (0.26-0.70)	7.44 (2.87-14.11)	12.21 (9.50-36.37)	95% (95-100)
Návratnost	43%	85%	86%	-

P = p < 0.05, Mo+Ly - monocyty + lymfocyty

Graf 1: Dynamika monoklonálního paraproteinu u nemocné od zahájení léčby po použití IL-2 aktivovaného štetu při druhé autologní transplantaci a následném sledování.



dnů u obou nemocných. Rovněž následná imunoterapie byla velmi dobře tolerovaná. Vznik autologní reakce štetu proti myelomu jsme nepozorovali. Graf 1 ukazuje dynamiku monoklonálního paraproteinu v průběhu času u nemocné, která tuto léčbu absolvovala při druhé autologní transplantaci při léčbě prvního relapsu.

Autologní GVHD reakce u pacientů s MM je reprodukovatelná užitím CsA (87) nebo CsA s Interferonem gama (88) nebo užitím IL-2 aktivovaným štetem následovaným infúzí IL-2 (89). Otázka vlivu na dlouhodobé přežití pacientů a období bez relapsu choroby zůstává otevřena. Dnes se zdá, že k vytvoření účinné autologní reakce štetu proti nádoru s přiměřenou toxicitou by mohlo přispět vhodné začlenění dendritických

buněk, protože prezentace nádorového antigenu se zdá klíčová pro účinnost imunokompetentních buněk.

Závěr

Imunoterapie je velmi perspektivní disciplínou, jejíž preklinické výsledky se stále častěji dostávají do klinické experimentální medicíny s cílem zlepšení prognózy nemocných s nádorovým onemocněním. Do této doby byla jen infúze dárčových lymfocytů schopna navodit významnou léčebnou odpověď u nemocných s MM, relabujících po alogenní transplantaci. Výsledky ukazují, že GV M reakce může někdy probíhat nezávisle na GVHD. Využití GV M reakce může přispět k redukci relapsu po alogenní transplantaci u MM. Jedná se o ojedinělý příklad účinné imunoterapie s demonstratelnou klinickou odpovědí limitovanou na malý počet pacientů. Bohužel nejsme stále schopni přenést obvykle slibné výsledky in vitro do výsledků in vivo měřené EFS nebo dlouhodobým přežitím u jiných typů imunoterapie. Současný klinický výzkum postrádá i dobrý klinický model pro testování nových terapeutických přístupů. Nové typy imunoterapie jsou stále klinicky zkoušené u nemocných s pokročilými malignitami a minimální prognózou. Takový přístup již obvykle není schopen demonstrovat jakoukoliv odpověď či výhodu imunoterapie. Zbytková nádorová choroba by mohla být optimálním polem pro různé typy imunoterapie. Nové terapeutické možnosti, jako jsou vakcíny užívající antigen-předkládající dendritické buňky, jsou dnes zkoušené ve fázi I/II klinických studií. Tyto nové typy imunoterapie by mohly zlepšit současné kontroverzní postavení imunoterapie u MM.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 4253-2 a grantem MSMT JD 7/98 14110003

Literatura

- Adam Z., Vorlíček J., Hájek R. et al.: Pokroky v léčbě mnohočetného myelomu, 1999, Opuscula Haematologica, Masaryk University Brno, v tisku.
- Attal M., Payen C., Facon T. et al.: Single versus double transplant in myeloma: A randomized trial of the Inter Groupe Français du Myelome (IFM), Blood 1997, 90,10 (suppl. 1), pg. 418a (abstr.1859).
- Nishimoto N., Shima Y., Yoshizaki K. and Kishimoto T.: Myeloma biology and therapy: present status and future developments. Hematology/Oncology Clinics of North America 1997; 11:159-172.
- Klein B., Bataille R.: Cytokine network in multiple myeloma 1997. Hematology/Oncology Clinics of North America 1997; 11:273-284.
- Munshi N. C.: Immunoregulatory mechanisms in multiple myeloma. Hematology/Oncology Clinics of North America 1997; 11:51-69.
- Browman G. P., Rubin S., Walker I. et al.: Interferon-alpha-2b (IFN) maintenance therapy prolongs progression-free and overall survival in plasma cell myeloma (PMC): Results of a randomized trial. Proc Am Soc Clin Oncol 1994; 13:408 (abstr. 1391).
- Ludwig H., Cohen A. M., Polliac A., et al.: Interferon alpha for induction and maintenance in multiple myeloma: Results of two multicenter randomized trials and summary of other studies. Ann Oncol 1995; 6:467-476.
- Mandelli F., Avvisati G., Amadori S. et al.: Maintenance treatment with recombinant interferon alfa-2b in patients with multiple myeloma responding to conventional induction chemotherapy. N Engl J Med 1990; 322 (20): 1430-1434.
- McSweeney E. N., Tobias J. S., Blackmail G. et al.: Double hemibody irradiation (DHB) in the management of relapsed and primary chemoresistant multiple myeloma. Clin Oncol 1993; 5: 378-383.
- Peest D., Deicher H., Coldewey R. et al.: Induction and maintenance therapy in multiple myeloma: a multicenter trial of MP versus VCM P. Eur J Cancer Clin Oncol 1988; 24,6: 1061-1067.
- Salmon S. E., Crowley J. J., Grogan T. M. et al.: Combination chemotherapy, glucocorticoids, and interferon alpha in the treatment of multiple myeloma: a South-West Oncology Group study. J Clin Oncol 1994; 12,11:2405-2414.
- Westin J.: Interferon therapy during the plateau phase of multiple myeloma: an update of a Swedish multicenter study. Semin Oncol 1991; 18,5 (Suppl 7): 37-40.
- Cunningham D., Powles R., Malpas J. S. et al. A randomized trial of maintenance therapy with Intron-A following high dose melphalan and ABMT in myeloma. Proc Am Soc Clin Oncol 1993; 12:364 (abstr.1232).
- Cunningham D., Powles R., Malpas J. et al.: A randomized trial of maintenance interferon following high dose chemotherapy in multiple myeloma: long-term follow-up results. Brit J Haematol 1998; 102,495-502.
- Wheatley K.: Oxford Meta Analysis on Interferon. VI. Int. workshop on Multiple Myeloma 1997, Boston, Syllabus (abstr.).
- Hájek R., Adam Z., Ščudla Z. et al.: Report of the randomized trial „4 W“ of Czech

- Myeloma Group: Maintenance therapy with interferon alpha-2B monotherapy or sequential maintenance therapy IFN and Dexamethasone after high dose Melphalan and PBSC support in patients with multiple myeloma, J Clin Oncol 1998, 17,(abstr.100).
- Palumbo A., Bruno B., Boccadoro M. and Pileri A.: Interferon- in Multiple Myeloma. Leukemia and Lymphoma 1995; 18:215-219.
- Portier M., Zhang X.-G., Caron E., Lu Z.-Y., Bataille R. and Klein B.: Interferon in multiple myeloma: Inhibition of interleukin-6 (IL-6)- dependent myeloma cell growth and downregulation of IL-6-receptor expression in vitro. Blood 1993; 81, 11:3076-3082.
- Quesada J. R., Alexanian R., Kurzrock R., Barlogie B., Saks S., Gutterman J. U.: Recombinant interferon gamma in hairy cell leukemia, multiple myeloma, and Waldenstrom's macroglobulinemia. Am J Hematol 1988; 29,1:183-187.
- BUkowski R. M., McLain D., Finke J.: Clinical pharmacokinetics of interleukin 1, Interleukin 2, Interleukin 4, Tumor Necrosis factor, and Macrophage colony-Stimulating Factor. In: Cancer Chemotherapy and Biotherapy, sec. ed. by Chabner B. A. and Longo D. L., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996; 609-638.
- Taylor C. W., Grogan T. M. and Salmon S. E.: Effect of interleukin-4 on the in vitro growth of human lymphoid and plasma cell neoplasms. Blood 1990; 75: 1114-1118.
- Vesole D., Kornbluth J., Jagannath S., Sznol M. et al.: Biological response modifiers (BRM) in refractory multiple myeloma (MM): Lack of clinical efficacy of recombinant human interleukin-4 and ALL-trans retinoic acid (ATRA). Blood 1996; 88,10 (Suppl. 1): 263a (abstr. 1037).
- Battaglio S., Napoli P., Beggato E., Borriore P. et al.: Development of vaccines against autologous tumor-derived idiotype in human myeloma: rationale and preparation. Minerva Biotech 1996; 8:1.
- Bohlen H., Titzer S., Christensen O., Mancke O. et al.: Dendritic cell based idiotype vaccination in multiple myeloma. Blood 1997; 90,10 (Suppl. 1): 579a (abstr. 2577).
- Lum L. G., Treisman J., Taylor R. F., LeFever A.: Phase I/n trial of activated T cells (ATC), IL-2 and GM-CSF after PBSC transplant for stage IIIB or IV breast cancer. Blood 1997; 90,10 (Suppl. 1-part 2 of 2), 381b (abstr. 4462).
- Munshi N. C., Ding L. M., Dahe Lu., Kornbluth J., Naugler S., Mahavi D. and Srivastava A.: GM-CSF transduction of the tumor cells provides lasting immune response in multiple myeloma. Blood 1996; 88,10 (Suppl. 1): 585a (abstr. 2330).
- Grimm E. A., Mazumder A., Zhang H. Z. and Rosenberg S. A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral lymphocytes. J Exp Med 1982; 155: 1823-1841.
- Verma U. N., Charak B., Rajagopal Ch. and Mazumder A.: Interleukin-2 in bone marrow transplantation. In: Buckner C.D. Technical and biological component of marrow transplantation. Kluwer Ac. Publ., Boston 1995; 315-336.

29. Fefer A., Benyunes M. C.: Interleukin-2 as consolidative immunotherapy after clinical autologous bone marrow transplantation, in Spitzer T, Mazumder A (eds.): Immunotherapy and bone marrow transplantation. Armonk N/Y, Futura 1995; 101-121.
30. Peest D., Leo R., Bloche S. et al.: Low-dose recombinant interleukin-2 therapy in advanced multiple myeloma. *Brit J Hematol* 1995; 89:328-337.
31. Gottlieb D. J., Prentice H. G., Metha A. B. et al.: Recombinant interleukin IL-2 in the treatment of multiple myeloma. *Br J Haematol* 1989; 189 (abstr).
32. Robinson N., Benyunes M. C., Thompson J. A., et al.: Interleukin-2 after autologous stem cell transplantation for hematological malignancy: a phase I/II study. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19:435-442.
33. Morecki S., Revel-Vilk S., Nabet C. et al.: Immunological evaluation of patients with hematological malignancies receiving ambulatory cytokine-mediated immunotherapy with recombinant human interferon- α 2a and interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother* 1992; 35,401.
34. Nagler A., Ackerstein A., Naparstek R. O. E. and Slavin S.: Immunotherapy with recombinant human interleukin-2 and recombinant interferon- α in lymphoma patients postautologous marrow or stem cell transplantation. *Blood* 1997; 89, 11:3951-3959.
35. Belch A. R., Eisenhauer E. A., Muldal A. et al.: Phase II study of subcutaneous rHu-interleukin-2 and rHu-interferon α -2a in previously treated patients with multiple myeloma. *Ann Oncol* 1995; 6 (7): 721 - 723.
36. Hussein M. A., Snyder J., Rayman P., Mc Lain D. A. et al.: The effect of IL-2 maintenance (Mn) therapy (TX) in on duration of the plateau phase in responding multiple myeloma (MM) patients (PTS): *Blood* 1997; 90,10(Suppl.1): 307b (abstr. 4132).
37. Miller I. S., Tesmer-Tuck J., Pierson B. A., Weisdorf D. et al.: Subcutaneous IL-2 after autologous BMT expands NK in vivo but requires ex vivo high dose IL-2 for maximal activation. *Blood* 1996; 88,10, (Suppl.1): 609a (abstr. 2426).
38. LopeZJimenez J., Perez-Oteyza J., Munoz A., Parra C., Villalon L. et al.: Subcutaneous versus intravenous low-dose IL-2 therapy after autologous transplantation: results of a prospective, non-randomized study. *Bone Marrow Transplant* 1997;19:429-434.
39. Klein B.: Cytokine, cytokine receptors, transduction signals and oncogenes in human multiple myeloma. *Semin Oncol* 1995; 32,1:4-19.
40. Bataille R., Barlogie B., Yang Z. et al.: Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* 1995; 86,2:685-691.
41. Klein B., Wijdenes J., Zhang X. - G. et al.: Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for patients with plasma cell leukemia. *Blood* 1991; 78:1198-1242 Tamura T., Udagawa N., Takashashi N., Miyaura C. et al.: Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11924.
42. Tamura T., Udagawa N., Takashashi N., Miyaura C. et al.: Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11924.
43. Young R. I., Ranson M., Chang, Lodr B. et al.: Phase II trial of rHuIL-6 prior to and concurrently with VAD chemotherapy for patients with multiple myeloma. *Europ J Cancer* 1997;33,2: 307-311.
44. Goldmacher V. S., Bourret L. A., Levine B. A., Rasmussen R. A. et al.: Anti-CD38-blocked ricin: an immunotoxin for the treatment of multiple myeloma. *Blood* 1994; 84(9): 3017-3025.
45. Huang Y. -W., Richardson J. A. and Vitetta E.: Anti- CD54 (ICAM-1) has anti-tumor activity in SCID mice with human myeloma cells. *Cancer Res* 1995; 55: 610-616.
46. Ozaki S., Kosaka M., Wakatsuki S. et al.: Immunotherapy of multiple myeloma with monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24. *Blood* 1997; 90: 3179-3186.
47. Kornbluth J., Sneed T., Page R. et al.: Effective treatment of established human myeloma tumors in SCID mice with human natural killer cells and interleukins (IL-2 and IL-4). *Blood* 1993; 82:263a.
48. Shimazaki C., Atzpodien J., Wisniewski D. et al.: Cell-mediated toxicity of interleukin-2 activated lymphocytes against autologous and allogeneic human myeloma cells. *Acta Haematol* 1988; 80:203.
49. Rosenberg S. A., Lotze M. T., Mui L. M. et al.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in patients with metastatic cancer. *N Eng J Med* 1985; 313:1486-1492.
50. Rosenberg S. A., Lotze M. T., Yang J. C. 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.
51. TogaWa A., Sawada S., Amano M. et al.: Treatment of multiple myeloma with L A K cells plus interleukin 2 or interleukin 2. *SO-Rinsho Ketsueki* 1989; 30:650-658.
52. Miller J. S., Klingsporn S., Lund J., Pely E. H., Verfaillie C., McGlave P.: Large scale ex vivo expansion and activation of human natural killer cells for autologous therapy. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14:555- 562.
53. Aguila H. L., Weissman I.: Hematopoietic stem cells are not direct cytotoxic targets of natural killer cells. *Blood* 1996; 87,4:1225-1231.
53. Yi Q., Osterborg A., Bergenbrant S. et al.: Idiotype-reactive T-cell subsets and tumor load in monoclonal gammopathies. *Blood* 1995; 86,8:3043-3049.
54. Massaia M., Attisano C., Peola S., Montacchini I. et al.: Rapid generation of anti-plasma cell activity in the bone marrow of myeloma patients by CD3 cross-linking. *Blood* 1993; 82: 1787-1797.
55. Attisano C., Bianchi A., Montacchini L., Carlesso N. et al.: Generation of anti-tumor activity by OKT3 - stimulation in multiple myeloma: in vitro inhibition of autologous haematopoiesis. *Brit J Haematol* 1994; 87 (3): 494-502.
56. Borriane P., Montacchini L., Beggiato E., Pileri A. et al.: Clinical and immunological studies in advanced cancer patients sequentially treated with anti CD3 monoclonal antibody (OKT3) and interleukin-2. *Leukemia & Lymphoma* 1996; 21(3-4): 325-30.
57. Lum L. G., LeFever A. V., Treisman J., Garlie N. et al.: Phase I study of anti-CD3/antiCD28 coactivated T cells (COATS) in cancer patients: enhanced TH1 responses in vivo. *Experimental Hematology* 1998,25,8, s.772 (abstr 324).
58. Kwak L. W., Taub D. D., Duffey P. L., Bensinger W. I. et al.: Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunized marrow donor. *Lancet* 1995; 345: 1016-1020.
59. Kwak L. W., Sternas L. A., Jagannath S., Siegel D., Munshi N. C. and Barlogie B.: T-cell responses elicited by immunization of multiple myeloma patients with idiotype M - protein plus G M - CSF in remission after autologous transplantation. *Blood* 1997; 90, 10(Suppl.1): 579a (abstr. 2576).
60. Reichardt V., Okada C., Benike C., Long G. et al.: Idiotype vaccination using dendritic cells for multiple myeloma patients after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 1996; 88,10 (Suppl. 1): 481a (abstr. 1913).
61. Massaia M., Mariáni S., Battaglio S., Beggiato E. et al.: Idiotype reactive T cells. VI Int. Workshop Multiple Myeloma Boston 1997; Syllabus (abstr).
62. Stevenson F. K.: DNA vaccines against B-cells tumors. VI. Int. Workshop on Multiple Myeloma Boston 1997; Syllabus (abstract).
63. Bender A., Sapp M., Schuler G., Steinman R. M. and Bhardwaj N.: *J. Immunol. Methods* 1996,121-135.
64. Girolomoni G., Ricciardi-Castagnoli P.: Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunology Today* 1997; 104,3:18.
65. Pfeiffer S., Samson D., Apperley J. and Gooding R.: Ex vivo generation and function of dendritic cells in multiple myeloma. *Blood* 1996; 88, 10 (Suppl. 1): 392a (abstr. 1556).
66. Bensinger W. I.: Prognostic factors for outcomes after allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. VI Int. Workshop on Multiple Myeloma, Boston 1997; USA (abstr).
67. Björkstrand B., Ljungman P., Svensson H. et al.: Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: A retrospective case-matched study from The European Group for Blood and marrow Transplantation. *Blood* 1996; 88:4711-4719.
68. Tricot G., Vesole D. H., Jagannath S. et al.: Graft-versus-myeloma-effect: Proof and principle. *Blood* 1996; 87:1196-1197.
69. Verdonck L. F., Lokhorst H. M., Dekker A. W., Nieuwenhuis H. K., Petersen E. J.: Graft-versus-myeloma effect in two cases. *Lancet* 1996; 3,348 (9023): 346.
70. Bertz H., Burger J. A., Kunzmann R., Mertelsmann R. and Finke J.: Adoptive immunotherapy for relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation (BMT): evidence for a graft-versus-myeloma effect. *Leukemia* 1997; 11(2): 281-283.
71. Alyea E. P., Schlossman R. L., Canning C., Collins H. et al.: CD-8 depleted donor lymphocyte infusion mediate graft-versus multiple myeloma effect. *Blood* 1996, 88,10 (Suppl.1): 258a (abstr. 1021).
72. Lokhorst H. M., Schattenberg A., Cornelissen J. et al.: Successful induction of graft-versus-myeloma by donor leukocyte infusion in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation. VI Int. Workshop of Multiple Myeloma, Boston 1997; Syllabus (abstr).
73. Kolb H. J., Menzel H., Holler E., Verdonck D. et al.: Donor cell transfusion for the treatment of recurrent leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1997; 90,10(Suppl. 1): 46a (abstr. 2434).
74. Munchi N. C., Govindarajan R., Drake R. et al.: Thymidine Kinase (TK) gene-transduced human lymphocytes can be highly purified, remains fully functional, and are killed efficiently with ganciclovir. *Blood* 1997; 89,4:1334 -1340.
75. Slavin S., Naparstek E., Nagler A., Ackerstein A. et al.: Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87, 6:2195-2204.
76. Nagler A., Ackerstein A., Naparstek R. O. E., Kapelushnik J. and Slavin S.: Implications of donor lymphocyte infusion (DLI) on acute graft versus host disease (GVHD) tolerance in patients in relapse vs remission post matched allogeneic bone marrow transplantation (BMT). *Blood* 1997; 90, 10(Suppl.1): 383b (abstr. 4470).
77. Byrne J., Iqbal A., Davis J., Haynes A. P. and Russell N. H.: Autologous GVHD following PBSCT, with evidence for a graft versus myeloma effect. *Brit J Hematol* 1997; 97(Suppl. 1): 398 (abstr 143).
78. 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; 59-69.
79. Massamoto C., Benyunes M. C. et al.: Close stimulation of acute graft-versus host disease by interleukin-2 administered after autologous bone marrow transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 351-356.
80. Benyunes M. C., Higuchi C., York A., Lindgren C. et al.: Immunotherapy with interleukin 2 with or without lymphokine-activated killer cells after autologous bone marrow transplantation for malignant lymphoma: a feasibility trial. *Bone Marrow Transplant* 1995; 16 (2): 283-288.
81. 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.
82. Klingemann H. G., Eaves C. J., Barnett M. J. 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.
83. Vogelsang G. B., Hess A. D., Altomonte V., Bitton R. et al.: Interferons augmentation of autologous graft versus host disease (GVHD). *Blood* 1996; 88,10 (Suppl. 1): 129a (abstr. 504).
84. Margolin K. A., Wright C. and Forman S. J.: Autologous bone marrow purging by in situ IL-2 activation of endogenous killer cells. *Leukemia* 1997; 9:723-728.
85. Verma U. N., Areman A., Dickerson S. A. et al.: Interleukin-2 activation of chemotherapy and growth factor-mobilized peripheral blood stem cells for generation of cytotoxic effectors. *Bone Marrow Transplant* 1995,15,199-206.
86. Aguila H. L., Weissman I.: Hematopoietic stem cell are not direct cytotoxic targets of natural killer cells. *Blood* 1996,87,4:1225-1231.
87. Giral S., Weber D., Colome M., Dimopoulos M. et al.: Phase trial of cyclosporine-induced autologous graft-versus-host disease in patients with multiple myeloma undergoing high-dose chemotherapy with autologous stem-cell rescue. *J Clin Oncol* 1997; 15(2): 667-73.
88. Giral S., Weber D., Colome M. et al.: Induction of autologous graft-versus-host-disease in patients with myeloma undergoing high-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue. VI Int. Workshop of Multiple Myeloma, Boston 1997; (abstr 6-11).
89. Meehan 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.

NEJČASTĚJŠÍ CHROMOZOMÁLNÍ PŘESTAVBY U DĚTÍ S AKUTNÍ MYELOIDNÍ LEUKÉMIÍ A MOŽNOSTI JEJICH SLEDOVÁNÍ NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI

THE MOST FREQUENT CHROMOSOMAL ABERRATIONS IN CHILDREN WITH ACUTE MYELOID LEUKEMIA FOLLOW-UP AT THE MOLECULAR LEVEL

MICHÁLEK J.¹, ŠMARD A J.², ŠEVČÍKOVÁ S.², HRSTKOVÁ H.¹

¹ DĚTSKÁ INTERNÍ A ONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

² KATEDRA GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO

Souhrn: U osmdesáti procent dětí s akutní myeloidní leukémií (AML) lze cytogeneticky nalézt klonální chromozomální abe-
race. Mezi nejčastější patří specifické přestavby, úzce spjaté s určitým podtypem AML: translokace t(8;21) u M2, transloka-
ce t(15;17) u M3, inverze inv(16) u M4eo a translokace zahrnující oblast 11q23 u M4 a M5 podtypu AML dle FAB klasifika-
ce. Tyto čtyři specifické přestavby, které se dohromady vyskytují u 40-45% dětí s AML, lze také detekovat na molekulární
úrovni s vysokou citlivostí pohybující se na úrovni zachytu 1 leukemické buňky nesoucí specifickou přestavbu mezi 10³-10⁶
zdravými buňkami. S využitím molekulárně genetického vyšetření lze pacienty s AML nesoucí některou z přestaveb sledo-
vat dlouhodobě s možností monitorování reziduální nemoci při poklesu množství leukemických buněk pod hladinu deteko-
vatelnosti klasickým morfologickým a cytogenetickým vyšetřením.

Klíčová slova: akutní myeloidní leukémie u dětí, chromozomální přestavba, PCR

Summary: Eighty percent of children with acute myeloid leukemia (AML) show clonal chromosomal aberrations on
cytogenetic examination. The most frequent aberrations recognized in AML are: t(8;21) in M2, t(15;17) in M3, inv(16) in M4eo
and 11q23 translocation in M4 or M5 subtypes of AML according to FAB classification. The above-mentioned aberrations
comprise 40-45% of all AML cases in children. Recently, a molecular genetic examination of these specific genetic changes
allowing detection of 1 leukemic cell per 10³-10⁶ normal cells has been worked out. Using this approach, long-term monitoring
of residual disease has become possible, although the mass of leukemic cells has dropped far below the detection level of
morphologic and cytogenetic examination.

Key words: acute myeloid leukemia in children, chromosomal aberration, PCR.

Seznam zkratk: AML - akutní myeloidní leukémie, ALL - akutní lymfoblastická leukémie, CSF - kolonie stimulující fak-
tor, FAB - francouzsko-americko-britská (klasifikace), MRN - minimální reziduální nemoc, PCR - polymerázová řetězová
reakce

Úvod

Vznik leukémie je provázen nenáhodnými genetickými změnami, které představují porušení normální struktury a funkce genů zodpovědných za udržení rovnováhy mezi proliferací a diferenciací hematopoetických buněk (1). Genetické přestavby jsou specifické pro jednotlivé typy leukémií a fenotyp nádorové buňky je jimi podmíněn. Z historického pohledu byla většina těchto přestaveb popsána a charakterizována na úrovni chromozomů při pečlivé cytogenetické analýze. V současné době lze tyto přestavby charakterizovat na molekulární úrovni a odhalit tak aktivaci onkogenů a inaktivaci tumor-supresorových genů zapojených do procesu leukemogeneze (1,2). Klonální chromozomální přestavby jsou nalézány téměř u 80% dětí i dospělých s akutní myeloidní leukémií (AML) diagnostikovanou *de novo* (2,3). Úspěšnost cytogenetického vyšetření se pohybuje kolem 85% (viz tab. 1) a lze ji zvýšit využitím metody fluorescenční in situ hybridizace (2,9). Mezi nejčastější chromozomální přestavby patří translokace t(8;21), t(15;17), inverze inv(16) a translokace zahrnující oblast 11q23. Tyto přestavby jsou cytogeneticky nalézány u 40-45% dětských (3-5) a 30-35% dospělých (1,5) pacientů s AML a úzce korelují s určitou podskupinou AML podle FAB

(French-American-British) klasifikace (6). Podle velké studie cytogenetických nálezů u 2755 hodnotitelných pacientů s AML (5) se translokace t(15;17) vyskytuje pouze u podskupiny AML M3, translokace t(8;21) se z 91% vyskytuje u AML M2, inverze inv(16) se z 86% vyskytuje u AML M4eo a translokace zahrnující oblast 11q23 se z 83% vyskytuje u AML M4 nebo M5. Nejčastějším typem translokace zahrnující oblast 11q23 u AML je t(9;11), která se z 82% vyskytuje u podskupiny AML M5. Přehled nejčastějších specifických přestaveb u dětských i dospělých pacientů s AML uvádí tab. 1. Kromě těchto přestaveb úzce souvisejících s určitou podskupinou AML dle FAB klasifikace se také často setkáváme se ztrátou části nebo celého chromozómu (-7, -7q, -5q, -Y) nebo naopak s trisomií některých chromozomů (+8, +21, +22). Tyto chromozomální aberace však nejsou specifické pro jednotlivé podskupiny AML (5,7) a nejsou v tomto přehledu dále diskutovány.

Rozvoj molekulární biologie umožnil klonování a sekvenování genů poškozených nebo změněných translokací a poskytl nové možnosti pro diagnostiku a sledování pacientů. Zejména rychlá, přesná a vysoce citlivá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) našla značné uplatnění v hemato-onkolo-

Tab. 1: Výskyt specifických chromozomálních přestavb diagnostikovaných cytogenetiky u dětských a dospělých pacientů s A M L.

2	Děti s A M L					Dospělí s A M L			
Zdroj	Kalwinsky 1990	Creutzig 1995	Martinez-Climent 1995	Leblanc 1997	Rubini 1998	Mitelman 1992	Marosi 1992	Ferrant 1997	Grimwade 1998*
Číslo citace	3	21	4	51	43	5	57	56	20
Úspěšnost vyšetření** (%)	78	75	96	88	N	N	N	93	82
Počet pacientů*	121	147	115	220	N	2755	125	927	1612
Normální karyotyp (%)	20	20	15	28	21	N	28	N	42
t(8;21) (%)	12	17	8	16	12	13	6	10	8
t(15;17) (%)	7	3	10	4	7	12	10	9	12
inv(16) (%)	12	8	8	9	12	9	7	5	3
t 11q23** (%)	13	17	18	17	N	8	6	4	4
t(9;11) (%)	7	12	9	7	7	2	N	N	N
jiné chromoz. přestavby (%)	36	35	41	26	41	N	41	N	31

N údaj neuveden

* soubor zahrnuje dospělé i děti s A M L

** úspěšnost cytogenetického vyšetření v procentech

* počet pacientů s cytogeneticky hodnotitelným nálezem

* * t 11 q23 představuje všechny pacienty s nálezem této přestavby včetně pacientů s t (9; 11)

gii (1). V současné době je tato metoda nedílnou součástí vyšetření dětských pacientů s A M L vedle vyšetření morfolo- gického, cytogenetického a imunofenotypizačního. Metoda PCR se používá k detekci specifických chromozomálních pře- stavb u A M L (8). Rozšiřuje tak možnosti vyšetření specifi- ckých genových přestavb tam, kde chromozomální změny jsou tak nepatrné, že cytogenetickým vyšetřením jsou jen obtížné nebo zcela nerozpoznatelné.

Předpokládá se, že v době stanovení diagnózy A M L je v orga- nismu přítomno řádově 10^{12} leukemických buněk (9). Klasic- kým morfolo- gickým a cytogenetickým vyšetřením lze rozpo- znat 1 leukemickou buňku mezi řádově 10^2 zdravými buňka- mi. Poklesne-li v průběhu léčby počet leukemických buněk pod tuto hranici, tedy řádově pod 10^{10} , hovoříme na základě morfolo- gického vyšetření o remisi a vývoj onemocnění nelze tímto způsobem dále sledovat. Na tomto místě se může velmi dobře uplatnit vyšetření metodou PCR, kdy lze teoreticky zachytit ve vyšetřovaném materiálu jedinou leukemickou buň- ku nesoucí specifickou přestavbu. Prakticky se citlivost meto- dy PCR pohybuje v rozmezí zachytu 1 leukemické buňky mezi 10^3 - 10^6 zdravými buňkami (8-10). Tato metoda přispívá nejen k upřesnění diagnózy, ale zejména ke sledování tzv. mini- mální residuální nemoci (MRN) u pacientů po dosažení kli- nické remise onemocnění v průběhu další léčby. Pojem M R N označuje zbytkovou populaci leukemických buněk, kterou nelze zachytit klasickými morfolo- gickými metodami. Pokud dojde k relapsu onemocnění, lze jej detekovat na molekulární úrovni zpravidla o několik měsíců dříve, než dojde ke klinic- ké manifestaci a lze jej diagnostikovat klasickým morfolo- gickým vyšetřením kostní dřeně (1,8-10). V současné době nabý- vá také na významu sledování M R N metodou multiparame- trické imunofenotypizace průtokovým cytometrem, kde citli- vost detekce leukemických buněk, které však musí exprimovat specifickou kombinaci CD znaků, se pohybuje v rozmezí 1 leukemické buňky mezi 10^4 - 10^5 zdravými buňkami. Bližší informace, které lze nalézt např. v citacích (9-12), však pře- sahují rozsah tohoto článku.

Nejčastější specifické přestavby u A M L v dětském věku

Translokace t(8;21)

Při translokaci t (8;21)(q22;q22) dochází k fúzi genu ETO (MTG8) lokalizovaném na chromozomu 8 s genem A M L 1 na

chromozomu 21. Chimérický gen A M L 1 / E T O dává vznik nové RNA, kterou lze detekovat metodou reverzně-trans- kripční (RT)-PCR (8).

Gen A M L 1 za fyziologických okolností reguluje expresi něko- lika genů specifických pro jednotlivé linie hematopoetických prekurzorů: genu myeloperoxidázy, leukocytární elastázy, receptoru makrofágového kolonie-stimulujícího faktoru (M- CSF)(=colony-stimulating factor), granulocytárního-makro- fágového CSF a genů T-lymfocytárních receptoru (13). Je rov- něž nezbytný v procesu normální krve- tvorby v průběhu fetál- ního vývoje (14). Gen A M L 1 může fúzovat s dalšími geny, jako je tomu v případě poměrně vzácné translokace t (3;21)(q26;q22), která se vyskytuje u sekundární A M L a mye- lodysplastického syndromu (MDS) po léčbě cytostatiky a u některých pacientů v blastickém zvratu chronické myelo- idní leukemie, kdy vzniká fúzní gen A M L 1 / Evi- 1 (15). Dal- ším případem zapojení genu A M L 1 do leukemogeneze je trans- lokace t(12;21), nalézáná u 25% dětí s B-prekurzorovou akut- ní lymfoblastickou leukemií (ALL), kdy vzniká fúzní gen T E L / A M L 1 (16). A M L 1 tak představuje gen, který je vůbec nejčastěji zapojen do procesu leukemogeneze (13-18). Uka- zuje se, že v případě t(8;21), je jeho fyziologická funkce, kte- rou sehrává v procesu diferenciaci myeloidních buněk, domi- nantně potlačena fúzním genem A M L 1 / E T O (17). V kostní dřeni pacientů s A M L M2t(8;21) je nalézána významně vyš- ší hladina exprese receptoru pro M- CSF, stejně jako v přípa- dě buněčné linie Kasumi- 1, vyznačující se rovněž touto trans- lokací (18). Signál přenášený receptorem pro M- CSF způso- bí zapojení cyklinů D a E, což vede k přechodu buněk do G1/S fáze a stimuluje tak buněčnou proliferaci. Stimulace exprese receptoru pro M- CSF prostřednictvím A M L 1 / E T O tak může být jedním z faktorů podílejících se na leukemoge- nezi u pacientů s A M L (19).

Translokace t(8;21)(q22;q22) je jednou z nejčastějších chro- mozomálních přestavb specifických pro A M L. U dětí je spo- jována s dobrou prognózou s více než 80% dosažením remi- se a s 5-letým intervalem přežití bez známek nemoci nad 50% (20,21). Vyskytuje se u podtypu A M L M2, charakteristickým rysem je přítomnost Auerových tyčí v myeloblastech, silná pozitivita myeloperoxidázy a častá pozitivita CD13, CD15, CD33, CD34, CD65, HLA- DR a negativita CD11b, CD14 (21,22). Blasty mohou rovněž aberantně exprimovat CD19,

což je fyziologický znak B-lymfocytů (22). Ojedinele byla t(8;21) nalezena u A M L M1 a M4, byla popsána i u pacientů s myelodysplastickým syndromem a u dospělých pacientů v blastické fázi chronické myeloidní leukemie (5, 22). Podtyp A M L M2 tvoří 15-25% všech pacientů s A M L, přičemž 50-60% A M L M2 je t(8;21) pozitivních.

Metoda dvoukolové RT-PCR umožňuje detekci fúzního genu A M L 1/ETO a dlouhodobé sledování M R N u pacientů s translokací t(8;21) na úrovni citlivosti 1 leukemické buňky mezi 10^6 zdravými buňkami. Zpravidla však nedochází k úplné eradikaci fúzního genu po chemoterapii, ani po autologní či alogenní trasplantaci kostní dřeně, přestože pacienti jsou dlouhodobě v remisi bez známek aktivace leukemie (23,24). Při vyšetření fúzního genu A M L 1/ETO metodou kvantitativní RT-PCR je patrný pokles pozitivitu o 3-4 řády ve srovnání s vyšetřením při diagnóze. Gen A M L 1/ETO je však stále nalézán i po několika letech od zahájení léčby A M L v granulocytární-makrofágové, erytroidní a megakaryocytární linii prekurzorových buněk, což ukazuje na přítomnost A M L 1/ETO genu v pluripotentních progenitorových buňkách kostní dřeně se schopností diferenciace do všech tří buněčných hníz (24). Tento fenomén přetrvávání malého množství fúzního leukemogenního genu ve všech třech buněčných liniích v kostní dřeni dlouhodobě po léčbě u pacientů v klinické kompletní remisi A M L dosud nebyl uspokojivě vysvětlen (23-26). V případě relapsu A M L však dochází ke zvyšování positivity A M L 1/ETO mRNA, což lze dokumentovat na molekulární úrovni o několik měsíců dříve, než morfologicky a klinicky (25,26).

Translokace t(15;17)

Translokace t(15;17)(q22;q21) se vyskytuje výhradně u podtypu A M L M3, který je také nazýván akutní promyelocytární leukemií (APL). Jedná se o fúzi genu P M L na chromosomu 15q22 s genem R A R a na chromosomu 17q21. Tuto specifickou přestavbu lze v 70% případů diagnostikovat cytogeneticky a prakticky u všech pacientů s A P L metodou RT-PCR (27). A P L tvoří 5-15% všech A M L, jejím charakteristickým rysem je častá exprese CD13, CD33 a CD9, nízká exprese CD15, CD34, chybění HLA-D R a aberantní exprese CD2 (21,28). V nedávné době bylo podáno několik důkazů o klíčové roli receptoru kyseliny retinové (RAR) při myeloidní diferenciaci (29,30). Existují tři geny kódující receptory kyseliny retinové: RAR α , RAR β a RAR γ , přičemž především RAR α je exprimován v buňkách myeloidní řady. Produktem tohoto genu je jaderný protein RAR α , který vytváří heterodimer s retinoidovým receptorem X (RXR). Tento komplex je schopen po navázání all-trans retinové kyseliny (ATRA) stimulovat transkripci a vést k normální diferenciaci promyelocytů (31). V případě A P L s translokací t(15;17), kdy je gen RAR α fúzován s genem P M L pak vznikají aberantní proteiny P M L-RAR α a RAR α -P M L. Předpokládá se, že význam v leukemogenezi má chimérický protein P M L-RAR α , který vytěsňuje RAR α protein z jeho fyziologické funkce a dominantně negativním účinkem blokuje diferenciaci promyelocytů (32). Podání vysokých dávek ATRA lze tento patologický proces vést k leukemické proliferaci promyelocytů zvrátit. ATRA stimuluje tvorbu fyziologického proteinu RAR α , který pak kompetitivně převládá nad aberantním proteinem P M L-RAR α (33). Tímto způsobem lze dokonce navodit úplnou remisi A P L, bohužel pouze dočasně. Pacienti s A P L léčení pouze ATRA většinou do 1 roku relabují (34). V současné době má však použití ATRA své pevné místo v indukční léčbě A P L v kombinaci s intenzivní cytostatickou léčbou. Charakteristickým rysem A P L je časté a klinicky závažné krvácení, které je způsobeno uvolňováním aktivátorů plasmínogenu z promyelocytů. Riziko život ohrožujícího krvácení s rozvojem syndromu diseminované intravaskulární koagulace prudce narůstá po zahájení indukční cytostatické léčby spojené s masivním rozpadem leukemických buněk. Pokud je však současně podávána ATRA, riziko krvácení se minimalizuje (35,36).

Kombinovaná chemoterapie spojená s podáním retinové kyseliny v indukci vede k navození klinické remise u více než 90% pacientů s A P L (35,37). Další vývoj nemoci pak již nelze sledovat klasickými morfologickými metodami, přitom asi 30% dětských pacientů s A P L relabuje (21). Metoda kvantitativní dvoukolové RT-PCR prokázala schopnost sledovat M R N u pacientů s A P L (1,8). Existují však odlišnosti při sledování M R N podle nastavení citlivosti detekce specifického fúzního transkriptu P M L-RAR α . Většina autorů dosahovala citlivosti zachytu 1 leukemické buňky mezi 10^4 zdravými buňkami v kostní dřeni, s častějším nálezem vymizení leukemické populace v průběhu konsolidační léčby a v průběhu dlouhodobého sledování M R N. Pokud došlo k relapsu, bylo to často u pacientů M R N P M L-RAR α negativních (1,8,37,38). Naproti tomu studie, ve kterých se dařilo detekce 1 leukemické buňky mezi 10^6 zdravými buňkami, ať už přímo (39) nebo po inkubaci s Interferonem (40), zjistily častěji přetrvávání leukemického klonu nesoucího gen P M L-RAR α při dlouhodobém sledování M R N a méně často docházelo k relapsu u M R N P M L-RAR α negativních pacientů. U pacientů s M R N, kteří jsou pozitivní na P M L-RAR α , znamenalo zvyšování stupně positivity předzvěst relapsu, který se dostavil během několika měsíců. Pacienti s dlouhodobě nízkou pozitivitou P M L-RAR α byli dlouhodobě v remisi (39,40). Z uvedeného vyplývá, že důležitou roli při sledování M R N hraje kvantifikace použité PCR metody. V současné době se ukazuje, že určitá populace buněk nesoucích přestavbu P M L-RAR α může dlouhodobě perzistovat „vyléčeného“ pacienta s A P L v remisi, bez jakýchkoliv známek aktivace choroby (39), podobně jako je tomu u pacientů s t(8;21) A M L (23,24).

Kromě přestavby P M L-RAR α byly v současné době nalezeny další dvě přestavby u pacientů s A P L: translokace t(11;17) s fúzí genu P L Z F a RAR α (41) a translokace t(5;17) s fúzí genu nukleosfminu (NPM) a RAR α (42). Podání ATRA však na rozdíl od t(15;17) nevede u těchto pacientů k navození remise (19).

Inverze inv(16)

Inverze inv(16)(p13;q22) a příbuzná translokace t(16;16)(p13;q22) se vyskytuje u 12-15% dětí s A M L (43,44). Ukazuje se, že cytogeneticky jsou tyto přestavby obtížně diagnostikovatelné a lze je zjistit pouze v polovině případů, nejčastěji u podtypu A M L M4eo dle F A B klasifikace (definované jako alespoň 3% eosinofilů v kostní dřeni v době stanovení diagnózy). Všechny cytogeneticky pozitivní nálezy jsou prokazatelné na molekulární úrovni s použitím metody RT-PCR, kterou lze detekovat fúzní transkript C B F β -M Y H 11 vznikající na základě fúze genu C B F β na 16q22 s genem M Y H 11 na 16p13 (44-48). Navíc u zbývajících poloviny cytogeneticky negativních případů lze metodou RT-PCR rovněž detekovat fúzní transkript C B F β -M Y H 11, často u pacientů s jiným podtypem A M L než M4eo (45-47). Fúzní protein C B F β -M Y H 11 se váže na protein A M L 1 a vede k transformaci fibroblastů *in vitro* (43). Gen C B F β je podobně jako gen A M L 1 nezbytný pro normální fetální krevetvorbu (14). Protein C B F β zasahuje do funkce komplexu A M L 1-C B F β který za fyziologické situace funguje jako transkripční faktor potřebný pro normální myelopoezu. Tímto způsobem se C B F β -M Y H 11 zřejmě uplatňuje v procesu leukemogeneze, podobně jako A M L 1-ETO.

Přestavba inv(16) nebo t(16;16) je u dětí i dospělých s A M L spojena s dobrou prognózou. Po indukční cytostatické léčbě téměř všichni pacienti dosáhnou klinické remise, dlouhodobě přežití bez známek nemoci po cytostatické léčbě je zaznamenáno u více než 60% dětských pacientů. U 30% dochází k relapsu (20,45). Pomocí dvoukolové RT-PCR lze detekovat 4 různé chimérické transkripty C B F β -M Y H 11. Sledování M R N prokazovalo postupně se snižující PCR pozitivitu v průběhu léčby až na hranici detekovatelnosti touto metodou, tj. zachyt 1 leukemické buňky mezi 10^4 - 10^5 zdravými buňkami.

Při dlouhodobém sledování klesla hladina reziduálních leukemických buněk pod tuto hranici (1,46,49). Klinickému relapsu vždy předcházela nálezy zvyšující se PCR pozitivitu nebo u některých pacientů stále přetrvávaly hladiny leukemických buněk řádově $1 : 10^2$ - 10^3 (46-49).

Translokace týkající se oblasti 11q23

Přestavby zahrnující oblast chromozomu 11q23 byly detekovány u různých typů hematologických malignit. Postihují 7-10% pacientů s akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), kde se nejčastěji vyskytují translokace t(4;11) a t(11;19), 4-8% dospělých pacientů s AML *de novo* (1,5,20,50), 13-18% dětských pacientů s AML *de novo* (3,4,21,51) a často jsou nalézány u pacientů se sekundární AML po předchozí cytostatické léčbě inhibitory topoizomerázy II (43,58). U dětských i dospělých pacientů s t(11q23) AML se nejčastěji vyskytuje translokace t(9;11)(p22;q23), která představuje u dětí s AML přibližně polovinu všech translokací týkajících se oblasti 11q23 (3,4,51,52). V současné době je kromě t(9;11) známo více než 30 různých přestaveb, které zahrnují oblast chromozomu 11q23 (53). Místo zlomu na partnerském chromozomu se nejčastěji týká proužků 4q21,6q27, 10q11,19p13, Xq22 a vznikají tak translokace t(4;11), t(6;11), t(10;11), t(11;19) a t(11;X). Převážná většina těchto přestaveb je spojena s podtypem AML M5, s hyperleukocytózou v periferní krvi v době stanovení diagnózy, koagulačními poruchami, s častou expresí CD11b, CD15, CD33, CDw65, HLA-DR, CD4 (21,54) a obecně se špatnou prognózou. 70% AML i AML diagnostikovaných u kojenců do 1 roku života nese přestavbu zahrnující oblast 11q23 (3,4,50).

Molekulární studie prokázaly, že převážná většina reciprokých translokací či inzercí týkajících se oblasti 11q23 působí přestavbu genu MLL (syn. ALL1, HRX), který je v tomto místě lokalizován (1,59). Gen MLL hraje významnou roli v době fetálního růstu a fetální krvetvorby. Studie na myších ukázaly, že chybění genu MLL vede ke smrti *in utero*, heterozygoti v genu MLL vykazují retardaci růstu, anemii a trombocytopenii (43,55). Ačkoliv role fúzních partnerů genu MLL není dosud objasněna, patrně dochází při těchto přestavbách ke změně normální funkce genu MLL vedoucí k leukemogenezi.

V poslední době se však ukazuje různé biologické chování jednotlivých přestaveb týkajících se oblasti 11q23. Nejčastější typ, translokace t(9;11), je spojována s lepší léčebnou odpovědí jak u dospělých, tak zejména u dětských pacientů s AML. Prognóza dětí s t(9;11) je významně lepší (5leté přežití nad 50%) (21,51) než u ostatních translokací týkajících se oblasti 11q23, kde i přes agresivní léčbu se začleněním alogenní transplantace kostní dřeně dlouhodobě přežívá méně než 20% pacientů (3,4,43).

Jednotlivé specifické přestavby týkající se genu MLL lze kro-

mě cytogenetického vyšetření sledovat na molekulární úrovni metodou RT-PCR. Studie zabývající se dlouhodobým sledováním MRN jsou však omezené vzhledem ke špatné prognóze těchto pacientů (60,61). Umožňují však detekci 1 leukemické buňky mezi 10^3 - 10^6 zdravých buněk.

Léčba dětí s AML v České republice

V České republice je ročně diagnostikováno 15-20 nových pacientů s akutní myeloidní leukémií ve věku 0-18 let (62). Tito pacienti jsou jednotně léčeni podle tzv. BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) protokolu. V současné době je používán protokol BFM 98, který rozděluje pacienty do standardního a vysokého rizika (63). Do protokolu se standardním rizikem, který nezařazuje transplantaci kostní dřeně v 1. remisi, jsou mimo jiné zahrnuti pacienti s nálezem přestavby t(8;21), t(15;17) a inv(16) s dobrou odpovědí na indukční léčbu. Do protokolu s vysokým rizikem, který začleňuje transplantaci kostní dřeně v 1. remisi, jsou mimo jiné začleněni pacienti s přestavbou zahrnující oblast 11q23.

Závěr

Zavedení molekulárně genetických metod znamená převrat v pohledu na léčbu leukémie a posouvá náš pohled na toto zhoubné onemocnění daleko za hranice klasického mikroskopického vyšetření kostní dřeně. Současně se však objevují nové otázky spjaté s dlouhodobým přetrváváním leukemického klonu v organismu bez známek jeho aktivace, dokonce s možností diferenciací do všech tří hematopoetických linií, jak je tomu v případě přestavby AML1/ETO (24). Názor o úplném vyléčení leukémie při poklesu leukemické populace pod hladinu detekovatelnosti na molekulární úrovni dnes neobstojí, zejména pokud se limit detekce pohybuje na úrovni 1 leukemické buňky mezi 10^4 zdravými buňkami. Riziko relapsu sice klesá se snižujícím se počtem leukemických buněk, avšak mnoho dalších faktorů, jako například vznik rezistence na cytostatika, může ovlivnit další vývoj nemoci. Největší přínos molekulárně genetického vyšetření tedy zřejmě spočívá v odhalení těch pacientů, kteří i přes intenzivní indukční léčbu jeví stále vysoký stupeň MRN, který je zpravidla předzvěstí klinického relapsu leukémie. Podobně je tomu v případě pacientů pohybujících se na hranici detekovatelnosti nebo v molekulárně genetické remisi s náhle se zvyšujícím stupněm MRN. Těmto pacientům bude třeba do budoucna věnovat zvláštní pozornost s cílem včasného a efektivního potlačení leukemické populace.

Tato práce byla sponzorována grantem Interní grantové agentury MZ ČR číslo: NC/4547-3

Literatura

- Drexler H. G., Borkhardt A., Janssen J. W. G.: Detection of chromosomal translocations in leukemia-lymphoma cells by polymerase chain reaction. *Leuk. Lymph.* 1995;19:359-80;
- Rubin C. M., Rowley J. D.: Chromosomal abnormalities in childhood malignant diseases. In: Nathan D. G., Oski F. A., eds. *Hematology of infancy and childhood*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993:1288-1318;
- Kalwinsky D. K., Raimondi S. C. et al.: Prognostic importance of cytogenetic subgroups in de novo pediatric acute nonlymphocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 1990, 8: 75-83;
- Martinez-Climent J. A., Lane N. J. et al.: Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid leukemia de novo. *Leukemia* 1995;9:95-101;
- Mitelman F., Heim S.: Quantitative acute leukemia cytogenetics. *Genes Chrom. Cancer* 1992;5:57-66;
- Bennet J. M., Catovsky D., Daniel M. T. et al.: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann. Int. Medicine* 1985;103:620-5;
- Stasi R., Poeta G. et al.: Incidence of chromosome abnormalities and clinical significance of karyotype in de novo acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1993;67:28-34;
- Baer M. R.: Assessment of minimal residual disease in patients with acute leukemia. *Curr. Opin. Oncol.* 1998;10: 17-22;
- Campana D., Pui C. H.: Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic advances and clinical significance. *Blood* 1995, 85: 1416-34;
- Wormann B.: Implications of detection of minimal residual disease. *Curr. Opin. Oncol.* 1993;5:3;
- San Miguel J. F., Martinez A. et al.: Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 1997;90:2465-70;
- Sievers E. L., Lange B. J. et al.: Prediction of relapse of pediatric acute myeloid leukemia by use of multidimensional flow cytometry. *J. Natl. Cancer Inst.* 1996, 88:1483;
- Tanaka K., Tanaka T. et al.: The AML1/ETO (MTG8) and AML1/Evi-1 leukemia-associated chimeric oncoproteins accumulate PEBP2(CBF) in the nucleus more efficiently than wild-type AML1. *Blood* 1998;91:1688-99;

14. Okuda T., van Deursen J. et al.: AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996,84:321;
15. Nucifora G., Begy C. R. et al.: Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91: 4004-8;
16. Romana S. P., Mauchauffe M. et al.: The t (12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a TEL/AML1 gene fusion. *Blood* 1995,85:3662;
17. Tanaka T., Kurokawa M. et al.: The cellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its activation ability. *Mol. Cell. Biol.* 1996,16: 3967;
18. Rhoades K. L., Hetherington C. J., Rowley J. D. et al.: Synergistic up-regulation of the myeloid-specific promoter for the macrophage colony-stimulating factor receptor by AML1 and the t (8;21) fusion protein may contribute to leukemogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996,93:11895;
19. Tenen D. G., Hromas R., Licht J. D., Zhang D. E.: Transcription Factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* 1997,90:489-519;
20. Grimwade D., Walker H. et al.: The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998,92:2322-33;
21. Creutzig U., Harbott J. et al.: Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87. *Blood* 1995,86: 3097-3108;
22. Miyamoto T., Nagafuji K. et al.: Quantitative analysis of AML1/ETO transcripts in peripheral blood stem cells harvests from patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Br. J. Haematol.*, 1995,91: 132-8;
23. Jurlander J., Caligiuri M. A. et al.: Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood* 1996,88:2183-91;
24. Miyamoto T., Nagafuji K. et al.: Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 1996,87:4789-96;
25. Marcucci G., Livak K. J. et al.: Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Leukemia* 1998, 12: 1482-9;
26. Muto A., Mori S. et al.: Serial quantification of minimal residual disease of t(8;21) acute myelogenous leukemia with RT-competitive PCR assay. *Br. J. Haematol.* 1996,95:85-94;
27. Warrel R. P. Jr., de Thé H., et al.: Acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1993,329:177;
28. Guglielmi C., Martelli M. P., et al.: Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint and clinical outcome. A comparative Italian study of 196 cases. *Br. J. Haematol.* 1998,102: 1035-41;
29. Gratas C., Menot M. L., et al.: Retinoic acid supports granulocytic but not erythroid differentiation of myeloid progenitors in normal bone marrow cells. *Leukemia* 1993,7:1156;
30. Douer D., Koeffler H. P.: Retinoic acid enhances colony-stimulating factor-induced clonal growth of normal human myeloid progenitor cells in vitro. *Exp. Cell. Res.* 1982,138: 193;
31. Largman C., Detmer K., et al.: Expression of retinoic acid receptor alpha mRNA in human leukemia cells. *Blood* 1989,74:99;
32. de Thé H., Lavau C. et al.: The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 1991,66:675;
33. Tallman M. S., Andersen J. W., et al.: All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 1997,337:1021-8;
34. Chen Z. X., Xue Y. Q., et al.: A clinical and experimental study on *M-trans* retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood* 1991,78: 1413;
35. Avvisati G., Lo Coco F., et al.: AIDA (*All-trans* retinoic acid + Idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: A Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study. *Blood* 1996, 88: 1390-8;
36. Dombret H., Sutton L., et al.: Combined therapy with All-trans-retinoic acid and high-dose chemotherapy in patients with hyperleukocytic acute promyelocytic leukemia and severe visceral hemorrhage. *Leukemia* 1992,6:1237-42;
37. Mandelli F., Diverio D., et al.: Molecular remission in PML-RARa-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin therapy. *Blood* 1997,90:1014-1021;
38. Diverio D., Rossi V., et al.: Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML-RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter, AIDA trial. *Blood* 1998,92: 784-9;
39. Tobal K., Liu Jin J. A.: RT-PCR method with increased sensitivity shows persistence of PML-RARa fusion transcripts in patients in long-term remission of APL. *Leukemia* 1998,12:1349-54;
40. Seale J. R., Varma S., et al.: Quantification of PML-RARalpha transcripts in acute promyelocytic leukaemia: explanation for the lack of sensitivity of RT-PCR for the detection of minimal residual disease and induction of the leukaemia-specific mRNA by alpha interferon. *Br. J. Haematol.* 1996,95: 876-7;
41. Chen S. J., Zelent A., et al.: Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* 1993,91: 2260;
42. Redner R. L., Rush E. A., et al.: The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* 1996,87: 882;
43. Rubnitz J. E., Look A. T.: Molecular genetics of childhood leukemias. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 1998,20: 1-11;
44. Liu P., Tarle S. A., et al.: Fusion between transcription factor CBFbeta-PEBP2b and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 1993, 261: 1041-4;
45. Costello R., Sainty D., et al.: Detection of CBFbeta-MYH11 fusion transcripts in acute myeloid leukemia: heterogeneity of cytological and molecular characteristics. *Leukemia* 1997,11:644-50;
46. Laczika K., Novak M., et al.: Competitive CBFbeta-MYH11 reverse-transcriptase polymerase chain reaction for quantitative assessment of minimal residual disease during postremission therapy in acute myeloid leukemia with inversion 16: A pilot study. *J. Clin. Oncol.* 1998,16: 1519-25;
47. Langabeer S. E., Walker H., et al.: Frequency of CBFbeta-MYH11 fusion transcripts in patients entered into the U. K. MRC AML trials. *Br. J. Haematol.* 1997, 96: 736-9;
48. Claxton D. F., Liu P., et al.: Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994,83: 1750-6;
49. Evans P. A., Short M. A., et al.: Detection and quantitation of the CBFbeta-MYH11 transcripts associated with the inv(16) in presentation and follow-up samples from patients with AML. *Leukemia* 1997,11: 364-9;
50. Tnirman M. J., Gill H. J., et al.: Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N. Engl. J. Med.* 1993,329:909-14;
51. Leblanc T., Auvrignon A., et al.: Prognosis value of cytogenetics in 250 children with acute myeloblastic leukemia treated in the LAM E 89/91 protocol. *Blood Suppl.* 1997,634a;
52. Swansbury G. J., Slater R., et al.: Hematological malignancies with t(9;11)(p21-22;q23) - a laboratory and clinical study of 125 cases. *European 11q23 Workshop participants. Leukemia* 1998,12: 792-800;
53. Cimino G., Rapanotti M. C., et al.: ALL-1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects. *Haematologica* 1998,83: 350-7;
54. Baer M. R., Stewart C. C. et al.: Acute myeloid leukemia with 11q23 translocations: myelomonocytic immunophenotype by multiparameter flow cytometry. *Leukemia* 1998,12:317-25;
55. Yu B. D., Hess J. L. et al.: Altered Hox expression and segmental identity in MLL-mutant mice. *Nature* 1995,378:505-8;
56. Ferrant A., Labopin M. et al.: Karyotype in acute myeloblastic leukemia: prognostic significance for bone marrow transplantation in first remission: a European Group for Blood and Marrow Transplantation study. *Blood* 1997,90:2931-8;
57. Marosi C., Koller U., et al.: Prognostic impact of karyotype and immunologic phenotype in 125 adult patients with de novo AML. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1992,61:14-25;
58. Felix C. A., Hosier M. R., et al.: ALL-1 gene rearrangements in DNA topoisomerase II inhibitor-related leukemia in children. *Blood* 1995,85: 3250-6;
59. Cimino G., Lo Coco F., et al.: ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy. *Blood* 1993,82:544-6;
60. Yamamoto K., Seto M., et al.: A reverse transcriptase-polymerase chain reaction detects heterogeneous chimeric mRNAs in leukemias with 11q23 abnormalities. *Blood* 1994, 83: 2912-21;
61. Repp R., Borkhardt A., et al.: Detection of four different 11q23 chromosomal abnormalities by multiplex-PCR and fluorescence-based automatic DNA-fragment analysis. *Leukemia* 1995,1: 210-5;
62. Národní onkologický registr České republiky, Bmo, 1998;
63. Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hamatologie: Therapiestudie AML-BFM 98,1998.

FASAY: NOVÉ MOŽNOSTI

FASAY: RECENT ACHIEVEMENTS

J. ŠMARDOVÁ

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Metoda FASAY je jednoduchý test pro stanovení důsledku mutací na funkci p53. FASAY byla využita při analýze mutací p53 v buněčných liniích, v somatických buňkách nádorů i v krevních buňkách při vyhledávání mutací zárodečných. Tato metoda našla rovněž své uplatnění při studiu afinity mutovaných proteinů p53 k promotorům jednotlivých cílových genů.

Klíčová slova: p53, mutace, FASAY, transaktivace

Abstract: The aim of the FASAY is to determine the effects of p53 mutations on the function and activity of the p53 protein. The method was successfully used for mutation analysis of p53 in various cell lines, somatic tumor cells and in blood cells for analysis of germ-line mutations. In addition, the method was also found effective in tests measuring affinity of mutant p53 proteins to promoters of target genes.

Key words: p53, mutation, FASAY, transactivation

Úvod

Molekula nádorového supresoru p53 patří k „evergreenům“ molekulární onkologie. Tento protein, poprvé detekovaný v roce 1979 (1,2), vyhlášený molekulou roku 1993, je už po několika let intenzivně studován celou řadou světových laboratoří. Zájem o p53 má nejméně dvě příčiny: tou první je fakt, že více než 50% lidských nádorů má mutaci v genu pro p53 (3,4,5); druhým důvodem je skutečnost, že p53 hraje významnou roli v regulaci tak základních procesů buňky jako jsou buněčný cyklus, apoptóza a genomová stabilita (6,7).

V roce 1997 jsme v tomto časopise publikovali krátký přehledný článek (8), který měl čtenáře seznámit s poměrně novou metodou nazývanou FASAY, vytvořenou pro vyhledávání mutací v genu pro p53 v klinickém materiálu. Tímto přehledem chceme na předchozí článek navázat, shrnout výsledky, kterých bylo pomocí metody FASAY dosaženo při studiu klinického materiálu, a ukázat, jak se metoda, určená původně především pro onkologickou praxi a aplikovaný výzkum, stala skvělým nástrojem základního výzkumu a přinesla originální poznatky o proteinu p53.

FASAY

FASAY („functional analysis of separated alleles in yeast“) je funkční test pro analýzu genu pro p53. Tímto testem se měří transkripčně aktivační schopnosti proteinu p53, který je exprimován v kvasinkách z genu, jehož centrální část (kodóny 67 až 374) byla získána z vyšetřovaného materiálu (nádorová tkáň, krevní buňky,...) technikou RT-PCR. Vzniklý protein p53 potom aktivuje (nebo neaktivuje) transkripci reportérského genu, kterým je buď ADE2 nebo HIS3. Ve verzi využívající ADE2 mají kolonie kvasinek vyrostlé na selekčním médiu bez adeninu buď bílé (obsahují-li funkční p53) nebo červené zbarvení (mají-li nefunkční p53) (9). Při využití HIS3 se porovnává počet kolonií kvasinek vyrostlých na plotnách s histidinem nebo bez histidinu (10).

Klinické studie využívající FASAY

Metoda FASAY má několik výhod: je schopná zachytit mutaci p53 i v nádorové tkáni kontaminované značným množstvím

zdravé tkáně, měří odděleně obě alely genu, je schopná stanovit *ts* mutanty („temperature sensitive“) - mutanty citlivé na zvýšení inkubační teploty (9). To vše ji předurčuje k tomu, aby byla použita k měření somatických mutací genu pro p53 v nádorech, zárodečných mutací ve vzorcích krve a také mutací v modelových buněčných liniích. Pro všechny tyto případy byla FASAY skutečně použita, často v kombinaci s dalšími metodami. Uvádíme zde přehled těchto prací; zvláště se zaměříme na srovnání s jinými technikami a všechna vylepšení vlastních metod nebo její interpretace.

1. Buněčné linie

Buněčné linie byly použity jako zdroj p53 už v jedné z původních prací (9), a to k ověření spolehlivosti metody. Výsledky měření 11 buněčných linií přesně odpovídaly již dříve známým údajům o přítomnosti mutace v genu pro p53. U dalších dvou linií autoři zjistili částečnou aktivitu p53 (růžové zbarvení kolonií kvasinek vyrostlých na plotnách bez adeninu) a následně prokázali přítomnost *ts* mutace v genu pro p53. Zajímavé výsledky poskytlo také měření buněčné linie LN428, která měla na každé alele jinou mutaci: v jedné alele byla mutace 173M, ve druhé 282W (9). Na plotnách bez adeninu vyrostly nejenom červené kolonie (obsahující nefunkční p53), ale také 15% bílých kolonií. Následnou analýzou bylo prokázáno, že v kvasinkách došlo k intragenové rekombinaci.

Další práce využívající FASAY sledovala 3 různé buněčné linie odvozené z kolorektálního karcinomu: SNU-C1, SNU-C4 a SNU-C5 (11). Zatímco SNU-C1 a SNU-C4 měly obě alely genu pro p53 funkční, linie SNU-C5 měla obě alely mutantní. Jedna alela nesla mutaci 248trp a druhá 218leu. Celkově se buňky této linie chovaly odpovídajícím způsobem: nebyly schopny reagovat na poškození DNA indukci p53, *waf-1* a *mdm-2*, či zastavením buněčného cyklu v G1/S fázi. Zajímavý byl ale výsledek FASAY: ten ukázal, že klony s mutací 218leu mají schopnost transaktivovat promotor specifický pro p53. Autoři interpretovali tento výsledek tak, že buď má alela 248trp silnou dominantně negativní aktivitu nebo má alela 218leu zatím neznámou abnormální funkci.

V jiné práci byla FASAY použita ke stanovení stavu genu pro p53 u dvaceti nově ustavených lidských buněčných linií (12).

U 11 linií byly obě alely imitované, u 8 funkční. Jedna linie byla heterozygotní a měla jednu alelu funkční a druhou imitovanou. Následné sekvenování genu p53 tento heterozygotní stav potvrdilo.

FASAY se stala součástí také další rozsáhlé studie, v níž bylo 58 lidských buněčných linií podrobeno pečlivému zkoumání stavu genu pro p53 (13). V této práci byl protein p53 studován nejen metodou FASAY, ale také western blottingem, byla sekvenována cDNA p53 a navíc byly použity další testy funkčnosti: schopnost indukovat zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a expresi *cip1/vaf1*, *GADD45* a *mdm2* δ-zářením. Z 54 buněčných linií, které byly testovány metodou FASAY, mělo 36 linií nefunkční alely p53. Ve všech byla sekvenováním zjištěna mutace. 17 linií mělo funkční alely, z toho u 15 nebyla mutace sekvenováním odhalena, ve dvou případech ano. Jedna linie - ve shodě s výsledky sekvenování - měla jednu alelu funkční a druhou nefunkční. Celkově úspěšnost metody FASAY v odhalování mutací p53 dosáhla 96% (porovnáno se sekvenováním), což bylo ze všech použitých metod nejvíce. FASAY byla použita také v několika studiích, které hledaly souvislost mezi stavem genu pro p53 a rezistencí či citlivostí buněčné linie či sublinie k chemoterapeutikům (14,15) a TNF-α (16). Ke sledování stavu genu pro p53 byly využity vedle metody FASAY také sekvenování genu p53 (14, 16), SSCP (16) a imunocytochemické metody (15).

2. Nádory

Opět již v jedné z původních prací o metodě FASAY se objevují první výsledky vyhledávání mutací v genu pro p53 v nádorové tkáni (9). Autoři tato měření prováděli u 10 nádorů hlavy a krku a zjistili, že dva nádory obsahovaly pouze funkční alely p53 a v osmi nádorech zachytili mutaci. Ve dvou případech přítomnost mutace dodatečně ověřili sekvenováním. Na tyto prvotní výsledky navázala další rozsáhlá studie, v níž autoři stanovovali metodou FASAY stav genu pro p53 u celkem 53 pacientů s nádory hlavy a krku (nádory horních cest dýchacích a horní části trávicího traktu) (17). Smyslem této studie bylo zjistit, zda existuje souvislost mezi mutací v genu pro p53 a pravděpodobností výskytu násobných primárních nádorů. Autoři měřili p53 přímo v nádorech všech pacientů a také vždy alespoň ve třech nezávislých biopsiích histologicky normální okolní tkáně. Porovnáním výsledků získaných u pacientů s jediným nádorem a pacientů s více nádory došli k závěru, že mutace v genu pro p53 v histologicky normální tkáni zvyšuje významně pravděpodobnost vzniku násobných primárních nádorů. Autoři v této práci použili metodu FASAY ve zdokonalené formě - tzv „split assay“. Tato varianta metody měří odděleně dvě části genu pro p53 a umožňuje tak odlišit klonální (tedy reálné) a neklonální (vzniklé sekundárně během provádění vlastní metody) mutace tohoto genu.

Autoři dalších dvou prací (18,19) analyzovali gen pro p53 v 54 maligních astrocytomech, nejčastějších nádorech centrálního nervového systému u dospělých. Mutace byla zjištěna u 26 nádorů. Ve třech případech počet červených kolonií dosahoval 10 až 20%, a proto u nich byla provedena analýza technikou „split assay“. Ve všech třech případech byla potvrzena přítomnost klonální mutace. Ve 26 případech, u nichž byla nalezena mutace, bylo provedeno klonování genu pro p53. Ve všech případech byla mutace potvrzena, ve dvou případech byla na každé alele odlišná mutace (heterozygotní dvojnásobní mutanti). Celkem byly mutace nalezeny u 48% případů, což je mnohem více než dříve uváděných 29%. Autoři tento výsledek připisují především citlivosti metody FASAY.

Metoda FASAY byla využita k analýze mutací v genu pro p53 u epitelálních dysplasií a karcinomů dutiny ústní japonských pacientů a pacientů ze Srí Lanky (20). Celkem bylo vyšetřeno 33 japonských pacientů s primárním nádorem, 14 pacientů s dysplasií a 6 pacientů s hyperplasií. Mutace v genu pro p53 byla nalezena ve 26 primárních nádorech (79%) a 5 dysplasiích (36%), u hyperplasií mutace nalezena nebyla. Primární

nádory pacientů ze Srí Lanky byly analyzovány metodou FASAY a dále metodou SSCP. Zatímco FASAY zachytila 9 pozitivních nádorů (53%), SSCP pouze 6 (35%). Mutace byly potvrzeny sekvenováním. Autoři dále v této práci podrobně měřili citlivost metody FASAY a přesnost interpretace jejích výsledků. Zjistili, že touto metodou lze zachytit přítomnost nejméně 6% DNA s mutací v genu pro p53. Srovnáním výsledků FASAY a sekvenování zjistili, že klonální mutace byly potvrzeny u těch případů, které metodou FASAY vykazovaly alespoň 17% červených kolonií. V případech, kdy počet červených kolonií byl nižší než 13%, klonální mutace potvrzeny nebyly. Autoři proto navrhuji, aby počet červených kolonií nad 20% byl považován za bezpečnou klinickou hranici stanovení mutace v genu pro p53 bez sekvenční analýzy.

3. Zárodečné mutace

Metoda FASAY byla původně vyvinuta především pro vyhledávání zárodečných mutací p53, tedy pro stanovení heterozygotního stavu p53. Proto také byla k tomuto účelu hned v první práci použita (10). Byly vyšetřeny lymfocyty 6 pacientů s Li-Fraumeniho syndromem, kde riziko výskytu zárodečné mutace p53 dosahuje 50 až 70% (21,22,23,24). U tří pacientů byla metodou FASAY nalezena mutace v jedné alele genu pro p53, druhá alela byla funkční. Následné sekvenování tento výsledek potvrdilo. Také při zavedení další verze metody FASAY (9) byla sekvenováním ověřena její schopnost zachytit heterozygotní stav genu pro p53 u jednoho pacienta.

V další práci se metodou FASAY podařilo vyřešit několik let starý neobjasněný případ. Jednalo se o případ pacientky, která odpovídala kritériím Li-Fraumeniho syndromu, s manifestním nádorem prsu. V nádoru i ve zdravé tkáni pacientky (a také její stejně postižené matky) byla naměřena zvýšená hladina proteinu p53. Ani sekvenováním genu p53, ani specifickou imunoprecipací, nebyla prokázána mutace v genu pro p53 (25). O několik let později se autoři k tomuto nedořešenému případu vrátili a ke stanovení p53 použili FASAY a také další funkční metodu - test schopnosti vyvolat apoptózu jako následek γ-záření (26). Výsledky FASAY byly překvapivé. Jedna alela genu p53 byla jednoznačně funkční, ale kolonie kvasinek, které obsahovaly druhou alelu, byly růžové - barvou ani velikostí neodpovídaly ani funkčnímu ani nefunkčnímu p53. Přítomnost této mutace, která dává také růžové zbarvení kolonií (9), byla vyloučena. Podobně výsledek testu na apoptózu poskytoval hodnoty, které byly mezi hodnotami jednoznačně funkčního a jednoznačně nefunkčního p53. Až sekvenování genu p53 odhalilo neobvyklou mutaci kodónu 337 v oligomerizační doméně. Tato mutace byla dále studována a bylo potvrzeno, že skutečně způsobuje nedostatečnou oligomerizaci. Protein p53 mající tuto neobvyklou mutaci v kodónu 337 tvoří funkční tetramery s méně než 50% účinností (27,28).

Další studií (29), která se pokusila využít metodu FASAY, byla práce podrobně charakterizující zárodečnou mutaci p53 u rodiny, která nesplňovala přesná kritéria Li-Fraumeniho syndromu, ale měla tzv. Li-Fraumeniho-like syndrom. Mutace, která se u postižených členů rodiny vyskytovala, byla velmi neobvyklá: imitovaný byl nukleotid na třetí pozici kodónu 125, což je tichá záměna neměnící smysl kodónu. Proto chtěli autoři jednoznačně prokázat souvislost mezi touto mutací a predispozicí ke vzniku nádorů u jejích nositelů. Autoři prokázali, že popsaná mutace v kodónu 125 je sice tichá na úrovni aminokyselin, ale postihuje donorové místo pro sestřih a způsobuje tak vznik neobvyklých transkriptů. Autoři použili několik funkčních metod ke zjištění, zda aberantní transkripce vede k tvorbě nefunkčních proteinů p53, mezi nimi také FASAY. V tomto případě však FASAY (podobně jako např. apoptotický test, míra radiorezistence,...) selhala, metoda zachytila pouze funkční p53. Aberantní transkripty - ač teoreticky metodou zachytitelné - se nepodařilo naklonovat. Tento výsledek se zatím nepodařilo vysvětlit.

FASAY ve službách základního výzkumu

Po dlouhou dobu se předpokládalo, že schopnost proteinu p53 indukovat zastavení buněčného cyklu a schopnost indukovat apoptózu jsou neoddelitelné. Postupně se ale objevilo několik studií, které tento názor změnily. Např. se podařilo nalézt mutantní varianty proteinu p53 neschopné indukovat zastavení buněčného cyklu, ale zcela kompetentní indukovat apoptózu alespoň v některých buněčných typech (30). Na druhé straně bylo zjištěno, že p53 nesoucí mutaci v kodónu 175 vede ke ztrátě apoptotické funkce při zachování schopnosti vyvolat zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (31). Podobně mutace v kodónu 143 zachovává proteinu p53 schopnost indukovat zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (32). Také byly studovány mutace v genu p53 buněčných linií odvozených z lymfoblastů pacientů s Li-Fraumeniho syndromem, tedy heterozygotní mutace p53. Buněčná linie s mutací jedné alely p53 v kodónu 282 měla zcela normální blok ve fázi G1 buněčného cyklu, ale výrazně sníženou indukcí apoptózy, zatímco heterozygotní mutace v kodónu 286 měla vedle snížené apoptózy také sníženou schopnost zastavit buněčné dělení v G1 fázi (33). Ze všech výše uvedených studií plyne: 1. indukce apoptózy a indukce bloku buněčného cyklu v G1 fázi jsou separovatelné funkce p53; 2. různé mutace p53 různě ovlivňují tyto funkce; 3. inaktivace pouze apoptotické funkce p53 může sama o sobě přispívat ke zvýšené dispozici ke vzniku nádorů.

Funkční p53 má schopnost regulovat jak apoptózu, tak zastavení buněčného cyklu. Obě funkce vykonává - alespoň do jisté míry - mechanismem transaktivace svých cílových genů: v případě zastavení buněčného cyklu jednoznačně regulací exprese genu *p21/waf1* (34), v případě apoptózy např. regulací exprese genu *bax* (35). Z výše uvedených analýz mutantních p53 vyplynulo, že obě tyto dráhy představují odlišné funkce p53. Jedním z možných mechanismů tohoto oddělení funkcí by byla různá míra afinity p53 k regulačním oblastem v promotorech genů *p21* a *bax*. Ověření této možnosti bylo předmětem několika studií, z nichž některé využily metodu FASAY.

V první studii řešící tuto problematiku (36) využili její autoři „klasické“ metody: schopnost p53 vázat DNA sledovali metodou EMSA („electrophoretic mobility shift assay“), transaktivaci schopnosti testy p-galaktosidázové a luciferázové aktivity. Studium schopnosti tří různých mutantů p53 (173L, 175P, 181L) transaktivovat tři různé promotory - promotor genu *p21*, genu *bax* a genu IGF-BP3 - boxB - zjistili, že mutanti 175P a 181L aktivují expresi genu *p21* a mají tedy schopnost indukovat zastavení buněčného cyklu ve fázi G1, ale zároveň netransaktivují *bax* a IGF-BP3 a mají proto výrazně sníženou schopnost indukovat apoptózu.

Pro řešení stejné otázky byla později upravena metoda FASAY. Původní metoda vycházela z obecně přijímaného názoru, že testování schopnosti p53 vázat se do regulační sekvence RGC je spolehlivým měřítkem transaktivace způsobilosti p53 (9,10). V nové verzi upravili autoři metodu tak, že před reportéřský gen ADE2 předřadili regulační sekvenci, která se nachází v promotoru genu *p21*, a regulační sekvenci

z promotoru genu *bax*. To jim umožňovalo měřit zvlášť schopnost p53 transaktivovat gen *p21* a gen *bax* (37). Touto metodou potom analyzovali 51 mutací p53. Většina mutantů (celkem 42) nebyla schopna transaktivovat ani jeden reportér. Devět mutantů bylo schopno transaktivovat promotor *p21*, ale ne promotor *bax*.

Další studie měla podobnou strategii, ale šla ještě dále (38). Její autoři testovali 19 různých mutantů p53 klasifikovaných jako transkripčně neaktivní v testu, který využíval regulační sekvenci RGC. Před reportéřský gen - v tomto případě HIS3 - předřadili postupně regulační sekvence genů: *p21*, *mdm2*, *GADD45*, *Cyclin G*, *bax*, *IGF-BP3* - boxA, *IGF-BP3* - boxB, *RGC* a *SCS* (uměle odvozené vazebné místo s vysokou afinitou pro p53). FASAY byla navíc prováděna ve třech různých teplotách: 37°C, což je fyziologická teplota lidských buněk, 30°C, což je optimální teplota pro růst kvasinek a 24°C. Ze všech testovaných mutantů jen šest bylo zcela nefunkčních se všemi reportéry při všech teplotách. Další mutanti byli rozděleni na skupiny podle selektivity a podle závislosti na teplotě.

Obvyklý biologický efekt mutace p53 je inaktivace tohoto proteinu jako transkripčního faktoru. Výše uvedené práce ukázaly, že mezi mutanty p53 mohou být podstatné rozdíly. Jejich přesnější klasifikace může mít významné klinické důsledky. Např. nádory obsahující p53 schopné aktivovat indukcí *p21* mohou reagovat na terapii jinak než nádory se zcela nefunkčním p53 (39). Modifikovaná verze FASAY (37) se nabízí jako jeden z možných testů schopných tohoto rozlišení.

ZÁVĚR

Tímto krátkým přehledem se snad podařilo ukázat, že metoda FASAY zcela splnila očekávání, které do ní její autoři vložili, a našla uplatnění v onkologickém výzkumu, a to jak při testování mutací p53 v nádorech, tak při testování zárodečných mutací p53. V některých případech bylo technikou FASAY dosaženo slibných až skvělých výsledků (např. 13, 17, 25), spíš výjimečně selhala (29). FASAY byla navíc vtipně využita i ve studiích, které přinesly zcela nové poznatky o p53, které se dříve či později odrazí v klinickém onkologickém výzkumu i v onkologické praxi. Dá se očekávat, že FASAY bude jejich důležitým nástrojem.

Pro úplnost je třeba uvést, že tento krátký přehled neuvádí všechny práce, které metodu FASAY využily, většina neuvedených je ale citována v předešlém přehledu publikovaném v tomto časopise (8). Naopak chceme na závěr zdůraznit, že metoda FASAY není využitelná pouze pro stanovení p53, ale s příslušnými úpravami ji lze využít i ke stanovení dalších genů pro faktory s transaktivací vlastnostmi. Tak byla FASAY využita např. pro testování mutací, které eliminují funkci NF1GRD („GTPase-activating protein related domain of the human neurofibromatosis type 1 protein“) (40) nebo pro lidský estrogenový receptor (41).

Práce byla sponzorována grantem IGAMZ ČR č. M/16-3

Literatura

1. Lane D. P. and Crawford L. V.: T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979;278:261-263
2. Linzer D. I. and Levine A. J.: Characterization of a 54Kdalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979;17:43-52
3. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B. and Harris C. C.: p53 Mutations in Human Cancers. *Science* 1991;253:49-53
4. Lane D. P.: p53 and human cancers. *Brit. Med. Bull.* 1994;50:582-599
5. Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M. and Harris C. C.: Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. *Cancer Res.* 1994;54:4855-4878
6. Cox L. S. and Lane D. P.: Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates to DNA damage. *BioEssays* 1995;17:501-508
7. Levine A. J.: p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell*, 1997, 88:323-331
8. Smardová J.: FASAY: funkční analýza p53. *Klin. Onkol.* 1997;10:131-134
9. Flaman J., Frebourg T., Moreau V., Charbonnier F., Martin C., Chappuis P., Sappino A.-P., Limacher J.-M., Bron L., Benhattar J., Tada M., Van Meier E. G., Estreicher A. and Iggo R. D.: A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995;92:3963-3967
10. Ishioka C., Frebourg T., Yan Y.-X., Vidal M., Friend S. H., Schmidt S. and Iggo R.: Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nature Genet.* 1993;5:124-129
11. Rand A., Glen K. S., Alvares C. P., White M. B., Thibodeau S. M. and Karnes W. E. Jr.: p53 functional loss in a colon cancer cell line with two missense mutations (2181eu and 248trp) on separate alleles. *Cancer Lett.* 1996; 98: 183-191
12. Mihara K., Miyazaki M., Kondo T., Fushimi K., Tsuji T., Inoue Y., Fukaya K., Ishioka C. and Namba M.: Yeast Functional Assay of the p53 Gene Status in Human Cell Lines Maintained in Our Laboratory. *Acta Med. Okayama* 1997, 51:261-265

13. O'Connor P. M., Jackman J., Bae I., Myers T. G., Fan S., Mutoh M., Scudiero D. A., Monks A., Sausville E. A., Weinstein J. N., Friend S. and Fornace A. J. Jr.: Characterization of the p53 Tumor Suppressor Pathway in Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and Correlations with the Growth-Inhibitory Potency of 123 Anticancer Agents. *Cancer Res.* 1997, 57: 4285-4300
14. Wosikowski K., Regis J. T., Robey R. W., Alvarez M., Buters J. T. M., Gudas J. M. and Bates S. E.: Normal p53 Status and Function Despite the Development of Drug Resistance in Human Breast Cancer cells. *Cell Growth Different.* 1995, 6: 1395-1403
15. Gudas J. M., Nguyen H., Li T., Sadzewicz L., Robey R., Wosikowski K. and Cowan K. H.: Drug-resistant breast cancer cells frequently retain expression of a functional wild-type p53 protein. *Cancerogenesis* 1996,17:1417-1427
16. Cai Z., Capoulade C., Moyret-Lalle C., Amor-Gueret M., Feunteun L., Larsen A. K., Bressac-de Paillerets B. and Chouaib S.: Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induced cell death is associated with loss of p53 function. *Oncogene* 1997,15:2817-2826
17. Waridel F., Estreicher A., Bron L., Flaman J.-M., FontolUet C., Monnier P., Frebourg T. and Iggo R.: Field cancerisation and polyclonal p53 mutation in the upper aero-digestive tract. *Oncogene* 1997,14:163-169
18. Tada M., Iggo R. D., Ishii N., Shinohe Y., Sakuma S., Estreicher A., Sawamura Y. and Abe H.: Clonality and stability of the p53 gene in human astrocytic tumor cells: Quantitative analysis of p53 gene mutations by yeast functional assay. *In U.Cancer* 1996,67:447-450
19. Tada M., Iggo R. D., Waridel F., Nozaki M., Matsumoto R., Sawamura Y., Shinohe Y. and Abe H.: Reappraisal of p53 Mutations in Human Malignant Astrocytic Neoplasms by p53 Functional Assay: Comparison With Conventional Structural Analyses. *Mol. Carcinogenesis* 1997,18:171-176
20. Kashiwazaki H., Tonoki H., Tada M., Chiba I., Shindoh M., Totsuka Y., Iggo R. and Moriuchi T.: High frequency of p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay. *Oncogene* 1997,15:2667-2674
21. Malkin D., Li F. P., Strong L.-C., Fraumeni J. F. Jr., Nelson C. E., Kim D. H., Kassel J., Gryka M. A., Bischoff F. Z., Tainski M. A. and Friend S. H.: Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasias. *Science* 1990,250:1233-1238
22. Birch J. M., Hartley A. L., Tricker K. J., Prosser J., Condie A., Kelsey A. M., Harris M., Morris Jones P. H., Binchy A., Crowther D., Craft A. W., Eden O. B., Evans D. G. R., Thompson E., Mann J. R., Martin J., Michell E. L. P. and Santibanez - Koref M. F.: Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1988,54:1298-1304
23. Varley J. M., Evans D. G. R. and Birch J. M.: Li-Fraumeni syndrome - a molecular and clinical review. *Br.J.Cancer.* 1997,76:1-14
24. Varley J. M., McGown G., Thoracraft M., Santibanez-Koref M. F., Kelsey A. M., Tricker K. J., Evans D. G. R. and Birch J. M.: Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni Families: an extended study of 39 families. *Cancer Res.* 1997, 57: 3245-3252
25. Barnes D. M., Hanby A. M., Gilett C. E., Mohammed S., Hodgson S., Bobrow L. G., Leigh I. M., Purkis T., MacGeoch C., Spurr N. K., Bartek J., Vojtesek B., Pickles S. M., and Lane D. P.: Abnormal expression of wild type p53 protein in normal cells of a cancer family patient. *Lancet* 1992,340:259-263
26. Lomax M. E., Barnes D. M., Gilchrist R., Pickles S. M., Varley J. M. and Camplejohn R. S.: Two functional assays employed to detect an unusual mutation in the oligomerisation domain of p53 in a Li-Fraumeni like family. *Oncogene* 1997,14:1869-1874
27. Lomax M. E., Barnes D. M., Hupp T. R., Pickles S. M. and Camplejohn R. S.: Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li - Fraumeni and Li - Fraumeni like family members. *Oncogene* 1998,17:643-649
28. Davison T. S., Yin P., Nie E., Kay C. and Arrowsmith C. H.: Characterization of the oligomerization defects of two p53 mutants found in families with Li - Fraumeni-like syndrome. *Oncogene* 1998,17:651-656
29. Varley J. M., Chapman P., McGown G., Thorncroft M., White G. R. M., Greaves M. J., Scott D., Spreadborough A., Tricker K. J., Birch J. M., Evans D. G. R., Reddel R., Camplejohn R. S., Burn J. and Boyle J. M.: Genetic and functional studies of a germline TP53 splicing mutation in a Li-Fraumeni-like family. *Oncogene* 1998,16: 3291-3298
30. Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Vowsden K. H. and Oren M.: Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation deficient p53. *Genes.Dev.* 1995,9: 2170-2183
31. Rowan S., Ludwig R. L., Haupt Y., Bates S., Lu X., Oren M. and Vowsden K.: Specific loss of apoptotic but not cell arrest function in a human tumour derived p53 mutant. *EMBO J.* 1996,15: 827-838
32. Pocard M., Chevillard S., Villaudy J., Poupon M. F., Dutrillaux B. and Remvikos Y.: Different p53 mutations produce distinct effects on the ability of colon carcinoma cells to become blocked at the G1/S boundary after irradiation. *Oncogene* 1996,12:875-882
33. Delia D., Goi K., Mizutani S., Yamada T., Ariello A., Fontanella E., Lamorte G., Iwata S., Ishioka C., Krajewski S., Reed J. C. and Pierotti M. A.: Dissociation between cell cycle arrest and apoptosis can occur in Li-Fraumeni cells heterozygous for p53 gene mutations. *Oncogene* 1997,14:2137-2147
34. El-Deiry W., Tokino T., Velculescu V. E., Levy D. B., Parson V. E., Trent J. M., Lin D., Mercer W. E., Kinzler K. W. and Vogelstein B.: WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* 1993,78:817-825
35. Miyashita T. and Reed J. C.: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of human bax gene. *Cell* 1995,80:293-299
36. Ludwig R. L., Bates S. and Vowsden K. H.: Differential Activation of Target Cellular promoters by p53 Mutants with Impaired Apoptotic Function. *Mol.Cell.Biol.* 1996,16:4952-4960
37. Flaman J.-M., Robert V., Lenglet S., Moreau V., Iggo R. and Frebourg T.: Identification of human p53 mutations with differential effects on the bax and p21 promoters using functional assay in yeast. *Oncogene* 1998,16:1369-1372
38. Di Como C. J. and Prives C: Human tumor-derived p53 proteins exhibit binding site selectivity and temperature sensitivity for transactivation in a yeast-based assay. *Oncogene* 1998,16:2527-2539
39. Waldman T., Zhang Y., Dillehay L., Yu J., Kinzler K., Vogelstein B. and Williams J.: Cell-Cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat.Med.* 1997,3:1034-1036
40. Ishioka C., Ballester R., Engelstein M., Vidal M., Kassel J., The I., Bernards A., Gusella J. F. and Friend S. H.: A functional assay for heterozygous mutations in the GTPase activating protein related domain of the neurofibromatosis type 1 gene. *Oncogene* 1995,10:841-847
41. van Dijk M. A. J., Floore A. N., Kloppenborg K. I. M. and van't Veer L. J.: A Functional Assay in Yeast for the Human estrogen receptor Displays Wild-Type and Variant Estrogen receptor Messenger RNAs Present in Breast Carcinoma. *Cancer Res.* 1997,57: 3478-3485

knihy

TEXT ATLAS OF LYMPHOMAS

Armitage J. O., Cavalli F., Longo D. L., Ferry J. A.
MARTIN DUNITZ, LONDON 1999
 216 s., 238 obr., ISBN 1-85317-705-9, cena GBP 75,-

Do devadesátých let panovala v klasifikaci non-Hodgkinských lymfomů nejednotnost, projevující se především používáním různých systémů v Evropě a Americe. K jejímu odstranění přispěla spolupráce hematopatologů celého světa, díky níž vznikla nová klasifikace nazývaná „Revised European American Lymphoma (REAL) classification“. V ní došlo k opuštění předchozího principu třídění pouze podle histologického obrazu a k vytvoření nového systému kombinujícího morfologické a klinické charakteristiky. Jsou zde zahrnuty i nově poznané subtypy non-Hodgkinských lymfomů, k nimž patří mantle-cell lymfom, anaplastický velkobuněčný lymfom a MALT lymfom. Nová klasifikace má spolu s mezinárodním prognostickým indexem velký význam pro stanovení odpovídající léčby a určení prognózy pacientů.

Cílem recenzované knihy je popsat významné charakteristiky hlavních subtypů non-Hodgkinských lymfomů zařazených do REAL klasifikace. Kapitoly popisující jednotlivé subtypy non-Hodgkinských lymfomů a lymfoidních leukémii jsou seřazeny podle četnosti jejich výskytu. Navíc jsou zde uvedeny i extranodální lymfomy, Hodgki-

nova choroba a vzácné jednotky, z nichž některé nejsou zařazeny v nové klasifikace, ale přesto mohou být příležitostně diagnostikovány. Složení všech kapitol je podobné - definice a zařazení subtypu, četnost výskytu, popis patologie zahrnující histologické, imunofenotypové a genetické informace, klinická charakteristika, léčba a přehled literatury. Tato textová část zabírající obvykle okolo deseti stran je napsána srozumitelně, důležité informace jsou navíc seřazeny do přehledných tabulek. Po ní následuje atlas typických histologických obrazů podobného stranového rozsahu. Všechny obrazy jsou barevné, otištěné ve vynikající kvalitě. Zahrnují nálezy z různých orgánů (nejčastěji lymfatických uzlin) i různé způsoby barvení. Jsou doplněny výstižnými popisy. Obrazová část je bohatá a zcela opravňuje označení knihy jako atlas. V závěrečném rejstříku jsou zvlášť uvedeny odkazy na text a na obrazy, což usnadňuje orientaci v knize. Dílo čtyř významných odborníků v této oblasti se jistě stane vítanou pomůckou hematologů, onkologů a hematopatologů. Velmi přehledným a názorným způsobem seznamuje s novou klasifikací lymfomů a přináší důležité informace pro tvorbu léčebných plánů. Pro zájemce je od stejného nakladatele k dispozici i soubor 200 diapozitivů založený na obrazech tohoto atlasu (ISBN 1-85317-838-1).

Adresa nakladatelství: Martin Dunitz Ltd, The Livery House, 7-9 Pratt Street, London NW1 0AE, Great Britain.

M. Heřman

původní práce

SYMPTOMATICA PARENTERÁLNÍ ANTIPYRETICKÁ LÉČBA U ONKOLOGICKY NEMOCNÝCH - SROVNÁNÍ METAMIZOLU, DICLOFENACU A PROPACETAMOLU

SYMPTOMATIC INTRAVENOUS ANTIPYRETIC THERAPY IN CANCER PATIENTS-COMPARISON OF METAMIZOL, DICLOFENAC AND PROPACETAMOL

OBOŘILOVÁ A., MAYER J., POSPÍŠIL Z.¹, KOŘÍSTEK Z., VORLÍČEK J., HAVRANOVÁ D.

II. INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO-BOHUNICE

¹KATEDRA MATEMATICKÉ ANALÝZY, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERSITY, BRNO

Souhrn: *Východiska:* Horečka a její symptomatická terapie je v onkologii velmi častý problém. Druh léku a cestu aplikace limitují jednak časté poruchy perorálního příjmu v důsledku zvracení a mukositivity, jednak trombocytopenie a poruchy koagulace. *Typ studie a soubor* Cílem studie bylo srovnat efekt, toleranci a nežádoucí účinky jednorázové dávky antipyretika, podaného intravenózně. V pěti ramenech studie byly hodnoceny u 254 febrilních epizod tyto preparáty: metamizol 2500 mg versus metamizol 1000 mg versus diclofenac 75 mg versus propacetamol 1000 mg versus propacetamol 2000 mg. *Metody a výsledky:* Účinnost antipyretika byla hodnocena z poklesu tělesné teploty v čase. Teplota byla měřena před podáním antipyretika tj. v čase 0 minut a dále ve 30., 60., 90. a 120. minutě po jeho aplikaci. Další sledované parametry byly: zmírnění symptomů provázejících horečku a tolerance léku při aplikaci. Ve všech ramenech studie byl pokles teploty po podání léku statisticky významný, avšak byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi skupinami. Nejsilněji a nejrychleji působil metamizol á 2500 mg (průměrný pokles v čase T60 min o 1,06 °C a T120 min o 1,62 °C), nejslabší byl pak propacetamol á 1000mg (průměrný pokles v čase T60 min o 0,69 °C a T120 min o 1,10 °C). Nejlépe tolerovaným lékem byl diclofenac a metamizol (jak 2500 mg, tak i 1000 mg). Ustup symptomů provázejících horečku po aplikaci antipyretika byl alespoň mírný u 82 % pacientů, přičemž nebyl prokázán významný rozdíl mezi rameny studie. *Závěry:* Všechna sledovaná antipyretika byla dostatečně účinná. Nejúčinnějším byl sledován metamizol á 2500 mg, který byl také spolu s diclofenacem nejlépe tolerovaným lékem. Po všech antipyreticích byla pozorována významná subjektivní úleva. Z klinického hlediska bychom mohli doporučit v této indikaci také diclofenac, propacetamol á 2000 mg a zejména metamizol á 1000 mg (pro srovnatelný antipyretický efekt, avšak podstatně nižší dávku a tím i nižší riziko nežádoucích účinků).

Klíčová slova: Diclofenac, Metamizol, Propacetamol, Intravenous antipyretics, Symptomatic antipyresis

Summary: *Backgrounds:* Fever and its symptomatic therapy are very frequent problems in oncology. The type of drug and way of its administration are limited both by inability of peroral intake (due to vomiting and/or mucositis) and by severe thrombocytopenia with disorder in coagulation. *Design and Subjects:* The aim of this study was to compare single-dose administered intravenous antipyretic drugs in efficacy, tolerance and in adverse effects in 254 febrile events. Our study had five arms in which the following drugs were evaluated: metamizol 2500 mg versus metamizol 1000 mg versus diclofenac 75 mg versus propacetamol 1000 mg versus propacetamol 2000 mg. *Methods and Results:* The efficacy of antipyretics was evaluated on the basis of decrease of body temperature in time. The temperature was measured before administration of drug, at time 0 in time 0 minutes and at 30, 60, 90 and 120 minutes after administration. We also observed the following parameters: the elimination of symptoms associated with fever and tolerance during application of drug. The reduction of body temperature was statistically meaningful after administration of each drug in this study, however, there are significant differences found among arms. Metamizol 2500 mg affected most powerfully and rapidly (average reduction of temperature was in time T60 min. 1,06 °C and in time T120 min. 1,62 °C), diclofenac, metamizol á 1000 mg and propacetamol á 2000 mg were less efficient, propacetamol á 1000 mg had the significantly weakest efficacy (average reduction of temperature was in time T60 min. 0,69 °C and in T120 min. 1,10 °C). Diclofenac and metamizol (both in dose 2500 mg and 1000 mg) were tolerated best. The elimination of symptoms accompanying fever was at least mild in 82% patients, and at the same time without significant differences among arms of study. *Conclusions:* All examined drugs were sufficiently efficient in symptomatic antipyretic therapy. Metamizol 2500 mg was found the most efficient and with diclofenac were the best tolerated drug. A considerable degree of subjective relief was observed after all antipyretics. From the clinical point of view, we recommend in this indication diclofenac, propacetamol 2000 mg and metamizol 1000mg too. The administration of metamizol 1000mg has sufficient antipyretic effect and considerable lower risk of agranulocytosis.

Keywords: Diclofenac, Metamizol, Propacetamol, Intravenous antipyretics, Symptomatic antipyresis

Úvod

Horečka se vyskytuje u více než 30% onkologicky nemocných, u hematologických malignit je její podíl ještě vyšší (37). Příčinou bývá infekce (50-70 %), vlastní nádorové onemocnění

(5%), reakce na podání léku, krevního derivátu apod. (18). Ve febrilní neutropénii, při které klesá počet granulocytů pod $1 \times 10^9/l$, bývá horečka nezářidka jediným příznakem i velmi těžké infekce. Základem zůstane vždy kauzální léčba horečky,

avšak významná je i terapie symptomatická. Obecně se uznává, že horečka je součástí evoluční obranné reakce organismu a má tedy pro svého nositele pozitivní význam (12,21,41,22,26,21). Nadto zvýšení tělesné teploty do 41 °C je, dle literárních údajů, pro lidský organismus bez patologických následků (10). Na druhé straně nebyl však dosud prokázán jednoznačně škodlivý efekt tlumení horečky (12,41,10), i když se v různých studiích potvrdila fakta jako např.: snížení imunologické odpovědi organismu, zvýšení virulence mikrobů a tím morbidity hostitele (10,41,23,14), zkreslení diagnózy, toxicita a nežádoucí účinky antipyretik atd. Symptomatické tlumení horečky podporují naopak argumenty: značný diskomfort pacientů při horečce (bolesti hlavy, kloubů a svalů, nauzea apod.), objektivně pak dehydratace, zvýšení metabolického obrátu včetně spotřeby kyslíku, významná zátěž kardiovaskulárního systému, neurologické poruchy včetně febrilních křečí apod. (12,41,10,25,15).

U onkologicky nemocných, zvláště pak u pacientů po transplantaci kostní dřeně, kteří jsou často malnutriční a celkově vyčerpaní, mohou převažovat negativní dopady horečky nad jejím profitem. Tady považujeme symptomatickou antipyretickou léčbu za plně indikovanou. Navíc sami nemocní, dle literatury a dle našich pozorování (viz dále), vyžadují tlumení horečky pro celkový diskomfort a pociťují úlevu po jejím zmírnění či úplném odstranění (28,23).

Vzhledem k častým komplikacím jako jsou mukositivity, zvracení, trombocytopenie a poruchy koagulace, je výběr vhodného antipyretika i způsob podání značně limitován. Kyselina acetylsalicylová není přijatelná (zvláště u hematologicky nemocných), neboť ireverzibilně blokuje destičkovou cyklooxygenázu a tudíž značně zvyšuje riziko krvácení. Indometacin, jinak výborné antipyretikum, by mohl svým dlouhým působením a účinkem (více než 12 hodin) příliš zakrýt horečku - často jediný příznak infekce u neutropenických pacientů. Diclofenac, metamizol a propacetamol v intravenózní formě, jsou akceptovatelná antipyretika i u těžce trombocytopenických pacientů s mukositidami.

Metamizol je pyrazolonový derivát s analgetickými, antiflogistickými, spazmolytickými a antipyretickými účinky, který je běžně používán ve všech těchto indikacích. Mechanismus jeho antipyretického účinku není přesně znám, pravděpodobně působí přímo v CNS a skrze periferní inhibici syntézy a uvolňování endogenních pyrogenů. Po parenterálním podání je hydrolyzován na aktivní metabolit metylaminoantipyrin, jehož biologický poločas je 3,2 hod. Vylučuje se převážně ledvinami. Nežádoucí účinky jsou ojediněle alergická reakce až šok a při rychlé intravenózní aplikaci hypotenze. Velmi obávaným a limitujícím je výskyt těžké, někdy i fatální agranulocytózy. Dle literatury byla kauzální souvislost prokázána, vznik agranulocytózy po metamizolu lze však označit za velmi vzácný (1,29,31,17). Přesto je jeho používání v některých zemích zakázáno.

Diclofenac je derivát kyseliny octové ze skupiny nesteroidních antirevmatik, s výraznými antiflogistickými, analgetickými, antipyretickými a antiagregačními vlastnostmi. Podstatou všech jeho účinků je blokáda syntézy prostaglandinů a dalších mediátorů zánětu včetně reverzibilní inhibice destičkové cyklooxygenázy (13). Po parenterálním podání je dosaženo maximálních plazmatických koncentrací za 10-20 min., poločas diclofenacu je asi 1-3 hod (závisí na rychlosti infuze), vylučuje se především ve formě glukuronátu močí, jedna třetina stolicí. Nežádoucí účinky jsou většinou mírné a přechodné: gastrointestinální potíže, aktivace peptického vředu a krvácivé komplikace vyplývající z jeho antiagregačního potenciálu, dále cefalea, vertigo, ospalost, alergické reakce, lokální reakce v místě aplikace, elevace jaterních enzymů (1,40,31,27).

Propacetamol je bioprekurzor paracetamolu (též acetaminofen), analgetikum a antipyretikum, které je slabým inhibitorem prostaglandinů a nemá signifikantní antiflogistické účinky.

Po parenterálním podání je do 15 minut hydrolyzován na účinný paracetamol, přičemž 1 g propacetamolu odpovídá 0,5 g paracetamolu. Poločas v plazmě je 2-3 hod., metabolizován je v játrech a vylučován převážně močí v konjugované formě. Nežádoucí účinky jsou: vzácně alergické kožní reakce, hepato- a nefrotoxicita s nekrózou hepatocytů a tubulárních buněk vedoucí až k hepatorenálnímu selhání, dále lokální bolest v místě injekce (33,34,38,31).

Cíl práce:

V této studii jsme chtěli porovnat antipyretika s odlišným mechanismem účinku: metamizol, diclofenac a propacetamol. Účinnost každého z výše jmenovaných léků byla v antipyretické indikaci opakovaně ověřena, avšak v publikovaných studiích se jednalo o soubory neonkologických pacientů a také o jiné než o intravenózní preparáty (33,43,2,8,14,3,32,40,42,28).

Navzdory tomu, že je horečka každodenním problémem nejen na onkologických odděleních, existuje o této specifické problematice velmi málo exaktních dat. Patrně jediná studie tohoto typu byla provedena u 24 pediatrických onkologických pacientů s propacetamolem (33). Proto jsme se rozhodli porovnat účinnost, toleranci a míru subjektivní úlevy u tří odlišných parenterálních antipyretik (ve dvou případech i v různých dávkách) právě u onkologicky nemocných a doplnit tak chybějící informace nutné pro optimální symptomatickou terapii horečky v této indikaci.

Vedlejším cílem studie bylo zhodnocení subjektivních obtíží pacientů při horečce a jejich odstranění po podání antipyretika, neboť jsme v literatuře nenalezli studii, která by se detailně zabývala zhodnocením diskomfortu pacientů při horečce a efektem antipyretické léčby z tohoto pohledu. Součástí několika srovnávacích studií byly však hodnoceny například stupeň úlevy, chuť k jídlu, tělesná aktivita apod (23,11,28).

Metody:

Studie byla prováděna od května 1996 do května 1998 u pacientů hospitalizovaných na hematologicko-onkologické klinice v Brně-Bohunicích. Celkový počet febrilních epizod byl 254 s tělesnou teplotou minimálně 38 °C, která byla měřena v axile. Vylučovacím kritériem byla jediná známá alergická reakce na některý preparát studie. Všichni pacienti byli současně léčeni empiricky nebo cíleně antibiotiky. Studie měla 5 ramen: skupina č. 1 zahrnovala 54 pacientů, kteří dostávali diclofenac v dávce 75 mg (Voltaren inj.® Novartis) v krátkodobé intravenózní infúzi, skupina č. 2 zahrnovala 50 pacientů, kterým byl aplikován metamizol v dávce 2500 mg (Novalgin inj.® Hoechst), skupina č. 3 s 50 pacienty, kteří dostávali metamizol v dávce 1000 mg (Novalgin inj.® Hoechst) rovněž v krátkodobé intravenózní infúzi, skupina č. 4 zahrnovala 50 pacientů, kterým byl podáván propacetamol v dávce 1000 mg (Pro-Dafalgan inj.® Bristol-Myers Squibb) a skupina č. 5 s 50 pacienty, kteří dostávali propacetamol v dávce 2000 mg (Pro-Dafalgan inj.® Bristol-Myers Squibb) pomalou nitrožilní injekcí. Jednotlivé preparáty byly podávány jeden po druhém, tzn. nejprve byl 54 pacientům podán diclofenac, potom dalším 50 metamizol a 2500 mg atd. Teplota byla měřena v axile po dobu minimálně 5 minut sklo-rtuťovým lékařským teploměrem a to před podáním antipyretika a dále ve 30., 60., 90. a 120. minutě po aplikaci. Doba aplikace krátkodobé infuze byla 20-25 minut, intravenózní injekce trvala minimálně 1 minutu. Dále byly sledovány parametry: snášenlivost léku při aplikaci (stupnice: celková reakce, lokální reakce, žádná reakce, nelze určit), míra subjektivní úlevy po snížení horečky (stupnice: žádná, mírná, značná, nelze určit) - tyto údaje formou dotazníku poskytl sám pacient.

Kvalitativní znaky v jednotlivých ramenech studie (tzn. věk, pohlaví, tolerance a stupeň úlevy, diagnóza, příčina horečky) byly srovnávány chi-kvadrát testem a Fisherovým LSD testem mnohočetného srovnání. Porovnání výchozích teplot a po

podání antipyretika bylo provedeno pomocí párového T-testu, znaménkového testu a nebo Wilcoxonova testu. Vliv léku na snížení teploty v čase byl testován dvoucestnou analýzou variance s testováním významnosti interakce. Pro zvýšení objektivity porovnání účinku antipyretik byl vytvořen nový kvalitativní znak - pokles teploty v 60. minutě po aplikaci alespoň o 0,7 °C a ve 120. minutě alespoň o 1,3 °C. Tyto kvalitativní znaky byly porovnány chi-kvadrát testem. Součástí studie byl i dotazník zaměřený na obecný význam horečky, na její subjektivní vnímání, na význam a úlevu symptomatického snížení horečky. Celkem bylo dotázáno 45 respondentů, kteří současně byli zařazeni do studie, dotazník obsahoval 10 otázek výběrového typu. Výsledky byli sumarizovány bez statistické analýzy, neboť pouze doplňují hlavní záměr a podporují oprávněnost této studie (viz tabulka č. 5).

Výsledky:
DEMOGRAFICKÉ A VSTUPNÍ PARAMETRY:
 Studie zahrnuje 254 febrilních epizod u pacientů ve věku 12 až 84 let, z toho 123 mužů a 131 žen s různou základní diagnózou (skupiny diagnóz: 1. akutní leukemie a myelodysplastický syndrom, 2. jiná onkologická diagnóza, 3. jiné neonkologické onemocnění) a s minimální axilární teplotou 38 °C, která byla různé příčiny (skupiny: 1. febrilní neutropenic, 2. infekce, 3. jiná příčina).
 Všechny skupiny studie byly srovnávány ve věku, pohlaví a výchozí teplotě (tj. před aplikací antipyretika), viz tabulka č. 1. Jednotlivé skupiny se významně Ušily v zastoupení mužů a žen ($p = 0,043$, chi-kvadrát 9,85), v průměrném věku ($p = 0,21$). Průměrné teploty v čase 0 min. se u jednothých ramen rovněž statisticky významně Ušily ($p = 0,024$).

Tabulka č. 1: Demografické a vstupní parametry souborů

Skupina antipyretika	Celkem	Počet pacientů Muži	Ženy	Průměrný věk	Medián věku	Minimální věk	Maximální věk	Průměrná teplota v čase 0 min.
DICLOFANAC 75 mg	54	32	22	47,03	44,73	18	65	38,54
METAMIZOL 2500mg	50	24	26	52,58	52,00	19	84	38,63
METAMEOL 1000 mg	50	26	24	50,20	55,00	23	70	38,38
PROPACETAMOL 1000 mg	50	15	35	50,08	48,50	19	79	38,35
PROPACETAMOL 2000 mg	50	26	24	46,36	43,42	12	84	38,48

Tabulka & 2: Struktura souborů podle zastoupení diagnóz a příčiny horečky

Zastoupení v souborech	podle typu diagnózy			podle příčiny horečky		
Skupina antipyretika	MDS + leukemie	ostatní malignity	neonkol. choroby	infekční příčina	febrilní neutropenic	jiná příčina
DICLOFANAC 75 mg	61 %	35 %	4 %	32 %	41 %	27 %
METAMIZOL 2500mg	68 %	28 %	4 %	24 %	42 %	34 %
METAMEOL 1000 mg	20 %	60 %	20 %	56 %	20 %	24 %
PROPACETAMOL 1000 mg	62 %	28 %	10 %	28 %	46 %	26 %
PROPACETAMOL 2000 mg	58 %	36 %	6 %	26 %	46 %	28 %

Tabulka č. 3: Dynamika poklesu tělesné teploty po podání antipyretika

Skupina antipyretika	Průměrný pokles teploty v čase ve stupních Celsia					Rozdíl teploty	
	0. min.	30. min.	60. min.	90. min.	120. min.	0.-60. min.	0.-120. min.
DICLOFANAC 75 mg	38,54	38,18	37,75	37,33	36,96	0,791	1,578
METAMTZOL 2500mg	38,63	38,13	37,57	37,21	37,01	1,058	1,622
METAMIZOL 1000mg	38,38	37,99	37,55	37,25	36,98	0,824	1,394
PROPACETAMOL 1000 mg	38,35	38,03	37,65	37,44	37,25	0,698	1,104
PROPACETAMOL 2000 mg	38,48	38,16	37,81	37,36	37,06	0,662	1,416

Tabulka č. 4: Tolerance a míra úlevy po podání antipyretika

Skupina antipyretika	Nežádoucí reakce během aplikace léku				Míra subjektivní po podání antipyretika			
	žádné	lokální	celkové	nelze říci	žádná	mírná	značná	nelze říci
DICLOFANAC 75 mg	96 %	2 %	2 %	0 %	6 %	72 %	22 %	0 %
METAMIZOL 2500mg	92 %	0 %	4 %	4 %	2 %	64 %	30 %	4 %
METAMIZOL 1000 mg	100 %	0 %	0 %	0 %	16 %	60 %	24 %	0 %
PROPACETAMOL 1000 mg	82 %	10 %	6 %	2 %	16 %	64 %	18 %	2 %
PROPACETAMOL 2000 mg	70 %	10 %	20 %	0 %	8 %	60 %	32 %	0 %

Tabulka č. 5: Dotazník - Subjektivní vnímání horečky pacienti

Otázka číslo/odpověď	A	B	C	D	E	F	G
1. Co rozumíte pod pojmem horečka - zvýšení tělesné teploty v podpaží nad:	37 °C	37,5 °C	38 °C	38,5 °C	39 °C	nevím	—
2. Kdy jste naposledy měl horečku minimálně 38 °C:	poslední 24 hod.	minulý týden	minulý měsíc	minulý rok	nevím	-	-
3. Myslíte, že horečka je pro lidský organismus:	velmi užitečná	spíše užitečná	nemá význam	spíše škodí	výrazně škodí	nevím	-
4. Myslíte si, tlumení horečky je třeba:	vždy	někdy	nikdy	nevím	-	-	-
5. Od jaké teploty těla byste tlumil(a) horečku:	37 °C	37,5 °C	38 °C	38,5 °C	39 °C	nikdy bych netlumil	nevím
6. Při horečce pociťujete průvodní příznaky:	žádná změna	celková slabost	bolesti svalů	zimnice třasavky	nevolnost zvracení	závratě únava	jiné
7. Sám byste při horečce usiloval(a) o její snížení:	vždy	někdy	nikdy	nevím	-	-	-
8. Po úmyslném snížení horečky cítíte úlevu:	velkou	střední	velmi mírnou	žádnou	spíše zhoršení	nevím	-

Zastoupení diagnóz mezi rameny studie (chi-kvadrát 33,79, $p = 0,00004$) a stejně tak zastoupení příčin horečky bylo významně různé (chi-kvadrát 17,43, $p = 0,026$). Viz tabulka č. 2.

Přes statistickou signifikanci jsou absolutní rozdíly vstupních parametrů mezi skupinami malé a tudíž pravděpodobně bez klinické relevance.

ZHODNOCENÍ ÚČINNOSTI, TOLERANCE A VEDLEJŠÍCH REAKCÍ PŘI PODÁNÍ ANTIPYRETIKA

Vzhledem k významným rozdílům ve vstupních kvalitativních znacích (viz výše) mezi jednotlivými rameny byl vliv jednotlivých preparátů na snížení teploty v čase testován pomocí dvoucestné analýzy variance s testováním významnosti interakce. Samostatný vliv každého léku na pokles teploty je statisticky signifikantní ($F=2,74$), vliv léku se v různých časových intervalech měření teploty (tj. 0., 30., 60., 90. a 120. min.) průkazně lišil ($F = 1,76$).

Byl vypočítán rozdíl mezi výchozí teplotou a teplotou v 60. minutě po aplikaci léku, průměrný pokles byl pak testován jednocestnou analýzou variance. Takto byly prokázány signifikantní rozdíly v poklesech teplot ($F = 3,83$) mezi rameny studie, přičemž největší pokles byl pozorován oproti všem ostatním skupinám po metamizolu a 2500 mg (dle Fisherova LSD testu mnohočetného porovnání) a nejmenší pokles, významně odlišný oproti ostatním skupinám, byl prokázán po propacetamolu v dávce 1000 mg.

Dále byl vytvořen nový kvalitativní znak pro pokles teploty v 60. minutě alespoň o 0,7 °C a ve 120. minutě alespoň o 1,3 °C. Tyto znaky byly dále srovnávány u jednotlivých ramen chi-kvadrát testem. Statisticky nejvýznamnější pokles byl po metamizolu a 2500 mg a to v 60. i ve 120. minutě po jeho aplikaci, nejméně výrazný efekt byl po propacetamolu a 1000 mg. Přehledně jsou data znázorněna v tabulce č. 3 a grafy č. 1 a č. 2.

Dalším sledovaným kritériem byla tolerance preparátu v průběhu podání a bezprostředně po něm. Údaje poskytli pacienti volbou ze škály: 1. žádné potíže, 2. lokální potíže (bolest či pálení v místě vpichu), 3. celkové komplikace (dušnost, cefalea, nauzea...), 4. nelze určit. Současně byli pacienti dotazováni na míru úlevy po podání antipyretika, opět volbou ze škály: 1. žádná úleva, 2. mírná, 3. značná, 4. nelze určit (viz tabulka č. 4 a grafy č. 3 a č. 4).

VÝSLEDKY DOTAZNÍKU:

45 pacientů ze studie bylo dotazováno, formou výběrových otázek, na názory týkající se subjektivního prožívání horečky a významu jejího tlumení. Celkem dotazník obsahoval 10 otázek,

včetně základních personálních údajů, na které respondenti odpovídali anonymně. Podstatné závěry uvádíme:

Pacienti považují za horečku minimální teplotu měřenou v podpaží: 37 °C v 13,3 %, 37,5 °C v 29 %, 38 °C a více v 57,7 %. Horečku shledali pacienti obecně pro lidský organismus za velmi užitečnou v 6,7%, za spíše užitečnou ve 22,2%, za spíše škodlivou 60,1%, nedokázali posoudit v 11,1%.

Pacienti sami by snižovali horečku vždy v 37,8 %, alespoň někdy v 60%, nikdy v 0 % a nedokázali se vyjádřit ve 2,2 %. Při teplotě nad 38 °C by snižovali pacienti horečku v 88,9%. Při výskytu horečky mělo 100% respondentů nějaké obtíže: celkovou slabost udávalo 35,6%, myalgie a artralgie 37,6 %, nechutenství s nauseou nebo zvracením 17,8%, cefaleu či závratě 4,4 %, jiné obtíže uvedlo 6,7 %

Po symptomatickém snížení horečky pocítilo úlevu alespoň mírnou 86,7 % pacientů (značnou 26,8 %, střední 44,4 % a mírnou 15,5 %).

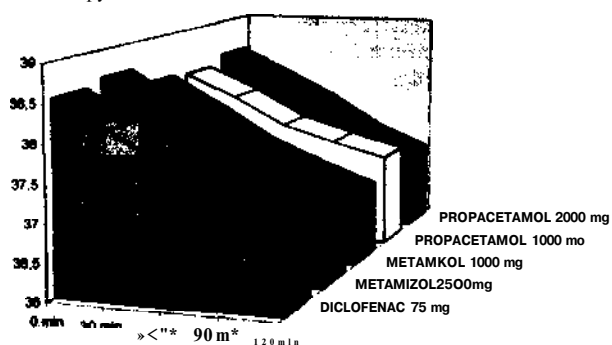
Diskuse:

Navzdory obecnému pojetí horečky jako prospěšné reakce organismu, hodnotíme symptomatickou antipyretickou terapii, alespoň z hlediska onkologicky nemocných, za plně oprávněnou. Mírní nežádoucí doprovodné příznaky horečky: zvýšenou spotřebu kyslíku, která je spojena s hyperventilací a následnými ztrátami tekutin, snižuje zvýšený metabolický obrát, jehož důsledkem je katabolismus svalů a negativní dusíková bilance, dále tachykardii a zvýšený srdeční výdej, stejně jako neurologické příznaky (zmatenost, delirantní stavy apod.) (15,26). Navíc, dle našich vlastních šetření, pacienti považují horečku za škodlivou v 61%, a domnívají se, že její snížení je prospěšné v 90 % a dále snížení horečky jim v 87 % přináší pocit úlevy (viz výše).

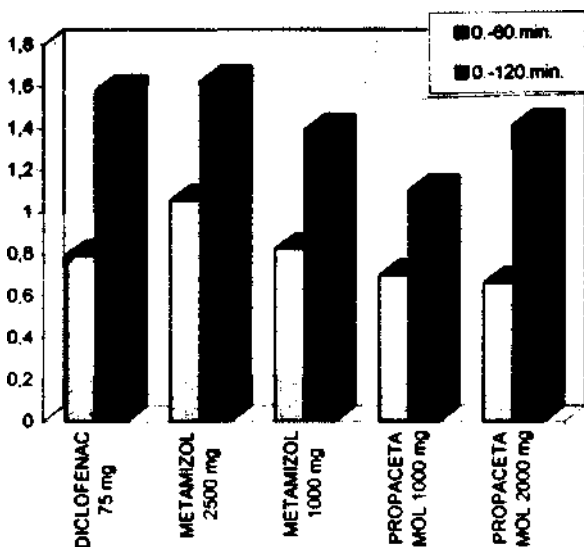
Z možných antipyretických prostředků nepovažujeme u našich pacientů za vhodné veškeré fyzikální metody, které jednak způsobují diskomfort pacientů a navíc sekundárně vedou k reaktivnímu zvýšení teploty (10, 41). Kortikoidy nejsou akceptovatelné pro jejich imunosupresivní a komplexní metabolické účinky a rovněž kyselina acetylosalicylová pro ireverzibilní blokádu trombocyty cyklooxygenázy a značné riziko krvácení. Preparáty typu indometacinu ze skupiny NSA, mají příliš dlouhý biologický poločas a účinek, který by mohl tlumit horečku příliš dlouho a tím zakrýt důležitý diagnostický symptom.

Metamizol i diclofenac se jeví z těchto aspektů jako vhodné a byly osvědčené jak dle literárních sdělení (8,2, 32), tak i dle našich vlastních zkušeností. Oba preparáty mají však svá rizika. Po podání metamizolu je to těžká až fatální agranulocytóza, jejíž asociace byla jasně prokázána (29), ale považuje-

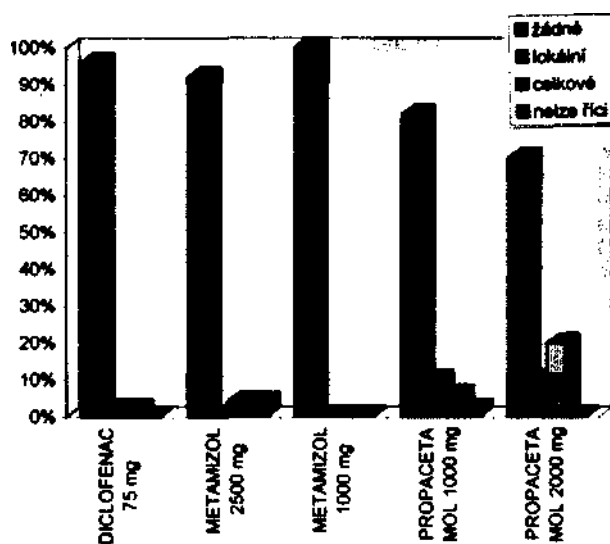
Graf & 1: Dynamika poklesu tělesné teploty ve stupních Celsia v čase po podání antipyretik



Grafč. 2: Rozdíl v poklesu tělesné teploty v 60. a 120. minutě po podání antipyretika

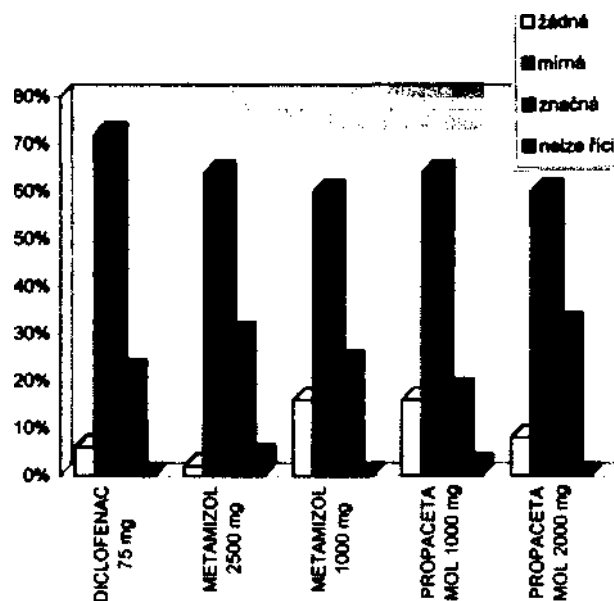


Grafč. 3: Výskyt nežádoucích reakcí během podání léku



je se za vzácnou (1,17). Diclofenac může způsobit krvácivé komplikace, které jsou ale mnohem mírnější než u kyseliny acetylosalicylové a také než u jiných NSA (27). Další nevýhodou diclofenacu jako i ostatních NSA je častá iritace GIT. Navzdory výše uvedeným rizikům jsme u našich pacientů nepozorovali ani zhoršení krvácivých projevů ani GIT-toxicitu, což ovšem může být dáno masivní antiemetickou tera-

Grafč. 4: Míra subjektivní úlevy po podání antipyretika



pií a korekci trombocytopenie v rámci léčby základního onemocnění. Propacetamol se zdál být vhodnou alternativou, neboť neovlivňuje ani destičky ani koagulaci, nepoškozuje krvetvorbu a rovněž je stran GIT dobře snášen. Obávaným rizikem je popisovaná fatální hepatotoxicita, pozorovaná zejména po podání vysoké jednorázové dávky. Dle literatury je dávka nad 150 mg/kg/24 hod (tj. asi 10-15 g za 24 hod) prokazatelně toxická, avšak ne smrtelná, úmrtí byla pozorována po dávkách vyšších než 300 mg/kg/24 hod (38). Toto riziko je v klinické praxi zanedbatelné, neboť běžně užívané dávky jsou 1-2 g pro dospělou osobu (v případě propacetamolu je to dokonce 0,5-1g paracetamolu pro dospělou osobu) a frekvence podání dosahuje maximálně 4-6x denně.

Podle našich výsledků efekt jednotlivé dávky je prokazatelně horší u propacetamolu 1000mg, naproti tomu u metamizolu 2500mg je nejlepší. Pokud se týká výsledků jiných studií, lze vcelku říci, že za účinné jsou považovány všechny tři preparáty, což je v souladu i s našimi závěry. Odlišné jsou ale výsledky srovnávající účinnost jednotlivých preparátů navzájem. Například studie, na souboru 150 dětí s neonkologickými diagnózami, srovnávající antipyretický efekt paracetamolu (50 mg/kg/24 hod, rozděleně 6x, tj. jednotlivě, dávka 1-1,5g) a ibuprofenu (20 mg/kg/24 hod, rozděleně 6x), neprokázala žádný významný rozdíl (28), zatímco podobná studie, u 127 neonkologických pediatrických pacientů, porovnávající efekt ibuprofenu v jednotlivé dávce 5 a 10 mg/kg vs efekt paracetamolu v jednotlivé dávce 10 mg/kg (tj. asi 0,5-1g) vs placebo, jasně zhodnotila ibuprofen i v dávce 5 mg/kg jako účinnější než paracetamol, i ten však měl signifikantně větší efekt než placebo (43). Závislost velikosti účinku na dávce u i.v. paracetamolu (Pro-Dafalgan 15 a 30 mg/kg) byla hodnocena na souboru 24 onkologicky nemocných dětí, přičemž se vyšší dávka jevila účinnější, ale rozdíl nebyl statisticky významný (33). V naší studii jsme naopak prokázali významně rozdílný efekt mezi odpovídajícími dávkami propacetamolu (viz výše). Nutno poznamenat, že při podání propacetamolu 2000 mg byli pozorováni lokální nežádoucí reakce téměř výhradně po i.v. injekcích, po infuzní aplikaci (ke které jsme z tohoto důvodu později přistoupili) se však prakticky nevyskytly. Tato zkušenost nebyla však statisticky zpracována. Diclofenac a metamizol byly v jedné srovnávací studii (soubor 20 dětí ve věku 3-8 let, diclofenac supp. 25 mg vs metamizol supp. 350 mg) hodnoceny jako stejně efektivní (2), avšak v jiné pediatrické studii (122 dětí ve věku 0,4-10 let)

srovnávající metamizol vs diclofenac (1 mg/kg) vs paracetamol byl pozorován signifikantně větší a rychlejší efekt po diclofenacu (8). Diclofenac účinně snížil horečku i v mnohem nižší jednotlivé dávce (0,2 mg/kg i.v.) než standardně užívané (amp. á 75 mg, tj. asi 1mg/kg pro dosi), což publikoval Pesenti (32).

Úleva navozená symptomatickým snížením horečky byla pozorována minimálně u 82% pacientů, přičemž alespoň 18% pociťovalo značnou úlevu a to i u nejméně efektivního preparátu. I když celkový diskomfort pacienta provázející horečku může být často jedinou indikací symptomatické antipyretické léčby, jsou k dispozici jen ojedinělé práce zabývající se zhodnocením úlevy navozené antipyretiky. V dostupné literatuře byla nalezena data, která jsou v souladu s našimi výše uvedenými výsledky např., McIntyre ve srovnávací studii ibuprofen vs paracetamol zhodnotil mimo jiné změnu v klinickém stavu dětí po podání antipyretika jako celkově zlepšen (28). Další práce hodnotila úlevu navozenou podáním paracetamolu rovněž u dětských pacientů a v antipyretické indikaci: zřetelně byla zlepšena aktivita a bdělost dětí, ale nálada, úleva,

chuť k jídlu byly bez významného efektu oproti podanému placebo (23).

Závěr:

Z našeho šetření vyplývá, že neúčinnější antipyretický efekt má metamizol á 2500 mg, nejslaběji působí propacetamol á 1000 mg. Diclofenac á 75 mg, metamizol á 1000 mg a propacetamol á 2000 mg jsou zhruba stejně účinná antipyretika. Mezi různými dávkami jak propacetamolu tak i metamizolu byl prokázán signifikantní rozdíl. Úleva po podání antipyretika byla statisticky významná po podání každého preparátu, avšak mezi rameny studie není v tomto ohledu rozdíl. Tolerance testovaných léků byla signifikantně odlišná, nejlépe tolerovaným byl metamizol á 2500 mg i 1000 mg a diclofenac, nejvíce nežádoucích účinků bylo pozorováno po podání propacetamolu 2000mg (ve formě intravenózní infekce).

Z klinického pohledu se domníváme, že v symptomatické léčbě horečky, navzdory prokázaným rozdílům v účinnosti, lze úspěšně použít všechna uvedená antipyretika s výjimkou propacetamolu á 1000 mg.

Literatura

- Adam D., Stankov G.: Treatment of fever in childhood. Eur J. Pediatr. 1994; 153: 394-402.
- Armellini P. A.: Study comparing the antipyretic potency of diclofenac potassium and dipyron magnesium in children. Invest. Med. Im. (Mex.) 1984; 11:126-129.
- Bertini R., Grossi E., Rapazzini P.: Diclofenac sodium versus acetylsalicylic acid: a randomized study in febrile patients. J. Int. Med. Res. 1986; 14:95-100.
- Bock H. E.: Fieberzustände-diagnostische und therapeutische Problematik. Med. Welt. 1989; 40:1109-11.
- Brown R. D., Wilson J. T.: Quantification of Fever. Clin. Pediatrics 1992:228-229.
- Brtick K.: Fieber-biokybernetische Vorstellungen und neurophysiologische Grundlagen. Med. Welt 1989; 40:1112-19.
- Burke M., Merdler C.: Thermometry. In Isaac B, Kernbaum S, Burke M. eds. Unexplained Fever. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc, 1991; 33-39.
- Cedrato A. E., Passarelli L., Cimollini L.: Comparison of the antipyretic effect of a single dose of dipyron, paracetamol and diclofenac resinate. A multicenter clinical trial. Medicina (RA). 1989; 49:635-636.
- Cocceani F., Lees J., Redford J.: Interleukin-1 receptor antagonist: effectiveness against interleukin-1 fever. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1992; 70:1590-1596.
- Drwal-Klein L. A., Phelps J.: Antipyretic therapy in the febrile child. Clin. Pharm. 1992; 11: 1005-1021.
- Eskenrud J. R., Hofvedt B. O., Laerum E.: Fever: Knowledge, Perception and Attitudes. Results from a Norwegian Population Study. Family Practice 1991; 8: 32-36.
- Fischler M. P., Reinhart W. H.: Fieber: Freund oder Feind? Schweiz. Med. Wochenschr 1997; 127:864-870.
- Gewirtz A. M., Schick B.: Platelet Production and Function. In Colman W, ed. Hemostasis and Thrombosis, Philadelphia J. B. Lippincott Company, 1994:694-5.
- Graham N. M., Burrell C. J., Douglas R. M.: Adverse effects of aspirin, acetaminophen, and ibuprofen on immune function, viral shedding and clinical status in rhinovirus-infected volunteers. J. Infect. Dis. 1990; 162:1277-82.
- Greisman S. E.: Cardiovascular Alterations During Fever. In Mackowiak PA ed. Fever: Basic Mechanisms and Management, New York: Raven Press, 1991: 143-165.
- Hibberd P. L., Rubin R. H.: Fever in Immunocompromised Host. In Mackowiak PA, ed. Fever: Basic Mechanisms and Management, New York: Raven Press, 1991: 197-218.
- Kaufman D. W., Kelly J. P., Levy M.: The Drug Etiology of Agranulocytosis and Aplastic Anemia, New York Oxford University Press, 1991:170-203.
- Kernbaum S.: Unexplained Fever in the Immunocompromised Patient. In Isaac B, Kernbaum S, Burke M, eds. Unexplained Fever, Boca Raton, Florida: CRC Press Inc, 1991:355-64.
- Klein N. C., Cunha B. A.: Treatment of fever. Infect. Dis. Clin. North. Am., 1996; 10:211-216.
- Kluger M. J.: Fever Revisited. Pediatrics, 1992; 90: 846-850.
- Kluger M. J., Kozak W., Conn C. A.: The adaptive value of fever. Infect. Dis. Clin. North. Am. 1996; 10:1-20.
- Kozak W.: Fever: A possible strategy for membrane homeostasis during infection. Perspective in Biology and Medicine 1993; 37:14-34.
- Kramer M. S., Naimark L. E., Roberts-Brauner R: Risks and benefits of paracetamol antipyresis in young children with fever of presumed viral origin. Lancet 1991; 337:591-4.
- Leatherman J. W., Schmitz P. G.: Fever: Hyperdynamic Shock, and Multiple-System Organ Failure (A pseudo-sepsis syndrome associated with chronic salicylate intoxication). Chest 1991; 100:1391-96.
- Mackowiak A. P.: Fever: Blessing or Curse? Unifying Hypothesis. Ann. Intern. Med. 1994; 120:1037-1040.
- Mackowiak P. A., Wasserman S. S., Levine M. M.: A Critical Appraisal of 98,6°F, the Upper Limit of the Normal Body Temperature, and Other Legacies of Carl Reinhold August Wunderlich. JAMA 1992; 268: 1578-1580.
- Matzke G. R.: Nonrenal Toxicities of Acetaminophen, Aspirin, and Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents. Am. J. Kidney Dis. 1996; 28, Suppl.1: 63-70.
- McIntyre J., Hull D.: Comparing efficacy and tolerability of ibuprofen and paracetamol in fever. Arch. Dis. Child. 1996; 74:164-167.
- Mihajlovic G.: Recall of metamizole from the market in countries with modern pharmacotherapy. Srp. Arh. Celok. lek. 1996; 124:44-46.
- O'Donnell O., Axelrod P., Fisher C.: Use and Effectiveness of Hypothermia Blankets for Febrile Patients in the Intensive Care Unit. Clin. Inf. Dis. 1997; 27: 1208-13.
- Payan D. G.: Nonsteroid analgetics. In Katzung BG, ed. Basic and Clinical Pharmacology, 5th ed., San Francisco: Prentice Hall International Inc, 1994: 511-35.
- Pesenti A., Riboni A., Basilico E.: Antipyretic therapy in ICU patients: evaluation of low dose diclofenac sodium. Intensive Care Med. 1986; 12: 370-373.
- Reymond D., Birrer P., Liithy A. R.: Antipyretic effect of parenteral paracetamol (propacetamol) in pediatric oncologic patients: A Randomized Trial. Ped. Hematol. Oncol. 1997; 14: 51-57.
- Roach J. A., Stacey B.: Acetaminophen toxicity. Orthop. Nurs. 1997; 16:49-55.
- Rosenthal T. C., Silverstein D. A.: Fever. What to do and what not to do. Postgrad. Med. 1988; 83:75-84.
- Saper C. B., Breder C. D.: The Neurologic Basis of Fever. New Eng. J. Med. 1994; 330:1880-86.
- Schachter J.: Fever in Oncology. In Isaac B, Kernbaum S, Burke M, eds. Unexplained Fever., Boca Raton Florida: CRC Press Inc, 1991; 381-5.
- Shan F. Paracetamol: When, Why and How Much. J. Ped. Child Health 1993; 29: 84-85.
- Shenep J. L., Adair J. R., Hughes W. T.: Infrared, Thermistor and Glass-mercury Thermometry for Measurement of Body Temperature in Children With Cancer. Clin. Ped. 1991; Suppl. April: 36-41.
- Small R. E.: Diclofenac sodium. Clin. Pharm. 1989; 8:545-58.
- Styr B., Sugarman B.: Antipyresis and fever. Arch. Intern. Med. 1990; 150: 1589-97.
- Vargas R., Maneatis T., Bynum L.: Evaluation of the Antipyretic Effect of Ketorolac, Acetaminophen, and Placebo in Endotoxin-Induced Fever. J. Clin. Pharmacol. 1994; 34:848-853.
- Walson PD, Galletta G, Braden NJ. Ibuprofen, acetaminophen and placebo treatment of febrile children. Clin. Pharmacol. Ther. 1989; 46:9-17.
- Wehmeier A., Kliche K. O.: Fieber: Ausdruck der zytokinvermittelten Abwehrreaktion, Dtsch. Med. Wschr. 1992; 117:1105-110.

CYTOMEGALOVIROVÁ INFEKCE U DĚTÍ SE ZHOUBNÝM NÁDOROVÝM ONEMOCNĚNÍM: OD SÉROLOGIE K PRŮKAZU VIROVÉ DNA.

CYTOMEGALOVIRUS INFECTION IN CHILDREN WITH CANCER: FROM SEROLOGY TO VIRAL DNA DETECTION.

MICHÁLEK J.¹, HORVÁTH R.², BENEDÍK J.², HRSTKOVÁ H.¹

¹ Dětská interní a onkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno;

² Genetická laboratoř, Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie, Brno.

Souhrn: Cytomegalovirová infekce u dětí se zhoubným nádorovým onemocněním: od sérologie k průkazu virové DNA. **Východiska:** Cytomegalovirová infekce je jednou z příčin morbidity a mortality u dětí léčených pro zhoubné nádorové onemocnění. V poslední době se v diagnostice CMV vedle sérologického vyšetření stále častěji uplatňuje vysoce citlivá a rychlá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR). **Typ studie a soubor:** Sérologickými metodami (IgG, IgM - proti CMV) bylo testováno 186 dětí s leukémií, solidními nádory, lymfomem nebo histiocytózou. Z toho 70 pacientů bylo vyšetřováno metodou PCR na přítomnost cytomegalovirové DNA v krvi. Výsledky sérologického i PCR vyšetření byly hodnoceny semikvantitativně. **Metody a výsledky:** Sérologickými metodami nebyly nalezeny významné rozdíly v promořenosti CMV mezi onkologickými pacienty v době stanovení diagnózy a zdravou kontrolou. Promořenost onkologických pacientů po léčbě byla ve srovnání s kontrolním souborem významně vyšší ($p < 0,01$). V průběhu protinádorové léčby byl zaznamenán signifikantní nárůst promořenosti CMV. Výsledky detekce CMV DNA metodou PCR z plné krve se senzitivitou 98,4% velmi dobře rozlišují mezi symptomatickou infekcí a asymptomatickou perzistencí viru. PCR pozitivní byli všichni symptomatictí pacienti (18/18), ale pouze jeden z 62 zdravých kontrol. PCR pozitivita byla detekována v 1-5 týdenním předstihu před pozitivitou sérologickou. **Závěry:** Detekce CMV infekce metodou PCR zpřesňuje diagnostiku potíží neznámé etiologie u imunosuprimovaných dětských pacientů a zlepšuje možnosti jejich terapie.

Klíčová slova: Cytomegalovirus, PCR, onkologie, diagnostika

Summary: Human Cytomegalovirus Infection in Children with Cancer: From Serology to Viral DNA Detection. **Background:** Cytomegaloviral infection is an important cause of morbidity and mortality in children treated for cancer. Recently, rapid and highly sensitive polymerase chain reaction (PCR) has been used in the diagnostics of such infections. **Design and subjects:** A group of 186 children with leukemia, solid tumors, lymphoma or histiocytosis were tested serologically (CMV-IgG, IgM) and 70 of them were tested for CMV DNA in blood, both semiquantitatively. **Methods and results:** No significant difference in seropositivity was found between healthy controls and cancer patients at the beginning of treatment. At the end of anticancer treatment, the seropositivity of cancer patients was significantly higher than in healthy controls ($p < 0,01$), suggesting a high rate of CMV infection during anticancer treatment. The results of PCR detection of CMV (with 98,4% sensitivity) correlates with clinical symptoms of infection. All symptomatic patients (18/18) and only one of 62 healthy controls were PCR positive. Furthermore, the PCR positivity was detected 1-5 weeks before detection of seroconversion. **Conclusions:** Detection of CMV DNA by PCR improves the diagnosis of complications of unknown origin in children with cancer and offers the possibility of their treatment.

Key words: human cytomegalovirus, PCR, oncology, cancer, diagnostics

Úvod

Onkologický pacient je imunosuprimován samotným nádorovým procesem a následně pak ještě jeho léčbou, čímž je vystaven zvýšenému riziku oportunní infekce (1). Jednou z příčin morbidity a mortality pacientů léčených pro zhoubné nádorové onemocnění, zejména při použití intenzivních režimů protinádorové léčby je cytomegalovirus (CMV) (2-5). Promořenost dospělé populace cytomegalovirem se pohybuje kolem 70%. Primární infekce probíhá většinou asymptomaticky v dětství a virus pak zřejmě perzistuje v hostiteli až do konce života (6). Méně často může CMV infekce probíhat pod obrazem syndromu infekční mononukleózy. Při CMV infekci v těhotenství může dojít k přenosu infekce na plod a ke vzniku kongenitální CMV infekce provázené mentální retardací, mikrocefalií, slepotou a hluchotou (6). U imunosuprimovaných pacientů bývá CMV infekce často provázena intersticiální pneumonií, hepatitidou, esofagitidou, gastroen-

terokolitidou, dřeňovou aplazií, encefalitidou a chorioretinitidou (3-7). Pacienti po transplantaci kostní dřeně nebo orgánové transplantaci jsou nejvíce ohroženi pneumonitidou, která ještě před 10 lety byla s 80% letální (8). Pacienti s rozvinutým AIDS trpí často CMV kolitidou, chorioretinitidou a postižením CNS (6,7).

Stanovení diagnózy CMV infekce u imunosuprimovaných pacientů je na základě samotného klinického pozorování prakticky nemožné, neboť klinické projevy jiné oportunní infekce mohou být velmi podobné (2,5). Proto je nutné potvrdit klinické podezření laboratorními vyšetřeními, která vedou ke spolehlivému určení příslušného infekčního agens. Laboratorní diagnostika virových infekcí, zejména u imunosuprimovaných jedinců je však velmi obtížná, což může být také jedním z důvodů malé znalosti úlohy virů při komplikacích u onkologických pacientů. Donedávna byla virologická diagnostika omezena na metody sérologické a kulturační. Sérologická

vyšetření jsou však zatížena vysokým rizikem falešně negativních výsledků v důsledku nedostatečné tvorby specifických protilátek při poškození imunitního systému hostitele během protinádorové léčby. Navíc, u malých dětí předškolního věku, je tvorba protilátek v průběhu akutní virové infekce ve třídě IgM nedostatečná nebo zcela chybí (6,7,9). Jindy naopak můžeme dostat falešně pozitivní výsledky na základě zkřížené reaktivity, zejména mezi různými herpetickými viry (6). Kultivační vyšetření je velmi pracné a zdlouhavé a nehodí se k diagnostice akutně probíhající infekce (10). Zavedení techniky "shell-vial assay" sice podstatně zkrátilo délku kultivace, senzitivita tohoto vyšetření je však stále nedostatečná (10,11).

Naštěstí s rozvojem molekulární biologie se od počátku 90. let rychle rozvíjí i diagnostika virů, používající metody polymerázové řetězové reakce (PCR), kterou lze prokázat přítomnost virové DNA v jakémkoliv biologickém materiálu (15, 22, 23). Poslední zkušenosti ukazují, že při srovnání detekce cytomegalovirové DNA v plasmě metodou PCR (PCR z plasmy), detekce cytomegalovirové DNA z plné krve nebo z leukocytů periferní krve (PCR z plné krve nebo leukoDNAemie) a detekce antigenemie (přítomnost virově specifických antigenů v krvi, např. časného antigenu CMV matrix pp65), nejlépe koreluje s klinickou symptomatickou CMV infekcí u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci kostní dřeně, či po orgánové transplantaci nález virové DNA v plné krvi, nebo v leukocytech periferní krve (10,12,13). Další výhodou PCR detekce virové DNA je její rychlost a vysoká citlivost vyšetření, která v indikovaných případech umožňuje včasné zahájení protivirové léčby a tím dosažení její vyšší účinnosti.

Diagnostiky s využitím metody PCR bylo použito v kombinaci se sérologickým vyšetřením i ve zde předkládaném souboru dětských onkologických pacientů, kteří byli léčeni konvenční protinádorovou léčbou bez transplantace kostní dřeně, či periferních kmenových buněk, neboť dosud nebyla publikována práce, která by se v tomto rozsahu zabývala průběhem CMV infekce u těchto pacientů.

Cíl práce

Cílem práce je porovnat citlivost a specificitu stanovení CMV infekce u onkologických dětských pacientů metodami imunologické detekce protilátek a detekci CMV DNA v krvi pacientů a ukázat přednosti druhé z uvedených metod pro včasnou detekci nebezpečí CMV nemoci.

Metody

Hodnocený soubor obsahoval 186 dětí ve věku od 4 měsíců do 18 let, z toho 101 chlapců a 85 dívek léčených na 1. Dětské interní a onkologické klinice Fakultní nemocnice Brno od června 1993 do září 1998 s diagnózami: leukemie, včetně myelodysplastického syndromu, 77 dětí (41,4%), solidní nádory 58 dětí (31,2%), lymfomy 42 dětí (22,6%) a histiocytózy 9 dětí (4,8%) podle aktuálních léčebných protokolů BFM (Berlin-Frankfurt-Münster), SIOP (International Society of Pediatric Oncology) a POG (Pediatric Oncology Group) používaných pediatricko-onkologickými pracovišti západní Evropy a U.S.A. Soubor 186 pacientů byl rozčleněn do 4 věkových kategorií: 0-2 roky (25 pacientů), 2-6 let (49 pacientů), 6-12 let (52 pacientů) a 12-18 let (60 pacientů). Soubor 116 pacientů léčených od roku 1993 do září 1996 byl vyšetřen retrospektivně sérologicky na přítomnost specifických protilátek proti CMV ve třídě IgM a IgG metodou ELISA (9). Soubor 70 pacientů léčených od října 1996 do září 1998 byl vyšetřen prospektivně sérologicky stejně jako v retrospektivním souboru a nově byla zavedena metoda PCR k diagnostice přítomnosti cytomegalovirové DNA v plné krvi.

Metoda PCR spočívala v detekci specifické cytomegalovirové DNA ve vzorku plné krve. V případě střední a silné positivity (nálezu minimálně 10^2 kopií CMV v $1\mu\text{g}$ izolované DNA z plné krve) bylo provedeno také vyšetření $100\mu\text{l}$ plasmy pro

průkaz volných virových částic v plasmě (14,15). Sérologické vyšetření CMV a vyšetření metodou PCR od svého zavedení bylo prováděno u všech sledovaných pacientů:

- v době stanovení onkologické diagnózy;
- při klinickém podezření na infekci CMV kdykoliv v průběhu protinádorové léčby;
- v době ukončení protinádorové léčby.

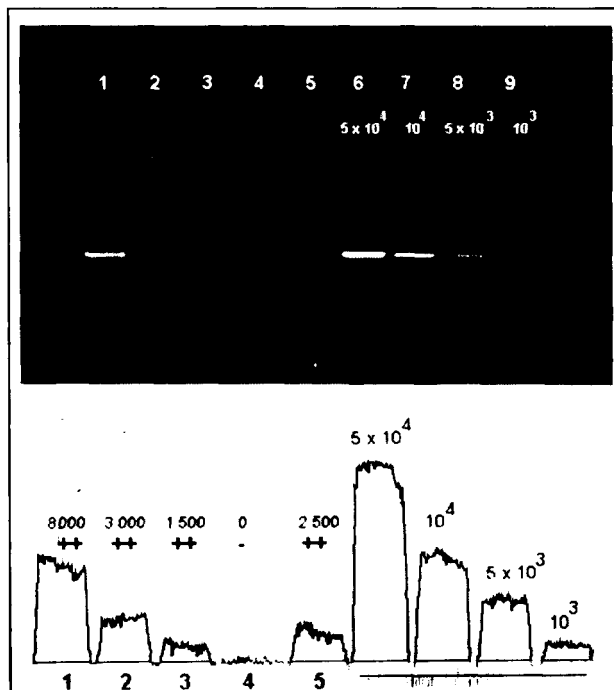
Do souboru vyšetřovaných pacientů nebyli zahrnuti pacienti, kteří podstoupili transplantaci kostní dřeně či periferních kmenových buněk.

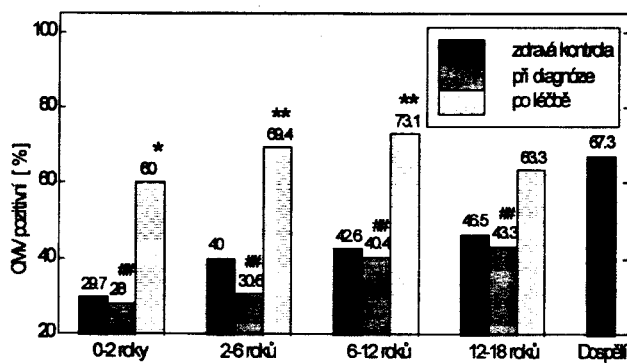
Klinické podezření na infekci virem CMV v průběhu protinádorové léčby bylo vzneseno na základě klinických či laboratorních známek vyskytujících se při CMV infekci: horečka bez známek bakteriální či mykotické infekce, protrahované subfebrilie, lymfadenopatie, hepatosplenomegalie, hepatopatie, protrahovaná aplazie kostní dřeně, lymfopenie, atypická lymfocytóza, atypická pneumonie a nebakteriální gastroenteritida, pokud nebyla nalezena jiná příčina těchto obtíží. Hodnocení sérologického i PCR vyšetření bylo prováděno semikvantitativně: + pozitivita odpovídala slabé sérologické pozitivitě a nálezu pod 10^2 kopií CMV (v $1\mu\text{g}$ DNA izolované z plné krve), ++ pozitivita odpovídala středně silné sérologické pozitivitě a nálezu $10^2 - 10^4$ kopií CMV v $1\mu\text{g}$ DNA izolované z plné krve), +++ pozitivita odpovídala silné sérologické pozitivitě a nálezu více než 10^4 kopií CMV (v $1\mu\text{g}$ DNA izolované z plné krve). Na obr. 1 je ukázka analýzy 5 pacientů pomocí digitální kamery Ultralum a software Scion Image.

Jako kontrolní pro sérologické vyšetření sloužil soubor 318 dětí a adolescentů ve věku od 4 měsíců do 18 let a 165 dospělých ve věku od 19 do 78 let. Metodou PCR bylo vyšetřeno 62 dětí a adolescentů ve věku od 4 měsíců do 18 let. U všech těchto osob bylo hlavním důvodem odběru krve jiné vyšetření a tyto vyšetřované osoby nejevily v době odběru známky ani akutního horečnatého ani infekčního onemocnění.

Pro statistické zpracování bylo použito McNemarova testu a χ^2 testu (16).

Obr. 1. Ukázka semikvantifikace pozitivních výsledků PCR detekce CMV Dráhy 1 – 5 pacienti s vyznačenou intenzitou záhytu Dráhy 6 – 9 ředící řada kontrolního plazmidového konstrukturu (hodnoty udávají počet kopií virové DNA v 1 g lidské DNA izolované z plné krve, tedy asi 3×10^5 leukocytů)



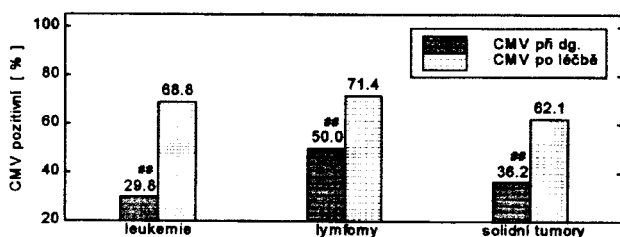


Obr. 2: Promořenost virem CMV podle věku.

* ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$): statisticky významný rozdíl na 5%, resp. 1% hladině významnosti mezi souborem pacientů v době ukončení protinádorové léčby (v legendě označeno „po léčbě“) a souborem zdravých, věkově odpovídajících kontrol („zdravá kontrola“).

($p < 0,05$), ## ($p < 0,01$): statisticky významný rozdíl na 5%, resp. 1% hladině významnosti mezi souborem pacientů v době stanovení onkologické diagnózy (v legendě označeno „při diagnóze“) a souborem pacientů v době ukončení protinádorové léčby.

Na ose x jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny (věk v letech) včetně kontrolní skupiny zdravých dospělých. Na ose y je procentuálně znázorněna sérologická pozitivita CMV ve třídě IgG.



Obr. 3: Promořenost virem CMV podle diagnózy.

($p < 0,01$): statisticky významný rozdíl na 1% hladině významnosti mezi souborem pacientů v době stanovení onkologické diagnózy (v legendě označeno „CMV při dg.“) a souborem pacientů v době ukončení protinádorové léčby (v legendě označeno „CMV po léčbě“). Na ose x jsou znázorněny jednotlivé skupiny pacientů podle diagnózy: leukémie (77 pacientů), lymfomy (42 pacientů) a solidní nádory (58 pacientů). Na ose y je procentuálně znázorněna sérologická pozitivita CMV ve třídě IgG.

Výsledky

Sérologické vyšetření

Nejprve byla srovnávána se zdravou kontrolou promořenost virem CMV na základě sérologické positivity ve třídě IgG u populace dětí se zhoubným nádorem v době stanovení onkologické diagnózy, tj. před jakoukoliv onkologickou léčbou, a poté v době ukončení komplexní protinádorové léčby. Výsledky tohoto sledování pro jednotlivé věkové kategorie ukazuje obr. 2. Z obrázku je zřejmé, že v době stanovení diagnózy zhoubného nádoru u dětí není statisticky významných rozdílů v promořenosti virem CMV ve srovnání se zdravou kontrolou v žádné věkové kategorii. Všechny věkové kategorie jsou však statisticky významně více promořeny virem CMV v době ukončení protinádorové léčby než před jejím zahájením v době stanovení onkologické diagnózy ($p < 0,01$). Kromě věkové kategorie 12-18 letých je také významný rozdíl v promořenosti CMV mezi kontrolním souborem a souborem 0-2letých ($p < 0,05$), 2-6letých a 6-12letých ($p < 0,01$) po skončení léčby. Promořenost dětské populace po léčbě zhoubného nádoru se tak ve všech věkových kategoriích blíží promořenosti dospělé populace.

Při rozdělení pacientů podle jednotlivých diagnóz (obr.3) je ve všech třech skupinách pacientů s leukémiemi, lymfomy a solidními nádory patrný signifikantní nárůst promořenosti CMV (charakterizovaný přítomností protilátke ve třídě IgG proti CMV) v průběhu protinádorové léčby ($p < 0,01$). Nejmarkantnější je tento nárůst u pacientů s leukémií. Skupi-

na histiocytóz nebyla pro malý počet pacientů statisticky hodnocena.

Hodnocena byla také pozitivní sérokonverze (pacient CMV IgG negativní v době stanovení onkologické diagnózy, u kterého došlo po léčbě k CMV IgG pozitivitě, aniž by proběhla infekce byla klinicky zaznamenána) a negativní sérokonverze (pacient CMV IgG pozitivní v době stanovení onkologické diagnózy, který je dále CMV IgG i IgM negativní). K pozitivní sérokonverzi došlo u 46 (27,4%) pacientů, k negativní sérokonverzi v průběhu léčby došlo u 11 (5,9%) pacientů a v době ukončení léčby u 3 (1,6%) pacientů. V době stanovení onkologické diagnózy byla sérologicky zjištěna recentní CMV infekce u 1 pacienta s leukémií. V průběhu protinádorové léčby pak bylo zachyceno 7 pacientů (2 s leukémií, 1 s histiocytózou I. třídy, 1 s nonhodgkinským lymfomem a 3 se solidním tumorem) se sérologicky potvrzenou recentní CMV infekcí. V laboratorním nálezu se poměrně často objevovala lymfopenie, nízký počet CD4 pozitivních lymfocytů a „převrácený“ poměr CD4/CD8, tj. menší než 1,0.

Vyšetření metodou PCR

Vyšetření na přítomnost specifické cytomegalovirové DNA z plné krve bylo provedeno opakovaně u všech 70 pacientů v prospektivním souboru a u 62 zdravých kontrol. Celkem bylo vyšetřeno 215 vzorků krve onkologických pacientů, tedy průměrně 3,07 vzorku na jednoho pacienta a jednorázově 62 vzorků kontrolního souboru. Výsledky shrnuje tab.1. Z tabulky je zřejmé, že nastavená senzitivita metody PCR, která činí 98,4%, velmi dobře odráží rozlišení mezi symptomatickou infekcí a asymptomatickou perzistencí CMV. Pouze v jednom případě z 62 zdravých kontrol byla nalezena přítomnost CMV DNA v krvi, zatímco jeho přítomnost byla potvrzena u všech 18 symptomatických onkologických pacientů. Z těchto 18 PCR pozitivních pacientů měl pouze jeden pacient s leukémií pozitivní na +++ zjištěnou akutní virémií (virová DNA i v plazmě), zatímco u 17 ostatních se jednalo o nález cytomegalovirové leukoDNAemie. PCR pozitivních bylo v době stanovení onkologické diagnózy 5 pacientů s leukémií a 1 pacient s histiocytózou II. třídy. V průběhu protinádorové léčby byla přítomnost CMV DNA v krvi zjištěna u 4 pacientů s leukémií, u 2 pacientů s non-hodgkinským lymfomem a u 7 pacientů se solidním tumorem, přičemž 1 pacient s leukémií měl reaktivaci CMV infekce v průběhu protinádorové léčby.

Srovnání sérologického a PCR vyšetření

Srovnání sérologického a PCR vyšetření na CMV je uvedeno v tab. 2, která ukazuje rozdíly mezi retrospektivním souborem pacientů vyšetřeným pouze sérologicky a prospektivním souborem vyšetřeným jak sérologicky, tak metodou PCR. Z tabulky jednoznačně vyplývá, že použití metody PCR k detekci CMV DNA v prospektivním souboru výrazně přispělo k objasnění příčin symptomatické CMV infekce. Při srovnání pro-

Tab. 1: Semikvantitativní hodnocení PCR pozitivních vyšetření na přítomnost cytomegalovirové DNA v plné krvi a plazmě onkologických pacientů a zdravých kontrol.

Stupeň positivity PCR*	Pacienti (n = 70)	Zdravá kontrola (n = 62)
+	16	1
++	7	0
+++	1	0
virémie (PCR pozitivita ve 100 µl plasmu)	1	0
Celkový počet PCR pozitivních vzorků	25	1
Počet PCR pozitivních jedinců	18 (25,7 %)	1 (1,6 %)

* Uváděn je stupeň positivity zachytu cytomegalovirové DNA v 3×10^5 leukocytech periferní krve. Číselné hodnoty v tabulce uvádějí počty pozitivních vzorků krve a plasmu kromě posledního řádku, kde je udán počet pacientů, resp. zdravých kontrol, s PCR pozitivním nálezem cytomegalovirové DNA.

Tab. 2: Srovnání retrospektivního a prospektivního vyšetření dětí se zhoubným nádorem

Sledovaná charakteristika s uvedením počtu pozitivních pacientů (v závorkách je uveden údaj v procentech)	Celkem 1993-1998 (n = 186)	Retrospektivně 1993-1996 (n = 116)	Prospektivně 1996-1998 (n = 70)
Pozitivní sérokonverze*	46 (24,7 %)	32 (27,6 %)	10 (14,2%)
Negativní sérokonverze po léčbě	3 (1,6 %)	1	2
Negativní sérokonverze v průběhu léčby	11 (5,9%)	6	5
Dokumentovaná symptomatická C M V infekce (sérologicky a/nebo PCR)	25 (13,4 %)	7 (6 *)	18 (25,7%)
Celkový počet laboratorně zjištěných symptomatických a asymptomatických C M V infekcí**	71 (38,2 %)	39 (33,6 %)	28 (40 %)

* Ve skupině „pozitivní sérokonverze“ jsou zahrnuti pouze pacienti, kteří nejsou ve skupině „dokumentovaná symptomatická C M V infekce“

** Jedná se o součet „pozitivní sérokonverze“ a „dokumentované symptomatické C M V infekce“

spektivního a retrospektivního souboru se prokázalo výrazné zvýšení počtu pacientů s PCR a sérologicky dokumentovanou symptomatickou C M V infekcí. Naopak ubylo pacientů s pozitivní sérokonverzí, tedy těch, u kterých C M V infekce proběhla asymptomaticky a nebo nebyla v průběhu protinádorové léčby zachycena.

Potvrdila se i vysoká predikční schopnost PCR detekce, která umožňuje zachytit C M V infekci o několik týdnů dříve, než se projeví první klinické i sérologické příznaky. Všichni pacienti v prospektivním souboru, kteří měli sérologicky prokazatelnou C M V infekci byli již v době o 1 - 5 týdnů dříve PCR pozitivní na přítomnost C M V DNA v krvi.

Klinický průběh CMV infekce

Laboratorně byla C M V infekce zjištěna celkem u 71 (38,2%) pacientů, z toho dokumentovaná C M V infekce sérologicky, nebo PCR metodou byla celkem u 25 (13,4%) pacientů. U 6 pacientů v době stanovení onkologické diagnózy, u 18 pacientů v průběhu protinádorové léčby a u 1 pacienta v době stanovení onkologické diagnózy s reaktivací v průběhu léčby. Nejčastěji se C M V infekce objevovala bezprostředně po proběhlém bloku protinádorové chemoterapie. Manifestovala se protrahovanými febriliemi nebo subfebriliemi nereagujícími na podání antibiotik a antimykotik, negativními bakteriálními a mykotickými nálezy z hemokultur, nízkými hodnotami C-reaktivního proteinu (markerů bakteriální infekce), protrahovanou nezvykle dlouhou a těžkou aplazií kostní dřeně i přes podávání růstových faktorů granulocyte, hepatopatii a gastroenteritidou. C M V pneumonie nebyla v našem souboru prokázána, i když u jednoho pacienta s leukemií, který prodělal oboustrannou bronchopneumonii v leukopenickém období v průběhu protinádorové léčby byla PCR zachycena C M V DNA v krvi. Diagnostická bronchoalveolární laváž však nebyla provedena, pacient měl tři dny poté pozitivní bakteriologický nálezy a po nasazení antibiotik došlo k ústupu bronchopneumonie.

Těžký průběh C M V infekce s protrahovanou aplazií kostní dřeně, hepatitidou a následnou bakteriální sepsí měli 3 pacienti s výrazným deficitem buněčné imunity s absolutním počtem CD4+ lymfocytů v periferní krvi nižším než $200 \times 10^6/l$. U pacientů s nálezem ++ nebo +++ PCR C M V pozitivita také často docházelo k těžkým bakteriálním a mykotickým infekcím, které probíhaly současně nebo následně po C M V infekci.

Rozhodování o léčbě C M V infekce ganciklovirem bylo prováděno v retrospektivním souboru na základě klinického průběhu infekce a sérologického vyšetření prokazujícího recentní C M V infekci. V prospektivním souboru byli ganciklovirem léčeni pouze symptomatictí pacienti s PCR pozitivitou na ++,

respektive +++. U pacientů s pozitivitou na + byl průběh infekce průběžně monitorován opakovaným PCR vyšetřením jedenkrát týdně a v případě kvantitativně prokazaného nárůstu C M V DNA v krvi byla zahájena 14 denní protivirová léčba ganciklovirem v dávce $2 \times 5 \text{ mg/kg}$ denně. Průběh infekce byl sledován do ústupu klinických potíží a do vymizení PCR pozitivitu 1 x týdně. Výsledky léčby ganciklovirem u dětských onkologických pacientů budou námětem samostatného sdělení.

Diskuze

Diagnostika cytomegalovirové infekce u imunosuprimovaných pacientů je značně obtížná. Klasické metody sérologické a kultivační jsou zatíženy značným rizikem falešně negativních výsledků (2-7). Zjištění nízké úspěšnosti zachytu C M V infekce sérologicky u imunosuprimovaných dětských onkologických pacientů potvrzuje také naše studie. V retrospektivním souboru, kdy laboratorní diagnostika byla založena pouze na sérologických testech, bylo zachyceno mnohem méně symptomatických infekcí než v prospektivně sledovaném souboru a zachytu C M V DNA pomocí PCR. Je však třeba zdůraznit, že sérologické vyšetření u dětských pacientů léčených standardní protinádorovou léčbou bez začlenění transplantace kostní dřeně má nadále zásadní význam v době stanovení onkologické diagnózy a v době ukončení protinádorové léčby, kdy tvorba protilátek není uměle ovlivněna. Ukazuje se, že více jak jedna třetina (38,2%) dětí prodělavá během protinádorové léčby C M V infekci, takže po jejím skončení se proměnost vyléčených pacientů blíží proměnosti dospělé populace.

Tato skutečnost je nepochybně způsobena zvýšeným rizikem C M V infekce během imunosupresivní protinádorové léčby a také opakovanými převody krevních derivátů, které i přes čištění deleukozitačními filtry mohou obsahovat malé množství potenciálně infikovaných leukocytů. Stálo by za úvahu, zda tedy neprovádět rutinní kontrolu krevních derivátů na přítomnost herpetických virů pomocí PCR v případech, kdy jsou podávány imunosuprimovaným pacientům.

V průběhu protinádorové léčby, zejména v leukopenickém období, kdy dochází k nejvýraznějšímu oslabení imunitního systému, je tvorba specifických protilátek opožděná, nebo zcela chybí. Podobná situace je popisovaná u pacientů po transplantaci kostní dřeně nebo po orgánové transplantaci, kdy dochází k silné imunosupresi a protilátkovou odezvu nelze očekávat (3,7,8). Dalším faktorem, který se podílí na falešně negativních sérologických výsledcích je věk pacientů. Zejména u kojenců a batolat do 2 let věku je nedostatečná tvorba specifických IgM protilátek a odhalení akutní C M V infekce je u nich značně obtížné (9). Na základě těchto skutečností, které potvrzuje i námi vyšetřovaný retrospektivní soubor pacientů, jsme v prospektivním souboru zařadili vyšetřování C M V DNA z krve velmi citlivou metodou PCR. Hlavní výhodou této metody, která je úspěšně používána k detekci C M V infekce u pacientů po transplantaci kostní dřeně, orgánové transplantaci a pacientů s AIDS (10,12,13,15), je vedle vysoké sensitivity a specificity také rychlost vyšetření, což umožňuje v případě potřeby zahájení protivirové léčby již za několik hodin po odběru biologického materiálu. Srovnání retrospektivního a prospektivního souboru ukazuje podstatně vyšší zachyt symptomatické C M V infekce s využitím PCR metody. Nárůst zachytu symptomatické C M V infekce jde na vrub sérologicky zjišťované pozitivní sérokonverze. Ve většině případů byl PCR pozitivní nálezy potvrzen se zpožděním 1 - 5 týdnů také sérologicky.

Klinický průběh C M V infekce u imunosuprimovaných pacientů lze velmi obtížně odlišit od jiných virových, bakteriálních nebo mykotických infekcí, které navíc mohou probíhat souběžně. O to větší význam má nálezy specifické DNA daného infekčního agens. Při testování korelace mezi klinickými příznaky C M V infekce a PCR nálezem C M V DNA v leukocy-

tech nebo plasmě, byla u pacientů po transplantaci kostní dřevě či orgánů největší shoda při testování leukocytů (10,12). Tuto zkušenost můžeme potvrdit i v našem souboru, kdy všichni klinicky symptomatictí pacienti byli pozitivní ze vzorku z plně krve, zatímco pouze jeden měl současně zjištěnou CMV DNA v plasmě.

Závěr

Závěrem lze tedy shrnout, že PCR detekce cytomegalovirové DNA v krvi a ostatních vzorcích biologického materiálu u imunosuprimovaných pacientů může výrazně zpřesnit diagnostiku potíží neznámé etiologie s nejednoznačnou symptomatologií a zlepšit tak možnosti jejich terapie.

Literatura

1. Pizzo P.A., Poplack D.G.: Principles and practice of pediatric oncology, ed 3, Philadelphia, JB Lippincott, 1997: 1069-71;
2. Chanock S.J., Pizzo P.A.: Infectious complications of patients undergoing therapy for acute leukemia: Current status and future prospects. *Semin. Oncol.* 1997, 24:132-40;
3. Wang F.Z., Dahl H., et al.: Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 1996,88:3615-3620;
4. Wingard J. R.: Viral infections in leukemia and bone marrow transplant patients. *Leuk. Lymphoma* 1993,11, p. 115;
5. Engelhard D., Marks M.I., Good R.A.: Infections in bone marrow transplant recipients. *J. Pediatr.* 1986,108: 335-46;
6. Alford C.A. Jr., Britt W.J.: Cytomegalovirus. In: Fields B.N., Knipe D.M., Chanock R.M., et al. (eds): *Virology*. New York, Raven Press 1985,629-60;
7. Drew W.L.: Nonpulmonary manifestations of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992, p. 204-10;
8. Reusser P.: Human cytomegalovirus infection and disease after bone marrow and solid organ transplantation. *Bailliere's Clin. Infect. Dis.* 1996,3: 357-71;
9. Stagno S., Tinker M. K., et al.: Immunoglobulin IgM antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infection in pregnant women and newborn infants. *J. Clin. Microbiol.* 1985,21:930-5;
10. Hebart H., Muller C., et al.: Monitoring of CMV infection: a comparison of PCR from whole blood, plasma-PCR, pp65-antigenemia and virus culture in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1996, 17: 861-8;
11. Paya C.V., Wold A. D., Smith T. F.: Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1987,25:755-7;
12. Gema G., Zavattoni M., et al.: Human cytomegalovirus (HCMV) leukoDNAemia correlates more closely with clinical symptoms than antigenemia and viremia in

- heart and heart-lung transplant recipients with primary HCMV infection. *Transplantation* 1998,65: 1378-85;
13. Souza I.E., Nicholson D., Matthey S., et al.: Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by the polymerase chain reaction and a nonradioactive probe. 1994,20: 13-19;
14. Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C., White T.J., eds: *Diagnostic molecular microbiology*. Washington. Am. Soc. Microbiol. 1993:641-50;
15. Dendis M., Horváth R., Černý J., Benedik J.: Využití genetických metod při detekci patogenů u komplikací po rozsáhlých chirurgických výkonech. *Rozhl. Chir.* 1998,77:567-73;
16. Anděl J.: *Statistické metody*. Matfyzpress, Praha 1994:154-6;
17. Einsele H., Ehninger G., et al.: Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 1995, 86:2815-20;
18. Jacobson J.A.: Treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1997,337:105-13;
19. Reddehase M.J., Dreher-Stumpp L., et al.: Hematopoietic stem cell deficiency resulting from cytomegalovirus infection of bone marrow stroma. *Ann. Hematol.* 1992,64: A127-7;
20. Taylor-Wiedman J., Sissons J.G., Borysiewicz L. K., Sinclair J.: Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 1991,72:2059-64;
21. Zhuravskaya T., Maciejewski J.P., et al.: Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: Model of HCMV latency. *Blood* 1997,90: 2482-91;
22. Horváth R., Benedik J., Černý J.: Detection of cytomegalovirus DNA in the walls of blood vessels. *Scripta Med. (Brno)* 1998,71:6.
23. Michálek J., Horváth R., Benedik J.: Infection of HHV-6 in pediatric cancer patients. *Scripta Med. (Brno)* 1998,71:6-7.

knihy

MOLECULAR BIOLOGY IN CANCER MEDICINE, SECOND EDITION

R. KURIRNCK, M. TAIPAZ (Eds.)

Martin Dunitz, London 1999

679 STR., 139 OBR., 97 TAB., ISBN 1-85317-676-1, CENA 65; GBP

Tvorby této aktuální knihy vycházející již ve druhém vydání se účastnilo 68 odborníků převážně z USA a Kanady, méně jsou zastoupeni autoři z Velké Británie, Švédska, Francie, Německa a Itálie. Editory jsou profesori z oddělení bioimunoterapie univerzity v Houstonu. 35 kapitol je uspořádaných do sedmi sekcí, je připojen slovníček použitých odborných výrazů a velmi podrobný rejstřík.

V první sekci je pouze jedna práce zabývající se nomenklaturou a klinickými aplikacemi nádorové cytogenetiky. Je pojednáno o chromosomálních abnormálních u hematologických malignit a maligních lymfoproliferativních onemocnění, o cytogenetice solidních nádorů a molekulární cytogenetice karcinomů. Cytogenetické změny poskytují informace užitečné v diagnostice, prognóze a péči o pacienta. Drahá část o klinických aplikacích laboratorních metod sestává ze dvou kapitol; první věnována klinickému použití a limitacím běžných molekulárních metodologií, druhá je přehledem o hematopoietickém systému, jeho regulaci a interakcím hematopoietickými růstovými faktory a elementy, jež se týkají stromatu. Ve třetí části o molekulární patogenezi nádorů jsou kapitoly o virech, onkogenech, defektech apoptózy a transkripčních faktorech. Malignity spojené s virovou infekcí se vyznačují dlouhou inkubační dobou mezi infekcí a klinicky poznatelným nádorem, nádorovým postižením jen malé části infikovaných jedinců a známkami účasti jiných genetických nebo environmentálních faktorů. Příma antivirová terapie může postihnout virové faktory v transformaci buněk a dovolit profylaktickou léčbu infikovaného pacienta za účelem zabránění potenciální malignitě. Kapitoly ve čtvrté části o molekulárních základech hematologických malignit se týkají chronické a akutní myeloidní leukémie, chronické a akutní lymfoidní leukémie a lymfomů řady Ta B.

Nejrozsáhlejší je sekce s 12 pojednáními o molekulárních základech solidních nádorů zahrnujícími nádory mozku (se zaměřením hlavně na astrocytomy), nádory prsu, kolorektální tumory, endokrinní nádory, hepatocelulární karcinomy, nádory plic, melanomy, nádory pankreatu a prostaty, epitelální nádory vaječníků, nádory ledvin, sarkomy. Skladba kapitol není příliš jednotná; zatímco např. v kapitole o nádorech plic je text rozdělen do odstavců o klinickém projevu, molekulární patogenezi a klinických aplikacích, kapitola o sarkomech je členěna do těchto částí: epidemiologické a histopatologické úvahy, dědičné syndromy spojené se sarkomy, environmentální faktory a sarkomy s genetickými alteracemi řízení buněčného cyklu. Tematikou posledních dvou částí jsou dědičné nádory (neurofibromatóza typu 1, retinoblastom, Wilmsův tumor, ataxie - teleangiectazie aj.) a genová terapie (léčba akutní promyelocytární leukémie, terapeutický potenciál inhibitorů Ras a inhibice rakovinných genů). Konstatuje se, že o úspěšné genové terapii se dosud nedá hovořit. Pomocí současných technologií se zatím nedaří dosáhnout obnovení funkce tumorsupresorových genů v každé nádorové buňce. Úspěšnějším postupem se zdá být inhibice funkce onkogenů malými molekulami, jež blokují receptory pro růstové faktory. Klinický výzkum věnuje značnou pozornost zlepšování imunogenicity celobuněčných vakcín genetickým inženýrstvím.

Text doprovázený výstižnými ilustracemi a rozsáhlými tabulkami přináší výtečný přehled důležitých molekulárních objevů v oblasti tumorigeneze a celkového pokroku v úsilí o vývoj genových léčebných metod, jež by mohly být zařazeny do spektra rutinně prováděných protinádorových postupů. Jedná se o dílo velmi užitečné pro onkology a hematology ve výzkumu i klinické praxi, pro studenty a účastníky postgraduálního vzdělávání. Na knize lze obdivovat jak vysokou odbornou úroveň, tak i přehledné uspořádání - to je ovšem charakteristické i pro ostatní publikace vydávané nakladatelstvím Martin Dunitz. Pro uživatele prvního vydání z r. 1995 je důležitá informace, že druhé vydání bylo podstatně novelizováno a rozšířeno.

Adresa nakladatelství: Martin Dunitz Ltd, The Livery House, 7-9 Pratt Street, London NW 1 London NW1 0AE, U K. V.H.

ENDOVASKULÁRNÍ BRACHYTERAPIE - PRVNÍ TECHNICKÉ ZKUŠENOSTI

ENDOVASCULAR BRACHYTHERAPY - EARLY TECHNICAL EXPERIENCES

DVOŘÁK J.¹, HŮLEK P.³, RAUPACH J.², VAŇÁSEK T.³, VAŇÁSEK J.¹, KRAJINA A.², MEDKOVÁ V.¹, STEJSKAL J.¹, ODRAŽKA K.¹, LOJÍK M.², MASKOVÁ J.², ŠAFKA V.³, VODNANSKÝ P.⁴, FRIDRICH J.⁴

¹ KLINIKA RADIOTERAPIE A ONKOLOGIE FN, HRADEC KRÁLOVÉ

² RADIODIAGNOSTICKÁ KLINIKA FN, HRADEC KRÁLOVÉ

³ I. INTERNÍ KLINIKA FN, HRADEC KRÁLOVÉ

⁴ ODDĚLENÍ KARDIOPULMONÁLNÍ A VASKULÁRNÍ DIAGNOSTIKY FN, HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn: Cévní restenózy jsou současným velkým problémem léčby cévních stenóz pomocí stentů a balónkové angioplastiky. Toto sdělení seznamuje s možností endovaskulární brachyterapie v prevenci cévních restenóz a zveřejňuje první zkušenosti s tímto způsobem aplikace brachyterapie v naší republice. Od března 1998 do července 1998 byla na Klinice radioterapie a onkologie ve spolupráci s intervenčními radiology, gastroenterology a angiology aplikována endovaskulární brachyterapie 2 pacientům s restenózou arteria poplitea a 3 pacientům s transjugulárním intrahepatálním portosystémovým zkratem. Endovaskulární brachyterapie byla všem pacientům aplikována vysokým dávkovým příkonem automatickým afterloadingem přístrojem Gammamed 12i. Bylo aplikováno jednorázové ozáření stenotického úseku cévy dávkou 12 Gy ve 3 mm od osy. Doba poléčebného sledování činila 82–159 dní. Ozářený úsek cévy byl sonograficky vyšetřen u všech pacientů. U 1 pacienta se vyskytla restenóza v léčeném úseku cévy 71 dní po aplikaci endovaskulární brachyterapie transjugulárního portosystémového zkratu. Všichni ostatní pacienti byli během doby poléčebného sledování bez restenózy. Naše zkušenost v souladu s literaturou prokazuje, že endovaskulární brachyterapie je bezpečnou, pro pracoviště radiační onkologie vybavené automatickým high dose rate afterloadingovým systémem, technicky schůdnou a pacienty dobře tolerovanou metodou. Nepozorovali jsme žádné nežádoucí účinky související s endovaskulární brachyterapií.

Klíčová slova: cévní restenózy, endovaskulární brachyterapie, afterloading, Iridium 192.

Summary: Vascular restenoses are a current problem in the treatment of vascular stenoses with stents and balloon angioplasty. This article introduces the possibility of endovascular brachytherapy in the prevention of vascular restenoses and describes the first experiences in this way of application of brachytherapy in the Czech Republic. Between March 1998 and July 1998 at the Department of radiotherapy and oncology in collaboration with interventional radiologists, gastroenterologists and angiologists we performed endovascular brachytherapy in 2 patients with restenosis of arteria poplitea and 3 patients with transjugular intrahepatic shunt. Endovascular brachytherapy was performed in all patients with a high dose rate automatic afterloading machine Gammamed 12i. We used a single fraction dose of 12 Gy given 3 mm from the source axis in the stenotic vessel segment. Follow-up time ranged from 82–159 days. The irradiated vessel segment was examined by ultrasound in all patients. In 1 patient, restenosis occurred in the treated vessel segment 71 days after endovascular brachytherapy of transjugular intrahepatic shunt. All other patients were without restenosis in the irradiated vessel segment during the follow-up time. Our experience in accordance with the literature shows that endovascular brachytherapy is a safe (for departments of radiation oncology equipped with high dose rate afterloading system), technically feasible, and well-tolerated method. Radiation-associated side-effects were not notable.

Key words: vascular restenosis, endovascular brachytherapy, afterloading, Iridium 192.

Úvod

Cévní restenózy jsou současným velkým problémem léčby cévních stenóz pomocí stentu a balónkové angioplastiky (1,2,6,7). Přes vývoj nových metod v léčbě cévních stenóz (stenty, směrovaná či extrakční aterektomie, rotační ablace, laser, genová terapie a další) je počet restenóz neúnosně vysoký: 35–40% (2). Jedním z možných, v současné době intenzivně studovaných, způsobů léčby je endovaskulární brachyterapie (BRT). Endovaskulární BRT znamená lokální ozáření lumina stenotického úseku cévy. Jedná se o novou, rychle se rozvíjející metodu na pomezí radiační onkologie, intervenční radiologie, radiobiologie, fyziky, intervenční kardiologie, angiologie, cévní chirurgie a nefrologie (1,6). Předpokládaným mechanismem účinku prevence restenóz v ozářeném úseku cévy je inhibice hyperplazie intimy; inhibice proliferace buněk hladké svaloviny a buněk pojivové tkáně (1,4). Endovaskulární BRT může být aplikována kovovým vodičem se zdrojem gama záření na distálním kon-

ci (Iridium 192) či balónkem naplněným roztokem obsahujícím beta zářič (např. Yttrium 90) či zavedením kovového radioaktivního cévního stentu např. impregnovaného beta zářičem (Fosfor 32).

Ca

Cílem endovaskulární BRT je inhibice restenózy ozářeného úseku cévy, prevence komplikací způsobených restenózou a snížení počtu jinak nutných intervenčních výkonů na cévě (6), což může vést i ke skutečným úsporám nákladů na zdravotní péči (7).

Soubor pacientů

Na Klinice radioterapie a onkologie byla od března 1998 do července 1998 ve spolupráci výše uvedených 4 oddělení ozářena cévní restenóza celkem 5 pacientům (1 ženě a 4 mužům): 2 pacientům s restenózou periferní arterie - v obou případech arteria poplitea vpravo a 3 pacientům s restenó-

zou TIPS (transjugulární intrahepatální portosystémový zkrat). Průměrná doba poléčebného sonografického sledování ozářeného úseku cévy činila 82-159 dní.

Charakteristiky aplikací:

přístroj: Gammamed 12i
zdroj záření: Iridium-192
celková dávka: 12 Gy ve 3 mm od osy
jednotlivá dávka: 12 Gy ve 3 mm od osy
step distance: 5 mm
průměrná aktivní délka aplikátoru: stenóza arteria poplitea vpravo (2 pacienti): 10,5 cm (10-11 cm)
stenóza TIPS (3 pacienti): 11 cm
lumen aplikátoru: katetr o průměru 6 Frenchů

Metody:

V našem souboru nemocných jsme po předchozím schválení Etickou komisí Lékařské fakulty a Fakultní nemocnice v Hradci Králové zvolili následující indikace endovaskulární BRT:

1/ Indikace endovaskulární BRT periferní cévy:

restenóza indikovaná k PTA (perkutánní transluminální angioplastice)
věk starší 55 let

bez předchozího ozařování v léčené oblasti cévy
pacientem podepsaný informovaný souhlas s léčbou.

2/ Indikace endovaskulární BRT TIPS (transjugulárního intrahepatálního portosystémového zkratu):

restenóza zkratu indikovaná k dilataci TIPS
pokročilá jaterní onemocnění: Child B a C
pacientem podepsaný informovaný souhlas s léčbou.

Léčebný postup endovaskulární BRT stenózy periferní cévy či TIPS:

Na Vazografickém pracovišti Radiodiagnostické kliniky je standardním způsobem provedena PTA či dilatace TIPS a heparinizace. Po PTA či dilataci TIPS je ponechán centrační katétr v místě cévní stenózy. Pacient je s tímto zavedeným centračním katétre převezen na Kliniku radioterapie a onkologie. Zde je za asistence intervenčního radiologa do centračního katétru zaveden endovaskulární katétr (se zaslepeným distálním koncem) a následně markrovník, provedeny centrační snímky v ortogonální projekci na C - rameni či simulátoru a určen cílový objem a dávka. Poté je provedena jednorázová aplikace BRT HDR dávkou 12 Gy ve 3 mm od osy zářiče, přístrojem Gammamed 12i. Po ozáření je katétr intervenčním radiologem vytažen a pacient je převezen na I. Interní kliniku, kde je monitorován způsobem obvyklým jako po PTA či dilataci TIPS. Pro Klinikou radioterapie a onkologie se jedná o ambulantní výkon.

Výsledky

U všech pacientů byla provedena poléčebná sonografická kontrola ozářeného úseku cévy. U 1 pacienta byla při sonografickém vyšetření (dne 30.6.1998) zjištěna restenóza TIPS po 71 dnech od endovaskulární BRT.

U ostatních léčených pacientů nedošlo během doby poléčebného sledování k restenóze.

Doba poléčebného sledování:

pacient po endovaskulární BRT arteria poplitea vpravo: 82 dní bez restenózy,

pacientka po endovaskulární BRT arteria poplitea vpravo: 159 dní bez restenózy,

pacient po endovaskulární BRT TIPS: 84 dní bez restenózy,

pacient po endovaskulární BRT TIPS: 120 dní bez restenózy.

Nepozorovali jsme žádné komplikace související s endovaskulární BRT. Doba hospitalizace takto léčených pacientů nebyla delší než po standardní PTA či dilataci TIPS.

Diskuse:

První klinická studie zabývající se endovaskulární BRT a současně studie s nejdelší dobou poléčebného sledování je studie Schopohl B. et al. (5). V této studii byla endovaskulární BRT aplikována 28 pacientům od května 1990 do června 1996 automatickým afterloadingem vysokým dávkovým příkonem (HDR) Iridium-192 dávkou 12 Gy ve 3 mm od osy v 1 frakci. Délka poléčebného sledování činila 8-71 měsíců. Léčba byla hodnocena jako účinná, bezpečná a technicky proveditelná. Nebyly pozorovány žádné vedlejší účinky. Klinickou studii s největším souborem pacientů léčených endovaskulární BRT je studie Nori D. et al. (3), ve které bylo léčeno 175 pacientů se stenózou periferní cévy a 70 pacientů se stenózou renální arterie endovaskulární BRT automatickým afterloadingem HDR Iridium-192 dávkou 12 Gy ve 3 mm od osy v 1 frakci. Léčba byla hodnocena jako účinná, bezpečná a technicky proveditelná. Prospektivní randomizovanou dvojité slepou studii, která prokázala klinickou účinnost endovaskulární BRT je studie SCRIPPS (Scripps Coronary Radiation to Inhibit Proliferation post-Stenting). V této studii byla aplikována endovaskulární BRT 26 pacientům manuálním afterloadingem (Iridium-192) a 29 pacientům bylo aplikováno placebo. Restenóza byla pozorována pouze u 16,7% pacientů po aplikaci Iridia-192 vs. 53,6% pacientů po aplikaci placeba. Stejně jako ve výše uvedených studiích, jsme i v naší nemocnici zahájili léčbu cévních restenóz metodou HDR afterloadingu Iridium-192. Naše zkušenosti odpovídají literárním údajům o bezpečnosti endovaskulární BRT.

Závěr:

Endovaskulární BRT je technicky schůdná a je pacienty dobře tolerována. Nebyly pozorovány žádné krátkodobé nežádoucí účinky související s ozářením stenotického úseku cévy. Délka poléčebného sledování našeho souboru nemocných je relativně krátká, k vyhodnocení efektu je nutné dlouhodobé sledování a větší soubor pacientů. Endovaskulární BRT neprodlužuje dobu hospitalizace ve srovnání se standardní PTA či dilataci TIPS. Cílem sdělení je seznámení pracovišť radiační onkologie s možností endovaskulární BRT, která rozšiřuje možnosti brachyterapie a zveřejnění prvních zkušeností s touto metodou léčby v naší republice.

Literatura:

1. Baumgart D., Quast U., Erbel R.: Die intravasale Strahlentherapie zur kombinierten Therapie und Prevention der Restenosierung, Herz, 1997, Nr. 6, 22:335-46.
2. Hlava A., Krajina A.: Intervencionní radiologie, Nucleus, HK, 1996.
3. Nori D., Parikh S., Moni J., et al.: Management of peripheral vascular disease: Innovative approaches using radiation therapy, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1996, vol. 36, No. 4: 847-856.
4. Perez C. A., Brady L. W.: Principles and practice of radiation oncology, 3rd edition, 1997.

5. Schopohl B., Liermann D., Pohl L. J., et al.:¹⁹²Ir endovascular brachytherapy for avoidance of intimal hyperplasia after percutaneous transluminal angioplasty and stent implantation in peripheral vessels: 6 years of experiences, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1996, vol. 36, No. 4: 835-840.
6. Waksman R., King S. B., Crocker I. R. et al.: Vascular brachytherapy, Nucletron B. V., The Netherlands, 1996.
7. Weintraub W. S.: Evaluating the cost of therapy for restenosis: considerations for brachytherapy, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1996, vol. 36, No. 4: 949-958.

AKTUÁLNÍ TÉMATA HORMONÁLNÍ REGULACE NÁDOROVÉHO RŮSTU

4: 6th International Congress on Hormones and Cancer, Jerusalem, Israel, 5.-9.9.1999

J. ŽALOUŠÍK

Univerzitní onkologické centrum Brno

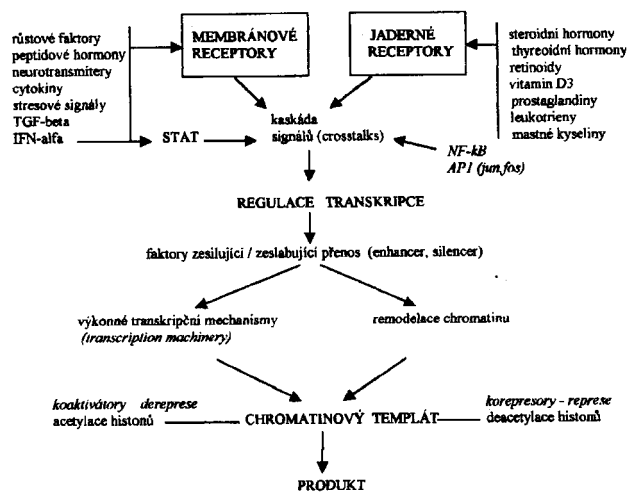
Vnímání světa jako ploché desky s nebem shora a peklem vespod bylo báječné svou jednoduchostí a přehledností. Také onkologii si lze usnadnit rozdělením nádorů na hormonálně dependentní a independentní, s pozitivitou a negativitou hormonálních receptorů, odpovídající a neodpovídající na hormonální léčbu. Svět je naštěstí složitější a také pojem hormonální regulace nádorů se stává mnohem širším než jak byl dříve interpretován. Nejde již pouze o závislost nádorů prsu, prostaty a endometria na účincích endogenních nebo terapeutických pohlavních hormonů nebo antihormonálních zásahů a prostředků. V jistém smyslu je každý nádor hormonálně dependentní. Klasické pojetí hormonů jako endokrinních produktů žláz s vnitřní sekrecí je doplňován celou řadou regulátorů produkovaných parakrinně či autokrinně na místní tkáňové úrovni nebo nádorem samotným, ať již jde o cytokiny, růstové faktory nebo biologicky aktivní metabolity mastných kyselin. K samotné produkci hormonu endokrinní žlázou přistupuje významná modulace jeho účinku v cílové tkáni nebo dokonce alternativní produkce nádorovou tkání. To je třeba připad aromatázové aktivity některých karcinomů. Rozhodující pro konečný efekt je ovšem vzájemná provázanost receptorových systémů, výměna informací mezi signály z membránových a nukleárních receptorů (crosstalks) a mechanismy zajišťující transkripci příslušných genů jako integrál všech zúčastněných signálů.

Regulace genové transkripce je v současnosti hlavním tématem hormonální regulace nádorového růstu. Individualita jedince i nádoru, syntéza specifických struktur i spuštění určitých funkcí jsou podmíněny spuštěním komplexů a kombinací genů. Podle základního dogmatu molekulární genetiky musejí být tyto geny z DNA přepsány (transkribovány) do RNA a poté teprve realizovány v podobě nově syntetizovaného proteinu. Regulace transkripce je tedy klíčovou oblastí buněčné fyziologie i patologie a všech jejích aplikací včetně endokrinologie a onkologie. Hormony a jejich receptory jsou v regulaci transkripce faktory významnými, zdaleka však ne jedinými. Jednou z nejkoumanějších oblastí jsou *crosstalks* čili komunikace mezi signalizací předávanou přes membránové a jaderné receptory, mimo jiné třeba vztahy mezi regulací růstovými faktory a pohlavními hormony. Zjednodušeně je vzájemné propojení receptorových signálů podílejících se na regulaci transkripce znázorněno na připojeném schématu (Chambon, Francie) (obr.1).

Pozornost je věnována také *koaktivátorům* a *korepresorům* hormonální regulace transkripce (Parker, USA). Jsou zkoumány účinky nové třídy koaktivátorů steroidních receptorů SRC1-3 a SRA (O'Malley, USA). Koaktivátory a korepresory fungují jako rovnovážné komplexy regulačních faktorů, které jsou nazývány *koregulatorsomy*. Různé koregulatorsomy mají odlišnou afinitu k různým receptorům a v řadě případů se přímo podílejí na regulaci mechanismů v linii receptor – promotor – transkripcie – specifická funkce v cílové tkáni. Situace může být ovšem dále komplikována existencí více promotorů pro spuštění transkripce jednoho genu jako je tomu v případě genu pro estrogenový receptor alfa, kdy ze dvou promo-

torů se výrazněji uplatňuje vliv vzdálenějšího promotoru B, zároveň však jde o poměrně instabilní oblast vstupující do dalších interakcí (Hayashi, Japonsko). Spolu s *transaktivacími mechanismy* jsou takto dány důvody pro značnou fenotypickou a funkční diverzitu hormonálních receptorů i v rámci jednoho onemocnění. Praktickým důsledkem může být také skutečnost, že účinky tamoxifenu se diametrálně liší u fenotypu ER+/PgR+ a ER-/PgR+. Zatímco u ER+/PgR+ funguje tamoxifen jako typický antagonist estrogenní stimulace, v případě ER-/PgR+ není neúčinný či indiferentní, jak bychom očekávali, nýbrž stává se nežádoucím agonistou stimulujícím nádorovou proliferaci (Becker, Belgie). Receptorovou podstatu mají také účinky karcinogenních polycyklických halo-genovaných uhlovodíků, které se vážou na *AhR* (*arylový receptor*), jehož signál je zprostředkován specifickými transkripčními faktory TFIIB a TFIIIE (Jalaquier, Francie). *Ekotoxikologie* a mechanismy kancerogeneze se tak dostávají do oblasti podobných či shodných s regulací transkripce účinky hormonů a nejsou spojeny pouze s přímým toxickým vlivem a molekulu DNA jak se dříve soudilo.

Obr. 1: Přenos signálů a regulace transkripce.



Dalším aktuálním tématem je heterogenita steroidních receptorů. Po progesteronových receptorech typu A a B je v posledních letech věnována pozornost také estrogenovému receptoru alfa a beta. Jde o dva geneticky odlišné receptory. ER alfa je kódován genem na chromosomu 6 a sestává z 595 aminokyselin, zatímco ER beta o 530 aminokyselinách je kódován samostatným genem z chromosomu 14. Struktura obou receptorových molekul je ovšem podobná s doménou C vážící DNA doménou E a obvyklým *alfa helixem 12* spojeným s aktivací funkce typu 2. (Alfa helix 12 je konzervovaný úsek společný pro všechny jaderné receptory, který prodělává konformační změny v souvislosti s aktivací.) Význam objevu ER beta před několika lety je značný. Především jde o receptor s výraznou afinitou k *fytoestrogenům* (Genistein aj.). Expres ER beta byla nalezena v ledvinách, tlustém střevu a buňkách hladké svaloviny cévní stěny. Přítomnost ER beta v cévní stěně může souviset s ochranným účinkem estrogenů na kardiovaskulární systém. Výskyt ER alfa i beta v různých proporcích v mozku, kůži, hypothalamu, ovšem i v gangliích mozkového kmene otevírá prostor pro širší pochopení neurohumorálních regula-

ci. ER beta se nachází hojně také v tkáni prostaty a připisuje se mu spoluúčast v rozvoji prostatické hyperplasie. Zdá se, že ER beta je na rozdíl od ER alfa přítomen ve většině, ne-li u všech, karcinomů prsu. To podporuje hypotézu, že estrogenní receptory jsou v podstatě stabilním fenotypickým znakem všech karcinomů prsu (Robertson, Br.J.Cancer, 1996). ER beta je patrně výhodnější cílovou strukturou pro antihormonální léčbu karcinomu prsu. Kromě častější exprese, je jím zprostředkováná stimulace přímá, zatímco v případě ER alfa probíhá za spoluúčasti některých růstových faktorů. Oba receptory jsou aktivovány buď vazbou ligandu (estrogenu) na doméně E (aktivační funkce 2. typu, AF2) nebo fosforylací domén A/B (aktivační funkce 1. typu, AF1).

Funkci jednotlivých steroidních receptorů lze v současnosti studovat i izolovaně, a to na myších, jímž byl gen pro daný receptor genetickou manipulací vyřazen. Jde o takzvané *knock-out myši*. Existují tedy myši AERKO (alfa estrogen receptor knock-out), BERKO (beta estrogen receptor knock-out), ale i ARKO (androgen receptor knock-out) a další (Korach, USA). I přes nástup celé řady *selektivních inhibitorů (modulátorů) estrogenových receptorů (SERM)* nejen ze skupiny triphenylethylenových látek typu tamoxifenu, toremifenu či droloxifenu, nýbrž benzothiofrenů jako raloxifen, benzpyrenů SERMHJ a 57050 či čistých steroidních antiestrogenů jako ICI 182780 (Faslodex), zůstává pozice tamoxifenu v klinických aplikacích u karcinomu zatím neotřesená. Důvodem je zejména skutečnost, že není možno v krátké době opakovat celou řadu studií v komparaci s tamoxifenem na tak četných souborech, aby se prokázaly drobné rozdíly spočívající více než v samotném protinádorovém efektu ve snížení rizika nežádoucích kardiovaskulárních účinků, snížení rizika indukovaného karcinomu endometria a podobně. Jde totiž o komplikace máločetné a průkaz rozdílu bude vyžadovat mnohatisícové soubory (Howell, UK). Ani účinky tamoxifenu samotného však nejsou dosud dostatečně objasněny. Kromě kompetitivní inhibice na estrogenovém receptoru tamoxifen také ruší stimulační účinky estradiolu na produkci VEGF a tedy nádorovou neoangiogenezi (Bogin, Izrael). Estrogeny zvyšují v nádorových buňkách expresi Fas ligandu (FasL), což má za důsledek spuštění apoptózy a zánik infiltrujících lymfocytů v nádoru, které jsou vybaveny Fas receptorem. Tamoxifen expresi FasL v nádorových buňkách snižuje a zasahuje tím příznivě také do interakcí imunitních a nádorových buněk (Mor, USA). Zajímavá je také otázka *rezistence nádorů vůči tamoxifenu*. Vzhledem k tomu, že 40-60% nádorů rezistentních k tamoxifenu stále exprimuje estrogenové receptory (ER+), nejde o selekci buněk s negativními receptory jak se předpokládalo. V mechanismu rezistence se spíše uplatňuje změna reakce na zprvu inhibiční signál, aktivace transkripce, *aktivní acetylace histonů acetyltransferázami* a podobně. Je přitom klinicky varující, že nárůst rezistence na tamoxifen nemusí být spojen se ztrátou jeho účinku, nýbrž s jeho konverzí z antagonisty v agonistu. Neúčinný tamoxifen může být tedy v medikaci i nebezpečný. Disociace účinku tamoxifenu užívaného v adjuvanci a zároveň substituce jako HRT se může projevit snížením rizika osteoporózy, avšak zároveň stimulačními účinky v endometriu a vaskulárním systému. Tato disociace nebyla dosud pozorována u raloxifenu

V klinických studiích hormonoterapie se stále více projevuje úsilí podrobněji stratifikovat soubory podle *prediktorů léčebného efektu*. Nestor organizace kontrolovaných klinických studií a ředitel projektu NSABP Bernard Fisher shrnuje svoje více než čtyřicetileté zkušenosti se závěrem, že klinické triály sice přispěly nalezení statisticky optimalizovaných léčebných postupů, to však neznamená, že jde o postupy optimální pro každého jednotlivého pacienta. Je například zřejmé, že dlouhodobá *chemoprevence karcinomu prsu tamoxifenem* po provedené léčbě může být zdůvodněná a úspěšná především v jasně definované skupině vyššího rizika s mutacemi v BRCA genech a s prokázaným nálezem atypické duktální hyperplasie či dokonce CLIS

nebo DCIS v mladším věku. Tamoxifen je již pokládán za účinnou alternativu bilaterální profylaktické subkutánní mastectomie i u vysoce rizikových nemocných. V případě karcinomu narůstá počet klinicky využívaných prediktivních parametrů, nicméně sporé jsou zatím pokusy o jejich multidimensionální interpretace. Například flow cytometrická S fáze (SPF) se stává vysoce signifikantním prediktorem intervalu bezchoroby (disease-free survival) pouze u PgR pozitivních nádorů a má různou prediktivní sílu nepřímou úměrou velikosti nádoru. Do predikce DFI tak vstupuje nejen SPF, ale zároveň stav PgR a velikost nádoru. Mnozí upozorňují, že DNA microarrays nebo DNA chips, které analyzují stovky amplifikací či delecí stovek a tisíců genů komparativní genovou hybridizací během jedné analýzy již brzy odsunou jakékoli interpretace založené na jednom či několika faktorech mezi historické reminiscence.

Výsledky klinických studií zabývajících se hormonoterapií karcinomu prsu také mění některé klasifikační zvyklosti. Ukazuje se, že skupina nemocných se stabilizovanou chorobou (SD) hodnocena po třech měsících podle kritérií UICC v sobě skrývá při hodnocení po 6 měsících dvě podskupiny. Skupina s SD více než 6 měsíců se při konečném hodnocení podobá skupině s parciální remisi, zatímco skupina s SD pod 6 měsíců je prakticky totožná se skupinou od počátku progredující (PG) (Van Klíjn, Holandsko). Stejný autor také ve velkém holandském souboru nachází po osmi letech lepší výsledky adjuvance operovaného karcinomu prsu s kombinací LHRH agonisty a tamoxifenu než při aplikaci tamoxifenu samotného. Význam ovariální ablace v adjuvanci u premenopauzálních žen, který byl i u nás opakovaně opomíjen a zpochybňován tak získává novou podloženou argumentaci.

Klinické pohledy na léčbu nádorů ovlivněním hormonální regulace se v jednom bodě zcela shodují. Potřebujeme mnohem více poznatků o fyziologii a patofyziologii hormonální regulace transkripce a více informací o každém jednotlivém nádoru zahrnujících markery celého spektra regulátorů, včetně exprese řady onkogenů, abychom byli schopni racionálně cílit léčbu i stratifikovat nemocné. Cesta k účinnější léčbě zhoubných nádorů vede především přes hlubší poznání jejich molekulární patologie.

MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN MELANOMA. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGY, DETECTION AND CLINICAL RELEVANCE OF MICROMETASTASES, SEPTEMBER 17.18.,1999, HOMBURG/SAAR.

V. FAIT, V.VAGUNDA

Minimální residuální choroba je fenomén, který je v současné době skloňován v onkologii stále častěji v souvislosti s nejrůznějšími typy nádorů. Jedná se jev, který je v onkologii v zásadě znám již poměrně dlouhou dobu a s ohledem k tomuto jevu je směřována adjuvantní terapie. Nicméně teprve v relativně krátké době se běžněji setkáváme s metodami, které jsou schopny minimální zbytkovou chorobu přímo zjišťovat a začíná být možno tyto metody postupně zavádět i do klinické praxe. Na meetingu v Homburgu bylo k tomuto tématu prezentováno 33 přednášek z evropských a amerických pracovišť.

Mikrometastázy byly například citlivými metodami zjištěny u tzv. časných karcinomů v kostní dřeni v 15% u karcinomu prsu, ve 32% u karcinomu kolorekta a v 41% u karcinomů jícnu. Setkání v Homburgu mělo za cíl shrnout současný stav těchto metod a možnosti u maligního melanomu.

Byla nastíněna biologie metastazování, zahrnující děje uvolnění metastatických buněk, průnik cévní stěnou, uvolnění do oběhu i problematika průniku cévní stěnou a založení viabilní metastázy. Byly zdůrazněny rozdíly mezi makrometastázou a latentní mikrometastázou (tzv. dormantní) metastázou, kte-

rá kromě výrazně menšího počtu buněk nemá vlastní cévní zásobení, má nižší proliferaci i apoptotický index a je schopna v relativně klidovém stavu setrvat velmi dlouhou dobu. Další typ metastázy - extravaskulární migratorní - se vyskytuje u angiotropního melanomu, kdy se nádorové buňky plazí jako pericyty po novotvořené cévě směrem od periferie centrálně. Vyvolávajícím momentem tohoto jevu je pravděpodobně kontakt s „volným“ lamininem před dokončením výstavby cévy.

Byl znovu konstatován fakt, že populace metastatických nádorových buněk je i u jednoho pacienta mnohdy výrazně nehomogenní, což prokazují studie fenotypu (např. MAGE). Na genetické úrovni se využívají metody jako multicolor fluorescenční hybridizace in situ a komparativní genomová hybridizace. Tento fakt důsledek v různorodé citlivosti k chemoterapii, ale také ztěžuje diagnostiku minimální residuální choroby pro obtíže s výběrem nejvhodnější antigenní determinanty.

Samotná detekce minimální residuální choroby je možná několika způsoby, z nichž každý si pravděpodobně časem najde svá nejvhodnější uplatnění.

Relativně nejjednodušší, ale v zásadě nenahraditelné je sériové histologické zpracování a vyšetření zkušeným patologem, užívané u sentinelových uzlin, které jsou predilekčním místem první metastázy.

Metodika sentinelové lymfadenektomie je u maligního melanomu již prakticky standardní součástí diagnostiky a léčby ve všech specializovaných centrech. Metodika vyhledávání sentinelové uzliny je za pomoci barviva, či za pomoci radionuklidu se speciální sondou, či kombinace obou metod. V zahraničí se většinou využívá metody s pomocí sondy či kombinovaná pro vyšší procento nálezu. Námi prezentovaný soubor 220 pacientů se sentinelovou lymfadenektomií pomocí barvení měl pochopitelně lehce nižší procento nálezu, v ostatních parametrech, tedy v procentech relapsů a v přežívání byl plně srovnatelný. Všechny prezentované soubory pak plně podporují předpoklad, že v současné době lze stav sentinelové uzliny u maligního melanomu považovat za nejsilnější prognostický faktor.

Další možností je využití imunohistochemických metod, za jejichž pomoci lze vylepšit záchyt histologický, například v sentinelové uzlině, ale které lze užít i například při hodnocení vzorků kostní dřeně.

Metoda, o které se v současné době vedou nejvíce zpráv, která je používána mnohými pracovišti, ale současně která přináší i nejvíce rozporů je zjišťování pomoci RT-PCR. Jedná se o extrémně citlivou metodu, za jejíž pomoci lze nalézt až jednu nádorovou buňku na 10 ml. krve. Vysoká citlivost je jak předností, tak i záporem této metody. Při této citlivosti je nesmírně důležitý způsob zpracování vzorků i extrémní nároky na čistotu - například v periferní krvi při stanovování melanomových buněk nesmí být nabrána první porce krve po punkci, neboť kontakt punkční jehly s normálními melanocyty při průchodu kůží je již schopen navodit falešně pozitivní výsledky. Metoda má prozatím značně vysoké procento falešné positivity, dle některých laboratoří až 33%, takže použití jako jediné metody, na níž budou stát terapeutická rozhodnutí je zatím zcela nevhodné. Situace je navíc zatím komplikována i tím, že metodika dosud není plně standardní, takže srovnávání výsledků jednotlivých laboratoří je velmi obtížné. K detekci melanomových buněk bývá obvykle využíváno stanovování mRNA tyrosinázy, melan-A/Mart-1 či GAGE, buňky mohou být detekovány v kostní dřeni, v periferní krvi, metody může být využito i k zvýšení přesnosti vyšetření sentinelových uzlin. Presentované studie se neshodovaly v otázce prognostického významu RT-PCR nálezů. Nejmoderněji se zavádí kvantifikovaná RT-PCR. Vyžaduje mimořádně pečlivé zpracování materiálu (zmaření čerstvého vzorku) a standardizaci.

Další metodou izolace a detekce nádorových buněk, využitel-

nou i u melanomu je imunomagnetické třídění - metoda spočívá v použití protilátky vázané na drobná magnetická tělíska, vytvoří komplex s buňkou nesoucí žádaný antigen. Buňka se tímto stane magnetickou a lze ji za použití silného magnetického pole mechanicky oddělit od zbytku vzorku. Výhodou metody je to, že jsou detekovány celé buňky a nikoliv pouze fragmenty jako u PCR, je možná optická kontrola buněk, je dokonce možná i další kultivace izolovaných buněk. Metoda je zatím poměrně nová, její citlivost (1 na milion) je pravděpodobně srovnatelná s PCR. Problémem metody je pochopitelně opět výběr nejvhodnějšího antigenů k detekci.

Probrány byly i další metody časně detekce metastáz, byť u těchto metod již nelze mluvit o minimální residuální chorobě.

U časně detekce relapsu melanomu jako nejlepší marker se ukazuje protein S100, druhým nejlepším je MIA, nejpřesnější je zřejmě kombinace obou. Prvním místem relapsu u melanomu bývá nejčastěji regionální uzlina, je tedy pochopitelná pozornost věnována i časně diagnostice uzlinového relapsu. Rutinní sledování bývá obvykle zabezpečováno palpačním vyšetřením. Dle několika studií bylo prokázáno, že záchyt metastáz je časnější při rutinním používání sonografie - rozdíl byl ale pravděpodobně ovlivněn i subjektem hodnotícím palpační vyšetření. Jedná se o závěr jistě logický, nicméně v našich podmínkách bude palpce ještě dlouho hlavním způsobem vyšetření, když pominu finanční náročnost rutinního sonografického sledování, jeho zavedení u nás je omezeno i propustností sonografů. Nicméně i v našich podmínkách je možno jakoukoliv palpační nejasnost objasnit sonograficky eventuálně ve spojení s cytologií.

Další zmiňovanou metodikou je pozitronová emisní tomografie, což je metodika, dle literatury schopná nalézt tumor o velikosti 5mm, dle zkušeností přednášejících však ve většině případů i tumory od 2mm. Metoda má výhodu i v tom, že je skenováno prakticky celé tělo, takže nehrozí tak velké nebezpečí vynechání některé oblasti. Nevýhody metody jsou vcelku dobře známy, hlavní je pak extrémní finanční náročnost.

Nastíněny byly opět imunologické experimentální terapeutické postupy pro melanom.

Polyvalentní vakcína (proti MART-1, tyrosinase, gp100, MAGE-3 aj. antigenům melanomových buněk) statisticky významně zlepšila bezpříznakový interval ale ne celkové přežití. Co se týká mechanismu působení, bylo prokázáno snížení cirkulujících melanomových buněk po vakcinaci.

Jako forma návratu k B imunitě byly zkoušeny antiidiotypické protilátky, které po vazbě na melanomovou buňku stimulují B odpověď - nicméně produkované antiidiotypické protilátky mají nízkou afinitu. Tento nedostatek by měl být odstraněn použitím modifikovaného peptidu namísto antiidiotypické protilátky, kdy by následně došlo k produkci vysoko-afinitních protilátek proti melanomovým bb.

CTL (CD8+) mohou rozpoznat a ničit melanomové bb. ale jsou jen zřídka indukovány, poněvadž melanom (pravděpodobně přes IL10) konvertuje antigen prezentující dendritické bb. do tolerující formy. Je možno indukovat melanomovými antigeny maturaci dendritických buněk in situ i generovat je ex vivo (GM-CSF plus IL4). Tento postup vedl k remisím u některých melanomů, kdy regredující nádorová ložiska byla infiltrována CD8+ lymfocyty. K optimalizaci postupů je nutný podrobný imunomonitoring.

Asi 50% melanomu je deficitní na HLA1, takže unikají T buňčenskému dozoru. Byla vyvinuta strategie k obejití MHC restrikce T odpovědi konstrukcí chimérického T receptoru. Tento má spojení signální domény gamma/delta s vazebnou doménou imunoglobulinovou (z B buněk). Je tedy odstraněna variabilní doména T receptoru, která při vazbě na nádorovou bb. závisí na MHC. Chimérický receptor je možné transferovat do buněk prostřednictvím retroviru. Následně stimulovaný T lymfocyt může zničit až 100 nádorových buněk.

onkologické společnosti

1. Schválena odměna za Cenu ČOS za rok 1998 ve výši 10 000,- Kč pro as. MUDr. Olgu Příbylovou a kol.
2. Výbor ČOS vyhlašuje soutěž členů onkologické společnosti na LOGO společnosti. Soutěž bude inzerována na www.linkos.cz. Návrhy budou přijímány do konce roku 1999 a autor nejlepšího návrhu, jenž bude podkladem pro vytvoření loga ČOS, výbor odmění symbolickou finanční částkou.
3. Členové výboru obdrželi návrh na koncepci oboru klinická onkologie k připomínkování do konce října 1999.
4. Členové výboru obdrželi připomínky ke standardům, k jejich připomínkování k dopracování konečné verze doporučených léčebných postupů onkologicky nemocných do konce října 1999.
5. Doc. Zaloudík informoval o schůzi NOR, kde bude projednáváno sponzorování pro vypracování programu zpracování dat NOR. ČOS bude podporovat sponzorování NOR z nestátních dotací za předpokladu, že ČOS bude jedním z hlavních zadavatelů pro publikaci a zejména interpretaci dat NOR.
6. Na internetových stránkách ČOS budou zveřejněny i akce s onkologickou tematikou jenž nejsou konány pod záštitou společnosti. Výbor doporučuje požádat ostatní odborné společnosti o sdělení konaných akcí s onkologickou tematikou. U akcí, které budou konány pod záštitou ČOS, výbor požaduje účast člena výboru ČOS při výběru přednášek.
7. Korespondence:
 - a) Doc. Daneš požádal výbor ČOS o stanovisko k projektu „Časný záchyt a prevence kolorektálního karcinomu Nadace Dagmar a Václava Havlových - VIZE 97. Na podkladě informací od Doc. Daneše vypracuje Doc. Zaloudík.
 - b) Výzvu Prof. MUDr. J. Hyánka, DrSc. k spoluúčasti na pořádání III. dnů průtokové cytometrie, konaných 10. - 11.4. 2000 vzal výbor na vědomí a na konání této akce upozornil členy ČOS na internetových stránkách společnosti. Výbor souhlasí s podílem na organizaci odborného programu a jmenoval do programového výboru zástupce za ČOS Doc. MUDr. Tomáše Eckschlanger (FN Motol). (Petruželka)
 - c) MUDr. T. Horváth - žádost o vyjádření postoje výboru ČOS k zahájení dohodovacího řízení o začlenění výkonu autofluorescenční endoskopie do Seznamu zdravotních výkonů s bodovými hodnotami. Výbor ČOS začlenění výkonu autofluorescenční endoskopie do Seznamu zdravotních výkonů s bodovými hodnotami podporuje. (Klener)
 - d) Výbor vzal na vědomí informaci paní Kataríny Zatovičové, Studio pro život, o pobytovém kurzu „Jak žít s rakovinou“. Pro dohodnutí některých otázek další strategie v boji proti nádorovým onemocněním výbor doporučuje paní K. Zatovičovou a MUDr. V. Štrnadelovou vyzvat k účasti na některé z příštích schůzí výboru ČOS. (Klener)
 - e) Výbor vzal na vědomí informaci předsedkyně představenstva ARCU S onko centrum Jany Koželské o semináři v rámci projektu Onko Info Centrum. V rámci vzájemné informovanosti a koordinace aktivit výbor doporučuje paní J. Koželskou pozvat k účasti na některé z příštích schůzí výboru ČOS. (Klener)
 - f) Žádost prim. MUDr. Arnošta Václavíčka o odbornou pomoc ve smyslu posouzení racionální farmakoterapie onkologicky nemocných, léčených v Soukromém onkologickém pracovišti - stacionáři v Nymburce, vedeném prim. MUDr. Miroslavem Kašparem, vzal výbor na vědomí. (Klener)
 - g) Dopis Prof. MUDr. Z. Dientsbiera, DrSc. informujícího o podpoře výzkumných onkologických projektů, grantech a ceně mladého onkologa vzal výbor na vědomí a vyslovuje ochotu k bližší spolupráci s „Ligou proti rakovině“ i v jiných oblastech. K vyjasnění stanovisek „Ligy“, k některým neortodoxním aktivitám, a pro diskutování formy spolupráce výbor doporučuje pozvat Prof. Dientsbiera na zasedání výboru ČOS. (Klener)
 - h) Výbor vzal na vědomí dopis MUDr. Drápala ohledně právní formulace preambule ke standardům. Odpověď Prof. Klener po konzultaci s právníkem.
 - i) Výbor ČOS byl požádán prim. MUDr. Renatou Neumannovou o spoluúčast při konání 5. ročníku onkologického sympozia „Onkologie v gynekologii a mammologii“ se koná 21.-23.1.2000 v Brně. Výbor schválil převzetí záštity nad sympóziem plánovaným na leden 2000. Vzhledem ke každoročnímu konání většího počtu akcí se stejnou tematikou, výbor doporučuje MUDr. Neumannové domluvení s ostatními pracovišti gynekol.onkologie na dalším postupu. Výbor navrhuje koordinaci brněnského dne gynekologické onkologie s pražským dnem gynekologické onkologie. (Klener)
 - j) Výbor ČOS byl požádán o pomoc v kauze pokračujících sankcí ředitele MOU, vůči signatářům výzvy k jeho rezignaci z února 1999. Výbor se obrátí doporučeným dopisem na ministra zdravotnictví s žádostí o řešení situace v MOU. (Klener)
 - k) Na žádost fy L A C H E M A výbor ČOS přejímá záštitu nad česko-polským onkologickým sympóziem, konaného 11.-12.11. 1999 s problematikou zaměřenou na urologickou oblast protinádorových léčebných postupů a dále na terapeutickou strategii u malobuněčného karcinomu plic. Program sympozia bude zveřejněn na internetových stránkách ČOS. (Petruželka)
8. Výše členských příspěvků pro rok 2000 se nemění.
9. Výbor ČOS upozorňuje členy ČOS, že těm členům, jenž do konce roku 1999 nezaplatí dlužné členské příspěvky (dluh přesahující částku 200,- Kč) bude zrušeno členství v ČOS.
10. Noví členové:

MUDr. Stejskal Jan	RTO, Jihlava
MUDr. Marková Jana	OKH FNKV
MUDr. Cypro Petr	RTOO Motol
RNDr. Kozel Petr	fy Galena, Ph 5 (byt Brno)
RNDr. Blechová Alena	fy Galena, Ph 5 (byt Ph 9)
MUDr. Tomáška Miroslav, CSc.	II.interní klinika FN Brno
11. Další zasedání výboru ČOS bude 30.listopadu 1999.

Za výbor ČOS:
Prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., předseda ČOS
Doc. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., vědecký sekretář ČOS
V Praze dne 20.10.1999

INFORMACE O VZNIKU CHIRURGICKÉ ONKOLOGICKÉ SEKCE

Za podpory výboru České onkologické společnosti vzniká **sekce chirurgické onkologie jako zájmová skupina chirurgických oborů při České onkologické společnosti** ČLS JEP. Vítání jsou zástupci všech chirurgických oborů, kteří se v rámci své specializace aktivně podílejí na péči o onkologické pacienty, chtějí spolupřevést klinickou onkologii jako multidisciplinární obor a posilovat vazby i komunikaci s nechirurgickými obory onkologie. Postupně budete nacházet další informace na webových stránkách ČOS <http://www.linkos.cz>.

Své přihlášky obsahující *jméno a příjmení, titul, rodné číslo, adresu pracoviště, specializaci, telefon, fax a e-mailovou adresu* odesílejte na adresu: Doc. MUDr. Jan Zaloudík, CSc., Univerzitní onkologické centrum, koordinační pracoviště, Kamenice 3,625 00 Brno nebo faxem na 05-4319 3900 nebo e-mailem na zaloudik@med.muni.cz. *Uveďte také prosím, máte-li zájem o standardní členství nebo jste-li ochotni aktivně přispět k organizaci sekce zejména v počátcích její činnosti. Vyznačte, jste-li členy České onkologické společnosti.* Těm, kteří dosud členy ČOS nejsou bude přihláška do ČOS zaslána. Členství v sekci chirurgické onkologie je vázáno na členství v ČOS, avšak není spojeno s dalším poplatkem.