

DOPORUČENÉ POSTUPY

Neuroonkologické sekce České onkologické společnosti ČLS JEP

Stanovisko Pracovní skupiny Neuroonkologické sekce
České onkologické společnosti ČLS JEP

Kolektiv autorů



NEUROONKOLOGICKÁ
SEKCE ČESKÉ ONKOLOGICKÉ
SPOLEČNOSTI



DOPORUČENÉ POSTUPY

Neuroonkologické sekce
České onkologické společnosti ČLS JEP

Stanovisko Pracovní skupiny pro doporučené postupy
Neuroonkologické sekce České onkologické společnosti ČLS JEP

Kolektiv autorů

Doporučené postupy Neuroonkologické sekce České onkologické společnosti:

Stanovisko Pracovní skupiny pro doporučené postupy Neuroonkologické sekce České onkologické společnosti ČLS JEP

Pracovní skupina pro doporučené postupy NOS ČOS JEP

MUDr. Radek Lakomý, Ph.D. – Masarykův onkologický ústav, Brno

prof. MUDr. Pavel Šlampa, CSc. – Masarykův onkologický ústav, Brno

MUDr. Ferdinand Třebický – Nemocnice Na Bulovce, Praha

MUDr. Pavel Fadrus, Ph.D. – Fakultní nemocnice Brno

prof. MUDr. Vladimír Beneš, DrSc. – Ústřední vojenská nemocnice, Praha

prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D. – Fakultní nemocnice Brno

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc. – Fakultní nemocnice Olomouc

prof. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D. – Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc. – I. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

MUDr. Renata Belanová – Masarykův onkologický ústav, Brno

doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D. – Masarykův onkologický ústav, Brno

Ve spolupráci s časopisem Klinická onkologie
vydalo nakladatelství

Ambit Media, a. s.

Klicperova 604/8, I50 05 Praha 5

www.ambitmedia.cz

Odpovědná redaktorka: Mgr. Simona Nováková

Grafická úprava: Karel Zlevor

I. vydání, Praha 2014

© Ambit Media, a. s.

ISBN: 978-80-905474-4-5

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

publikace, kterou právě čtete, je společným dílem Pracovní skupiny pro doporučené postupy Neuroonkologické sekce, která je organizační složkou České onkologické společnosti ČLS JEP (www.neurooncology.cz). Neuroonkologická sekce byla ustanovena v prosinci roku 2011 s obecným cílem přispívat k rozvoji a rozšiřování poznatků lékařských a biologických věd zaměřených na problematiku neuroonkologie, usilovat o jejich využívání v péči o pacienty s nádorovým onemocněním nervového systému a podílet se na zvyšování odborných znalostí členů.

Východiskem Neuroonkologické sekce nebyla jen existence podobných odborných společností v jiných zemích, nadnárodně reprezentovaných např. Evropskou neuroonkologickou společností, ale především skutečnost, že obor neuroonkologie je svou podstatou natolik interdisciplinární, že si přímo žádá o vznik platformy umožňující snadnější komunikaci mezi jednotlivými odbornostmi. Kliničtí onkologové, radioterapeuti, neurochirurgové, specialisté na radiochirurgii, neurologové, patologové, radiologové – tyto a ještě některé další odbornosti se podílejí na péči o nemocné s nádory CNS. Ke klinickým pracovníkům je nutné připočítat rovněž vědce zabývající se výzkumem v této oblasti. Činnost vyjmenovaných odborníků je však mnohdy atomizovaná, což dohromady se skutečností, že se většinou jedná o nádorová onemocnění s velice nízkou incidencí, vede k tomu, že v rámci ČR není zcela ujednocena.

Mezi konkrétní cíle Neuroonkologické sekce proto od samotného počátku patřila příprava celorepublikových doporučených postupů pro diagnostiku a léčbu pacientů s nádory CNS, v první fázi trpících gliomy, a vytvoření sítě **Center Neuroonkologické sekce** postupujících dle těchto postupů, a to nejen z hlediska poskytování léčebně-preventivní péče, ale také standardizovaného sběru klinických dat a biologického materiálu. K dnešnímu dni se podařilo ustanovit pět těchto center (2× Praha, Brno, Olomouc, Ostrava) představujících základnu pro multicentrické studie klinického a translačního neuroonkologického výzkumu a předpokládáme, že jejich počet ještě poroste. Věříme, že doporučené postupy povedou nejen ke sjednocení diagnostiky a léčebné péče v rámci ČR, ale že je shledáte užitečnými také v rámci Vaší každodenní léčebné praxe.

*prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.
předseda Neuroonkologické sekce ČOS ČLS JEP*

*doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
vědecký tajemník Neuroonkologické sekce ČOS ČLS JEP*

OBSAH

Chirurgická léčba gliomů	7
Fadrus P., Smrčka M., Beneš V.	
Histopatologická diagnostika nádorů centrálního nervového systému	15
Hermanová M., Kolář Z.	
Cytogenetická a molekulárně genetická vyšetření gliomů	21
Slabý O.	
Radioterapie a chemoterapie gliomů	25
Lakomý R., Šlampa P., Třebický F.	
Příloha I	33
Doporučené postupy MRI	
Příloha II	34
Odběr, transport a uchovávání biologického materiálu pro výzkumné účely v rámci Center Neuroonkologické sekce	
Příloha III	37
Seznam Center Neuroonkologické sekce ČOS ČLS JEP	

Fadrus P.¹, Smrčka M.¹, Beneš V.²

¹ Neurochirurgická klinika LF MU a FN Brno

² Neurochirurgická klinika 1. LF UK a ÚVN Praha

Úvod

Nejčastějšími mozkovými primárními intraaxiálními nádory jsou gliomy (40–50 % všech nádorů mozku). Jedná se o širokou skupinu nádorů lišících se svojí typickou lokalizací, věkovou predispozicí, morfologií, stupněm malignity a sklonem k progresi. Rozdělení vycházející z WHO klasifikace a gradingu (2007) dělí gliomy na dvě základní skupiny: gliomy nízkého stupně malignity (low-grade glioma – LGG) a gliomy vysokého stupně malignity (high-grade glioma – HGG). Tyto dvě skupiny se mezi sebou značně liší svými biologickými vlastnostmi, a tím i celkovou prognózou pacienta [1]. Proto mají i své specifické diagnostické a terapeutické postupy.

Klinický obraz

Klinické projevy mozkových nádorů závisí významnou měrou na jejich lokalizaci. Celkové příznaky jsou převážně způsobeny nitrolební hypertenzí. Zvýšený nitrolební tlak se nejčastěji projeví bolestí hlavy, nauzeou a zvracením, měštnáním na očním pozadí, poruchami psychiky a vědomí. Při konusovém mechanismu (temporální, okcipitální konus) dochází k anizokorii (léze n. oculomotorius) s hemiparézou, poruchou vědomí a vitálních funkcí. Ložiskové příznaky jsou klinickým obrazem různých symptomů a syndromů odpovídajících lokalizaci intrakraniálního nádoru. Při supratentoriální lokalizaci je nejčastější senzomotorický deficit, poruchy řeči a kognitivních funkcí [2]. K těmto příznakům zde patří i sekundární parciální nebo generalizované epileptické záchvaty, které jsou nejčastějším příznakem (80 %) u LGG. U infratentoriálních nádorů dominují příznaky v rámci mozečkové a kmenové symptomatologie s parézami hlavových nervů. Během léčby se mimo hodnocení neurologického stavu pacienta provádí hodnocení jeho celkového stavu (Karnofsky performance score – KPS) [3] s posouzením jeho soběstačnosti

a zvládnutí běžných aktivit. Také se testují i kognitivní funkce (mini-mental state examination – MMSE). Výsledek těchto hodnocení je i jedním z kritérií při určování další případné terapie [4].

Terapie

Strategie léčby závisí na biologickém charakteru nádoru, na jeho velikosti a lokalizaci v mozku, na věku a celkovém stavu pacienta. Mezi základní možnosti terapie nádorů mozku patří chirurgická resekce s případnou následnou komplexní onkologickou léčbou [5,6]. V klinické praxi je vhodné léčebnou strategii u pacientů s nádory CNS řešit v rámci specializovaného centra se zastoupením jednotlivých odborností podílejících se na diagnostice a léčbě pacientů s tímto onemocněním.

Chirurgická léčba gliomů

Chirurgická léčba nádorů mozku v rámci neuroonkologie patří mezi jednu z hlavních součástí neurochirurgie. První zaznamenanou resekci gliomu, a to zřejmě HGG, provedl v roce 1884 Rickman Godlee [7]. Princip onkologické operační techniky s totální resekci nádoru a s bezpečným lemem do okolí zvýšil dobu přežití u ostatních solidních nádorů. Tento princip je ale nemožné ve většině případů dodržet v operativě gliomů mozku pro jejich biologické vlastnosti. Jejich převážně invazivní a infiltrativní charakter je zodpovědný za nemožnost kurativní resekce. Radikální chirurgická resekce je signifikantně efektivnější než méně radikální resekce nebo biopsie a má pozitivní vliv na sledované prognostické faktory, tj. celkovou dobu přežití (overall survival – OS) a čas do progresu onemocnění (progression-free survival – PFS) [8]. Základním cílem chirurgických postupů je maximálně možná resekce nádorů s jejich cytoredukcí bez poškození funkčně důležitých oblastí mozku. Získaný biologický materiál je také nezbytný k určení definitivní histolo-

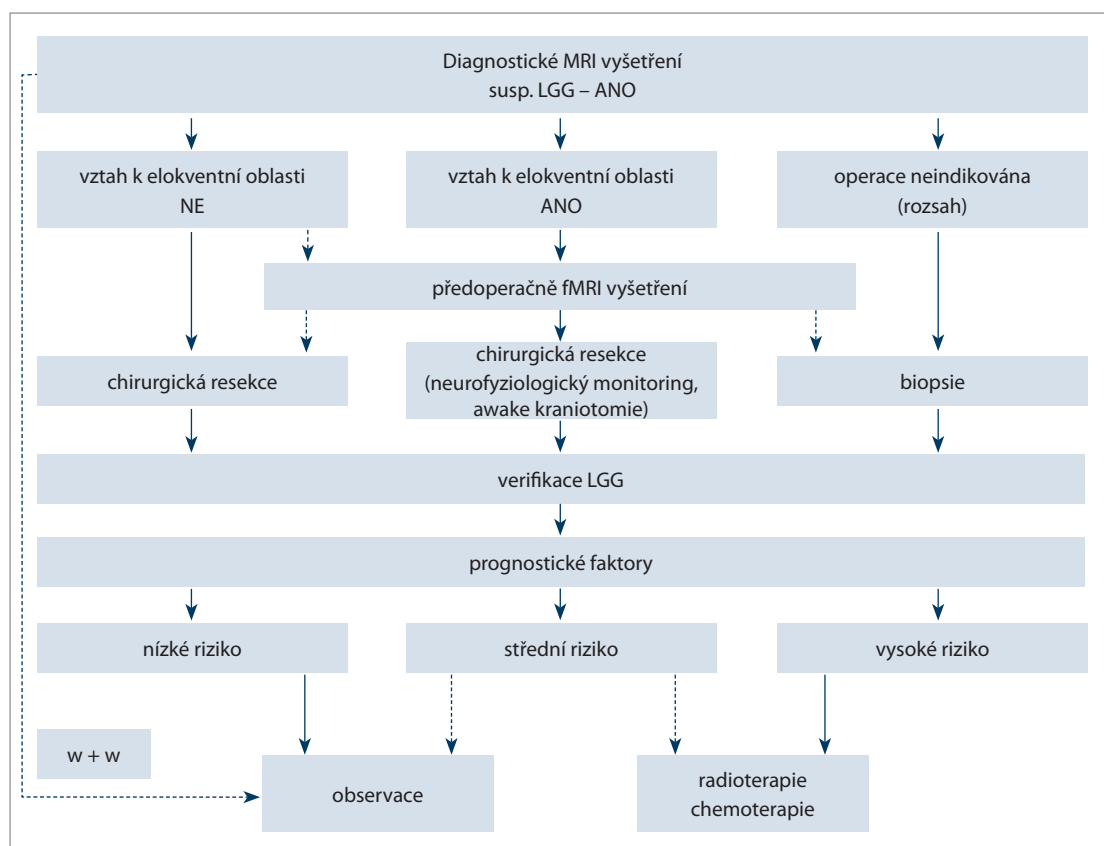


Schéma 1. Grafické schéma terapie LGG.

gické diagnózy a k jeho molekulárně genetickému vyšetření. U nádorů uložených v hlubokých strukturách mozku nebo ve funkčně důležitých oblastech mozku (eloquentní zóny) je často indikována stereobiopsie. K maximálně možné a bezpečné chirurgické resekci nám napomáhají zobrazovací a funkční metody. Při resekcích nádorů v eloquentních zónách lze využít jejich předoperační radiologické zobrazení pomocí MRI a funkčního MRI (fMRI, traktografie) a tyto využít peroperačně v kombinaci se stereonavigací, neurofyziologickým monitoringem, peroperační fluorescencí a awake kraniotomií [9–12]. V poslední době je věnována značná pozornost další nové technologické modalitě pozitivně ovlivňující radikalitu resekce gliomů, a tou je intraoperační MRI (iMRI). Možnost peroperačního zobrazení operační oblasti na MRI umožní nejen vyšší radikalitu resekce, ale hlavnělepší i její bezpečnost [13,14]. Ukazuje se, že u pacientů s LGG peroperační použití iMRI snižuje riziko recidivy LGG a sou-

časné i prodlužuje PFS. U pacientů s HGG možnost využít při operaci iMRI prodlužuje OS.

1. Chirurgická léčba LGG

1.1 Úvod

Skupina nízkostupňových gliomů představuje v širším slova smyslu všechny gliomy dle WHO klasifikace se stupněm (grade) WHO G I – pilocytární astrocytom, subependymom a WHO G II – difúzní astrocytom, ependymom, oligodendrogliom a smíšený oligoastrocytom. Mimo tyto uvedené zástupce jsou v této skupině zastoupeny i některé zřídka se vyskytující gliomy uvedené ve WHO klasifikaci (viz kapitola Histopatologická diagnostika nádorů centrálního nervového systému). Vzhledem k výrazně odlišným biologickým vlastnostem hlavně pilocytárního astrocytomu, který je relativně benigního charakteru a stojí tak stranou této podskupiny gliomů, je v užším slova smyslu skupina LGG reprezentována difúzně

rostoucími gliomy, které mají podobné biologické vlastnosti. Reprezentují 10–15 % všech mozkových nádorů astrocytární řady a jsou charakteristické pomalým růstem a difúzní infiltrací sousedících struktur mozkové tkáně. Zásadní biologickou vlastností je jejich tendence k maligní transformaci.

Nejčastěji se vyskytují mezi 35.–44. rokem s lehkou převahou výskytu u mužů. Převažuje supratentoriální lokalizace (80 %) – často v subkortikální, suplemen-tární motorické a insulární oblasti. Obvykle prvním neurologickým příznakem je epileptický záchvat (80 %). Fokální neurologický deficit je méně častý a při vyšetření pacienta je potřeba věnovat zvýšenou pozornost i vyšetření řeči a kognitivních funkcí [15]. Základní diagnostickou metodou u LGG je MRI (T1, T2, Flair) vyšetření. Zde se zobrazuje jako hypointenzní v T1 váženém obraze a hyperintenzní v T2 váženém obraze, bez zvýšení signálu po podání gadolinia [16]. Přítomnost i jen diskrétního zvýšení signálu po podání gadolinia je již známkou jeho maligní transformace. Vzhledem ke skutečnosti, že některé gliomy vyššího stupně (WHO G III) se nemusejí po podání gadolinia také sytit (až 30 %) a současně se může jednat o léze jiné etiologie (ischemie, demyelinizační onemocnění), je potřeba při hodnocení MRI nálezů tyto možnosti zohlednit v rámci diferenciální diagnostiky. Zde může být nápomocné i vyšetření PET a případně i MRI spektroskopie [17]. Definitivní diagnózu však stanoví až neuropatologické vyšetření.

1.2 Prognostické faktory

Mezi hlavní negativní prognostické faktory patří vyšší věk, histopatologický nález astrocytomu, horší klinický stav pacienta (KPS), neurologická zániková symptomatologie, velikost nádoru > 6 cm a jeho progresse do druhé hemisféry. Epileptická aktivita, která je nejčastěji jediným neurologickým příznakem, je v literatuře převážně hodnocena jako pozitivní prognostický faktor. Oligodendrogliomy mají lepší prognózu než astrocytomy. Pokud je u oligodendrogliomu zjištěna delece 1p s (nebo bez) delece 19q, tak tato skutečnost je pozitivním prognostickým faktorem. V současné době máme k dispozici tyto následující hodnotící škály:

- 1. V roce 2002 Pignatti popsal jednoduchý skórující systém (ano = 1 bod, ne = 0 bodů) na základě hodnocení těchto prognostických faktorů: věk ≥ 40 let,

astrocytom, maximální průměr nádoru ≥ 6 cm, progresse nádoru do kontralaterální hemisféry a neurologický deficit před operací. Na základě multivari-
• 2. V roce 2008 zavedla University of California, San Francisco (UCSF) nový skórující systém pro pacienty s LGG: věk > 50 let, KPS ≤ 80, elokventní lokalizace, maximální průměr nádoru > 4 cm, kdy jednotlivé faktory byly hodnoceny bodovým systémem (ano = 1 bod, ne = 0 bodů).

Po rozdělení pacientů do jednotlivých kategorií: nízké riziko (0–1), střední (2) a vysoké (3–4) bylo v těchto jednotlivých skupinách 5leté OS (97 %, 81 % a 56 %) a 5leté PFS (76 %, 49 % a 18 %) [19].

Ve škále zavedené UCSF je nově zohledněna jako prognostický faktor lokalizace nádoru v elokventní oblasti negativně ovlivňující rozsah chirurgické resekce nádoru. Vzhledem k této skutečnosti a současně i širšímu rozmezí hodnocení stupně rizika dáváme tomuto skórujícímu systému nyní u našich pacientů přednost a navrhuje-
me jej zařadit do doporučeného postupu léčby.

1.3 Chirurgická resekce
Pomalý růst a infiltrativní charakter této skupiny nádorů umožňuje využití různých modalit léčby, které v přirozeném průběhu onemocnění na sebe postupně navazují. V případě symptomatických nádorů s projevy nitrolební hypertenze je indikována časná chirurgická resekce. U nádorů asymptomatických nebo s příznivými prognostickými faktory lze léčbu zahájit stereobiopsií k přesnému stanovení diagnózy. Vzhledem k možné histopatologické heterogenitě této skupiny nádorů je výsledná diagnóza stanovena na základě pouze omezeného množství tkáně ze stereobiopsie zatížena poměrně vysokým rizikem stanovení chybné diagnózy (až 50 %), a to hlavně s rizikem stanovení nižšího stupně malignity. Proto se takto stanovená diagnóza musí dát do korelace se všemi dostupnými výsledky neuroradiologických vyšetření. V případě, že není indikována časná chirurg-

gická resekce, je zvolen konzervativní postup s pravidelnými MRI kontrolami (observe – tzv. watch and wait). V tomto případě je nutnou podmínkou standardní vyšetřovací protokol MRI vyšetření a absolvování kontrolních vyšetření na stejném přístroji. Chirurgická resekce je poté indikována až odloženě při progresi sledovaných faktorů. Další významnou skutečností ovlivňující rozsah resekce nádoru je jeho lokalizace a vztah k elokventním oblastem. S ohledem na infiltrativní a biologické vlastnosti této skupiny nádorů je potřeba si uvědomit, že radikální biologická resekce není možná. Možná je pouze, za příznivých lokálních anatomických poměrů, radikální resekce hodnocená graficky na základě kontrolního pooperačního MRI vyšetření (T1, T2, Flair). Snahu o radikální grafickou resekci je proto nutné vždy přizpůsobit velikosti a anatomické lokalizaci nádoru. V současné době převládá koncept nejen maximálně možné radikality, ale současně i maximálně možné bezpečné resekce nádoru s ohledem na individuální funkčně-anatomické poměry a výsledný funkční stav pacienta se snahou minimalizovat výskyt a rozsah pooperačního neurologického deficitu. Možnosti této bezpečné resekce v poslední době rozšířily nové technologie v rámci zobrazovacích metod: fMRI, MRI traktografie, i současně peroperační metody: neurofyzilogie, peroperační fluorescence, neuronavigace, kortikální a subkortikální stimulace, awake kraniotomie, peroperační ultrazvuk a peroperační MRI. Celá řada studií prokázala pozitivní vliv těchto peroperačních technologií na výsledný neurologický stav pacienta se snížením rizika nového pooperačního deficitu [20]. Přestože chybí randomizované studie zaměřené na efekt rozsahu resekce, tak v doposud dostupné literatuře převládá názor favorizující jednoznačně více extenzivní resekce LGG. Na základě multivariální analýzy jedné retrospektivní studie má rozsah resekce (extent of resection – EOR) signifikantně pozitivní vliv na OS, ale ne na PFS [21]. Jiná retrospektivní studie ukazuje také signifikantně pozitivní vliv radikální resekce na OS, ale současně i na PFS [22]. V rámci neuroradiologických vyšetřovacích metod jsou nyní využívány jejich kombinace, tzv. fúze, např. MRI + PET/CT, nebo se případně využívají i další speciální techniky, jako je MRI spektroskopie, které jsou schopny upřesnit diagnózu a event. i včas odhalit možnou maligní transformaci.

Reoperace s provedením bezpečné resekce může také zlepšit OS. U pacientů s nepříznivými prognostickými faktory s nemožností radikální bezpečné resekce je po stanovení diagnózy z biopsie indikována radioterapie.

2. Gliomy vysokého stupně malignity (HGG)

Nejčastějším a nej malignějším astrogliálním nádorem CNS je glioblastom (G IV) tvořený málo diferencovanými nádorovými astrocyty. Termín multifonní glioblastom (GBM) byl zaveden v roce 1914 Mallorym [23] a je používán dodnes. Nádor se vytváří buďto sekundárně maligní transformací z difuzního astrocytomu (G II), nebo z anaplastického astrocytomu (G III), kdy vzniká tzv. sekundární glioblastom. Druhou, častější možností je vznik *de novo*, bez známek předchozího více diferencovaného nádoru – primární glioblastom. Průměrný věk výskytu je kolem 60 let, anamnéza potíží je v týdnech či měsících. Ložiskové příznaky závisí na lokalizaci a často se vyskytují s příznaky nitrolební hypertenze. Dalšími představiteli jsou anaplastický ependymom (G III), oligodendrogliom (G III), oligoastrocytom (G III) a hlavně anaplastický astrocytom (G III), který má nižší průměrný věk výskytu (45 let) s delší anamnézou. V CT a MRI obraze u HGG je typické jejich nepravidelné postkontrastní syčení se známkami centrálních nekrotizací a kolaterálním edémem se známkami expanzivnosti [24].

2.1 Prognostické faktory

K obecně uznávaným a klinicky podloženým prognostickým faktorům, které mají vliv na délku života pacientů s glioblastomy, patří: věk pacienta (50 let), jeho celkový zdravotní stav (KPS, MMSE), přítomnost neurologického deficitu a délka jeho příznaků. Další faktory souvisejí s vlastním nádorem, kdy rozhodující je jeho lokalizace a velikost. Prognostický význam má i řada molekulárně genetických faktorů, kterým je nyní věnována značná pozornost (např. status metylace promotorové oblasti genu pro *MGMT*). Silným prediktivním faktorem je věk pacienta. Není ovlivňuje možnosti zvolené terapie, ale ukazuje se, že má i korelaci v nádorové biologii a patogenezi. Starší pacienti mají s větší pravděpodobností primární GBM a mladší pacienti spíše sekundární GBM. Dalším silným pozitivním prediktivním faktorem je pacientův KPS a MMSE, což zřejmě souvisí s jeho schopností absolvovat komplexní onkologickou terapii [25].

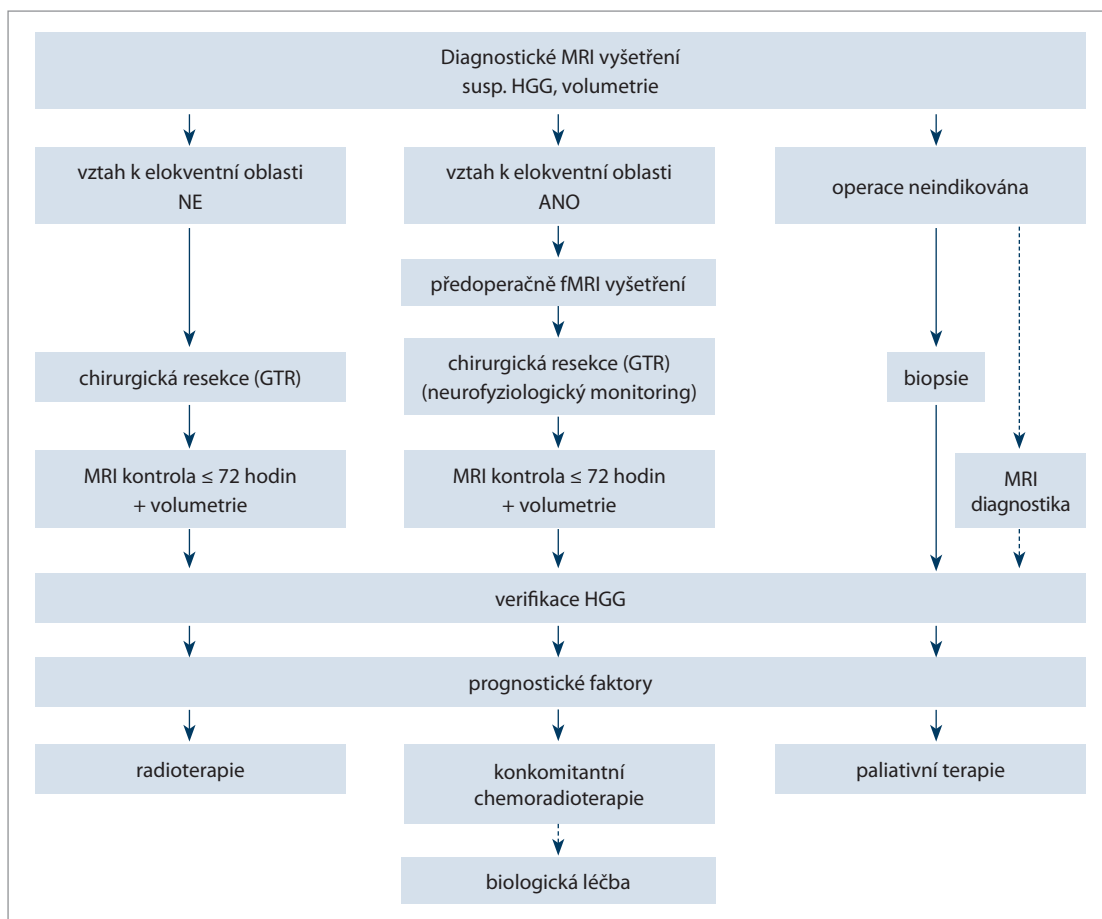


Schéma 2. Grafické schéma terapie HGG.

2.2 Chirurgická léčba HGG

HGG jsou charakterizovány invazivním infiltrativním růstem a aktivní proliferací. Invazivní a infiltrativní charakter HGG je zodpovědný za nemožnost kura- tivní resekce. Současně nelze dodržet požadavek na bezpečný lem resekce pro riziko neurologického po- škození pacienta, zvláště je-li nádor uložen v blízkosti elokventních center mozku. Přes všechny současné možnosti je radikální resekce tohoto nádoru termín pouze grafický – radiologický, nikoli však biologický. Z toho plyne, že cílem neurochirurgického výkonu je maximálně možné odstranění nádorové masy s její cytoredukcí, bez poškození funkčně důležitých ob- lastí mozku. Z anatomického pohledu jsou kontrain- dikovány nádory zasahující mozkový kmen, bazální ganglia a nádory prorůstající corpus callosum (tzv. butterfly glioma).

Pro hodnocení rozsahu chirurgické resekce u HGG na základě časně pooperační MRI kontroly (MRI: T1 + gadolinium) jsou v současné literatuře použí- vány tyto stupně:

1. Radikální, neuroradiologicky totální resekce – gross total resection (GTR) je definována nepřítomností postkontrastního syčení v operační oblasti na po- operačním MRI vyšetření.
2. Téměř totální resekce – near-total resection (NTR), kdy na pooperačním MRI se sytí pouze lem postre- sekční dutiny.
3. Subtotální resekce – subtotal resection (STR) s rezi- duálními syťícími se ložisky i mimo postresekční dutinu.

Je potřeba si uvědomit rozdíl oproti běžně použí- vané terminologii, kdy stupeň subtotální, používaný jako druhý v pořadí po totální resekci, odpovídá v an-

glosaské literatuře až třetímu stupni v hodnocení rozsahu resekce. Proto navrhuje tuto terminologii sjednotit a dále používat v hodnocení rozsahu resekce zde uvedené termíny (GTR, NTR, STR).

Radikálním chirurgickým výkonem dosáhneme dočasného zmírnění nebo odstranění vlastních příznaků onemocnění, histologické verifikace procesu, a hlavně zlepšení podmínek pro následnou terapii, a tím i zvýšení šancí na prodloužení života současně se zlepšením jeho kvality. Proto strategie chirurgické léčby závisí hlavně na biologickém charakteru nádoru, na jeho velikosti a lokalizaci v mozku, na věku a celkovém stavu pacienta. Chirurgická léčba zahrnuje celý komplexní onkologický postup.

Možnosti chirurgické léčby jsou tyto: biopsie nebo resekce, které umožní stanovení tkáňové diagnózy a biologických vlastností nádoru, jeho molekulárně genetické vyšetření a případně i získání materiálu na další výzkum. U pacientů, kde není možné vzhledem k limitujícím faktorům provést GTR, přichází v úvahu stereotaktická biopsie s následnou radioterapií. U pacientů, kdy je i stereotaktická biopsie zatížena vysokým rizikem, může být diagnóza stanovena i pouze na základě MRI vyšetření (DWI, PWI, spektroskopie). Hlavním cílem při maximálně bezpečné resekci (GTR) je makroskopicky radikální odstranění nádoru s minimalizací postoperačního neurologického deficitu. Resekce je zaměřena hlavně na MRI postkontrastně se sytící části tumoru (MRI: T1 + Gadolinium). V dostupné literatuře je vlivu rozsahu resekce na přežití u pacientů s GBM jako dominantního představitele celé skupiny HGG do současné doby věnována celá řada studií, bohužel naprostá většina z nich je retrospektivních. Menší počet studií je prospektivních a nejméně jsou zastoupeny studie randomizované. Většina těchto studií v hodnocení rozsahu resekce nepoužívá ke zhodnocení redukce objemu nádoru MRI volumetrii. Tato je zohledněna pouze v posledních několika studiích. Zásadní informaci přinesla studie založená na volumetrickém hodnocení stupně resekce, která ukázala, že u pacientů s GBM je optimální resekce více než 98 % jeho předoperačního objemu (MRI: T1 + Gadolinium). V této studii je uveden medián doby přežití (medián OS 13 měs. oproti 8,8 měs.) ve prospěch radikální resekce [26]. Práce věnovaná resekci, kdy bylo dosaženo resekce menšího objemu než 98 %, ukazuje stále pozitivní vliv

rozsahu resekce. Jako spodní hranici optimálního resekovaného objemu se zde udává 78 % objemu nádoru [27]. Kombinaci resekce nádoru současně s použitím 5-ALA-peroperační fluorescence (Gliolan) se věnovala randomizovaná prospektivní studie fáze III, která prokázala, že tato metoda signifikantně pozitivně ovlivňuje PSF, ale již bez vlivu na OS [28]. Pro adekvátní posouzení rozsahu resekce se doporučuje kontrolní MRI vyšetření v rozmezí do 72 hodin po operaci, kdy jako optimální se jeví interval vyšetření za 48 hodin od operace. Tato kontrola umožní rozlišit sekundární postoperační změny od reziduálního tumoru. Proto v současné době na základě dostupných literárních údajů lze říci, že neurochirurgický výkon s GTR má ve srovnání s méně rozsáhlou resekci nebo biopsií pozitivní vliv na délku života pacientů a patří k všeobecně uznávaným pozitivním prognostickým faktorům. Stejně tak signifikantně výraznější rozdíl v době přežití je ve skupině pacientů, kteří absolvovali GTR, oproti skupině pacientů, kteří podstoupili pouze stereotaktickou biopsii [29]. Operace rekurentního nádoru by měla být indikována v závislosti na celkovém stavu pacienta, věku, biologických vlastnostech nádoru a jeho odpovědi na absolvovanou onkologickou terapii. Uvádí se, že průměrně 20–40 % pacientů s rekurentním GBM absolvuje reoperaci. Tento poměr kolísá v závislosti na zkušenosti jednotlivých center. Neexistují formální doporučení k indikaci reoperace. Každopádně favorizujícími faktory jsou: nižší věk pacienta, dobrý KPS, velikost a lokalizace rekurentního tumoru v neokventní oblasti mozku a delší doba od první operace [30].

2.3 Doporučený postup chirurgické léčby u pacientů s gliomem mozku

1. Morfologická diagnostika nádoru – MRI.
2. Funkční předoperační vyšetření – fMRI, MRI traktografie.
3. Zhodnocení provedených neuroradiologických vyšetření a celkového zdravotního stavu pacienta hlavně se zřetelem na známé prediktivní faktory. Na základě těchto údajů rozhodnutí ohledně indikace operačního výkonu a typu chirurgického výkonu:
 - a) stereobiopsie,
 - b) chirurgická resekce (EOR, GTR, NTR, STR),
 - c) konzervativní postup – dále zvažována indikace radioterapie.

4. Makroskopická radikální resekce – k optimálnímu výsledku při operačním výkonu je snaha o využití všech dostupných technologií.

Mezi nutný standard peroperačních technik při chirurgické resekci patří tyto: operační mikroskop, stereonavigace, ultrazvukový aspirátor, neurofyziologické monitorovací techniky a peroperační fluorescence*.

Pozitivní skutečností je i možnost využití peroperačního ultrazvuku (iUZ) a intraoperační MRI (iMRI).

5. Zajištění transferu odebrané mozkové tkáně ke stanovení tkáňové diagnózy a biologických vlastností nádoru včetně jeho molekulárně genetického vyšetření.

6. Volumetrické zhodnocení rozsahu resekce (MRI) do 72 hodin, ideálně do 48 hodin po operaci.

Literatura

1. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455(7216): 1061–1068.
2. Bussière M, Hopman W, Day A et al. Indicators of functional status for primary malignant brain tumour patients. *Can J Neurol Sci* 2005; 32(1): 50–56.
3. Giles GG, Gonzales MF. Epidemiology of brain tumors and factors in prognosis. In: Kaye AH, Laws ER Jr (eds). *Brain tumors*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone 2001: 51–70.
4. Laws ER, Parney IF, Huang W et al. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg* 2003; 99(3): 467–473.
5. Johannesen TB, Langmark F, Lote K. Progress in long-term survival in adult patients with supratentorial low-grade gliomas: a population-based study of 993 patients in whom tumors were diagnosed between 1970 and 1993. *J Neurosurg* 2003; 99(5): 854–862.
6. Stupp R, Hegi ME, Mason WP et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5 year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10(5): 459–466. doi: 10.1016/S1473-0245(09)70025-7.
7. Bennett H, Godlee R. Excision of tumour from the brain. *Lancet* 1888; 2: 906.
8. Sanai N, Polley MY, McDermott MW et al. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg* 2011; 115(1): 3–8. doi: 10.3171/2011.2.JNS10998.
9. Gore JC, Manning HC, Quarles CC et al. Magnetic resonance in the era of molecular imaging of cancer. *Magn Reson Imaging* 2011; 29(5): 587–600. doi: 10.1016/j.mri.2011.02.003.
10. Nimsky C, Ganslandt O, Merhof D et al. Intraoperative visualization of the pyramidal tract by diffusion tensor imaging. *Neuroimage* 2006; 30(4): 1219–1229.
11. De Witt Hamer PC, Robles SG, Zwinderman AH et al. Impact of intraoperative stimulation brain mapping on glioma surgery outcome: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2012; 30(20): 2559–2565.
12. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2006; 7(5): 392–401.
13. Senft C, Bink A, Franz K et al. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *Lancet Oncol* 2011; 12(11): 997–1003.
14. Nimsky C, Ganslandt O, Buchfelder M et al. Intraoperative visualization for resection of gliomas: the role of functional neuronavigation and intraoperative 1.5 T MRI. *Neurol Res* 2006; 28(5): 482–487.
15. Wessels PH, Weber WE, Raven G et al. Supratentorial grade II astrocytoma: biological features and clinical course. *Lancet Neurol* 2003; 2(7): 395–403.
16. Henson JW, Gaviani P, Gonzalez RG. MRI in treatment of adult gliomas. *Lancet Oncol* 2005; 6(3): 167–175.
17. McKnight TR, von dem Bussche MH, Vigneron DB et al. Histopathological validation of a three-dimensional magnetic resonance spectroscopy index as a predictor of tumor presence. *J Neurosurg* 2002; 97(4): 794–802.
18. Pignatti F, van den Bent M, Curran D et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol* 2002; 20(8): 2076–2084.
19. Chang EF, Smith JS, Chang SM et al. Preoperative prognostic classification system for hemispheric low-grade gliomas in adults. *J Neurosurg* 2008; 109(5): 817–824. doi: 10.3171/JNS.2008.109.11.0817.
20. Duffau H, Lopes M, Arthuis F et al. Contribution of intraoperative electrical stimulations in surgery of low grade gliomas: a comparative study between two series without (1985–96) and with (1996–2003) functional mapping in the same institution. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76(6): 845–851.
21. Smith JS, Chang EF, Lamborn KR et al. Role of extent of resection in the long-term outcome of low-grade hemispheric gliomas. *J Clin Oncol* 2008; 26(8): 1338–1345. doi: 10.1200/JCO.2007.13.9337.
22. McGirt MJ, Chaichana KL, Attenello FJ et al. Extent of surgical resection is independently associated with survival in patients with hemispheric infiltrating low-grade gliomas. *Neurosurgery* 2008; 63(4): 700–707; author reply: 707–708. doi: 10.1227/01.NEU.0000325729.41085.73.
23. Mallory FB (ed.). *The principles of pathologic histology*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders 1914: 1–667.
24. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008; 359(5): 492–507.
25. Showalter TN, Andrej J, Andrews DW et al. Multifocal glioblastoma multiforme: prognostic factors and patterns of progression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69(3): 820–824.
26. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001; 95(2): 190–198.
27. Sanai N, Polley MY, McDermott MW et al. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg* 2011; 115(1): 3–8. doi: 10.3171/2011.2.JNS10998.
28. Stummer W, Novotny A, Stepp H et al. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg* 2000; 93(6): 1003–1013.
29. Vuorinen V, Hinkka S, Farkkila M et al. Debulking or biopsy of malignant glioma in elderly people – a randomised study. *Acta Neurochir (Wien)* 2003; 145(1): 5–10.
30. Tatter SB. Recurrent malignant glioma in adults. *Curr Treat Options Oncol* 2002; 3(6): 509–524.

* Česká neurochirurgická společnost její použití u operací gliomů již doporučila jako standardní postup. Je nutné dokončit schvalovací proces její úhrady zdravotními pojišťovnami.

HISTOPATOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA NÁDORŮ CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU

Hermanová M.¹, Kolář Z.²

¹ I. patologicko-anatomický ústav, LF MU a FN u sv. Anny v Brně

² Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc

Histopatologická bioptická diagnostika nádorů centrálního nervového systému (CNS) představuje standardní součást péče o pacienty s tímto typem onemocnění a je nutným předpokladem adekvátní terapie. Spektrum metodických přístupů využívaných v bioptické diagnostice nádorů mozku je v posledních letech rozšířeno o imunohistochemii a metody molekulárně patologické/genetické. Aplikace těchto metod přináší důležité

informace využitelné nejen ve vlastním diagnostickém procesu – typizaci nádoru, ale mají i potenciál poskytnout řadu informací prediktivních a prognostických. Histologický grading nadále zůstává nezastupitelným v predikci biologického chování nádoru a zásadně ovlivňuje volbu terapie. Při typizaci nádoru a stanovení histologického stupně diferenciaci („gradingu“) vždy vycházíme z platné WHO klasifikace nádorů CNS.

WHO klasifikace nádorů CNS (přehled jednotek)

Pozn.: Histologickou typizaci a grading tumorů provádíme dle platné WHO klasifikace (t. č. z roku 2007) vždy, pokud je to možné. Léze, u kterých není možná zcela jednoznačná typizace, vyžadují vysvětlující komentář a diferenciálně-diagnostickou rozvahu.

NEUROEPITELOVÉ NÁDORY

Astrocytární nádory

- pilocytární astrocytom
- pilomyxoidní astrocytom
- subependymový obrovskobuněčný astrocytom
- pleomorfní xantoastrocytom
- difuzní astrocytom (fibrilární, gemistocytární, protoplazmatický)
- anaplastický astrocytom
- glioblastom
 - obrovskobuněčný glioblastom
 - gliosarkom
- gliomatóza mozku

Oligodendrogliové nádory

- oligodendrogliom
- anaplastický oligodendrogliom

Oligoastrocytární nádory

- oligoastrocytom
- anaplastický oligoastrocytom

GRADE

Ependymové nádory

- subependymom
- myxopapilární ependymom
- ependymom (celulární, papilární, světlobuněčný, tanycytický)
- anaplastický ependymom

Nádory chorioidálního plexu

- papilom chorioidálního plexu
- atypický papilom chorioidálního plexu
- karcinom chorioidálního plexu

Ostatní neuroepitelové nádory

- astroblastom
- chordoidní gliom 3. komory
- angiocentrický gliom

Neuronální a smíšené glioneuronální nádory

- dysplastický gangliocytom mozečku (Lhermitte-Duclos)
- desmoplastický infantilní astrocytom
- a gangliogliom

• dysembryoplastický neuroepitelový tumor	I	NÁDORY MOZKOVÝCH OBALŮ	GRADE
• gangliocytom a gangliogliom	I	Nádory meningotelové	
• anaplastický gangliogliom	III	• meningeom	I
• papilární glioneuronální tumor	I	• meningoteliální	I
• rosety tvořící glioneuronální tumor	I	• fibrózní (fibroblastický)	I
4. komory	I	• přechodný (transicionální, smíšený)	I
• centrální a extraventrikulární neurocytom	II	• psamomatózní	I
• cerebelární liponeurocytom	II	• angiomatózní	I
• paragangliom	I	• mikrocystický	I
		• sekreční	I
		• bohatý na lymfocyty a plazmocyty	I
		• metaplastický	I
		• chordoidní	II
		• světlobuněčný	II
		• atypický	II
		• papilární	III
		• rabdoidní	III
		• anaplastický (maligní)	III
Nádory pineální oblasti			
• pineocytom	I		
• pineální parenchymální tumor	II–III		
střední diferenciace			
• pinealoblastom	IV		
• papilární tumor pineální oblasti	II–III		
Embryonální nádory			
• meduloblastom	IV		
• desmoplastický/nodulární			
meduloblastom			
• meduloblastom s extenzivní			
nodularitou			
• anaplastický meduloblastom	IV		
• velkobuněčný meduloblastom	IV		
• primitivní neuroektodermový			
tumor CNS			
• neuroblastom CNS	IV		
• ganglioneuroblastom CNS	IV		
• meduloepiteliom	IV		
• ependymoblastom	IV		
• atypický teratoidní/rabdoidní tumor	IV		
NÁDORY KRANIÁLNÍCH A PARASPINÁLNÍCH NERVŮ	GRADE	Mezenchymové nádory	
• schwannom/neurinom (celulární,		• (nádory korespondující s analogickými	
plexiformní, melanotický)	I	nádory dle platné klasifikace WHO nádorů	
• neurofibrom	I	měkkých tkání a kostí)	I–IV
• perineuriom		• hemangiopericytom	II
• perineuriom		• anaplastický hemangiopericytom	III
• perineuriom, NOS			
• maligní perineuriom	II–III		
• maligní tumor periferní nervové			
pochvy	II–IV		
• epitelioidní			
• s mezenchymovou diferenciací			
• melanotický			
• s glandulární diferenciací			
		Primární melanocytární nádory	
		• difuzní melanocytóza	
		• melanocytom	
		• maligní melanom	
		• meningeální melanomatóza	
		Nádory nejasné histogeneze	
		• hemangioblastom	I
		LYMFOMY A HEMATOPOETICKÉ NEOPLAZIE	
		NÁDORY Z GERMINÁLNÍCH BUNĚK	
		NÁDORY SELÁRNÍ OBLASTI	GRADE
		• kraniofaryngeom	I
		• nádor z granulárních buněk neurohypofýzy	I
		• pituicytom	I
		• vřetenobuněčný onkocytom	
		adenohypofýzy	I
		METASTATICKÉ NÁDORY	

Návrh strukturovaného protokolu pro vyšetření nádorů centrálního nervového systému

Navržený strukturovaný protokol by měl být aplikován u všech primárních neoplazií CNS, při hodnocení primární biopsie/resekátu. Strukturovaný protokol nenahrazuje standardní popis histopatologického nálezu včetně výsledků imunohistochemických a molekulárních vyšetření, které je součástí biotické průvodky jednotlivých pracovišť. Standardními součástmi protokolu biotického/cytologického vyšetření nádorů CNS jsou specifikace typu vzorku, způsobu jeho zpracování, makroskopický popis vzorku, specifikace použitých vyšetřovacích metod a finální histologická typizace a grading nádoru dle platné WHO klasifikace nádorů CNS. Včleněny jsou i závěry výsledků vyšetření zobrazovacími metodami a informace o případné předoperační terapii a onkologické anamnéze pacienta, pokud jsou tyto dostupné.

a) Specifikace odběru vzorku (k zakroužkování a doplnění):

- 1) otevřená biopsie
- 2) stereotaktická biopsie
- 3) resekce
 - a) parciální
 - b) totální
- 4) peroperační biopsie
 - a) kryostatové řezy
- 5) cytologie
 - a) nátěrová
 - b) otisková „touch“
- 6) jiný (specifikovat)
-
-
-

b) Zpracování vzorku (k zakroužkování a doplnění):

- 1) nativní materiál
- 2) formolem (10% pufovaným formaldehydem) fixovaný materiál
- 3) jiný typ fixace (specifikovat)
- 4) odběr pro elektronovou mikroskopii
- 5) jiné zpracování vzorku (specifikovat)
-
- 6) odběr pro molekulárně patologická vyšetření

- a) proveden (pokud možno specifikovat velikost a lokalizaci odběru a místo provedení odběru – pracoviště patologie/operační sál, odběr zmražením vzorku, odběr fixovaného materiálu)
-
- b) provedeno vyšetření paralelního řezu s histologickou verifikací diagnózy (blok č. ...)
- c) neproveden
- 7) specifikace aplikovaných molekulárních vyšetření (včetně specifikace metodiky: FISH, CISH, sekvenace...)

c) Makroskopický popis vzorku (k zakroužkování a doplnění):

- 1) popis celkové velikosti vzorku v mm
- 2) popis velikosti a počtu ložisek v mm (pokud to je možné)
- 3) lokalizace ložiska/ložisek
 - a) kostěné struktury
 - b) mozkové obaly (měkká/tvrdá plena)
 - c) mozek (lalok/laloky, kůra mozku, bílá hmota, bazální ganglia, thalamus, hypothalamus, oblast glandula pinealis, mozeček, mostomozečkový úhel, mozkové komory, mozkový kmen, hypofýza, kraniální nervy, jiné
 - d) mícha (etáž – vyjádřit specifikací obratlů včetně cauda equina a filum terminale....., míšní kořeny, prorůstání do obratlových těl)
 - e) lokalizace v páteřním kanálu (extradurálně, intradurálně extramedulárně, intradurálně, intramedulárně)
 - f) jiná (specifikovat)
- 4) určení stranové lokalizace (vlevo, vpravo, středočarově, oboustranně, nelze určit)
- 5) použité zobrazovací metody (pokud jsou dostupné klinické údaje)
- 6) závěr radiologa (pokud jsou dostupné klinické údaje)

d) Předoperační terapie (k zakroužkování a doplnění) – pokud existují klinické údaje:

- 1) bez terapie
- 2) chemoterapie (jaká)
- 3) radiační terapie
- 4) kortikosteroidy
- 5) embolizace
- 6) terapie provedena, avšak klinikem nespecifikována
- 7) není známo

e) Onkologická anamnéza/výskyt familiálních syndromů:

- 1) informace není známa
- 2) ano (specifikovat)
- 3) negativní

f) Histologické vyšetřovací postupy:

- 1) přehledná barvení
- 2) speciální barvení (specifikovat)
- 3) imunohistochemie (specifikovat markery a protilátky včetně klonů)
- 4) způsob provedení imunohistochemického vyšetření (manuální, automatické)
- 5) jiné (enzymová histochemie, lektinová histochemie, další)

Komentář k indikaci a technice peroperačního cytologického vyšetření CNS

Nátěrová cytologie (ideálně v kombinaci s kryostatovými tkáňovými řezy, výjimečně indikována samostatně) je preferenčně aplikována zejména v rámci peroperačního vyšetření lézí gelatinózní konzistence. U lézí tužší konzistence, lézí kohezivních (suspektní meningeomy, neurofibromy, neurinomy aj.) je preferenčně aplikováno vyšetření kryostatových tkáňových řezů (ani v tomto případě však není kontraindikované a může mít diagnostický význam). Využití otiskové cytologie je u lézí CNS limitované, nátěrová cytologie vzhledem k charakteru a konzistenci mozkových lézí poskytuje efektivnější diagnostický nástroj umožňující validní posouzení cytologických detailů i architektonických znaků. Při přípravě preparátů nátěrové cytologie pracujeme se vzorkem tkáně < 1 mm v průměru, který umístíme na okraj podložního skla, a druhým sklem vzorek jemně rozdrtíme (užíván je i termín „crush“ cytologie), následně jemnými rotačními pohyby druhým sklem tkáň rozprostřeme a rovnoměrně rozetřeme na podložní sklo. Následuje rychlá fixace a barvení.

Doplňující imunohistochemická a molekulárně genetická vyšetření v neuroonkologii

Jsou prováděna za účelem diagnostickým, prognostickým a prediktivním. Součástí neuroonkologické diagnostiky jsou vyšetření delecí 1p a 19q, stanovení

g) Histologická typizace a „grading“ nádoru dle platné WHO klasifikace nádorů CNS:

- 1) typ nádoru
- 2) nelze určit (specifikovat důvody)
- 3) stupeň diferenciaci
- 4) nelze určit (specifikovat důvody)

h) Další nálezy a komentáře (např. pokud je možné se vyjádřit k resekční linii nebo efektům předoperační léčby):

-
-
-
-
-

metylace promotoru genu kódujícího O6 metylguanin DNA metyltransferázu (*MGMT*), imunohistochemické vyšetření exprese *IDH1*, *p53* a β -catenin. Součástí spektra molekulárně genetických vyšetření může být v závislosti na specifické diagnóze vyšetření alterací genu *EGFR*, *PTEN*, *BRAF*, *MYC/NMYC*, *INI1* a dalších (viz Literatura a Molekulárně genetická diagnostika gliomů).

Doporučený postup pro testování *IDH* v diagnostické neuropatologii

Heterozygotní bodová mutace v kodonu 132 genu isocitrátdehydrogenázy 1 (*IDH1*) se vyskytuje u 60–80 % difuzních a anaplastických gliomů (WHO Grade II a III) a sekundárních glioblastomů. Ve 2–5 % těchto nádorů je průkazná mutace v genu *IDH2*, který kóduje vysoce homologní isocitrátdehydrogenázu 2.

- Imunohistochemický průkaz *IDH1* R132H mutovaného proteinu komerčně dostupnou myší monoklonální protilátkou klon H09 na tkáni fixované formolem a zalité do parafínu;
- manuální provedení imunohistochemického vyšetření či použití automatického imunostaineru;
- doporučená pozitivní kontrola – tkáň oligodendrogliomu či difuzního astrocytomy s pozitivitou *IDH1* R132H;
- doporučená negativní kontrola – tkáň pilocytárního astrocytomy, primárního glioblastomu;

- hodnocení positivity – za pozitivní je považována průkazná imunopozitivita lokalizovaná cytoplazmaticky;
- v případě IDH1 imuno-negativního gliomu je indikováno molekulárně genetické testování statusu IDH pro vyloučení vzácných mutací *IDH1*, resp. *IDH2*;
- pro průkaz mutace sekvenováním se doporučuje klasická Sangerova metoda – viz protokol publikovaný v práci Preusser et al, kde jsou uvedeny rovněž sekvence použitých primerů.
- u sekundárních glioblastomů je popsána fokální ztráta proteinového produktu mutovaného *IDH1*;
- u „low-grade“ gliomů se mohou vyskytovat pouze disperzně distribuované *IDH1* pozitivní nádorové buňky;
- v okraji infiltrativní fronty difuzních gliomů jsou předilekčně IDH1 pozitivní buňky lokalizovány periaxonálně, subpiálně a perivaskulárně.

Komentáře a poznámky k hodnocení výsledku imunohistochemické detekce IDH1

- Případná současná slabá jaderná pozitivita může být výsledkem „difuze antigenu“ během zpracování tkáně;
- část případů může vykazovat difuzní imunopozitivitu fibrilární matrix tumoru (často centrálně, na periferii invazivní fronty pak patrná imunopozitivita jednotlivých buněk);
- u oligoastrocytomů může být imunopozitivita *IDH1* omezena pouze na jednu komponentu;

Literatura

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al (eds). WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC Press 2007.
2. Brat DJ, Parisi JE, DeMasters BK et al. Protocol for the examination of specimens from patients with tumors of the brain/spinal cord. Central Nervous System – Brain/Spinal Cord 3.1.0.0, pp. 1–18, (www.cap.org/cancerprotocols), College of American Pathologists 2013.
3. Preusser M, Capper D, Hartmann C et al. IDH testing in diagnostic neuropathology: review and practical guideline article invited by the Euro-CNS research committee. Clin Neuropathol 2011; 30(5): 217–230.
4. Karsy M, Gelbman M, Shah P et al. Established and emerging variants of glioblastoma multiforme: review of morphological and molecular features. Folia Neuropathol 2012; 50(4): 301–321.
5. Hersh DS, Mehta RI, Woodworth GF et al. The molecular pathology of primary brain tumors. Pathology Case Reviews 2013; 18(5): 210–220.

CYTOGENETICKÁ A MOLEKULÁRNĚ GENETICKÁ VYŠETŘENÍ GLIOMŮ

Slabý O.

Masarykův onkologický ústav, Brno
CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

Molekulární biomarkery mají využití již v primární diagnostice gliálních nádorů, tj. klasifikaci nádorů do jednotlivých histologických podtypů, které někdy na základě histologie nemusí být jednoznačné, např. z důvodů neprůkaznosti nálezu v případě bioptického odběru nebo vysoké buněčné heterogenity, která je pro tyto nádory charakteristická. Typickými příklady diagnostických biomarkerů jsou fúze genu *BRAF* umožňující odlišit pilocytický astrocytom od jiných low-grade gliomů (LGG) [1], současná delece 1p/19q v diagnostice oligodendrogliomů [2] nebo mutace *IDH1* umožňující odlišit primární glioblastomy od sekundárních, což není morfologicky možné [3].

Zatímco klinická symptomatologie gliálních nádorů je dána jejich lokalizací v CNS, prognóza onemocnění značnou měrou závisí na biologickém chování nádoru a nelze ji u konkrétního histologického podtypu gliálního nádoru na základě konvenčních klinicko-patologických parametrů dostatečně citlivě předpovědět. Už vůbec současná klasifikace neumožňuje predikovat léčebnou odpověď. Takže např. i pa-

cienti s glioblastomem, tedy gliomem stejného stupně malignity, podstupující standardní Stuppův léčebný protokol se pořád významně liší svojí prognózou a odpovědí na podávanou léčbu.

Informace o individuálním riziku každého pacienta může umožnit adjustovat intenzitu a typ podávané terapie, případně režim sledování. Možnost predikovat léčebnou odpověď výrazně nabývá na významu, uvážíme-li, že v současné době se kromě temozolomidu začínají v léčbě gliomů užívat i další preparáty či moderní léčebné postupy na bázi imunoterapie. Biomarkery, které jsou u gliálních nádorů již používány v klinické praxi nebo minimálně na úrovni klinických hodnocení, shrnuje tab. 1 (přehledně zpracováno v [3]).

S výjimkou kitu thetascreen MGMT Pyro Kit určeného k analýze metylace promotoru genu pro MGMT, který vyžaduje speciální instrumentaci – viz níže, a vybraných sond pro fluorescenční *in situ* hybridizaci – FISH (delece 1p/19q – Zytovision) bohužel nejsou pro žádný z využívaných biomarkerů na trhu dostupné

Tab. 1. Přehled molekulárních biomarkerů již používaných nebo vstupujících do klinické praxe.

Nádor	WHO grade	fúze <i>BRAF</i>	delece 1p/19q	mutace <i>IDH1</i>	metylace <i>MGMT</i>
pilocytický astrocytom	I	60–80 %	–	–	< 20 %
oligodendrogliom	II	–	80–90 %	80–94 %	60–93 %
anaplastický oligodendrogliom	III	–	50–70 %	90 %	50–75 %
difuzní astrocytom	II	–	–	70–90 %	40–45 %
anaplastický astrocytom	III	–	–	70 %	50 %
sekundární glioblastom	IV	–	–	80–85 %	40–60 %
primární glioblastom	IV	–	–	< 5 %	40 %
klinická využitelnost testu		diagnostická	diagnostická	diagnostická	
			prognostická	prognostická	prognostická
			prediktivní		prediktivní

diagnostické soupravy splňující podmínky certifikace CE IVD. Pro každý biomarker budou proto uvedeny nejčastěji používané metodiky jejich vyšetřování, přičemž doporučeny budou vždy metody, které jsou používány nejvíce a bylo u nich dosaženo dosud nejvyššího stupně standardizace. Jednotlivé metody budou vždy doplněny odkazy na studie, ve kterých byly využity a jsou v nich detailně popsány.

Fúze *BRAF*

Typickým znakem sporadických forem pilocytických astrocytomů jsou fúze genu *BRAF*, nejčastěji s genem *KIAA1549*, případně *RAF1*. Tyto fúze vedou k onkogenní aktivaci kinázy *BRAF*. Vzhledem k tomu, že tyto nádory většinou neprogredují do vyšších stupňů malignity, změny na úrovni kinázy *BRAF* jsou zodpovědné za fenotyp pilocytického astrocytomu, ale nevedou k jeho další malignizaci. Fúze *BRAF* umožňuje diagnosticky odlišit pilocytární astrocytom od dalších nízkostupňových gliomů. Fúze *BRAF* se nejčastěji vyšetřuje pomocí interfázni FISH se sondami *BRAF* a *KIAA1549* (např. Agilent SureFISH, Empire Genomics) [4] nebo detekcí transkriptu fúzního genu pomocí kvantitativní PCR (RT-qPCR) [5].

Doporučená metoda vyšetření: FISH, RT-qPCR

Delece 1p/19q

Současná delece 1p/19q je typickým znakem oligodendrogliomů, a její přítomnost byla opakovaně potvrzena jako příznivý prognostický i prediktivní biomarker u tohoto typu gliomů [6]. Ztráty v oblastech 1p/19q se standardně vyšetřují pomocí metody FISH. Pro vyšetření interfázni jader lze použít dvě různé lokusově specifické FISH sondy, např. LSI 1p36/1q25 a LSI 19q13/19p13 od firmy Vysis/Abbott nebo analogické produkty od ZytoVision, Intellmed aj. [7].

Status 1p/19q lze detekovat rovněž na základě analýzy ztráty heterozygotnosti (loss of heterozygosity – LOH), kdy je umožněno pomocí specifických genomových markerů, mikrosatelitní DNA, analyzovat změny ztráty částí chromozomů, ve kterých je konkrétní mikrosatelitní marker umístěn. Při LOH analýze se ztráta heterozygotnosti projevuje po rozdělení amplifikovaných fragmentů na elektroforéze jako vymizení jednoho ze signálů na lokusech [7,8].

Delece 1p/19q lze alternativně vyšetřit pomocí metody MLPA (multiplex ligation probe amplification), konkrétně produktu Oligodendroglioma Problemix

společnosti MRC-Holland, který umožňuje vyšetřit současně ko-delece 1p/19q i mutační stav *IDH1/2* [9].

Doporučená metoda vyšetření: FISH

Je možné využít status 1p/19q pro diagnostické účely?	Ano. Přítomnost delece 1p/19q je významným faktorem svědčícím pro oligodendrogliální nádor. Její nepřítomnost tuto jednotku nevylučuje.
Je status 1p/19q v rámci nádorové tkáně homogenní?	Ano. Bylo to experimentálně potvrzeno v případech gliomů stupně II a III. Neexistují data pro glioblastom.
Je možné využít status 1p/19q jako prognostický biomarker?	Ano. Delece 1p/19q je silným a příznivým prognostickým biomarkerem u pacientů s anaplastickým oligodendrogliomem podstupujících RT a/nebo chemoterapii alkylačními činidly. Pro definici prognostického významu u gliomů nižšího stupně neexistuje v současné době dostatek dat.
Je možné využít status 1p/19q jako prediktivní biomarker při klinickém rozhodování?	Ano. Studie RTOG 9402 a EORTC 26951 potvrdily delece 1p/19q jako prediktivní biomarker lepšího přežívání u pacientů léčených RT + PCV. Analogická data pro temozolomid nejsou známá.

Mutace *IDH1/2*

Mutace *IDH1* (R132) je kromě aplikovatelnosti v primární diagnostice silně asociována s příznivou prognózou u astrocytomů všech stupňů [10,11], přičemž jsou přítomné především u gliomů stupně II a III, viz tabulka níže. Mutace v *IDH1/2* mohou být detekovány přímou sekvenací jejich genů [12], při které ovšem narážíme na problém s nízkou senzitivitou (minimálně 25 % buněk ve vzorku musí být mutovaných). *IDH1/2* lze vyšetřovat s vysokou citlivostí pomocí PCR s následnou analýzou tání s vysokým rozlišením (HRM) [13]. Díky nízké frekvenci mutací *IDH2* je často vyšetřován pouze mutační status *IDH1*, což lze považovat za dostatečné. K vyšetření *IDH1* se často používá také mutačně specifická protilátka (*IDH1* R132H, klon H09, společnost Dianova) a imunohistochemická detekce (IHC) [12]. Mutační stav obou genů lze detekovat rovněž pomocí metodiky MLPA (*BRAF-IDH1-IDH2* nebo Oligodendroglioma Problemix, MRC-Holland) [14].

Doporučená metoda vyšetření: sekvenace, HRM, IHC

Je možné použít status <i>IDH1/2</i> pro diagnostické účely?	Ano. Mutace <i>IDH1/2</i> jsou velice časté u gliomů stupně II a III a mohou pomoci při diferenciální diagnostice odlišit reaktivní gliózu a další gliální nádory, jako je např. pilocytární astrocytom, gangliogliom nebo ependymom, které obvykle nenesou mutace <i>IDH1/2</i> . Přítomnost mutací umožní odlišit primární a sekundární glioblastomy, přičemž jsou přítomné především u glioblastomů sekundárních.
Jsou mutace <i>IDH1/2</i> v rámci tumoru homogenní?	Ano. V případě gliomů stupně II a III je to experimentálně potvrzeno, pro glioblastom nejsou dostupná data.
Je možné využít status <i>IDH1/2</i> ke stanovení prognózy?	Ano. Mutace <i>IDH1/2</i> jsou příznivým prognostickým faktorem u vysokostupňových gliomů.
Je možné využít status <i>IDH1/2</i> jako prediktivní biomarker při klinickém rozhodování?	Ne.

Metylační status *MGMT*

Metylační status promotoru genu pro *MGMT* je v současné době asi nejvíce používaným molekulárním biomarkerem u gliálních nádorů. Metylace *MGMT* byla opakovaně spojována nejen s prognózou, a to většinou u studií staršího data, ale především s odpovědí na léčbu alkylačními činidly, nejvíce pak temozolomidem, jehož podání je kromě radio-terapie základem onkologické léčby high-grade gliomů (HGG). Methylace promotoru reparačního genu *MGMT* způsobující epigenetické umlčení jeho transkripce vede u daného nádoru ke snížené kapacitě reparace DNA, a znamená tak lepší odpověď na léčbu temozolomidem [15,16]. Tento biomarker, byť již rutinně užívaný, má některé, především metodické limitace, protože analýza metylací nepatří mezi běžné postupy užívané ve standardizované molekulární diagnostice [17,18]. Z analytického hlediska se jako problematická jeví především skutečnost, že kvantifikace stupně metylace ve vzorku DNA nevypovídá pouze o míře metylace jednotlivých promotorů, ale současně také o množství metylovaných promotorů ve vzorku, což může být zavádějící vzhledem k heterogenitě tkáně gliálních nádorů.

V současné době není ani konsenzuálně definována prahová hodnota positivity pro metylovaný vzorek. Prahové hodnoty se tak ve studiích různě v závislosti na použitých metodikách i v řádu desítek procent [18].

Pro vyšetřování metylačního statusu *MGMT* je na trhu k dispozici komerční souprava theascreen *MGMT* Pyro Kit splňující podmínky certifikace CE IVD. Tato metoda ovšem vyžaduje speciální a nákladnou instrumentaci, pyrosekvenátor PyroMark Q24 společnosti Qiagen, který obvykle není součástí standardního vybavení molekulárně genetických laboratoří [19]. Většina laboratoří proto využívá vlastní metody detekce metylace promotoru genu pro *MGMT*, obvykle metylačně specifickou kvantitativní PCR (MS-qPCR) [19,20] nebo metylačně senzitivní analýzu tání s vysokým rozlišením (methylation-sensitive high-resolution melting – MS-HRM) [21,22] s individuálně definovanými prahovými hodnotami pro pozitivitu výsledku vyjádřenou procentuální hodnotou (např. vzorek X – metylace 70 %, pozitivní). Alternativně je možné použít pro analýzu metylace *MGMT* rovněž metodiku MLPA (mismatch repair genes probemix, MRC-Holland) [23].

Doporučená metoda vyšetření: MS-qPCR, MS-HRM

Je možné využít status promotoru <i>MGMT</i> pro diagnostické účely?	Ne.
Je status <i>MGMT</i> v rámci tumoru homogenní?	Na základě většiny studií ano.
Mění se status <i>MGMT</i> v průběhu progresu onemocnění?	Ne. Většina gliomů má v recidivě onemocnění stejný status <i>MGMT</i> jako v původním tumoru.
Je možné využít status <i>MGMT</i> ke stanovení prognózy?	Ano. Methylace promotoru <i>MGMT</i> je příznivým prognostickým faktorem u anaplastických gliomů a glioblastomů léčených RT a/nebo chemoterapií (NOA-04, EORTC 26981).
Je možné využít status <i>MGMT</i> jako prediktivní biomarker při klinickém rozhodování?	Ano. Methylace promotoru <i>MGMT</i> predikuje benefit z terapie alkylačními činidly u glioblastomu (EORTC 26981), přičemž je jako prediktor použitelný také u pacientů vyššího věku (NOA-08, Nordic trial).

Literatura

1. Horbinski C, Hamilton RL, Nikiforov Y et al. Association of molecular alterations, including BRAF, with biology and outcome in pilocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol* 2010; 119(5): 641–649. doi: 10.1007/s00401-009-0634-9.
2. Aldape K, Burger PC, Perry A. Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. *Arch Pathol Lab Med* 2007; 131(2): 242–251.
3. Berghoff AS, Stefanits H, Woehrer A et al. Clinical neuropathology practice guide 3–2013: levels of evidence and clinical utility of prognostic and predictive candidate brain tumor biomarkers. *Clin Neuropathol* 2013; 32(3): 148–158.
4. Korshunov A, Meyer J, Capper D et al. Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathol* 2009; 118(3): 401–405. doi: 10.1007/s00401-009-0550-z.
5. Tian Y, Rich BE, Vena N et al. Detection of KIAA1549–BRAF fusion transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded pediatric low-grade gliomas. *J Mol Diagn* 2011; 13(6): 669–677. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.07.002.
6. Nikiforova MN, Hamilton RL. Molecular diagnostics of gliomas. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135(5): 558–568. doi: 10.1043/2010-0649-RAIR.1.
7. Horbinski C, Nikiforova MN, Hobbs J et al. The importance of 10q status in an outcomes-based comparison between 1p/19q fluorescence in situ hybridization and polymerase chain reaction-based microsatellite loss of heterozygosity analysis of oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71(1): 73–82.
8. Horbinski C, Hamilton RL, Nikiforov Y et al. Association of molecular alterations, including BRAF, with biology and outcome in pilocytic astrocytomas. *Acta Neuropathol* 2010; 119(5): 641–649. doi: 10.1007/s00401-009-0634-9.
9. Natté R, van Eijk R, Eilers P et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of 1p and 19q chromosomal loss in oligodendroglial tumors. *Brain Pathol* 2005; 15(3): 192–197.
10. Sanson M, Marie Y, Paris SI et al. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 2009; 27(25): 4150–4154. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832.
11. Hartmann C, Hentschel B, Wick W et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* 2010; 120(6): 707–718. doi: 10.1007/s00401-010-0781-z.
12. van den Bent MJ, Hartmann C, Preusser M et al. Interlaboratory comparison of IDH mutation detection. *J Neurooncol* 2013; 112(2): 173–178. doi: 10.1007/s11060-013-1056-z.
13. Horbinski C, Kelly L, Nikiforov YE et al. Detection of IDH1 and IDH2 mutations by fluorescence melting curve analysis as a diagnostic tool for brain biopsies. *J Mol Diagn* 2010; 12(4): 487–492. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090228.
14. Molenaar RJ, Verbaan D, Lamba S et al. The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone. *Neuro Oncol*. In press 2014.
15. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10): 997–1003.
16. Lakomy R, Sana J, Hankeova S et al. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci* 2011; 102(12): 2186–2190. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02092.x.
17. Olson RA, Brastianos PK, Palma DA. Prognostic and predictive value of epigenetic silencing of MGMT in patients with high grade gliomas: a systematic review and meta-analysis. *J Neurooncol* 2011; 105(2): 325–335. doi: 10.1007/s11060-011-0594-5.
18. Mason S, McDonald K. MGMT testing for glioma in clinical laboratories: discordance with methylation analyses prevents the implementation of routine immunohistochemistry. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138(11): 1789–1797. doi: 10.1007/s00432-012-1312-1.
19. Håvik AB, Brandal P, Honne H et al. MGMT promoter methylation in gliomas assessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR. *J Transl Med* 2012; 10: 36. doi: 10.1186/1479-5876-10-36.
20. Hateermann K, Mehdorn HM, Mentlein R et al. A methylation-specific and SYBR-green-based quantitative polymerase chain reaction technique for O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation analysis. *Anal Biochem* 2008; 377(1): 62–71. doi: 10.1016/j.ab.2008.03.014.
21. Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MSHRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(6): e41.
22. Adachi J, Mishima K, Wakiya K et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in 45 primary central nervous system lymphomas: quantitative assessment of methylation and response to temozolomide treatment. *J Neurooncol* 2012; 107(1): 147–153. doi: 10.1007/s11060-011-0721-3.
23. Sunwoo L, Choi SH, Park CK et al. Correlation of apparent diffusion coefficient values measured by diffusion MRI and MGMT promoter methylation semiquantitatively analyzed with MS-MLPA in patients with glioblastoma multiforme. *J Magn Reson Imaging* 2013; 37(2): 351–358. doi: 10.1002/jmri.23838.

RADIOTERAPIE A CHEMOTERAPIE GLIOMŮ

Lakomý R.¹, Šlampa P.², Třebický F.³

¹ Klinika komplexní onkologické péče LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno

² Klinika radiační onkologie LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno

³ Ústav radiační onkologie 1. LF UK a Nemocnice Na Bulovce, Praha

Obecné zásady

Základním léčebným přístupem u většiny mozkových nádorů je **chirurgický zákrok**. V optimálním případě je cílem úplná resekce tumoru bez poškození funkčně důležitých oblastí mozku. Parciální výkon mívá horší léčebné výsledky. Inoperabilní mozkový nádor je nutno histologicky verifikovat. V případě diskrpance peroperačního a histologického nálezu je vhodné provedení druhého čtení. **Druhé čtení histologie** nezávislým neuropatologem by mělo být v blízké době standardním postupem.

Jen ve výjimečných případech lze onkologickou terapii (radioterapii, event. chemoterapii) indikovat u neověřených tumorů, např. při neúnosném riziku provedení biopsie punkce v oblasti mozkového kmene, a to na základě charakteristického obrazu při vyšetření mozku zobrazovací metodou (MRI nebo CT s kontrastem). Léčebná strategie, zvláště pooperační a léčba recidiv, musí být určena **multidisciplinárním týmem**, zpravidla ve složení neurochirurg, radiační a klinický onkolog, radiodiagnostik, neurolog a patolog, a řešena s přihlédnutím ke všem rizikovým faktorům včetně celkového stavu pacienta. Vzhledem k pokrokům v oblasti molekulární biologie bude v budoucnu nezbytná spolupráce i s dalšími obory.

K negativním molekulárním prognostickým faktorům astrocytární řady dnes řadíme: nepřítomnost mutace genu pro *IDH1*, absenci metylace promotoru genu pro *MGMT* (major faktory) a non-co-delece 1p/19q (minor faktory). U oligodendrogliomů jsou dnes za hlavní negativní prognostické faktory považovány: absence co-delece 1p/19q a nepřítomná mutace genu pro *IDH1* (major faktory).

1. HIGH-GRADE GLIOMY

V této části bude uvedena doporučená léčba nejčastějších high-grade gliomů (HGG), což jsou anaplastický

astrocytom G3, glioblastoma multiforme (astrocytom G4), anaplastický oligodendrogliom G3 a smíšené oligoastrocytomy G3. Jedná se o vysoce maligní tumory s infiltrativním růstem. Ependymomy budou vzhledem k odlišné pooperační léčbě uvedeny zvlášť.

1.1 Pooperační léčba

Pooperační léčba HGG je dnes založená na radioterapii a chemoterapii. K základním klinickým příznivým prognostickým faktorům stále patří makroskopicky totální resekční výkon, věk pod 50 let, ECOG PS 0–1 [1,2]. K příznivým molekulárním prognostickým faktorům dnes řadíme přítomnou metylaci promotoru genu pro *MGMT*, co-deleci 1p/19q a mutaci genu pro isocitrátdehydrogenázu 1 (*IDH1*) [1,3–6]. Cílená (biologická) léčba zatím není mimo klinické studie standardně indikována, její zařazení bude podmíněno pozitivními výsledky z velkých randomizovaných klinických studií [7–8].

1.1.1 Radioterapie

Radioterapie má v léčbě nádorů centrální nervové soustavy nezastupitelnou roli. Zvláště po nekompletně provedených resekcích významně zlepšuje léčebné výsledky.

Pokud je stav nemocného odpovídající (KI 70 % a více), je zpravidla aplikována dávka záření 54–60 Gy, 5 × 1,8–2,0 Gy/týden, v délce šesti týdnů. Celkovou dávku záření je nutno upravit s ohledem na velikost ozařovaného objemu (plánovací cílový objem, PTV) a podle dávek na kritické orgány. Při eskalaci dávky nad 60 Gy či při použití hyperfrakcionace (ozařování 2krát denně) nebylo jednoznačně prokázáno prodloužení přežití, tyto režimy mají vyšší toxicitu (jejich indikaci je nutno zvažovat individuálně).

U pacientů se závažnými interkurentními chorobami, v horším celkovém stavu, KI 60–70 %, se provádí radioterapie na oblast lůžka tumoru nebo na

vlastní nádor v akcelerovaném režimu – dávka a frakcionace jsou voleny individuálně ($14\text{--}16 \times 2,5$ Gy, $10\text{--}12 \times 3,0$ Gy, $5 \times 4,0$ Gy, $1 \times 6\text{--}8$ Gy).

1.1.2 Chemoterapie

Chemoterapie má dnes významné postavení v léčbě HGG, a to jak v pooperační (adjuvantní) indikaci, tak i v léčbě recidiv.

Anaplastické gliomy – G3

a) Anaplastický oligodendrogliom G3 a anaplastický oligoastrocytom G3 s delecí 1p/19q

Dle dlouhodobého sledování pacientů léčených v klinických studiích 3. fáze s adjuvantní radioterapií a chemoterapií v režimu PCV (studie RTOG 9402 a EORTC 26951) bylo díky adjuvantní chemoterapii (prokarbazin, lomustin, vinkristin) 4krát před nebo 6krát po radioterapii dosaženo signifikantně delšího celkového přežití [9–11]. Dnes je v onkologických kruzích diskutována otázka možné náhrady režimu PCV za méně toxický a stejně účinný temozolomid (studie 3. fáze – NOA-04) [12].

b) Anaplastický oligodendrogliom G3, anaplastický oligoastrocytom G3 a anaplastický astrocytom G3 bez delecí 1p/19q

Chemoterapie po resekčním výkonu může být alternativou radioterapie. Radioterapie je však stále používána jako metoda první volby a chemoterapie je rezervována pro léčbu recidivy nebo progresse nádoru. Sekvence metod v opačném pořadí je také možná, celkové přežití pacientů je stejné (studie 3. fáze – NOA-04) [12].

Adjuvantní konkomitantní podání temozolomidu s radioterapií (Stuppův režim pro glioblastomy) v případě G3 gliomů bez delecí 1p/19q je dnes předmětem probíhajících klinických studií (RTOG 0834 – CATNON trial), tudíž zatím nelze tento postup považovat za standardní. Onkologická veřejnost je v těchto případech nejednotná, hranice mezi G3 a G4 astrocytomy není ostrá, nádory jsou často velmi heterogenní, indikaci konkomitantní chemoradioterapie je proto v těchto případech nutno zvažovat individuálně.

Glioblastoma multiforme – G4

a) Pacienti mladší 70 let (KI $\geq 70\%$)

Zde je standardním postupem pooperační konkomitantní chemoradioterapie s temozolomidem

s následným podáním šesti cyklů temozolomidu v 28denním intervalu. Tento postup je podložen výsledky klinické studie 3. fáze z roku 2005 (EORTC 26981 – Stupp et al [1]).

Zda mají pacienti benefit z prodloužené adjuvance/udržovací léčby (> 6 měsíců), zatím není jasné, není podloženo většími klinickými studiemi, proto je třeba v těchto případech postupovat individuálně (dle klinického průběhu, MRI nálezu, případně aktivity na 18F-FLT PET).

Alternativní dose-dense režim s adjuvantním/udržovacím temozolomidem po ukončené konkomitantní fázi neprokázal lepší výsledky ve srovnání se standardním 28denním cyklem (studie 3. fáze – RTOG 0525) [13].

Větší benefit z chemoterapie s alkylačním účinkem lze očekávat u pacientů s přítomnou metylací MGMT. U těchto pacientů se vyskytuje i vyšší procento „pseudoprogresí“ (20–30 %) – enhancement v MRI a CT obrazu na základě nekrózy nádoru, postradiačního zánětu v okolí a poškození endotelu cév (změna permeability). Pseudoprogrese se nejčastěji objevuje do tří měsíců po ukončení konkomitantní chemoradioterapie a často nebývá doprovázena klinickým zhoršením stavu. Pokud nejsou splněna kritéria jasné progresse, mělo by se pokračovat v adjuvantním/udržovacím temozolomidu (kritéria RANO) [5,14].

U pacientů léčených konkomitantní chemoradioterapií bylo v pilotní studii zjištěno zvýšené riziko vzniku pneumonie způsobené *Pneumocystis carinii*. Proto je nutné posoudit uvedené riziko u každého pacienta, zvláště má-li také současně nasazenu antiedematózní terapii s kortikoidy a nižší hodnoty leukocytů (lymfocytů $< 0,5 \times 10^9/l$). U těchto rizikových pacientů je vhodné zvážit profylaxi pneumonie způsobené *Pneumocystis carinii* aplikací kombinace sulfamethoxazolu a trimethoprimu (např. Biseptol tbl., Cotrimoxazol tbl., Sumetrolin tbl. aj.) nebo inhalací pentamidinu (v zahraničí, v ČR není k dispozici – jen na zvláštní dovoz).

b) Pacienti starší 70 let nebo pacienti v horším klinickém stavu (KI 60–70 %)

Zde je zpravidla indikována samotná pooperační radioterapie, vhodné zvážit šetrnější, stejně účinné hypofrakcionované režimy ($30\text{--}36$ Gy v $10\text{--}12$ frakcích nebo $40\text{--}42$ Gy v $15\text{--}16$ frakcích). Samotná che-

moterapie s temozolomidem je dle studií 3. fáze (NOA-08 a Nordic trial) rovnocennou alternativou radioterapie. Větší benefit z chemoterapie lze očekávat v případě metylace promotoru genu pro *MGMT* [15,16]. Použití konkomitantní chemoradioterapie s temozolomidem je předmětem probíhajících studií (EORTC 26062).

Adjuvantní chemoterapeutické režimy

1. Konkomitantní chemoradioterapie

a adjuvantní chemoterapie s temozolomidem (TMZ)

TMZ	75 mg/m ² , den 1.–42., p.o., po dobu radioterapie (i přes ví- kendy) a adjuvantní podávání po ukončení konkomitantní chemoradioterapie
Radioterapie	5 × 1,8–2,0 Gy/týden, celková dávka 60 Gy
V adjuvantní terapii (po ukončení konkomitance CHT/RT):	
TMZ	150–200 mg/m ² , p.o., den 1.–5., interval 28 dní, celkem 6 cyklů

2. Adjuvantní chemoterapie s temozolomidem

TMZ	150–200 mg/m ² , p.o., den 1.–5., interval 28 dní, celkem 6 cyklů
-----	---

3. PCV (RTOG 9402) – delece 1p/19q

prokarbazin	75 mg/m ² , p.o., den 8.–21.
CCNU (lomustin)	130 mg/m ² , p.o., den 1.
vinkristin	1,4 mg/m ² (max. 2 mg), i.v., den 8., 29. interval 6 týdnů, 4krát před RT

4. PCV (EORTC 26951) – delece 1p/19q

prokarbazin	60 mg/m ² , p.o., den 8.–21.
CCNU (lomustin)	110 mg/m ² , p.o., den 1.
vinkristin	1,4 mg/m ² (max. 2 mg), i.v., den 8., 29. interval 6 týdnů, 6krát po RT

1.2 Léčba recidivy/progrese

Při recidivě onemocnění se volí postup dle věku, celkového stavu, primární histologie, předchozí odpovědi na léčbu, doby od původní diagnózy a rozsahu recidivy (nejlépe při týmové multidisciplinární rozvaze). U lokálních tumorů je na prvním místě chirurgie,

u inoperabilních recidiv se zvažuje systémová terapie či případná reiradiace, u rozsáhlých onemocnění je doporučen jen symptomatický postup.

1.2.1 Paliativní radioterapie

Indikaci reiradiace je třeba individuálně a pečlivě zvážit. Důležité je, v jaké oblasti recidiva vznikla, jaký je celkový stav pacienta, jaká byla předchozí aplikovaná dávka a jakou dávku z předchozí radioterapie obdržela oblast mozku se současnou recidivou, kritické orgány a struktury.

Dávka a frakcionace jsou voleny individuálně. Z možností léčby zářením lze uvést:

- zevní standardní radioterapie, event. IMRT nebo IMAT technika (intensity-modulated multiple arc therapy);
- radiochirurgie (SRS) – u mladých pacientů s KI ≥ 70 %, recidiva do velikosti 3 cm, fixace v rámu, dávka dle předchozí radioterapie 15–20 Gy;
- stereotaktická radioterapie (SRT) – pacienti s KI ≥ 70 %, i starší pacienti, tumor do 4 cm, fixace v masce, dávka individuálně dle předchozí radioterapie 5 × 5 Gy, 5 × 6 Gy, 5 × 4 Gy.

1.2.2 Paliativní chemoterapie

Paliativní chemoterapie se uplatňuje v léčbě rekurencí nebo progresu reziduálních nálezů. Aplikuje se zpravidla temozolomid, ve druhé linii pak deriváty nitrosourey (karmustin, lomustin, kombinované režimy – PCV). Velmi důležitou roli hraje také podpůrná léčba.

Paliativní chemoterapeutické režimy

(volba odlišného režimu od adjuvance)

1. Temozolomid

TMZ	150–200 mg/m ² , den 1.–5., interval 28 dní, léčba do progresu
-----	--

2. PCV

prokarbazin	60 mg/m ² , p.o., den 8.–21.
CCNU (lomustin)	110 mg/m ² , p.o., den 1.
vinkristin	1,4 mg/m ² (max. 2 mg), i.v., den 8., 29. interval 6–8 týdnů, do progresu

3. BCNU v monoterapii

BCNU (karmustin)	80 mg/m ² , i.v., den 1.–3., interval 6–8 týdnů, do progresu
------------------	--

4. CCNU v monoterapii

CCNU (lomustin) 110 mg/m², p.o., den 1.,
interval 6–8 týdnů, do progresu

Ostatní vysoce paliativní režimy založené na CBDCA, ifosfamidů či vepesidu lze nalézt v Zásadách cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění (ČOS ČLS JEP).

1.3 Sledování po léčbě (follow-up)

a) Klinické kontroly – Nejsou-li komplikace, následuje první kontrola na ambulanci onkologie a neurologie jeden měsíc po skončení léčby ke zhodnocení odeznívajících akutních vedlejších účinků léčby. Dále pak probíhají kontroly neurologem a onkologem v prvních 2–3 letech v intervalech po třech měsících. V období tří a více let po léčbě následují onkologické a neurologické kontroly v intervalech 4–6 měsíců. Kontroly v neurochirurgické ambulanci probíhají fakultativně, dle zvyklostí pracoviště.

b) Zobrazovací vyšetření – MRI kontroly po třech měsících v prvních 2–3 letech po léčbě. Poté je vhodná kontrola každých šest měsíců do pěti let po léčbě, dále à 1 rok. Podle klinického stavu a event. záchvatových projevů je prováděno EEG vyšetření, obvykle po šesti měsících. V indikovaných případech možno zvážit 18F-FLT PET.

c) Laboratoř – Při kortikoterapii se sleduje hladina glykemie a draslíku, při chemoterapii navíc jaterní testy, funkce ledvin a KO + diff., při antiepileptické terapii hladina antiepileptik v séru (neurologická ambulance).

2. LOW-GRADE GLIOMY

Jednoznačně doporučená strategie léčby low-grade gliomů (LGG) nebyla doposud definována. Nejdůležitější diagnostickou a léčebnou modalitou je neurochirurgický zákrok. Cílem chirurgie je odběr vzorku ke stanovení přesné diagnózy a gradingu. Kompletní resekce tumoru může snížit riziko budoucí maligní transformace. V současné době je standardem léčby nízké maligních gliomů pokus o kompletní resekci vedený v zásadách „maximálně bezpečné resekce“, tedy takové operace, která nevyvolá neurologický deficit a nevede ke zhoršení kvality života.

2.1 Pooperační léčba

2.1.1 Pooperační radioterapie

Rozhodnutí o aplikaci pooperační radioterapie u LGG je rovněž nevyřešenou otázkou. Kontroverzní je především správné načasování radioterapie. Radioterapie může být zahájena „okamžitě“ po chirurgickém zákroku, nebo může být „odložena“ a zahájena až v případě progresu či recidivy nebo zhoršení klinických potíží.

Po subtotální resekci nebo u inoperabilních tumorů a špatně farmakologicky kontrolované neurologické symptomatologii je indikováno „okamžité“ ozáření.

U asymptomatických pacientů lze se zahájením radioterapie vyčkávat (při kontrolované epilepsii je indikace radioterapie kontroverzní). U pacientů starších 40 let se ozáření obvykle doporučuje – riziko brzkého přechodu do HGG [17].

Volba sledování a odklad radioterapie až na dobu případné progresu či recidivy je možná u vybraných pacientů s příznivými prognostickými faktory:

- při totální resekci, věku < 40 let, nízkém riziku (< 3 nepříznivé prognostické faktory),
- lze zvážit u inkompletní resekce nebo biopsie u tumorů malé velikosti a nepřítomných symptomů.

Volba okamžité pooperační radioterapie:

- při inkompletní resekci nebo biopsii, věku ≥ 40 let nebo přítomných symptomů (včetně nekontrolované epilepsie),
- při totální resekci a vysokém riziku (≥ 3 nepříznivé prognostické faktory).

Nepříznivými prognostickými faktory jsou:

- věk ≥ 40 let, histologicky čistý astrocytom, velikost tumoru ≥ 6 cm, tumor překračující střední čáru, neurologický deficit přítomný před operací. V úvahu lze mimo skórovací systém vzít také nepřítomnost mutace genu pro *IDH1* a absenci co-delece 1p/19q.
- Pacienti s nízkým rizikem mají 0–2 nepříznivé prognostické faktory.
- Pacienti s vysokým rizikem mají 3–5 nepříznivých prognostických faktorů [18].

Frakcionace a dávka radioterapie

Standardní dávka používaná u nízké maligních gliomů se pohybuje v rozmezí 45 až 54 Gy při

1,8–2,0 Gy na frakci. Doporučená dávka je zpravidla 54 Gy, 5 × 1,8 Gy/týden.

Eskalace dávky nepřináší zlepšení výsledků. Dle poznatků ze studií fáze I použití technik stereotaktické radioterapie, event. radiochirurgie neprokázalo výhodu, mohou se však uplatnit při léčbě recidiv nebo u vybraných případů.

2.1.2 Pooperační chemoterapie

Chemoterapie u LGG zatím nepatří k léčebným modalitám první volby, často je používána až po vyčerpání možností radioterapie. Chybí velké randomizované klinické studie, které by prokázaly vyšší účinnost než radioterapie. Data pro její pooperační aplikaci se opírají především o retrospektivní nebo menší klinické studie. Přednost před radioterapií bude mít spíše u mladých pacientů s objemnými tumory (velké ozařovací pole, sekundární vliv radioterapie na kognitivní funkce) a přítomnou co-delecí 1p/19q (předpoklad chemosenzitivity). Základním cytostatikem je temozolomid, po jeho selhání pak deriváty nitrosourey, režimy chemoterapie viz High-grade gliomy.

2.2 Léčba recidivy/progrese

Recidiva LGG by měla být řešena chirurgicky s následnou radioterapií, nebyla-li aplikována pooperačně. V případě, že proběhla předchozí radioterapie, je po resekci recidivy vhodné zvážit chemoterapii, zejména u oligodendrogliomů, které mohou být chemosenzitivní. Zvláště oligodendrogliomy s delecí 1p/19q jsou vysoce citlivé na alkylační cytostatika (režimy s temozolomidem, BCNU, CCNU, PCV, platinové režimy). Při druhé recidivě je doporučena změna chemoterapeutického režimu nebo zvážení reiradiace nebo jen symptomatická léčba. Režimy chemoterapie viz High-grade gliomy.

2.3 Sledování po léčbě (follow-up)

a) Klinické kontroly – Nejsou-li komplikace, následuje první kontrola na ambulanci onkologie a neurologie jeden měsíc po skončení léčby ke zhodnocení odeznívajících akutních vedlejších účinků léčby. Dále pak probíhají kontroly neurologem v prvních 2–3 letech v intervalech po 3–4 měsících, onkologem po šesti měsících. V období tři a více let po léčbě následují kontroly u neurologa po šesti měsících, u onkologa po 6–12 měsících. Kontroly v neurochirurgické ambulanci probíhají fakultativně, dle zvyklostí pracoviště.

b) Zobrazovací vyšetření – MRI kontroly po šesti měsících v prvních dvou letech po léčbě (první vyšetření tři měsíce po ukončení léčby). Poté je vhodná kontrola každých 6–12 měsíců do pěti let po léčbě, dále 1krát ročně. Podle klinického stavu a event. záchvatových projevů je prováděno EEG vyšetření, obvykle po šesti měsících. V indikovaných případech možno zvážit 18F-FLT PET (riziko přechodu do HGG).

c) Laboratoř – Při kortikoterapii se sleduje hladina glykemie a draslíku, při chemoterapii navíc jaterní testy, funkce ledvin a KO + diff., při antiepileptické terapii hladina antiepileptik v séru (neurologická ambulance).

3. EPENDYMOMY

U dospělých je asi 1/3 ependymomů lokalizováno infratentoriálně a 2/3 supratentoriálně, u dětí je tomu opačně. Celkem 90 % intrakraniálních ependymomů je umístěno v zadní jámě lební. Spinální ependymomy jsou nejčastěji lokalizovány v oblasti caudae equinae a fillum terminale (70 %). Metastazování se děje hlavně likvorovými cestami, hematogenní šíření je vzácné.

3.1 Léčebná strategie

Metodou první volby v léčbě ependymomů je **chirurgický zákrok**.

Pooperační radioterapie zlepšuje léčebné výsledky (5leté přežití zvyšuje z 30 % na 80 %). Jako minimální se uvádí dávka záření 45 Gy, většinou se doporučuje dávka 54–59,2 Gy.

Kraniospinální ozaření je indikováno vždy při pozitivní cytologii mozkomíšního moku a/nebo při MRI nálezů v páteřním kanálu. Na oblast míšního kanálu, s kaudální hranicí ozařovaného pole v úrovni těl obratlů S_{2-3} , a objem celé mozkovny se doporučuje aplikovat dávku 30–36 Gy. Pooperační ozaření se doporučuje i u *spinální formy ependymomu*. U vysoce maligních forem lokalizovaných v oblasti krční a hrudní páteře se doporučuje individuálně zvážit profylaktické ozaření celé kraniospinální osy (30–36 Gy) a doozaření lůžka tumoru v rozsahu dvou obratlů nad a pod hranicemi nádoru do celkové dávky 45 Gy. U *low-grade* ependymomů se dává přednost lokalizované pooperační radioterapii (50–54 Gy).

Výsledky **chemoterapie** u ependymomů nejsou přesvědčivé, nicméně léčebné protokoly standardně chemoterapii v případě recidiv doporučují (např. etopozid, temozolomid, nitrosourea či platinové preparáty).

U dětských pacientů jsou cílové objemy, dávka a frakcionace záření, technika radioterapie určeny léčebným protokolem POG či SIOP.

Literatura

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10): 987–996.
2. Lakomý R, Fadrus P, Šlampa P et al. Výsledky multimodální léčby glioblastoma multiforme: konsekutivní série 86 pacientů diagnostikovaných v letech 2003–2009. *Klin Onkol* 2011; 24(2): 112–120.
3. Hegi ME, Liu L, Herman JG et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol* 2008; 26(25): 4189–4199. doi: 10.1200/JCO.2007.11.5964.
4. Sanson M, Marie Y, Paris S et al. Isocitrate dehydrogenase 1 Codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 2009; 27(25): 4150–4154. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9832.
5. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol* 2008; 26(13): 2192–2197. doi: 10.1200/JCO.2007.14.8163.
6. Lakomy R, Sana J, Hankeova S et al. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and MGMT methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci* 2011; 102(12): 2186–2190. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02092.x.
7. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; 370: 699–708.
8. Chinot OL, Wick W, Mason W et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med* 2014; 370: 709–722.
9. Cairncross G, Berkey B, Shaw E et al. Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J Clin Oncol* 2006; 24(18): 2707–2714.
10. van den Bent MJ, Carpentier AF, Brandes AA et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial. *J Clin Oncol* 2006; 24(18): 2715–2722.
11. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJ et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol* 2012; 31(3): 344–350. doi: 10.1200/JCO.2012.43.2229.
12. Wick W, Hartmann C, Engel C et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* 2009; 27(35): 5874–5880. doi: 10.1200/JCO.2009.23.6497.
13. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD et al. RTOG 0525: a randomized phase III trial comparing temozolomide (TMZ) with a dose-dense (dd) schedule in newly diagnosed glioblastoma (GBM). *J Clin Oncol* 2011; 29 (Suppl): abstr. 2006.
14. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol* 2010; 28(11): 1963–1972. doi: 10.1200/JCO.2009.26.3541.
15. Wick W, Platten M, Meisner C et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(7): 707–715. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X.
16. Malmström A, Gronberg BH, Marosi C et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy for patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(9): 916–926.
17. Šlampa P, Kazda T. Konzervativní postupy v léčbě gliomů. *Postgraduální medicína* 2013; 15(3): 277–281.
18. Pignatti F, van den Bent M, Curran D et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J Clin Oncol* 2002; 20(8): 2076–2084.

PŘÍLOHA I

Doporučené postupy MRI

Doporučený protokol MRI vyšetření při dg. mozkový tumor.

Údaje nastavené pro přístroj 1,5 Tesla AVANTO Siemens.

	Rovina	TR (ms)	TE (ms)	Flip angle	Slice thickness FOV	Fov (mm)	Voxel (mm)
T1 SE (PAT2)	sagit.	511	15	90	5	230	1 × 0,9 × 5
T2 TSE	trans.	4 340	99	150	5	230	0,7 × 0,5 × 5
T1 SE (PAT2)	trans.	486	15	90	3	230	0,9 × 0,9 × 3
FLAIR trans.	trans.	8 500	111	150	5	230	0,9 × 0,9 × 5
DWI (1000)	trans.	3 700	114		5	230	1,2 × 1,2 × 5
T2 TSE	coron.	4 340	99	150	5	230	0,7 × 0,5 × 5
T1 SE MTC k.l.	trans.	692	16	90	3	230	0,9 × 0,9 × 3
T1 SE	sagit.	390	12	90	5	230	1 × 0,9 × 5
T1 SE	coron.	695	12	90	5	230	1 × 0,9 × 5

Doporučený protokol MRI vyšetření při dg. expanze míchy a páteřního kanálu.

Údaje nastavené pro přístroj 1,5 Tesla AVANTO Siemens.

	Rovina	TR (ms)	TE (ms)	Flip angle	Slice thickness FOV	Fov (mm)	Voxel (mm)
STIR (PAT2)	sagit.	5 000	69	150	4	320	1,5 × 1,3 × 4
T2 TSE (PAT2)	sagit.	3 810	108	170	4	320	0,8 × 0,7 × 4
T1 TSE (PAT2)	sagit.	500	10	150	4	320	1 × 1 × 4
myelografie	sagit.	8 000	1 200	150	50	340	1 × 0,7 × 50
myelografie	coron.	8 000	1 200	150	50	340	1 × 0,7 × 50
T2 TSE	trans.	4 100	99	150	4	250	0,8 × 0,6 × 4
T1 TSE (PAT2)	trans.	558	11	150	4	260	0,8 × 0,8 × 4
T1 TSE (PAT2) k.l. i.v.	trans.	558	11	150	4	260	0,8 × 0,8 × 4
T1 TSE FS	trans.	707	11	150	3	230	0,9 × 0,9 × 3
T1 TSE (PAT2)	sagit.	500	10	150	4	320	1 × 1 × 4
T1 TSE (PAT2)FS	sagit.	850	11	150	3	320	1 × 1 × 3

Pozn.: Pro ostatní výrobce a pro silnější magnetické pole doporučení s úpravami.

Zpracovala MUDr. Renata Belanová (MOÚ, Brno) ve spolupráci s MUDr. Andreou Šprlákovou-Pukovou (FN Brno).

Odběr, transport a uchovávání biologického materiálu pro výzkumné účely v rámci Center Neuroonkologické sekce

Šedo A.¹, Slabý O.^{2,3}

¹ 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

² Masarykův onkologický ústav, Brno

³ CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

1. Účel a rozsah platnosti dokumentu

Tento doporučený postup definuje způsoby odběrů vzorků a jejich transport z odběrových míst do míst dlouhodobého uchovávání – bank biologického materiálu (BBM) – v rámci jednotlivých Center NOS ČOS ČLS JEP.

2. Odběrová místa

Odběrová místa obvykle představují neurochirurgické operační sály, kde je chirurgem odebrána tkáň, případně krevní sérum pro účely bankování, a materiál je následně zpracován dle příslušných doporučení ve spolupráci s pracovníkem BBM, případně výzkumným pracovníkem, který zde vzorky vyzvedne bezprostředně po jejich exstirpaci. Každé odběrové pracoviště je vybaveno kombinovanou lednicí s mrazákem (–20 °C) pro dočasné uchování odebraných vzorků, chladicími taškami a odběrovým materiálem. Za manipulaci se vzorkem pro účely BBM je na každém odběrovém místě zodpovědná pověřená osoba.

3. Informovaný souhlas

Informovaný souhlas (IS, „Souhlas s uchováváním a použitím vzorku žilní krve a nevyužitých zbytků ze vzorků získaných z mého těla“), založena kopie IS. Druhý originál IS bude dlouhodobě archivován zodpovědným pracovníkem Centra NOS.

4. Odběr a transport tělních tekutin

Na základě podepsaného IS pacienta se na neurochirurgické klinice odebere před chirurgickým výkonem cca 6 ml žilní krve do zkumavky Vacutainer BD s K₂EDTA 6 ml (fialový uzávěr), krev se promíchá a dále

krátkodobě skladuje v lednici (4 °C). Krev se odebírá do předem označených zkumavek dodaných na klinické pracoviště úsekem BBM. Identifikační štítek se nalepí i na průvodku vzorků pro BBM (obsahuje informaci o času odběru), která se vyplní. Vzorek se vloží do igelitového sáčku. Sáček s průvodkou a sáček s odpovídajícími vzorky se spojí sešívačkou. Takto připravený vzorek je transportován v chladicí tašce s chladicími vložkami.

Pracovník BBM převezme vzorek a průvodku, zkontroluje dodaný materiál a údaje na průvodce, na průvodku zapíše čas dodání a podepíše se. Vzorek se zaeviduje do databáze a vygeneruje se nový kód (specifické číslo pro plazmu a DNA). Specifická čísla jsou natištěna na štítky, které se nalepí na kryozkumavky. Poté se vzorky zpracují dle níže uvedeného protokolu (viz 4.1). Následně se umístí do mrazáku (–80 °C) a zaznamená se pozice v krabici a mrazáku. Vzorek by měl být ihned transportován a na úseku BBM zpracován nejpozději do 60 minut od provedení odběru.

4.1 Zpracování vzorku v BBM

Vzorek žilní krve slouží jako zdroj plazmy pro biomarkerové studie, buněčné krevní elementy potom jako zdroj zárodečné genomové DNA.

4.1.1 Plazma

Vzorek – krev ve zkumavce Vacutainer BD s K₂EDTA 6 ml (fialový uzávěr).

Proces zpracování

- krev ve zkumavce je nutno promíchat (proběhne již na odběrových místech)
- centrifugace 10 min/1 500 g

- rozpipetování plazmy: **3–5 × 0,5 ml** plazmy do předem označených kryozkumavek **1 ml NUNC (modrý uzávěr/box)**
- frakce mononukleárních buněk po odstranění plazmy se dále použije k izolaci DNA (viz 4.1.2)
- uskladnění alikvotů plazmy při –80 °C
- zaevidování pozice vzorků v mrazáku
- popsat kvalitu plazmy (normální, hemolytická, chylózní, atd.)

4.1.2 DNA

Vzorek – krev ve zkumavce Vacutainer BD s K₂EDTA 6 ml (fialový uzávěr).

Frakce mononukleárních buněk po odstranění plazmy.

Proces zpracování

- izolace DNA kolonkovou metodou (menší počet izolací), přístrojem MagNA Lyser (větší počet izolací, problematické vzorky, perspektivně zmrazené vzorky) nebo jakýmkoliv standardním postupem
- změření koncentrace a čistoty DNA, zaevidování
- rozpipetování DNA – **2× kryozkumavka NUNC 1 ml sterilní (růžový uzávěr/box)**
- uskladnění –80 °C
- zaevidování pozice vzorků v mrazáku

Materiální vybavení pro odběr tělních tekutin

- kombinovaná lednice s mrazákem
- odběrová zkumavka BD Vacutainer s K₂EDTA 6 ml (fialový uzávěr)
- jehla Vacutainer (černá) 38 mm
- kanyla křídlo Vacutainer Safety Lok 21G 175 mm (modrá)
- držák Vacutainer
- buničina
- zipové zavírací sáčky
- průvodka vzorku (tekutiny)
- databáze BBM

5. Odběr a transport nádorové tkáně

Odběr tkáně je možné provést ve dvou schématech, a to pouze na základě podepsaného IS pacienta.

a) Nádorová tkáň získaná pro BBM je zpracována v průběhu chirurgického výkonu

Archivaci do BBM provádíme pouze v případě, že je vzorek dostatečné velikosti (tj. zůstane dostatek tkáně pro

histopatologické vyšetření). V předem určeném prostoru provede lékař/výzkumník/pracovník BBM rozdělení nádorové tkáně na alikvoty. Vzorek je po exstirpaci ihned položen na Petriho misku (nikoliv gázu nebo do fyziologického roztoku), která je zespodu chlazená např. chladicí vložkou. Je zaznamenán čas odběru tkáně, vzorek musí být zpracován do 30–60 minut. Odebrání se provádí skalpelem (ne elektroauterem) na 5 alikvotů po cca 100–150 mg nádorové tkáně bez makroskopicky patrných nekrotizací, přičemž nejmenší rozměr vzorku by měl být alespoň 2 mm. Část vzorku nádorové tkáně, nejlépe každého alikvotu, se dá do formolu pro ověření přítomnosti nádoru (tzv. parablok). Jeden alikvot nádorové tkáně se umístí do kryozkumavky (NUNC Starfoot 1,8 ml) obsahující 1 ml stabilizačního roztoku RNAlater (Ambion). Ostatní alikvoty jsou umístěny do předchlazených kryozkumavek (NUNC Starfoot 1,8 ml) předem označených specifickými kódy pracovníky BBM a zamrazeny umístěním do připravené nádoby s kapalným dusíkem. Je zaznamenán čas zpracování vzorku (zamrazení, uložení do RNAlateru).

b) Odběr pro BBM provádí patolog z exstirpované nádorové tkáně

Archivaci do BBM provádíme pouze v případě, že vzorek je dostatečné velikosti (tj. zůstane dostatek tkáně pro histopatologické vyšetření). Patolog provede na základě makroskopického vyšetření resekátu odběr reprezentativní části nádorové tkáně pro BBM. Tkáň dále zpracovává patolog/výzkumník/pracovník BBM analogicky jako v bodu a).

V případě, že zpracování tkáně probíhá na patologii, musí být zaznamenán přesný čas odběru tkáně na operačním sále a platí pravidlo zpracování tkáně do 30–60 minut po exstirpaci, musí tedy být zajištěn okamžitý transport **chlazené tkáně** ze sálu na patologii. Je zaznamenán čas zpracování vzorku (zamrazení, uložení do RNAlateru).

Kryozkumavky se zamrazenou tkání, předem označené příslušnými kódy pracovníky BBM, jsou vloženy do sáčku, doplněny vyplněnými průvodkami a transportovány na suchém ledu na oddělení BBM. Vzorky jsou následně uloženy k definitivní archivaci do dusíkových par (–156 °C), alternativně do hluboko mrazicího boxu (–80 °C). Vzorek s tkání uloženou ve stabilizačním roztoku RNAlater je transportován při

pokojové teplotě, po dobu 24 hodin uložen v lednici (4 °C), aby stabilizační roztok mohl dostatečně prostoupit archivovanou tkáň, a poté uložen k definitivní archivaci do dusíkových par (–156 °C), alternativně do hluboko mrazicího boxu (–80 °C). Následuje zápis do příslušného modulu interní BBM databáze obsahující definitivní pozici a datum uložení vzorků.

Pozn.: Pokud není v kontrolním řezu zhotoveném ze vzorku odebraného pro potřeby BBM přítomna nádorová tkáň, je tkáň z projektu BBM vyřazena. Nekrotická tkáň se do projektu BBM nezařazuje.

Materiální vybavení pro odběr nádorové tkáně

- kombinovaná lednice s mrazákem
- pinzeta anatomická obyčejná 250 mm
- nůžky preparační rovné špičaté 120 mm
- skalpel kovový s výměnnými noži
- buničina

- chladič boxy (10 l, 24 l) s chladičími vložkami
- RNAlater
- kryozkumavky NUNC Starfoot 1,8 ml
- kryopopisovač
- zipové zavírací sáčky
- průvodka vzorku (tkáň)
- rukavice
- sáčky na biologický odpad
- Petriho miska
- nádoba s kapalným dusíkem

6. Evidence vzorků

Evidence vzorků krevní plazmy, DNA a nádorové tkáně včetně informací popisujících proces odběru a zpracování tkáně, jako je čas odběru a čas zpracování, je vedená v databázi oddělení BBM, případně zodpovědným výzkumným pracovníkem daného Centra NOS tak, aby systém kódování umožňoval propojitelnost s paralelně sbíranými klinickými daty.

Seznam Center Neuroonkologické sekce ČOS ČLS JEP

1. Centrum Praha – Nemocnice Na Homolce

Koordinátor MUDr. Robert Tomáš, Ph.D. Neurologické oddělení Nemocnice Na Homolce Roentgenova 2 150 30 Praha 5 e-mail: robert.tomas@homolka.cz	Neurochirurg Patolog Onkolog Radioterapeut Radiodiagnostik Výzkumný pracovník	MUDr. Robert Tomáš, Ph.D. prim. MUDr. Jan Klener MUDr. Martin Syřůček MUDr. Běla Malinová MUDr. Ferdinand Třebický prof. MUDr. Josef Vymazal, DrSc. prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.
---	--	--

2. Centrum Praha – Ústřední vojenská nemocnice

Koordinátor MUDr. Filip Kramář, Ph.D. Neurochirurgická klinika 1. LF UK a Ústřední vojenská nemocnice U Vojenské nemocnice 1200 169 02 Praha 6 e-mail: filip.kramar@uvn.cz	Neurochirurg Patolog Onkolog Radioterapeut Radiodiagnostik Výzkumný pracovník	prof. MUDr. Vladimír Beneš, DrSc. doc. MUDr. David Netuka, Ph.D. prim. MUDr. Petr Hrabal MUDr. Běla Malinová MUDr. Ferdinand Třebický prim. MUDr. Tomáš Belšan prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.
--	--	---

3. Centrum Brno – Masarykův onkologický ústav

Koordinátor prof. MUDr. Pavel Šlampa, CSc. Klinika radiační onkologie Masarykův onkologický ústav Žlutý kopec 7 656 53 Brno e-mail: slampa@mou.cz	Neurochirurg Patolog Onkolog Radioterapeut Radiodiagnostik Výzkumný pracovník	prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D. doc. MUDr. Radim Jančálek, Ph.D. MUDr. Pavel Fadrus, Ph.D. doc. MUDr. Leoš Křen, Ph.D. prof. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D. MUDr. Radek Lakomý, Ph.D. prof. MUDr. Pavel Šlampa, CSc. MUDr. Renata Belanová doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
---	--	--

4. Centrum Olomouc – Fakultní nemocnice Olomouc

Koordinátor**MUDr. Ondřej Kalita, Ph.D.**

Neurochirurgická klinika

LF UP a FN Olomouc

I. P. Pavlova 6

775 20 Olomouc

e-mail: ondrej.kalita@fnol.cz**Neurochirurg**

MUDr. Ondřej Kalita, Ph.D.

doc. MUDr. Miroslav Vaverka, CSc.

prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

Patolog

MUDr. Miloslava Zlevorová

Onkolog

MUDr. Karel Čwierotka, Ph.D.

Radioterapeut

MUDr. Eva Čecháková

Radiodiagnostik**Výzkumný pracovník**

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

5. Centrum Ostrava – Fakultní nemocnice Ostrava

Koordinátor**MUDr. Štefan Reguli**

Neurochirurgická klinika

LF OU a FN Ostrava

17. listopadu 1790

708 52 Ostrava-Poruba

e-mail: stevoreguli@email.cz**Neurochirurg**

MUDr. Tomáš Hrbáč, Ph.D., MBA

Patolog

MUDr. Petr Buzrla

Onkolog

MUDr. Jakub Cvek, Ph.D.

Radiodiagnostik

MUDr. Jan Krajča

Výzkumný pracovník

MUDr. Zdeněk Večeřa

Pozn.: Vzhledem k tomu, že komplexní péče o pacienty s nádory CNS je obvykle zajišťována větším množstvím specializovaných pracovišť, členové jednotlivých týmu nemusí být vždy zaměstnanci příslušného koordinačního pracoviště Centra NOS.

POZNÁMKY

POZNÁMKY



**Staráme se
nejen o zdraví,
staráme se
o Váš život.**

**MSD jako vedoucí globální
společnost v oblasti inovativní
zdravotní péče působí v ČR od roku
1992. Se zaměřením na vědu
a výzkum má vedoucí postavení
v biologické léčbě, kardiologii,
léčbě astmatu a alergií, diabetu,
infekčních chorob, vakcín a v péči
o zdraví žen a dětí.**

**Pro informace
o jednotlivých
onemocněních
a aktivitách MSD
navštivte stránky
www.msd.cz**

We take cancer personally

