

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta



**Detekce a ex vivo eliminace
reziduálních nádorových buněk Ewingova sarkomu perzistujících
v autologních štěpech hematopoetických kmenových buněk**

MUDr. David Sumerauer

Disertační práce v oboru Biologie a patologie buňky
Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol v Praze

Školitel:
Prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha 2006

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování za vynikající vedení při řešení projektu patří na prvním místě školiteli prof. MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc., za cenné rady a vstřícnost dále děkuji panu prof. Josefu Kouteckému, DrSc. a spolupracovníkům z laboratoře, jmenovitě MUDr. Aleši Víchovi, PhD. a paní Janě Jašinské, vrchní laborantce. Poděkování patří i spolupracovníkům z oddělení kryoprezervace kostních dřeví Ústavu hematologie a krevní transfúze, PhMr. RNDr. Aleně Hrubé, CSc. a MUDr. Petru Kobylkovi, CSc. a kolegům lékařům z Kliniky dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN v Praze Motole za všestrannou pomoc při odběru a zpracování vzorků a získávání klinických dat. Za pomoc při statistické analýze dat děkuji Ing. Petru Gajdošovi ze Státního zdravotního ústavu.

Práce byla řešena jako součást projektu podporovaného Interní Grantovou Agenturou MZ ČR (grant NC/5239-3) a MŠMT ČR (grant MSM 0021620813).

OBSAH

| | |
|--|------------|
| OBSAH | 3 |
| ÚVOD | 4 |
| DETEKCE MINIMÁLNÍ NÁDOROVÉ CHOROBY U PACIENTŮ S DĚTSKÝMI SOLIDNÍMI NÁDORY..... | 6 |
| KONTAMINACE ŠTĚPŮ A JEJÍ KLINICKÝ VÝZNAM | 8 |
| ČIŠTĚNÍ ŠTĚPŮ (PURGING) A JEHO KLINICKÝ VÝZNAM | 11 |
| <i>Farmakologické čištění autologních štěpů progenitorových hematopoetických buněk deriváty cyklofosfamidu, etoposidem a použití amifostinu k protekci progenitorových buněk - přehled.</i> | 12 |
| NÁDORY RODINY EWINGOVA SARKOMU/pPNETU | 18 |
| CÍLE PRÁCE: | 22 |
| EXPERIMENTÁLNÍ PURGING | 23 |
| EXPERIMENTÁLNÍ PURGING - METODY | 23 |
| EXPERIMENTÁLNÍ PURGING – VÝSLEDKY..... | 27 |
| <i>Protinádorové účinky mafosfamidu</i> | 27 |
| <i>Protinádorové účinky etoposidu</i> | 29 |
| <i>Ovlivnění progenitorových buněk</i> | 29 |
| METODIKY DETEKCE MINIMÁLNÍ NÁDOROVÉ CHOROBY | 33 |
| POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)..... | 33 |
| REVERZNĚ TRANSKRIPČNÍ POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (RT-PCR) | 34 |
| KVANTITATIVNÍ PCR V REÁLNÉM ČASE (QRT-PCR)..... | 35 |
| VLASTNÍ METODIKA DETEKCE MRD | 37 |
| VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ KLINICKÝCH VZORKŮ | 43 |
| NÁDORY ZE SKUPINY ES/PNETU | 43 |
| DETEKCE MRD U PACIENTŮ S ES..... | 45 |
| MRD U PACIENTŮ S ES – KLINICKÝ VÝZNAM A DISKUSE | 52 |
| VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ ŠTĚPŮ URČENÝCH KE KLINICKÉMU POUŽITÍ | 60 |
| VÝSLEDKY TRANSPLANTACÍ | 63 |
| ZÁVĚRY | 66 |
| SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA | 76 |
| PŘÍLOHA 1 ,..... | 78 |
| SUMERAUER D., VÍCHA A., KUČEROVÁ H., KODET R., HOUSKOVÁ J., BEDRNÍČEK J., ECKSCHLAGER T., DETECTION OF MINIMAL BONE MARROW INFILTRATION IN PATIENTS WITH LOCALIZED AND METASTATIC EWING SARCOMA USING RT-PCR, FOLIA BIOLOGICA (PRAHA), 47(6): 206-210, 2001 | 78 |
| PŘÍLOHA 2 | 83 |
| VÍCHA A., STEJSKALOVA E., SUMERAUER D., KODET R., MALIS J., KUCEROVA H., BEDRNICEK J., KOUTECKY J., ECKSCHLAGER T., MALIGNANT PERIPHERAL PRIMITIVE TUMOR OF THE KIDNEY, CANCER GENET CYTOGENET, 139 (1), 67-70, 2002 | 83 |
| PŘÍLOHA 3 | 87 |
| KRSKOVA L., MRHALOVA M., SUMERAUER D., KODET R., RHABDOMYOSARCOMA: MOLECULAR DIAGNOSTICS OF PATIENTS CLASSIFIED BY MORPHOLOGY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY WITH EMPHASIS ON BONE MARROW AND PURGED PERIPHERAL BLOOD PROGENITOR CELLS INVOLVEMENT, VIRCHOWS ARCH, 448(4):449 – 458, 2006 | 87 |
| PŘÍLOHA 4 | 97 |
| SUMERAUER D., MATĚJČKOVÁ Š., HRUBÁ A., ECKSCHLAGER T., MANIPULACE SE ŠTĚPY HEMATOPOETICKÝCH PROGENITOROVÝCH BUNĚK A JEJICH POUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI, ČAS LÉK ČES, 141(13), 411-416, 2002 | 97 |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 101 |

ÚVOD

Nádory u dětí a adolescentů jsou relativně vzácná onemocnění. Představují méně než 1% nádorů dospělých, standardizovaná incidence se pohybuje v rozmezí 80-140 nemocných na milion dětí (*Lewis, I.J., 2003*). Uvádí se, že v rozvinutých zemích onemocnění přibližně jedno z 650 dětí mladších 15 let věku zhoubným nádorovým onemocněním.

Nejčastějším typem nádorového onemocnění dětského věku jsou leukémie (30%), následují nádory centrálního nervového systému (20%), maligní lymfomy (13%), neuroblastom (8%), nádory ledvin (6%), nádory měkkých tkání (6%), nádory kostí (5%) a další (retinoblastom, germinální nádory, nádory jater atd.). Epiteliální nádory, které jsou nejčastějšími nádory dospělých pacientů, představují pouze 1-2% z nádorů u dětí (*Koutecký, J., 2002, Lewis, I.J., 2003*).

Odlišný histogenetický původ se u dětských nádorů projevuje na jedné straně agresivním růstem a časným metastazováním většiny nádorů, na druhé straně vyšší citlivostí k protinádorové léčbě (*Koutecký, J., 2002, Helman, L.J., Malkin, D., 2005*). Řada dříve fatálních onemocnění je zařazením moderní multimodální léčby léčitelná a plně vyléčitelná. V současné době se na specializovaných pracovištích dětské hematooonkologie, při použití všech dostupných léčebných modalit, daří vyléčit 60-80% pacientů bez ohledu na typ a rozsah nádorového onemocnění (*Poplack, D., Pizzo, P.A., 1997*). Přesto však u části dětských pacientů převážně s nepříznivými histogenetickými typy nádorů, nádory lokálně pokročilými, případně generalizovanými, onemocnění recidivuje s letálním průběhem. Nádory v dětském věku tak zůstávají, přes jednoznačný pokrok dosažený v diagnostice a léčbě, druhou nejčastější příčinou úmrtí dítěte po úrazech (*Robinson L., 1993*). Představují tak nadále závažný sociálně ekonomický a zdravotní problém (*Koutecký, J., 2002*).

Zhoubné solidní nádory u dětí považujeme od počátku za systémová onemocnění. Předpokládáme přítomnost mikrometastáz v době stanovení diagnózy i u pacientů, u kterých je konvečními vyšetřeními (zobrazovací techniky) neprokazujeme (*Burchill, S.A, Selby, P.J., 2000*). Tento fakt potvrzují nepříznivé historické výsledky léčby většiny dětských nádorů v období před zařazením chemoterapie k dříve výlučně používané léčbě lokální (operace, radioterapie).

Přestože většina dětských solidních nádorů je potenciálně kurabilních, zůstávají pacienti které se nedaří zachránit. Příčinou selhání protinádorové léčby jsou nádorové buňky, které se staly rezistentními k chemoterapii, případně buňky, které unikly léčbě v rezervoárových místech s nedostatečnou oxygenací, případně s nedostatečným průnikem chemoterapeutik (*Reynolds C.P., 2004*).

Jedním z možných postupů k překonání přirozené či získané rezistence nádorových buněk k chemoterapeutikům a k zajištění vyššího průniku cytostatik je eskalace dávek cytostatik. U alkylačních cytostatik je vyšší protinádorový účinek vysokých dávek chemoterapeutik jednoznačně

potvrzen (*Riccardi, R. a kol., 1998*). Limitujícím faktorem použití vysokodávkované chemoterapie (megachemoterapie) v protinádorové léčbě je hematologická a orgánová toxicita cytostatik. Použití vysokodávkované chemoterapie vyžaduje následný převod štěpu hematopoetických progenitorových buněk k zajištění obnovy krvetvorby.

Nejčastějším typem transplantace u dětských solidních nádorů byl v 70. a v první polovině 80. let 20. století alogenní typ transplantace. Alogenní transplantace však byly a nadále jsou zatíženy vysokou peritransplantační morbiditou a mortalitou. Vyšší úmrtnost po alogenní transplantaci způsobuje rejekce štěpu, reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) a déle trvající rekonstituce imunity a krvetvorby (*Kavan, P., 1996*). Přitom protinádorový efekt reakce štěpu proti nádoru (GVT – reakce) je prokazatelný pouze u nádorů nesoucích MHC antigeny II. třídy tedy u některých leukémií, lymfomů, myelomu a několika dalších typů nádorů. Hlavní nevýhodou alogenních transplantací je malá pravděpodobnost nalezení vhodného dárce. Pouze $\leq 25\%$ dětí má HLA identického sourozence, který je nejvhodnějším dárce (*Starý, J. a kol., 2002*).

V léčbě dětských solidních nádorů se tak od druhé poloviny 80. let 20. století v naprosté většině využívá autologních transplantací hematopoetických progenitorů.

Výhody použití vysokodávkované chemoterapie a autologní transplantace u solidních nádorů před alogenní transplantací jsou snadná dostupnost štěpu (dárce je pacient), rychlejší obnova krvetvorby a chybění reakce štěpu proti hostiteli.

Hlavní nevýhodou je riziko kontaminace autologního štěpu klonogenními nádorovými buňkami, které jsou retransfundovány pacientovi při transplantaci a mohou dát vznik relapsu onemocnění v potransplantačním období (*Brenner M. a kol., 1993*). Relaps po transplantaci je také nejčastějším důvodem selhání terapie (*Kavan P., 1996*). Další nevýhodou autologní transplantace je chybění reakce štěpu proti nádoru.

Vzhledem k riziku kontaminace autologního štěpu nádorem jsme se rozhodli tento fenomén podrobněji studovat u vybraných solidních nádorů dětského věku. Zvolili jsme nádory rodiny Ewingova sarkomu/pPNETU, vysoce maligní nádory dětského věku, které často metastazují do kostní dřeně a riziko kontaminace štěpu je tak značné.

Detekce minimální nádorové choroby u pacientů s dětskými solidními nádory

Minimální nádorovou chorobu (MRD - minimal residual disease) definujeme jako přítomnost vitálních nádorových buněk v organismu v množství, které nelze detekovat konvenčními metodikami (*Willeke, F., Sturm J.W., 2001*). Hovoříme o ní zpravidla v průběhu nebo po ukončení onkologické léčby. Nejčastěji po ní pátráme v kostní dřeni (KD). Při morfologickém vyšetření buněk aspirátu KD je zkušený cytomorfológ schopen detekovat mikroskopickým vyšetřením přítomnost asi 2 – 5% kontaminujících nádorových buněk mezi buňkami normálními. Při tomto cytologicky nedetekovatelném množství nádorových buněk v kostní dřeni se přitom u dospělého pacienta může jednat až o 10^{10} nádorových buněk perzistujících v organismu. Citlivost morfologických metod lze zvýšit cytocentrifugací nebo separací buněk na hustotním gradientu, nicméně lze dosáhnout maximálně 1 % citlivosti průkazu (*Janossy, G. a kol., 1988*).

V současné době jsou však k dispozici detekční metody, které umožňují prokázat přítomné nádorové buňky s významně vyšší citlivostí, a to při zachování vysoké specifické nálezu. Jedná se především o molekulárně biologické a imunologické techniky. Metody, které je možné použít k detekci MRD, jsou v přehledu spolu s uvedením dosahované citlivosti představeny v tabulce 1.

| <i>Metoda</i> | <i>Citlivost</i> | <i>Podstata</i> |
|--------------------------|-------------------------|---|
| Morfologie * | 1: 10^2 | morfologické odlišnosti nádorové buňky |
| Konvenční cytogenetika * | 1: 10^2 | průkaz specifické chromozomální aberace |
| Southern blot * | 1: 10^2 | průkaz specifické sekvence DNA - chromozomální aberace nebo mutace |
| FISH | 1: 10^3 | průkaz specifické sekvence DNA |
| Imunologické metody | 1: 10^4 | průkaz pro nádor specifického antigenu nebo častěji kombinace antigenů (vč. aberantní exprese antigenů) |
| PCR | 1: 10^5 | průkaz specifické sekvence DNA - chromozomální aberace nebo mutace |
| RT-PCR | 1: 10^6 | průkaz specifické sekvence RNA - chromozomální aberace nebo mutace |

Tabulka 1, Citlivost jednotlivých metodik používaných k detekci nádorových buněk. *- nejedná se o metody vhodné k detekci MRD pro nízkou citlivost, lze je však využít k průkazu znaku vhodného k detekci reziduální choroby jinou metodou (např. detekce specifické translokace cytogenetickým vyšetřením v době záchytu nádoru a následná detekce MRD metodou RT-PCR)

Vlastní diagnostika minimální nádorové choroby je založena na průkazu rozdílů mezi nádorovými a “normálními” buňkami. Tento rozdíl je nutné zjistit v době záchytu onemocnění, kdy

je pro vyšetření k dispozici dostatek nádorových buněk. Detekce MRD je bez znalosti výsledku “vstupního” vyšetření (nejlépe vyšetřením vlastní nádorové tkáně) málokdy úspěšná a interpretace výsledků získaných v dalším období problematická. V době stanovení diagnózy, v době, kdy máme zpravidla k dispozici velké množství nádorových buněk pro vyšetření, je proto nezbytné provést co nejpodrobnější imunologické, cytogenetické a molekulárně biologické vyšetření konkrétního nádoru, i když zdánlivě nepřináší nové informace ke zpřesnění vlastní diagnózy. Po zjištění aberantního znaku (kombinaci znaků), které jsou specifické pro daný nádor následně pátráme v období klinické remise.

U řady nádorů dětského věku máme k dispozici vysoce specifické znaky identifikující jednoznačně přítomnost nádorových buněk ve vyšetřovaném materiálu. Příkladem jsou fúzní geny *EWS/ETS* (*EWS/FLI1*, *EWS/ERG*, *EWS/ETV1*, *EWS/E1AF* a *EWS/FEV*) u nádorů rodiny Ewingova sarkomu (ES), nebo fúzní geny *PAX3/FKHR* a *PAX7/FKHR* u alveolárního rhabdomyosarkomu, podmíněné nenáhodnými chromozomálními translokacemi (*Willeke, F., Sturm J.W., 2001*).

Často ovšem prokazujeme přítomnost nádorových buněk pomocí znaku, který není pro daný nádor zcela specifický, ale ve vyšetřovaném materiálu (kostní dřeni) se za normálních okolností nevyskytuje. V molekulárně biologické diagnostice se tato „relativní specificita“ uplatňuje například při detekci MRD u neuroblastomu, kde s úspěchem využíváme průkazu transkriptu mRNA genu pro tyrozin hydroxylázu (TH, první enzym v kaskádě syntézy katecholaminů, které tvoří 98% neuroblastomů) nebo případně GD2 syntetázu. Tyto znaky jsou přítomny v buňkách neurogenických nádorů i některých nenádorových tkání, ale nikoli v buňkách KD (*Corrias, M.V. a kol., 2004, Cheung, I.Y. a kol., 2003, Lo Piccolo, M.S. a kol., 2001*).

Vhodnost zařazení metody k detekci MRD u konkrétního onemocnění spočívá ve schopnosti vyhovět následujícím požadavkům: 1. možnost sledovat odpověď onemocnění na protinádorovou léčbu, 2. schopnost detekovat subklinický relaps onemocnění, 3. umožnit frekventní monitorování pacienta během léčby i po jejím ukončení, 4. minimální invazivnost, 5. vysoká specifita metody, 6. technická a finanční dostupnost.

Nejčastěji pátráme po minimální nádorové chorobě v kostní dřeni. Dále můžeme detekovat nádorové buňky cirkulující v periferní krvi, případně prokazovat přítomnost nádorových buněk v dalších tělních tekutinách a kompartmentech (mozkomíšním moku, moči atd.). Jako minimální nádorovou chorobu můžeme hodnotit i přítomnost nádoru v lymfatických uzlinách a jiných tkáních, například v hraniční tkáni resektátu při definitivním chirurgickém ošetření nádoru. Velmi důležité a v současné době nezbytné je vyšetření autologních štěpů kostní dřene a periferních kmenových buněk (PBSC) na přítomnost reziduálního nádoru u pacientů, u kterých je zařazena megachemoterapie a autologní transplantace hematopoetických kmenových buněk.

Kontaminace štěpů a její klinický význam

Přenos vitálních klonogenních nádorových buněk štěpem, které mohou dát vznik relapsu, je v současnosti považován u některých nádorů (neuroblastom, AML, CML) za prokázaný. V minulosti se vedly spory o to, zda relapsy po autologních transplantacích způsobují nádorové buňky, které perzistují v organizmu protože unikly megaterapii, nebo nádorové buňky přenesené s podaným štěpem. Klinicko-experimentální studie se značením štěpů geny prokázaly, že alespoň za část relapsů po transplantaci autologních hematopoetických progenitorů u neuroblastomu, AML a CML jsou odpovědné nádorové buňky přenesené se štěpem (*Brenner, M. a kol., 1993, Deisseroth, A.B. a kol., 1994, Rill, D.R. a kol., 1994*). Podstatou průkazu je vnesení nefunkčního bakteriálního genu do buněk štěpu, jeho označení („gene-marking“) a následný průkaz tohoto genu metodou PCR v buňkách recidivujícího nádoru. U neuroblastomu byly takto prokázány nádorové buňky nesoucí bakteriální gen rezistence pro neomycin izolované z orgánových metastáz u pacientů s recidivou onemocnění po transplantaci. K nepřímým důkazům přenosu relapsu štěpem patří údaje o častějším výskytu relapsů u nehodgkinských lymfomů a karcinomu prsu po autologních transplantacích nádorem kontaminovanými štěpy (*Gribben, J.G. a kol., 1993, Sharp, J.G. a kol., 1992, Cagnoni, P.J. a kol., 1996, Pedrazzoli, P. a kol., 1997*). Dále tento původ recidivy podporuje výskyt atypických miliárních plicních metastáz neuroblastomu po autologní transplantaci (*Allen Greave, J.L. a kol., 1988, Matthay, K.K. a kol., 1995*).

Na druhé straně jsou uveřejněny i práce, které neprokázaly horší prognózu pacientů po transplantaci prokazatelně kontaminovanými štěpy u pacientek s karcinomem mammy a s agresivními B-nehodgkinskými lymfomy (*Cooper, B.W. a kol., 1998, Blystad, A.K. a kol., 2004*).

Recentně byla publikována jedna práce autorů ze St. Jude Children's Research Hospital, která uvádí lepší přežití skupiny pacientů s vysoce rizikovým neuroblastomem transplantovaných štěpy PBSC s definovaným kritickým množstvím nádorových buněk, ve srovnání s pacienty transplantovanými štěpy bez imunologicky prokazatelných kontaminujících nádorových buněk neuroblastomu (*Handretinger, R. a kol., 2003*). Autoři předpokládají, že podání kontaminovaného štěpu u části pacientů indukovalo po transplantaci protinádorovou odpověď imunitního systému, která vedla k eliminaci reziduální nádorové choroby (*Handretinger, R. a kol., 2003*).

Riziko kontaminace štěpů kostní dřeně i periferních progenitorových buněk je poměrně značné. Některé údaje o výskytu kontaminace autologních štěpů kostní dřeně a periferních progenitorových buněk u ES a neuroblastomu shrnují tabulky 2a a 2b. Z přehledu je zřejmé, že kontaminace nádorovými buňkami byla v uvedených klinických studiích zjištěna v 7-82% štěpů,

podle zvolené metodiky detekce a sledovaného znaku. Významná je samozřejmě intenzita terapie, která předchází vlastnímu odběru štěpu, tzn. odběru kostní dřeně nebo cytaferéze periferních hematopoetických buněk, která se u jednotlivých studií může odlišovat. Jednou z předpokládaných výhod transplantace progenitorových buněk získaných z periferní krve, ve srovnání s transplantací progenitorů kostní dřeně, je nižší stupeň kontaminace nádorovými buňkami (*Moss, T.J., 1999, Shimoni, A., Körbling, M., 2002*). Tento předpoklad však nebyl dosud jednoznačně potvrzen u více typů nádorů a je pravděpodobné, že rozdíl je pouze v absolutním množství nádorových buněk kontaminujících štěpy.

| <i>Typ štěpu</i> | <i>Metoda detekce (sledovaný znak)</i> | <i>Pozitivních (pacientů)</i> | <i>Autor citace</i> |
|------------------|---|-------------------------------|------------------------------------|
| PBSC | RT-PCR (TH) | 9/13 , 69% | <i>Tchirkov, A. a kol., 1999</i> |
| PBSC | RT-PCR (PGP 9.5) | 9/11 , 82% | <i>Leung, W. a kol., 1998</i> |
| PBSC | IMUNOHISTOCHEMIE anti-GD2 Ab | 2/8 , 25% | <i>Moss, T.J. a kol., 1990</i> |
| PBSC | IMUNOHISTOCHEMIE anti-GD2 Ab, RT-PCR (TH) | 18/38 , 47% | <i>Lode, H.N. a kol., 1997</i> |
| PBPC | IMUNOHISTOCHEMIE anti-GD2 Ab | 3-6/42, 7-25% | <i>Faulkner, L.B. a kol., 2000</i> |

Tabulka 2a, Příklady kontaminace štěpů PBSC nádorovými buňkami neuroblastomu. Jsou uvedeny použité metodiky detekce nádorových buněk a detekovaný znak.

| <i>Typ štěpu</i> | <i>Metoda detekce (sledovaný znak)</i> | <i>Pozitivních (pacientů)</i> | <i>Autor citace</i> |
|------------------|--|-------------------------------|--------------------------------------|
| PBSC | RT-PCR (EWS/FLI-1) | 1/15 , 7% | <i>Fischmeister, G. a kol., 1999</i> |
| PBSC | RT-PCR (PGP 9.5) | 9/11 , 82% | <i>Leung, W. a kol., 1998</i> |
| PBSC | RT-PCR (EWS/FLI-1) | 3/15 , 20% | <i>Montanaro, L. a kol., 1999</i> |
| PBSC | RT-PCR (EWS/FLI-1) | 1/9 , 11% | <i>Thomson, B. a kol., 1999</i> |

Tabulka 2b, Příklady kontaminace štěpů PBSC nádorovými buňkami u pacientů s nádory rodiny Ewingova sarkomu/pPNETu. Jsou uvedeny použité metodiky detekce nádorových buněk a detekovaný znak.

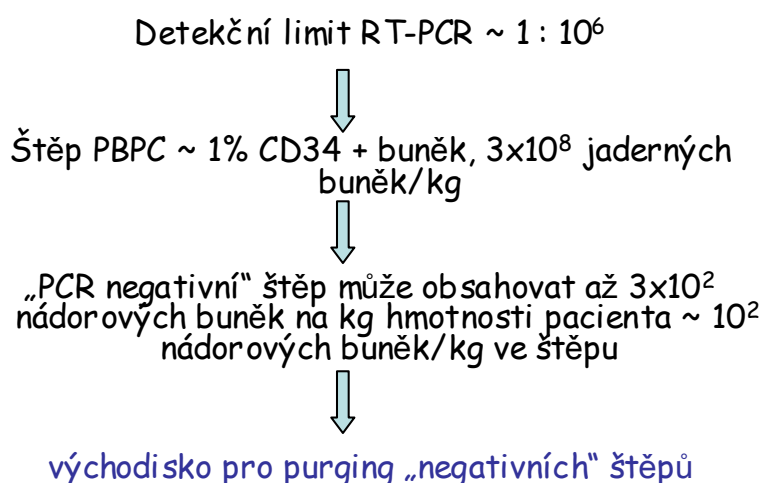
Přes výsledky experimentální práce se značením buněk štěpů vnesenými geny („gene-marking“) u neuroblastomu, AML, CML a přes povzbudivý závěr práce autorů ze St. Jude Children’s Research Hospital nadále platí, že přesně nevíme, u kterých nádorů kontaminace štěpu nádorovými buňkami představuje riziko přenosu relapsu. Rovněž nejasná je otázka, jaké množství kontaminujících nádorových buněk představuje riziko. Proto stále vycházíme z pracovní hypotézy,

že jakákoliv přítomnost nádorových buněk ve štěpu je u všech typů nádorů riziková. Snížení rizika kontaminace autologních štěpů kostní dřeně i periferních progenitorových buněk se dosahuje intenzivní chemoterapií před vlastním odběrem štěpu - tzv. "in vivo purging", někdy ještě doplněné o odstranění nádorových buněk manipulací se štěpem - "ex vivo purging". In vivo purging indukční chemoterapií je velmi významný, protože v současné době není známá technika ex vivo purgingu, která by byla schopná ze štěpu odstranit více než 2 % kontaminujících nádorových buněk (Seeger, R.C. a kol., 1991).

Dalším důležitým faktorem, který je potřeba zmínit je citlivost metodik používaných k detekci minimální nádorové choroby ve štěpech, zvláště PBSC. Pokud například dosahujeme uváděné ideální citlivosti „nested“ RT-PCR, tedy průkazu jedné nádorové buňky na 1×10^6 buněk normálních, nemusí negativní výsledek nutně vyloučit přítomnost nádorových buněk ve štěpu. Pokud si představíme idealizovaný štěp PBSC ve kterém je 1% CD34+ progenitorových hematopoetických buněk a který obsahuje 3×10^8 jaderných buněk na kilogram hmotnosti pacienta (parametry odpovídající klinicky užívaným štěpům) zjišťujeme, že štěp označený za PCR negativní může obsahovat 3×10^2 vitálních klonogenních buněk na kilogram hmotnosti pacienta, což při ideální váze 70 kg představuje $> 20\,000$ nádorových buněk ve štěpu (obrázek 1).

Vzhledem k této skutečnosti jsou vhodné a odůvodněné ex vivo manipulace i u štěpů, které jsou označeny za PCR negativní.

Detekční limit MRD ve štěpech



Obrázek 1, Detekční limit minimální nádorové choroby (MRD) ve štěpech k autologní transplantaci

Čištění štěpů (purging) a jeho klinický význam

Purging vychází ze dvou možností: 1, selekce hematopoetických progenitorových buněk při které se odstraní všechny ostatní, tedy i nádorové buňky - pozitivní selekce, 2, odstranění nádorových buněk - depleční (negativní) čištění štěpu.

Dosud není známá ideální metoda purgingu, která splňuje požadavky kladené na metodiku: 1, likvidovat všechny nádorové buňky ve štěpu u širokého spektra nádorů; 2, nepoškodit progenitorové buňky; 3, být technicky a ekonomicky přijatelná.

Z řady možností, které jsou k dispozici (přehledně *Sumerauer D. a kol., 2002 : Manipulace se štěpy hematopoetických buněk*, v příloze) jsme se rozhodli pro farmakologický purging štěpů se zaměřením na protekci hematopoetických progenitorů amifostinem (Ethyol, Shering Plough).

Farmakologický purging znamená inkubaci buněk štěpu s cytostatiky k eliminaci nádorových buněk kontaminujících štěp. Ideální chemoterapeutikum použité k farmakologickému čištění autologních štěpů progenitorových buněk by mělo splňovat následující kritéria: 1, citlivost hematopoetických buněk k použitému chemoterapeutiku je podstatně nižší než buněk nádorových; 2, cytostatikum lze odstranit před podáním štěpu pacientovi; 3, při in vitro manipulaci lze použít vyšších koncentrací chemoterapeutika než při podání in vivo (*Rizzoli, V., Carlo-Stella, C., 1995, 1997*). Ačkoliv uvedené podmínky jsou obtížně splnitelné, ex vivo manipulace používající k eliminaci nádorových buněk ze štěpů chemoterapeutika nebo jejich kombinace, se široce využívají. Nejčastěji používanými chemoterapeutiky jsou deriváty cyklofosfamidu (4-hydroperoxy-cyklofosfamid (4-HC) a mafosfamid), méně často další alkylační činidla (N-mustard), etoposid, u leukémií a lymfomů i kortikoidy. Experimentálně je zkoušena řada dalších látek (*Lemoli, R.M. a kol., 1999, Noga, S.J., 2000*). Mafosfamid a 4-HC jsou používány především u AML, méně u ALL a nehodgkinských lymfomů, kde je možnost čištění monoklonálními protilátkami. Oba preparáty byly použity i u řady solidních nádorů, u dětí především u neuroblastomu, u dospělých pacientek u karcinomu prsu. Klinická použitelnost farmakologického purgingu štěpů deriváty cyklofosfamidu a etoposidem je podpořena řadou publikovaných studií (*Gorin, N.C. a kol., 1990, 1991, Laporte, J.P. a kol., 1994*).

Uvedené studie rovněž odhalily rizika vyplývající z nežádoucího účinku cytostatik na hematopoetické progenitorové buňky. Výsledkem je prodloužení období dřeňové aplázie a z toho plynoucí možné zvýšení peritransplantační morbidity a mortality. Proto musíme před farmakologickým čištěním zajistit bohatý štěp a jako „zálohu“ pro případ nepříhojení štěpu se zpravidla ponechává část štěpu nečištěného. Takový štěp umožní agresivní purging a také

dostatečnou eliminaci kontaminujících nádorových buněk (*Laporte, J.P. a kol., 1994*). Význam velikosti dávky štěpu předaného k čištění dokumentoval Gorin u pacientů s akutní leukémií (*Gorin, N.C. a kol., 1999*). V současné době se zavádí postupy selektivně zvyšující odolnost progenitorových hematopoetických buněk a umožňují tak zvýšit účinnost purgingu. Nejčastěji používanou látkou je amifostin (Ethyol), aminothioliol jehož aktivní metabolit selektivně chrání hematopoetické buňky před toxickými účinky řady různých cytostatik (*Douay, L. a kol., 1995 (a), Douay, L. a kol., 1995 (b), Rill, D.R. a kol., 1994*).

Farmakologické čištění autologních štěpů progenitorových hematopoetických buněk deriváty cyklofosfamidu, etoposidem a použití amifostinu k protekci progenitorových buněk - přehled.

K experimentům i pro klinické použití jsou k farmakologickému čištění nejčastěji používány in vitro účinné, stabilní deriváty cyklofosfamidu (mafosfamid a 4-HC) a etoposid. Etoposid je k čištění štěpů používán samostatně i v kombinacích s dalšími chemoterapeutiky. Výše uvedená kritéria pro ideální chemoterapeutikum vyslovená Rizzolim (*Rizzoli, V., Carlo-Stella, C., 1997*) jsou prakticky nesplnitelná, nicméně právě deriváty cyklofosfamidu a etoposid se jim blíží. Farmakologické čištění štěpů je poměrně široce využíváno především u hematologických malignit, v řadě případů s velice slibnými výsledky.

Mafosfamid (cis-4-sulfoethylthiocyklofosfamid) je in vitro účinný derivát cyklofosfamidu. Po rozpuštění spontánně hydrolyzuje za vzniku 4-hydroperoxycyklofosfamidu. To je účinný metabolit, který normálně vzniká přeměnou cyklofosfamidu v mikrosómech hepatocytů. Vlastní 4-HC je rovněž používán k čištění, nevýhodou je jeho menší stabilita ve srovnání s mafosfamidem. Vlastní cyklofosfamid nelze k purgingu použít, protože je in vitro neúčinný a účinné jsou jeho metabolity, které vznikají v játrech (*Klener, P., 1996*).

První úspěšné experimentální použití mafosfamidu k čištění štěpu progenitorových buněk kostní dřeně kontaminovaných nádorovými buňkami popsal Sharkis počátkem 90. let. Na modelu leukemických myši popsal úspěšnou ex-vivo eliminaci nádorových buněk z kostní dřeně a jejich vyšší přežití po transplantaci s použitím čištěného štěpu (*Sharkis, S.J. a kol., 1980*). V současné době je mafosfamid v Evropě nejpoužívanějším cytostatikem k čištění autologních štěpů (*Olivieri, J. a kol., 1997*).

Mafosfamid a 4-HC při chemickém čištění štěpu inhibují v závislosti na použité dávce in vitro růst koloniformních jednotek jak leukemických (nádorových) tak hematopoetických (CFU-blast, CFU-GEMM, BFU-E, CFU-GM). In vitro studie ukazují, že tyto látky redukovat množství reziduálních nádorových buněk v rozmezí 2-4 řádů, současně snižují množství kmenových buněk o 1-2 řády (*Kramer, B. a kol., 1992*). Jedním z důležitých předpokladů purgingu je odlišná senzitivita mezi progenitory a nádorovými buňkami k cytostatiku. Tento rozdíl senzitivity byl prokázán na

zvířecím modelu (*Sharkis, S.J. a kol., 1980*). U lidských hematopoetických kmenových buněk nebyl takový rozdíl v senzitivitě leukemických buněk zjištěn (*Kluin-Nelemans, H.C. a kol., 1984*). Navíc je citlivost hematopoetických progenitorových buněk k dávkám mafosfamidu individuální v širokém rozmezí. Například koncentrace mafosfamidu inhibující růst kolonií CFU-blast na 50 % se ve skupině pacientů s AML individuálně pohybovala v rozmezí 61 - 146 µg/ml, tedy více než o 100 % (*Carlo-Stella, C. a kol., 1992*). Toto zjištění některé autory vedlo k použití individuálního přístupu u jednotlivých pacientů. K čištění konkrétního štěpu použijí takovou koncentraci, která v při vyšetření inhibovala růst kolonií k požadované hranici (nejčastěji LD95). Většina pracovních skupin zabývajících se manipulacemi se štěpy však individuální dávkování nevyužívá a všechny štěpy pacientů čistí stejnou koncentrací mafosfamidu.

Nádorové buňky vystavené účinku mafosfamidu a 4-HC podléhají apoptóze. Při inkubaci leukemických buněk s 4-HC byla prokázána indukce apoptózy při dávkách standardně používaných k in vitro purgingu. Autorům se navíc podařilo prokázat, že tento efekt je možné potencovat koinkubací buněk s cytokiny (IL-2, IL-6) (*Bullock, G. a kol., 1993*). V neposlední řadě je nutné zmínit zřejmé působení na efektorové buňky imunitního systému, například NK-buňky jsou aktivovány při farmakologickém čištění a u pacientů s AML a ne Hodgkinovými lymfomy je popsána zvýšená regenerace NK-buněk po čištění mafosfamidem (*Rizzoli, V. a kol., 1995, Almici, C. a kol., 1995*).

Mafosfamid a 4-HC jsou používány především při čištění štěpů pacientů s AML, méně s ALL a maligními lymfomy, kde se častěji využívá eliminace kontaminujících nádorových buněk monoklonálními protilátkami. Oba preparáty jsou používány i při čištění autologních štěpů pacientů se solidními nádory. V dospělosti především u pacientek s karcinomem prsu, v dětském věku nejvíce u pacientů s neuroblastomem. Klinická použitelnost manipulovaného štěpu je ověřena řadou publikovaných studií, jejich výsledky shrnuje tabulka 3.

| <i>Diagnóza</i> | <i>Počet pacientů</i> | <i>Příznivý efekt čištění</i> | <i>Autor citace</i> |
|-----------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| AML | 294 | + | <i>Miller, C.B. a kol., 2001</i> |
| AML + ALL | 229 | + | <i>Gorin, N.C. a kol., 1999</i> |
| NHL | 120 | +/- | <i>Fouillard, L. a kol., 1998</i> |
| AML | 263 | + | <i>Gorin N.C. a kol., 1990, 1991</i> |

Tabulka 3. Čištění štěpů hematopoetických kmenových buněk deriváty cyklofosfamidu (mafosfamid, 4-HC). Přehled studií, které se zabývají efektem purgingu.

Řada klinických údajů podporuje význam čištění mafosfamidem (nebo 4-HC) především u pacientů s AML. Zatímco žádná publikovaná studie dospělých pacientů s AML transplantovaných nečištěným štěpem v 1. kompletní remisi neukázala dlouhodobé přežití bez leukémie (LFS, leukemia free survival) vyšší než 35-40%, několik studií pacientů transplantovaných čištěným štěpem dokládá LFS vyšší než 50% a dvě dokumentují dlouhodobé přežití bez leukémie u 70% pacientů při desetiletém sledování (*Gorin, N.C. a kol., 1998*).

Množství progenitorových buněk ve štěpu a agresivita čištění jsou další významné faktory ovlivňující přežití. Pacienti, u kterých se podařilo odebrat bohatý štěp (CFU-GM > 5,46 x 10⁴/kg před čištěním), který byl agresivně čištěn (CFU-GM < 0,02 x 10⁴/kg po čištění), měli nižší mortalitu spojenou s léčbou (2 ± 2%) a vyšší přežití po 10 letech jak celkové, OS 77 ± 7%, tak i bez leukémie, LFS 70%. Především však pacienti, kteří byli transplantováni takto intenzívně čištěným štěpem (s méně než 0,004% původní hodnoty CFU-GM před čištěním mafosfamidem) měli nižší riziko relapsu. Tyto rozdíly byly statisticky významné. V této retrospektivní studii 229 pacientů léčených pro akutní leukémie byly dávka dřeně použité k čištění a intenzita čištění nejdůležitějšími faktory předurčujícími přežití (*Gorin, N.C. a kol., 1999*). Závislost mezi podanou dávkou CFU-GM a počtem relapsů po transplantaci čištěným štěpem potvrdili u AML a NHL i další autoři (*Rowley, S.D. a kol., 1989, Fouillard, L. a kol., 1998*).

Podobně je v experimentu i klinických studiích používán etoposid (4-demetyl-epipodofylotoxin-beta-D-etylglukosid, Vepesid, VP-16). Toto základní cytostatikum používané v léčbě řady typů leukemií, lymfomů a solidních nádorů je fázově specifické s maximálním účinkem v G₂ – fázi. Mechanismem účinku je inhibice topoizomerázy II a působení zlomů buněčné DNA. K farmakologickému čištění štěpů hematopoetických buněk je používán samostatně nebo v kombinacích. Etoposid podobně jako in vitro stabilní deriváty cyklofosfamidu vyvolává v závislosti na použité dávce lineární inhibici růstu progenitorových buněk a buněk nádorových. Dávky etoposidu, běžně používané k in vitro manipulacím, se pohybují mezi 15 - 50 µg/ml. V experimentu na zvířecím modelu Stiff a Koester demonstrovali rychlé obnovení krvetvorby u myši ozářených letální dávkou radiace a transplantovaných progenitory inkubovanými s VP-16 v koncentracích 10 – 55 µg/ml. Naproti tomu při inkubaci s etoposidem v koncentraci 70 µg/ml všechna testovaná zvířata uhynula bez obnovy krvetvorby (*Stiff, P.J. a Koester, A.R., 1987*). V relativně úzkém rozmezí tak byly koncentrace s vysokým protinádorovým účinkem (40 – 50 µg/ml) a koncentrace s neúnosnou toxicitou na progenitorové buňky zvyšující riziko selhání obnovy hematopoezy (> 60 µg/ml). Etoposid je považován za vhodný preparát k čištění vzhledem ke schopnosti eliminovat nejen leukemické buňky, ale i jejich nediferencované pluripotentní progenitory (*Stiff, P.J. a Koester, A.R., 1987*).

Oliveri v experimentu s leukemickou buněčnou linií K562 a kmenovými buňkami porovnával efektivitu a toxicitu čištění etoposidem a mafosfamidem. K dosažení 100% inhibice růstu buněčné linie K562 byly nutné koncentrace 50 µg/ml mafosfamidu a 70 µg/ml etoposidu. Při identických koncentracích koloniformní aktivita progenitorů CFU-GM byla redukována na 4,8% u etoposidu oproti 21,2% u mafosfamidu. Pokud byl použit model minimální nádorové choroby (0,5 a 5% kontaminace leukemickými buňkami) mafosfamid prokázal vyšší inhibici růstu leukemických buněk při zachování vyššího počtu progenitorů (*Oliveri, A. a kol., 1997*).

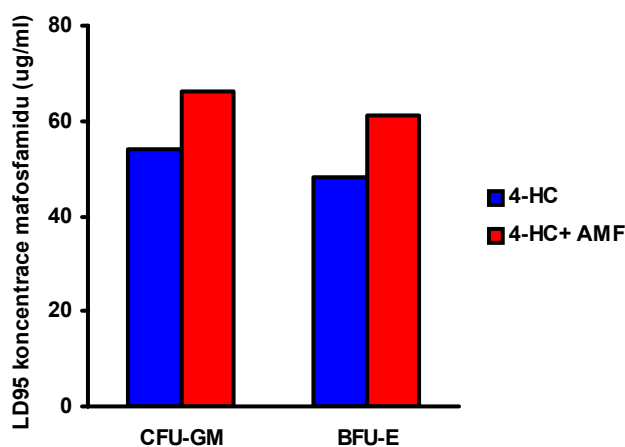
V kombinaci je etoposid často používán s alkylačními cytostatiky (mustargen, 4-HC) (*Motta, M.R. a kol., 1997, Lemoli, R.M., Gulati, S.C., 1990, Gulati, S.C., 1992*) nebo s kortikoidy (*Kavan, P. a kol., 1996*). Kombinaci etoposidu s mustargenem použil Lemoli u 12 pacientů k čištění štěpů PBSC. Etoposid v dávce 16 µg/ml byl kombinován s mustargenem v individuálně aplikované dávce, zachovávající cca 5% progenitorů v předchozím individualizovaném experimentu s buňkami kostní dřeně. Celkem 11 pacientů bylo čištěným štěpem transplantováno (medián 30 x 10⁴ CFU-GM/kg). Ve srovnání se skupinou pacientů transplantovaných nečištěným PBSC nebyl zjištěn klinicky signifikantní rozdíl v rychlosti příhojení, manipulace se štěpem obnovu krvetvorby po transplantaci neznemožnila. Navíc srovnání s transplantacemi progenitorů kostní dřeně prokázalo trvající rychlejší obnovu trombopoézy při použití periferních kmenových buněk (PBSC) i přes ex-vivo manipulaci (*Lemoli, R.M. a kol., 1999*).

Toxicita k progenitorovým buňkám limituje širší použití chemoterapeutik k in vitro manipulacím autologních štěpů. Poškození hematopoetických progenitorů může způsobit opožděné příhojení použitého štěpu a ohrozit pacienta časnými posttransplantačními komplikacemi. Proto se v současné době hledají postupy selektivně zvyšující rezistenci kmenových buněk krvetvorby k cytostatikům. Toxický účinek chemoterapeutik na progenitorové buňky může být snížen například použitím radioprotektivní a chemoprotektivní látky amifostinu. Amifostin (Ethyol, Schering Plough) je aminothiol (prodrug WR-2771), který k dosažení cytoprotektivního účinku musí být defosforylován alkalickou fosfatázou na vlastní aktivní látku, volný thiol (metabolit WR-1065). Selektivní účinek ochrany nenádorových buněk je dán enzymatickou aktivací amifostinu (Ethyol prakticky nevstupuje do buněk) alkalickou fosfatázou, která je jako membránově vázaný enzym přítomna ve vyšších koncentracích v normálních tkáních a přednostním vychytáním aktivního metabolitu WR-1065 v nenádorových buňkách (*Peters, G.J., van der Vijgh, W.J.F., 1995, Cappizzi, R.L., Oster, W., 1995*). Vlastní cytoprotektivní účinek WR-1065 je dán schopností inaktivace reaktivních skupin cytostatik, inaktivací volných kyslíkových radikálů vznikajících v buňkách působením cytostatik nebo ionizujícího záření a usnadněním reparace poškozené DNA (*Grđina, D.J. a kol., 1995*). Progenitorovým buňkám je tak v in vitro prostředí poskytnuta selektivní výhoda, zatímco nádorové buňky jsou plně vystaveny účinkům chemoterapeutika.

Protektivní efekt amifostinu na progenitorové hematopoetické buňky je dokumentován v několika klinických studiích. List (*List, A.F. a kol., 1996*) testoval předpokládané protektivní účinky (odděleně pro amifostin v koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ a aktivní metabolit WR-1065 v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$) na hematopoetické progenitory proti různým cytostatikům. Amifostin v uvedené koncentraci, která odpovídá maximu plazmatické hladiny po podání pacientovi, zajistil prokazatelnou ochranu CFU-GEMM proti účinkům daunorubicinu, paclitaxelu, mitoxantronu. Podobně významná byla ochrana kolonií BFU-E proti účinku doxorubicinu, mitoxantronu, paclitaxelu, cisplatinu a dalších testovaných chemoterapeutik. Autoři tak dokumentovali ochranu progenitorů proti řadě protinádorových léků s různou chemickou strukturou a odlišným mechanismem účinku na cílové buňky (*List, A.F. a kol., 1996*). Schopnost amifostinu ochránit progenitorové buňky před toxickým účinkem mafosfamidu a 4-HC v experimentu potvrdil Douay (*Douay, L. a kol., 1995*). Preinkubace s amifostinem v koncentraci 4 mg/ml vedla k statisticky signifikantní ochraně CFU-GM a BFU-E před mafosfamidem. Výsledky shrnuje obrázek 2.

Mimo vlastní ochranu hematopoetických kmenových buněk navíc amifostin u leukemických buněk prokazatelně potencuje protinádorový účinek mafosfamidu (*Balzarotti, M. a kol., 1999*). Možným mechanismem je v tomto případě pokles hladiny glutathionu v leukemických buňkách podmíněný působením WR-1065, což vede k zvýšení účinku alkylačních cytostatik, tedy i mafosfamidu (*Douay, L. a kol., 1995*).

Klinické studie, ve kterých je hodnocen protektivní efekt amifostinu na hematopoetické progenitory, uvádí tabulka 4. Z uvedených výsledků i přes malý počet pacientů v testovaných skupinách vyplývá, že použití amifostinu k ochraně kmenových buněk v manipulovaných štěpech může zkrátit dobu dřeňové aplázie, snížit peritransplantační morbiditu a redukovat celkové náklady na léčbu (*Balzarotti, M. a kol., 1999, Shpall, E.J. a kol., 1994, Cagnoni, P.J. a kol., 1996*).



Obrázek 2, Schopnost amifostinu ochránit progenitorové buňky před účinkem mafosfamidu (*Douay, L. a kol., 1995*)

| Počet pacientů | In vitro manipulace | Protektce progenitorových buněk | Autor |
|-----------------------|---|--|-----------------------------------|
| Ca prsu n=15 | 4-HC (80µg/ml) amifostin (4 mg/ml) | Přihojení štěpu PBSC v kontrolní skupině s amifostinem rychlejší (26 vs.36 dní, p=0,042) Počet TRF trombo nižší (12 vs. 29 TRF, p=0,017) Počet dní ATB léčby nižší (28 vs.40, p=0,012) | <i>Shpall, E.J. a kol., 1994</i> |
| NHL a HD N=13 | 4-HC (80µg/ml) amifostin (4 mg/ml) | Přihojení štěpu PBSC v kontrolní skupině s amifostinem rychlejší (30 vs.36 dní, p=0.019) | <i>Cognoni, P.J. a kol., 1996</i> |

Tabulka 4, Randomizované studie s manipulovanými štěpy s podáním amifostinu k protekci hematopoetických progenitorů – shrnutí výsledků
NHL – ne Hodgkinův lymfom, HD – Hodgkinův lymfom, PBSC – periferní hematopoetické kmenové buňky, TRF trombo – transfúze trombokonzentrátu

Nádory rodiny Ewingova sarkomu/pPNETU

Skupinu nádorů rodiny Ewingova sarkomu („Ewing Sarcoma Family of Tumors“, dále ES) tvoří agresivní nádory kostí nebo měkkých tkání zahrnující vlastní Ewingův sarkom, periferní primitivní neuroektodermální nádor - pPNET a jejich atypické varianty. U dětí a adolescentů jsou tyto nádory na druhém místě v četnosti výskytu mezi zhoubnými nádory kostí a představují 15% všech kostních nádorů (*Cullinane, C.J. a Burchill, S.A., 2003*).

Ewingův sarkom kosti byl poprvé popsán Jamesem Ewingem v roce 1921 jako vřetenobuněčný nádor dlouhých kostí citlivý k radioterapii, čímž se odlišoval od osteosarkomu. James Ewing předpokládal endoteliální původ nádoru. V současné době se předpokládá neuroektodermální původ nádoru v postgangliových buňkách parasymptiku, čímž se vysvětluje výskyt nádoru v kostech, méně častý extraskeletální výskyt primárního nádoru v měkkých tkáních a vzácné primární postižení viscerálních orgánů (ledvina, pankreas, ovaria atd.). Neuroektodermální původ nádoru podporují nálezy neurální diferenciaci charakterizované průkazem exprese neurálních antigenů při imuno-histochemickém vyšetření a průkaz neurosekrečních granul při elektronmikroskopickém vyšetření. Dalším důkazem je schopnost buněčných linií odvozených od ES podstoupit neurální diferenciaci v podmínkách in vitro (*Sugimoto, T. a kol., 1997*). V neposlední řadě buňky ES produkují acetylcholinesterázu, enzym nezbytný pro syntézu acetylcholinu (*O'Regan, S. a kol., 1995*).

V morfologickém obraze při klasickém barvení hematoxylin-eosinem imponují nádory z rodiny ES jako „nádory z malých tmavých kulatých buněk“, tedy obrazem typickým pro řadu nediferencovaných, biologicky agresivních dětských nádorů. Velmi podobným morfologickým obrazem se prezentují například rabdomyosarkom, neuroblastom, některé nehodgkinské lymfomy, meduloblastom a některé další nádory. Protože je léčba každého z nich odlišná, je určení správné diagnózy zcela zásadní pro další léčebný postup a osud pacienta. V současné době jsou imunohistochemické, elektronmikroskopické, cytogenetické a molekulárně biologické vyšetření zcela nezbytné pro přesnou diagnostiku a léčbu dětských nádorových onemocnění.

V případě vlastního Ewingova sarkomu se jedná o primitivní, nediferencovaný nádor, u pPNETU nacházíme známky neuronální diferenciaci. Tabulka 5 shrnuje nálezy imunohistochemického vyšetření u ES a pPNETU, zařazeny jsou i další nádory s obdobnou morfologií („small round blue cell tumors“), které je nutné zahrnout v diferenciální diagnóze. Mimořádný význam v diferenciální diagnóze ES od jiných nádorů z malých tmavých buněk dětského věku má protilátka CD99, která rozpoznává povrchový glykoprotein p30/32^{MIC2}. „Over-exprese“ genu MIC2 v ES je charakteristická, nicméně není zcela specifická (*Cullinane, C.J. a Burchill, S.A., 2003*). MIC2 glykoprotein nacházíme i u některých nehodgkinských lymfomů, leukémií, v Sertoliho buňkách a v pankreatu.

| <i>IHC</i> | <i>pPNET</i> | <i>ES</i> | <i>NBL</i> | <i>RMS</i> | <i>NHL</i> |
|--------------|--------------|-----------|------------|------------|------------|
| Vimentin | + | + | - | + | - |
| NSE | + | - | + | - (+) | - |
| PGP 9.5 | + | - | + | - | - |
| S100 | + | - | - (+) | - | - |
| Chromogranin | - (+) | - | + | - | - |
| GFAP | - (+) | - | - | - | - |
| Leu 7 | + | - | - | - | - (+) |
| MIC2 | +++ | +++ | - | - (+) | + (-) |
| NB84 | - | - | + | - | - |
| Desmin | - (+) | - (+) | - | + | - |
| MyoD1 | - | - | - | + | - |
| Myogenin | - | - | - | + | - |
| Aktin | - | - | - | + | - |
| CD45 | - | - | - | - | + |
| Cytokeratin | - (+) | - (+) | - | - (+) | - |

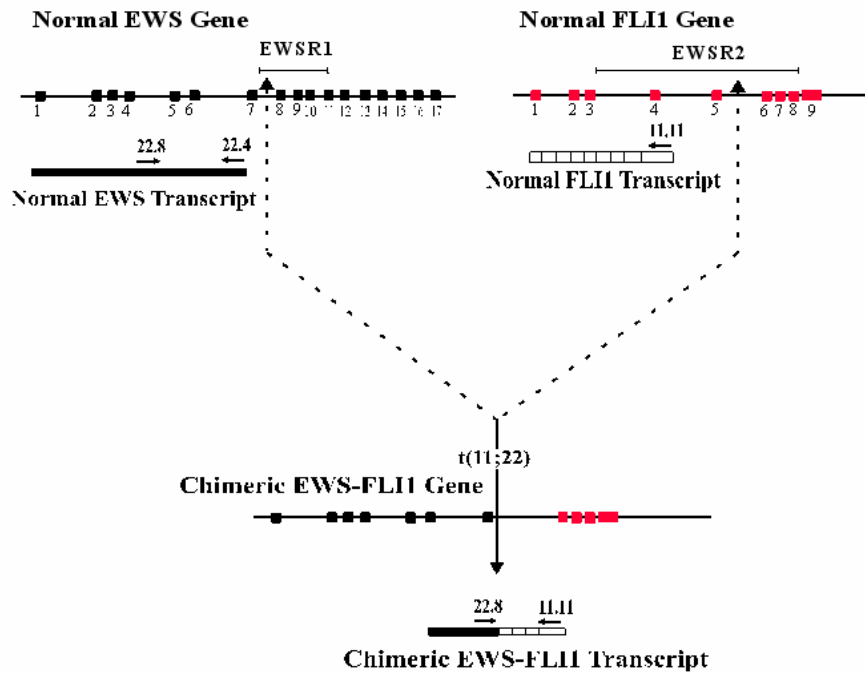
Tabulka 5, Imunohistochemické vyšetření u ES, pPNETu a dalších „nádorů z malých tmavých kultých buněk“. IHC - imunohistochemie, ES - Ewingův sarkom, pPNET - periferní primitivní neuroektodernální nádor, NBL - neuroblastom, RMS - rabdomyosarkom, NHL – nehodgkinský lymfom (v diferenciální diagnóze nejčastěji lymfoblastický T-NHL)

Nádory rodiny Ewingova sarkomu jsou charakterizovány přítomností specifických chromozomálních aberací zahrnujících gen *EWS* na 22. chromozómu (*West, D.C., 2000*). Byly identifikovány nenáhodné chromozomální translokace (tabulka 6), které jsou specifické pro ES. Na molekulární úrovni vedou tyto translokace k přestavbám mezi geny *ETS* rodiny transkripčních faktorů a genem *EWS* na 22. chromozómu (*Dellattre, O. a kol., 1994, Sandberg, A.A. a Bridge, J., 2000*). Výsledkem je nový fúzní gen, jehož přepisem vzniká protein s funkcí aberantního transkripčního faktoru, který je odpovědný za maligní transformaci buňky (*May, W.A. a kol., 1993*).

Nejčastější se vyskytující translokací je t(11;22)(q24;q12), kterou nacházíme u 85% nádorů ze skupiny ES (obrázek 3).

Druhou nejčastější je t(21;22)(q22;q12), ta je zastižena u <10% nádorů. Ostatní známé fúzní geny *EWS/E1AF*, *EWS/ETV-1* a *EWS/FEV* nacházíme u 1-2% ES, podobně jako komplexní translokace zahrnující další chromozómy mimo nejčastější oblasti 11q24 a 22q12.

ES - translokace t(11;22)(q24;q12)



Obrázek 3, Schematické znázornění fúzního genu EWS/FLI1, podmíněného translokací t(11;22)(q24;q12).

Příkladem jsou komplexní translokace t(11;14;22)(q24;q11;q12), t(10;11;22) (p11.2; q24;q12), t(11;17;22) (q24;q22;q12) a řada dalších (Sandberg, A.A. a Bridge, J., 2000).

Recentně byla identifikována t(1;22)(p36.1;q12) s novým fúzním partnerem ZSG na 1. chromozómu, rovněž z rodiny ETS transkripčních faktorů (Mastrangelo, T. a kol., 2000).

| Translokace | Chimerický fúzní gen | Četnost ve skupině ES |
|---|----------------------|-----------------------|
| t(11;22)(q24;q12) | EWS/FLI-1 | 85% |
| t(21;22)(q22;q12) | EWS/ERG | <10% |
| t(17;22)(q12;q12) | EWS/E1AF | < 2 % |
| t(7;22)(p22;q12) | EWS/ETV-1 | < 2% |
| t(2;22)(q33;q12) | EWS/FEV | < 1% |
| komplexní translokace postihující 11q24 a 22q12 | EWS/FLI-1 | Ojedinele |

Tabulka 6, Přehled translokací u nádorů z rodiny Ewingova sarkomu (Ewingův sarkom kostí i extraoseální, periferní primitivní neuroektodermální nádor)

Obě hlavní translokace t(11;22) a t(21;22) jsou tedy nalézány u více než 95% nádorů skupiny Ewingova sarkomu, ostatní typy jsou minoritní.

U části ES se mimo *EWS/ETS* přestavby vyskytují další přídavné změny, nejčastěji trizomie 8. a 12. chromozómu, nebalancovaná translokace t(1;16), vedoucí k deleci 16q a ke zmnožení kopií 1q a rovněž delece 1p (*Kaneko, Y. a kol., 1996; Maurici, D. a kol., 1998*). Jakým způsobem se uvedené sekundární chromozomální aberace podílejí na vývoji biologického chování ES není dosud zcela jasné. Trizomie 8. chromozómu byla původně považována za prognosticky nepříznivý znak (*Armengol, G. a kol., 1997, Tarkkanen, M. a kol., 1999*), nicméně tento nález byl zpochybněn na větším souboru pacientů (*Hattinger C.M. a kol., 1999*). Naproti tomu delece 1p se považuje za nepříznivý znak u pacientů s lokalizovaným onemocněním, t(1;16) je spojována s generalizací a progresí onemocnění (*Stark, B. a kol., 1997*).

Zatímco průkaz *EWS/ETS* přestaveb má zásadní význam diagnostický, prognostický význam různých typů translokací u ES se nepotvrdil (*Ginsberg, J.P. a kol., 1999*).

V současné době nicméně známe řadu faktorů určujících prognózu pacienta. Z klinických faktorů nepříznivě ovlivňujících prognózu pacienta jsou to především: přítomnost a lokalizace metastáz v době záchytu onemocnění, lokalizace primárního nádoru v osovém skeletu, objem primárního nádoru > 100 ml. Významnými rizikovými faktory jsou dále vyšší věk (pacienti starší 12 let v době stanovení diagnózy mají horší prognózu), vysoká hodnota LDH a mužské pohlaví (*Cullinane C.J. a Burchill S.A., 2003*).

Velmi významným nepříznivým prognostickým faktorem je nedostatečná odpověď na protinádorovou léčbu a masivní přítomnost viabilní neoplázie v resekatu nádoru po předoperační chemoterapii (*Picci, P. a kol., 1997*).

Nejvýznamnějším nepříznivým znakem je přítomnost metastáz v době stanovení diagnózy. Prognosticky příznivější je metastatické postižení plic, výrazně horší prognóza je u pacientů s metastázami ve skeletu, v kostní dřeni, nejhorší u kombinace obou (*Kushner, B.H., Meyers, P.A., 2001*).

U pacientů, kteří nereagují na chemoterapii první volby je další léčba obtížná, s nejistým výsledkem. V případě recidivy onemocnění má pro prognózu pacienta význam délka intervalu mezi ukončením léčby a relapsem onemocnění. Pokud je tato doba kratší než dva roky je prognóza pacienta velmi nepříznivá, významně horší než u pacientů s pozdním relapsem onemocnění.

Léčba pacientů s ES v posledních 20 letech velmi pokročila. Zařazením všech léčebných modalit (radioterapie, chirurgická léčba, chemoterapie) můžeme ve specializovaných centrech vyléčit >60% pacientů s lokalizovaným ES a přibližně 25-30% pacientů s primárně generalizovaným onemocněním (*Cullinane C.J. a Burchill S.A., 2003, Rodrigues-Galindo, C. a kol., 2003*).

CÍLE PRÁCE:

1. Stanovení vhodných znaků a určení optimální metodiky k detekci minimální nádorové choroby ve štěpech kostní dřeně a periferních hematopoetických progenitorových buněk (PBSC) určených k autologním transplantacím u nádorů rodiny Ewingova sarkomu/pPNETU.
2. Vyšetření štěpů na přítomnost minimální nádorové choroby.
3. Vypracovat metodiku farmakologického *ex vivo* čištění štěpů (purgingu) hematopoetických kmenových buněk.
 - a, Snížit toxický účinek cytostatika (mafosfamidu, etoposidu) na hematopoetické kmenové buňky v průběhu *ex vivo* purgingu předchozí inkubací s amifostinem.
 - b, Ověřit metodiku v experimentu a pokud experimentální data potvrdí protektivní účinek inkubace s amifostinem ověřit metodiku na štěpech určených ke klinickému použití a potvrdit použitelnost takto manipulovaných štěpů v klinické studii

EXPERIMENTÁLNÍ PURGING

Před klinickým použitím farmakologicky manipulovaných autologních štěpů jsme provedli řadu experimentů, které měly ověřit účinnost a bezpečnost zvoleného postupu a standardizovat pracovní postup a podmínky ex-vivo manipulace se štěpy hematopoetických kmenových buněk.

V provedených testech jsme hodnotili účinky ex-vivo čištění na progenitorové buňky štěpu. Protinádorový účinek metodiky jsme hodnotili na buněčných liniích odvozených od dětských solidních nádorů, jejichž biologicky nepříznivé formy, pokročilá nebo recidivující onemocnění jsou v indikovaných případech léčeny vysokodávkovanou chemoterapií s autologní transplantací hematopoetických kmenových buněk.

Ve štěpech hematopoetických progenitorových buněk získaných z kostní dřeně i z periferní krve jsme hodnotili počty jaderných buněk, počty hematopoetických kolonií (CFU-GM, BFU-E) a zastoupení CD34+ progenitorových buněk v přítomnosti amifostinu, testovaného chemoterapeutika (mafosfamidu nebo etoposidu) použitého k vlastní eliminaci nádorových buněk kontaminujících štěp a kombinace chemoterapeutika s amifostinem. Protinádorový účinek použitých cytostatik jsme ověřili v MTT testu s buněčnými liniemi neuroblastomu a Ewingova sarkomu. Za identických podmínek jsme studovali efekt krátkodobé inkubace nádorových buněk s amifostinem a následné ovlivnění inhibičního účinku cytostatik, tzn. ochrany nádoru nebo potenciace protinádorového účinku amifostinem u buněčných linií odvozených od nádorů.

Experimentální purging - metody

Experimenty s mafosfamidem

Mafosfamid jsme použili v sedmi preklinických experimentech se vzorky kostní dřeně (KD) a periferních progenitorových buněk (PBSC) získaných od zdravých dárců i od pacientů s nádorovým onemocněním. Nádorové buňky použité k hodnocení efektivity čištění mafosfamidem reprezentovaly buňky nádorových linií odvozených od neuroblastomu a Ewingova sarkomu. Buněčné linie odvozené od vysoce rizikových forem neuroblastomu byly poskytnuty prof. J. Činátlem, jr. (Ústav lékařské virologie, Univerzita J.W.Goetha, Frankfurt). Buňky použitých linií (UKF-NB1, UKF-NB2, UKF-NB3) amplifikují onkogen MYCN a to v desítkách kopií tohoto genu (*Bedrníček, J. a kol., 2005*). Tato amplifikace umožňuje odlišit neuroblastomové buňky od hematopoetických progenitorů metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) (*Eckschlager T., McClain, K., 1996*). Neuroblastomové buňky je možné detekovat rovněž průkazem exprese genu pro tyrosinhydroxylázu metodou RT-PCR a imunologicky monoklonálními protilátkami průtokovou cytometrií. K imunologické detekci využíváme cytometrického průkazu exprese

antigenů CD56 a CD81 a nepřítomnosti panleukocytárního antigenu CD45 buňkami neuroblastomu (Nagai, J. a kol., 2000). Buněčná linie IARC-EW2 odvozená od nádoru typu Ewingova sarkomu nese specifickou chromozomální translokaci t(11;22)(q24;q12). Chimerický fúzní transkript *EWS/FLI-1* podmíněný specifickou chromozomální translokací je možné detekovat pomocí reverzně transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR).

Účinek na nádorové buněčné linie a účinek na progenitorové buňky byl hodnocen jednotlivě pro mafosfamid (Mafosfamide-L-lysin, ASTA Medica AG), amifostin (Ethyol, Schering Plough) a jejich kombinace.

Mafosfamid jsme nepoužili k čištění autologního štěpu žádného pacienta z důvodu opakovaného odkládání termínu dodávky chemoterapeutika a neúměrnému navýšení ceny mafosfamidu firmou. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pokračovat v klinickém čištění štěpů PBSC s-etoposidem.

Experimenty s etoposidem

Etoposid jsme použili opětovně v experimentech se vzorky KD a PBSC získaných od zdravých dárců i od pacientů s nádory k určení vhodných koncentrací etoposidu k chemickému čištění štěpů hematopoetických buněk, tedy koncentrace efektivně likvidující nádorové buňky (uvedené linie IARC-EW2 a neuroblastomové linie UKF-NB1-3) a zachovávající štěp zajišťující obnovu hematopoezy po převodu štěpu.

Po standardizaci postupu jsme přistoupili k experimentálnímu čištění vzorků kostní dřeně pediatrických pacientů se solidními nádory, s předpokládanou infiltrací kostní dřeně v době stanovení diagnózy nebo při relapsu základního onemocnění. V těchto experimentech jsme opět hodnotili efektivitu postupu v likvidaci nádorových buněk, toxicitu etoposidu k hematopoetickým buňkám a ochranný efekt preinkubace s amifostinem. Současně jsme tímto způsobem testovali metody, které jsme zavedli k detekci kontaminujících nádorových buněk. Po dokončení preklinických testů jsme přistoupili k vlastnímu čištění autologních štěpů PBSC a kostní dřeně určených pro klinické použití.

Inkubační procedury s mafosfamidem

Suspenzi hematopoetických buněk a buněk nádorových linií připravených v koncentraci 2×10^7 v ml inkubujeme po dobu 15 minut s amifostinem (4 mg/ml) ve vodní lázni při 37°C a následně promýváme chladným pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS). Buňky dále inkubujeme s mafosfamidem o zvolené koncentraci (experimentálně 50, 100 a 150 µg/ml) třicet

minut ve vodní lázni při 37°C. Inkubace je ukončena rychlým ochlazením v ledové lázni a mafosfamid odstraníme dvojnásobným promytím buněk v PBS.

Inkubační procedury s etoposidem

Suspenzi hematopoetických buněk a buněk nádorových linií připravených v koncentraci 2×10^7 v ml inkubujeme po dobu 15 minut s amifostinem (4 mg/ml) ve vodní lázni při 37°C a následně promýváme chladným pufrovaným fyziologickým roztokem. Buňky dále inkubujeme s etoposidem o zvolené koncentraci (experimentálně 30, 40, 50 $\mu\text{g/ml}$) dvě hodiny ve vodní lázni při 37°C. Inkubace je ukončena rychlým ochlazením v ledové lázni a odstraněním etoposidu dvojnásobným promytím buněk v PBS.

K čištění autologních štěpů kmenových buněk jsme se na základě výsledků provedených testů rozhodli použít koncentraci etoposidu 40 $\mu\text{g/ml}$ po předchozí inkubaci štěpu s amifostinem v koncentraci 4 mg/ml po dobu 15 minut a jeho odmytí. Ex-vivo manipulace se štěpy určenými ke klinickému použití jsme prováděli za přísně sterilních podmínek podle zásad správné výrobní praxe.

Kultivační hodnocení hematopoetických kolonií CFU-GM a BFU-E

Suspenze hematopoetických buněk (1 ml) o koncentraci 1×10^6 se kultivuje v Petriho miskách v humidifikovaném prostředí s 5% CO₂ při 37°C v kompletním methylcelulózovém médiu MethoCult GF H4434 (StemCell Technologies Inc.). Po 14 dnech se odečítají kolonie tvořené více než 40 buňkami.

Stanovení CD 34+ buněk

Stanovení CD34 znaku se provádí imunologicky průtokovou cytometrií na přístroji FACSCalibur podle tak zvaného Milánského protokolu (*Siena, S. a kol., 1991*). K detekci znaku jsme použili protilátky značené fykoeritinem proti CD34 (klon 8G12) - antiHPCA2-myší IgG1 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Jedná se o protilátku zaměřenou proti 3. epitopu antigenu CD34. Lyzaci jsme prováděli lyzačním činidlem Becton Dickinson podle doporučení výrobce.

Hodnocení vitality buněčných linií - MTT test

Pro hodnocení vitality buněčných linií jsme použili MTT test (Sigma M 5655). K rozlišení živých a mrtvých buněk je využita schopnost vitálních buněk redukovat žlutou, rozpustnou tetrazoliovou sůl MTT (3-4,5-dimethylazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium) mitochondriálním enzymem sukcinátdehydrogenázou na nerozpustný modrý formazan. Po rozpuštění formazanu

organickým rozpouštědlem je fotometricky hodnocena absorbance barevného produktu při 570 nm. Ve vlastním experimentu jsme buňky nádorových linií po působení mafosfamidu a amifostinu resuspendovali v IMDM médiu s 10 % fetálního telecího séra a napipetovali do jamek kultivační destičky po 100 μ l. Po inkubaci trvající 48 hodin v atmosféře s 5% CO₂ při teplotě 37°C jsme přidali do každé jamky 10 μ l MTT roztoku, po 4 hodinách 100 μ l 10 % roztoku sodium dodecyl sulfátu v 0,1M HCl. Po inkubaci trvající 20 hodin jsme odečetli modré zbarvení při 570 nm na přístroji Dynatech MRX. Výsledky jsou vypočteny z průměrů extinkcí ze čtyř jamek kultivační destičky.

Hodnocení apoptózy CD34+ buněk

V (několika) experimentech jsme rovněž hodnotili apoptózu CD34+ buněk současným průkazem antigenu CD34 protilátkou a apoptózy vazbou FITC značeným annexinem V. Buňky jsme inkubovali se značenou protilátkou (anti-CD34 značená fykoerytrinem viz. výše) při 4°C 15 minut, poté je promyli při teplotě 4°C v PBS a resuspendovali ve vazebném pufru. Přidali jsme ředěný annexin V značený FITC a po desetiminutové inkubaci na ledu jsme měřili na cytometru FACSCalibur. Značený Annexin V a vazebný pufr jsou součástí komerční soupravy Annexin V FITC kit (Immunotech). Toto vyšetření bylo hodnotitelné pokud ve vzorku bylo nejméně 1% CD34+ buněk.

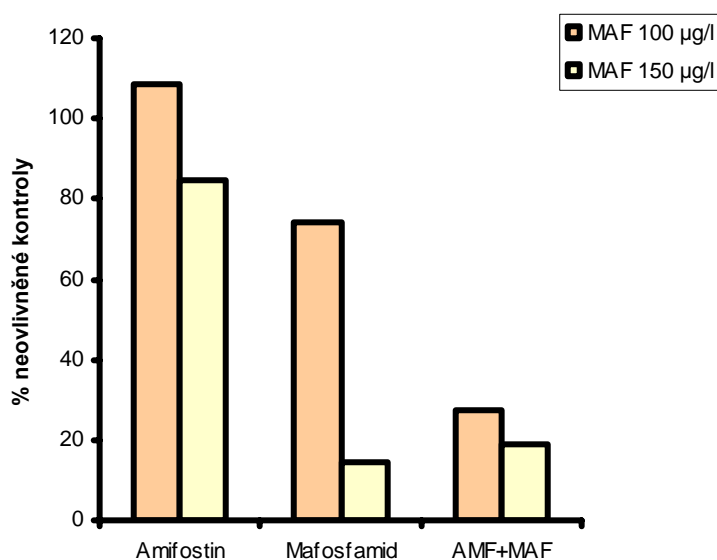
Experimentální purging – výsledky

Protinádorové účinky mafosfamidu

Protinádorové účinky jsme hodnotili MTT testem pro zvolené koncentrace mafosfamidu 100 a 150 µg/ml a k preinkubaci jsme používali standardní koncentraci amifostinu 4 mg/ml. Výsledné hodnoty MTT testu na buněčné linii IARC-EW2 odvozené od Ewingova sarkomu pro různé koncentrace mafosfamidu (průměr hodnot tří experimentů) ukazuje tabulka 7 a obrázek 4. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento extinkce kontroly (neovlivněné tkáňové kultury). Rozdíl na hranici významnosti jsme prokázali při vyšší koncentraci mafosfamidu ($p < 0,1$, Studentův t-test). Rozhodně však nebylo ani naznačeno, že by amifostin měl protektivní účinek na nádorové buňky.

| | <i>Amifostin</i> | <i>Mafosfamid</i> | <i>AMF+MAF</i> |
|---------------|------------------|-------------------|----------------|
| MAF 100 µg/ml | 108,73 ± 50,23 | 74,43 ± 60,39 | 27,25 ± 12,3 |
| MAF 150 µg/ml | 84,83 ± 16,24 | 14,25 ± 3,66 | 19,08 ± 7,38 |

Tabulka 7, Průměr ± směrodatná odchylka výsledků MTT testu buněk IARC-EW2 ovlivněných mafosfamidem, amifostinem a jejich kombinací. Vyjádřeno jako % neovlivněné kontroly.

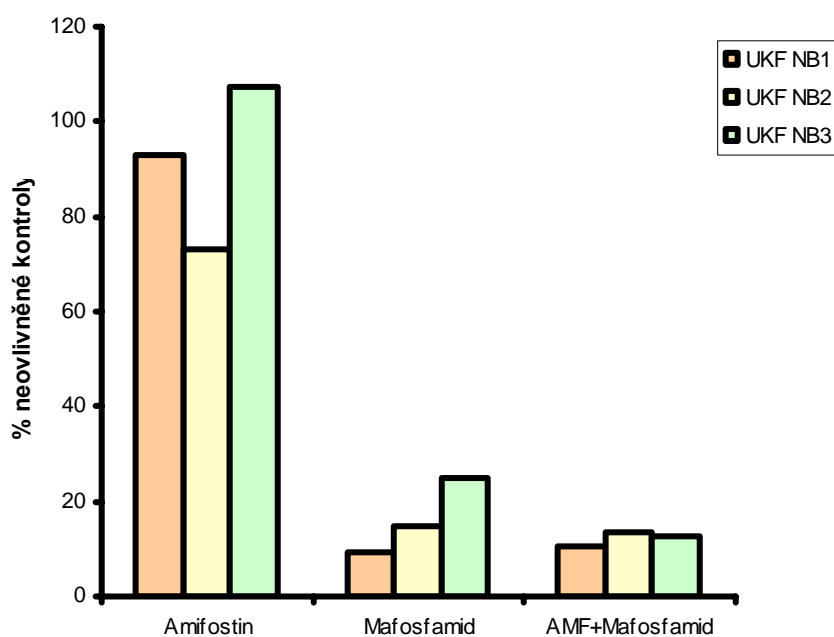


Obrázek 4, Výsledky MTT testu buněk IARC-EW2 ovlivněných mafosfamidem, amifostinem a jejich kombinací. Vyjádřeno jako % neovlivněné kontroly.

Obdobně jsme zjišťovali efekt účinku mafosfamidu, amifostinu a jejich kombinace na tři buněčné linie odvozené od neuroblastomu (UKF-NB1, UKF-NB2, UKF-NB3), výsledky jsou znázorněny v tabulce 8 a obrázku 5.

| | | <i>Amifostin</i> | <i>Mafosfamid</i> | <i>AMF+MAF</i> |
|---------------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| UKF-NB1 | MAF 150 µg/ml | 92,8 ± 3,8 | 9,3 ± 5,1 | 10,5 ± 8,4 |
| UKF-NB2 | MAF 150 µg/ml | 73,0 ± 4,7 | 14,7 ± 7,1 | 13,5 ± 8,6 |
| UKF-NB3 | MAF 150 µg/ml | 107,3 ± 8,9 | 24,9 ± 9,1 | 12,7 ± 13,9 |
| Průměr všech linií | MAF 150 µg/ml | 84,8 ± 16,2 | 19,08 ± 7,4 | 14,3 ± 3,7 |

Tabulka 8, Průměr ± směrodatná odchylka výsledků MTT testu buněk UKF-NB1, UKF-NB2, UKF-NB3 ovlivněných mafosfamidem, amifostinem a jejich kombinací. Vyjádřeno jako % neovlivněné kontroly.



Obrázek 5, Výsledky MTT testu buněk UKF-NB1, UKF-NB2, UKF-NB3 ovlivněných mafosfamidem (150 µg/ml), amifostinem a jejich kombinací. Vyjádřeno jako % neovlivněné kontroly.

Protinádorové účinky etoposidu

Stejně jako u mafosfamidu ověřovali jsme i efekt etoposidu na buněčné linie odvozené od nádorů. Tabulka 9 ukazuje efekt různých koncentrací etoposidu (30 µg/ml, 40 µg/ml a 50 µg/ml) s preinkubací s ethyolem a bez ní.

| | 0 µg/ml | 30 µg/ml | 40 µg/ml | 50 µg/ml |
|-------------|---------|----------|----------|----------|
| UKF-NB1 Et- | 100,0 | 0 | 0 | 0 |
| UKF-NB1 Et+ | 100,0 | 0 | 25,8 | 0 |
| UKF-NB2 Et- | 100,0 | 0 | 7,9 | 6,5 |
| UKF-NB2 Et+ | 96,0 | 7,2 | 4,4 | 21,1 |
| UKF-NB3 Et- | 100,0 | 21,2 | 58 | 41,7 |
| UKF-NB3 Et+ | 98,2 | 23,5 | 20,3 | 22,3 |

Tabulka 9, Viabilita neuroblastomových buněčných linií hodnocená v MTT testu. Průměrné hodnoty extinkce ze 4 jamek vyjádřené jako % hodnota kontroly.

Dokumentovali jsme pokles viability nádorových buněk všech testovaných linií. Pokles viability buněčných linií vyvolaly všechny použité koncentrace etoposidu. U buněčné linie UKF-NB1 vedla inkubace s etoposidem v koncentraci 30 µg/ml a vyšších k úplné inhibici růstu. Protinádorový účinek etoposidu byl v experimentu potencován preinkubací s amifostinem u neuroblastomové linie UKF-NB3 při vyšších koncentracích etoposidu (40 a 50 µg/ml). Signifikantní ochranný vliv amifostinu na nádorové buňky jsme nezjistili v žádném experimentu. Usuzujeme, že etoposid v koncentraci 40 µg/ml, kterou jsme na základě výsledků provedených experimentů zvolili k čištění štěpů hematopoetických kmenových buněk ke klinickému užití vede k dostatečné inhibici růstu kontaminujícího nádoru.

Ovlivnění progenitorových buněk

Efekt mafosfamidu

V provedených testech jsme u štěpů hematopoetických buněk hodnotili počty jaderných buněk, hematopoetických kolonií (CFU-GM, BFU-E) a zastoupení CD34+ progenitorových buněk v přítomnosti amifostinu, mafosfamidu (150 µg/ml) a jejich kombinace. Výsledky shrnují tabulky 10 a, b, c, d.

| | <i>Amifostin</i> | <i>Mafosfamid</i> | <i>AMF+MAF</i> |
|------------------|------------------|-------------------|----------------|
| KD | 76,07 ± 26,35 | 75,32 ± 32,83 | 81,93 ± 29,37 |
| PBSC | 98,20 ± 14,79 | 90,15 ± 19,54 | 91,68 ± 29,37 |
| KD + PBSC | 88,71 ± 23,29 | 83,79 ± 27,09 | 87,50 ± 20,78 |

Tabulka 10 a, Hodnoty jaderných buněk. Vyjádřeno v % kontroly.

| | <i>Amifostin</i> | <i>Mafosfamid</i> | <i>AMF+MAF</i> |
|------------------|------------------|-------------------|----------------|
| KD | 96,5 ± 3,15 | 3,58 ± 1,98 | 9,56 ± 7,52 |
| PBSC | 90,7 ± 14,62 | 5,2 ± 2,62 | 4,65 ± 3,47 |
| KD + PBSC | 92,65 ± 12,38 | 4,51 ± 2,5 | 6,52 ± 6,73 |

Tabulka 10 b, Hodnoty hematopoetických kolonií CFU-GM. Vyjádřeno v % kontroly.

| | <i>Amifostin</i> | <i>Mafosfamid</i> | <i>AMF+MAF</i> |
|------------------|------------------|-------------------|----------------|
| KD | 109,4 ± 12,6 | 3,10 ± 2,96 | 10,42 ± 12,6 |
| PBPC | 96,3 ± 8,1 | 3,18 ± 2,85 | 3,78 ± 4,37 |
| KD + PBPC | 100,67 ± 11,61 | 3,14 ± 2,9 | 6,62 ± 6,73 |

Tabulka 10 c, Hodnoty hematopoetických kolonií BFU-E. Vyjádřeno v % kontroly.

| | | <i>AMF vs. MAF</i> | <i>AMF vs. AMF+MAF</i> | <i>MAF vs. AMF+MAF</i> |
|---------------|-------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| BFU-E | KD | p < 0,01 | p < 0,05 | N.S. |
| | PBPC | p < 0,001 | p < 0,001 | N.S. |
| | Obě | p < 0,001 | p < 0,001 | p < 0,1 N.S. |
| CFU-GM | KD | p < 0,001 | p < 0,005 | p < 0,1 N.S. |
| | PBPC | p < 0,001 | p < 0,001 | N.S. |
| | Obě | p < 0,001 | p < 0,001 | N.S. |

Studentův t – test

Tabulka 10 d, Statistické posouzení jednotlivých skupin.

Potvrdili jsme, že procentuální zastoupení CD34+ buněk v manipulované KD a PBPC se nemění po působení obou testovaných látek ani jejich kombinace, podobně působení mafosfamidu na jaderné buňky nevedlo k významnému poklesu jejich procentuálního zastoupení (při poklesu

počtu všech jaderných buněk se snižuje absolutní počet CD34+ progenitorů). Vysoce významné bylo působení mafosfamidu na růst hematopoetických kolonií CFU-GM a BFU-E. Mafosfamid výrazně redukoval růst kolonií CFU-GM a BFU-E v kostní dřeni ($p < 0,001$; Studentův t-test) i periferních kmenových buňkách ($p < 0,001$; Studentův t-test), naproti tomu samotný amifostin růst kolonií neovlivnil. Při koncentraci amifostinu 4 mg/ml jsme neprokázali signifikantní protektivní efekt amifostinu na růst hematopoetických kolonií. Při samostatném hodnocení kmenových buněk získaných z kostní dřene jsme zjistili nesignifikantní trend k protekci kolonií CFU-GM amifostinem před působením mafosfamidu ($p < 0,1$; NS, Studentův t-test), podobně byla, na hranici významnosti, vyjádřena protekce kolonií BFU-E při společném hodnocení KD a PBPC ($p < 0,1$; NS, Studentův t-test)

Efekt etoposidu

Obdobně jako efekt mafosfamidu jsme hodnotili i efekt etoposidu, výsledky shrnuje tabulka 11.

| Amifostin | Etoposid 32 $\mu\text{g/ml}$ | | Etoposid 40 $\mu\text{g/ml}$ | |
|---------------|------------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------|
| | - | + | - | + |
| Jaderné buňky | 101,1 \pm 13,5 | 96,7 \pm 2,9 | 95,2 \pm 7,7 | 90,8 \pm 20,6 |
| CFU-GM | 38,8 \pm 24,0 * | 40,7 \pm 19,9 * | 32,1 \pm 13,7 ** | 35,6 \pm 20,0 ** |
| BFU-E | 62,4 \pm 35,5 * | 66,3 \pm 35,5 | 68,4 \pm 22,1 * | 54,4 \pm 22,7 * |
| CD34+ b. | 129,4 \pm 52,1 | 102,7 \pm 66,3 | 120,3 \pm 65,7 | 120,9 \pm 51,9 |

Tabulka 11, Hodnoty jaderných buněk, hematopoetických kolonií CFU-GM a BFU-E a CD34+ buněk po inkubaci s různými koncentracemi etoposidu s preinkubací amifostinem a bez ní. Vyjádřeno v % kontroly. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - hodnoceno t-testem

Jak je vidět z tabulky, obě koncentrace etoposidu redukují významně počty koloniformních buněk. Tento pokles je však v únosné míře. Preinkubace ethylem tuto redukci nesnižovala významným způsobem. Zvyšování procenta CD34+ buněk si vysvětlujeme zvýšením nespecifické vazby protilátky při poškození buněk nebo vyššími ztrátami ostatních buněk.

Z provedených experimentů vyplývá, že použití etoposidu v koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$ s patnáctiminutovou preinkubací ethylem v koncentraci 4 mg/ml neredukuje neúnosně počet buněk obnovujících krvetvorbu a redukuje počet nádorových buněk, které mohou štěp kontaminovat. Vzhledem k zachování počtu CD34+ buněk při výrazném poklesu kolonií je nezbytné všechny štěpy, u kterých byl prováděn purging, vyšetřit i kultivačně. Řada pracovišť se spoléhá pouze na vyšetření CD34+ buněk, což je u nemanipulovaných štěpů postačující. Rovněž je vhodné ponechat část štěpu nečištěného pro případ nepříhojení jako tzv. „back up“. My jsme vždy

ponechali back up v množství nejméně 1×10^6 CD34+ buněk/kg. To je množství, které zajistí přihojení po megachemoterapii, byť pomalejší než optimální množství hematopoetických progenitorů.

Apoptóza CD34+ buněk

U dvou štěpů určených k transplanatci (pacienti č. 2 a 7 viz. tabulka č.) a u jednoho experimentálního vzorku PBSC jsme vyšetřili apoptózu CD34+ buněk metodou vazby annexinu V (tabulka 12). Ta vykazovala značnou variabilitu, která mohla být kromě jiného podmíněna odstupem mezi odběrem štěpu, manipulací se štěpem a vyšetřením apoptózy, eventuálně manipulací při transportu. Poměrně vysoké procento progenitorových buněk vázalo Annexin V, tedy byly v apoptóze. Tato metoda detekuje i velmi časně fáze apoptózy (*van Engeland, M. a kol., 1998, Eckschlager, T., Bartůňková, J., 1999*). Přesto vysoké hodnoty naznačují, že poškozeno může být značné procento progenitorových buněk. To ostatně potvrzují rozdíly mezi prakticky nezměněným počtem CD34+ buněk a sníženou tvorbou kolonií při kultivačním vyšetření.

| | <i>Provedený purging</i> | <i>Kontrolní vzorek</i> |
|------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Exp.vzorek PBSC | 1,0 | 0,5 |
| Pacient č. 2 | 79,2 | 7,9 |
| Pacient č. 7 | 16,3 | 2,3 |

Tabulka 12, Procento CD34+ buněk vázících Annexin V (apoptotických). Srovnání štěpů inkubovaných s etoposidem v koncentraci 40 µg/ml s patnáctiminutovou preinkubací etyolem v koncentraci 4 mg/ml a štěpů nemanipulovaných

METODIKY DETEKCE MINIMÁLNÍ NÁDOROVÉ CHOROBY

Na klinice dětské hematologie a onkologie jsme k průkazu buněk Ewingova sarkomu/PNETu zavedli nejprve metodu “nested” RT-PCR k detekci obou hlavních chromozomálních aberací - t(11;22)(q24;q12) a t(21;22)(q22;q12). Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) je metoda umožňující detekovat cílové buňky na úrovni specifické mRNA. Následně jsme zavedli i metodu kvantitativní PCR reakce v reálném čase k detekci všech pěti základních fúzních genů (*EWS/FLII*, *EWS/ERG*, *EWS/FEV*, *EWS/E1AF* a *EWS/ETV1*), kterou používáme k detekci *EWS/ETS* přestaveb v nádorové tkáni.

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Principem PCR je enzymatická amplifikace DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané cílové sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Reakce je založena na schopnosti dvouvláknové DNA denaturovat při vysoké teplotě a opětovně renaturovat při jejím snížení při zachování pravidla komplementarity bází. Jestliže jsou známy nukleotidové sekvence na koncích určitého regionu DNA, je možné uvedený úsek DNA enzymaticky namnožit.

Typická PCR reakce začíná tepelnou denaturací vzorku DNA na dva jednoduché řetězce při teplotě 95°C. V další fázi po ochlazení vzorku nasednou primery na komplementární 3'-konce cílové DNA. Optimální teplota pro vazbu primerů je individuální pro každou dvojici primerů a obvykle se pohybuje mezi 50-65°C. Hybridizované primery slouží jako základ pro syntézu nových vláken a jsou v reakci přítomny ve vysoké koncentraci. Aby byl pro syntézu nových vláken k dispozici dostatek substrátu, musí být v reakci přítomno dostatečné množství deoxynukleotidtrifosfátů. Syntéza PCR produktu je katalyzována termostabilní DNA polymerázou. Tento enzym prodlužuje vlákna DNA směrem od obou primerů, ve směru od 5' konce k 3' konci při teplotě 72°C. Po dokončení syntézy obou vláken je zkumavka s PCR reakcí opět zahřáta na 95°C, aby denaturovaly nově vytvořené duplexy DNA, a celý cyklus začíná znovu. Opakování cyklů denaturace a syntézy vede k rychlému namnožení cílové sekvence DNA, teoreticky 2^n x, kdy n je počet cyklů, který se pohybuje obvykle mezi 15 - 45.

Vlastní PCR reakce tedy obsahuje následující komponenty nezbytné pro hladký průběh reakce:

- 1, vzorek DNA (obsahující cílový zkoumaný úsek)
- 2, primery – syntetické oligonukleotidy obvykle velikosti 18-30 nukleotidů, které slouží jako základ pro syntézu nových vláken a specificky ohraničí cílový úsek DNA. Primery musí být navrženy a syntetizovány tak, aby hybridizovaly s komplementárními sekvencemi dvouvláknové DNA
- 3, směs všech čtyř deoxynukleotidtrifosfátů

4, PCR pufr a Mg^{2+} ionty

5, Taq polymerázu (termostabilní DNA polymeráza)

Analýza produktu PCR reakce pak probíhá nejčastěji elektroforézou. Produkty amplifikačních reakcí (fragменты DNA) se dělí podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje elektroforézou DNA fragmentů v gelu. Analýza velikosti fragmentů je podstatou interpretace výsledků řady molekulárně-biologických metod vč. PCR. Nejčastěji se používá jako elektroforetické medium agaróza (0,8-3%), jejíž koncentrace se volí podle velikosti fragmentů, které mají být separovány.

Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)

Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) umožňuje detekci a v určitých případech i kvantifikaci mRNA pro určitý gen. Použití k detekci MRD je nutné vzhledem k variabilitě zlomových míst, přítomnosti intronů v postižených genech a jejich velikosti. Molekuly mRNA tvoří pouze 1-2% z celkového množství RNA izolované standardními technikami z buněk. Při RT-PCR je mRNA nejprve přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí některé z reverzních transkriptáz (enzymy retrovirů schopné přepisovat RNA na DNA, jako například virus ptačí myeloblastózy (AMV), Molonyho virus myší leukémie (MLV) a další) (*Downing J.R., 1993*). Pro získání cDNA z mRNA se používají tři typy primerů: specifické oligonukleotidy pro syntézu pouze určité mRNA, směs náhodných oligonukleotidů (metoda náhodných hexamerů), nebo oligo(dT) primer, který se naváže na poly(A) terminální část molekuly mRNA a umožní syntézu ve směru od 5' k 3' konci (*Zoubek A., 1994*). Vzniklá cDNA může být následně použita v PCR reakci jak je popsána výše.

Při PCR a RT-PCR se setkáváme s několika zásadními problémy. V první řadě ovlivňuje výsledek vyšetření kvalita izolovaných nukleových kyselin. Negativní výsledek RT-PCR nemusí nutně znamenat nepřítomnost exprese hledaného genu (RNA ve vzorku byla např. degradována, izolace byla neúspěšná atd.). Reakci může rušit i řada látek kontaminujících nukleové kyseliny při nedostatečně „čisté“ izolaci. Řada látek (bílkoviny, fenol, heparin apod.) ruší syntézu DNA. K vyloučení tzv. falešné negativy je paralelně k cílovému genu v každém vzorku amplifikován kontrolní gen, který je konstitutivně exprimován ve všech typech buněk. Pokud PCR reakce kontrolního genu proběhne úspěšně je degradace vzorku nebo chyba v PCR reakci nepravděpodobná, naopak neproběhne-li reakce kontrolního genu je vyšetření cílového genu nehodnotitelné. Vzhledem k existenci pseudogenů (bezintronový gen) zařazujeme běžně i kontrolu bez reverzní transkripce k vyloučení nechtěné amplifikace kontaminující genomové DNA ve vzorku.

Druhým extrémem je riziko kontaminace reakce produktem předchozí PCR (falešná pozitivita) podmíněné velmi vysokou citlivostí metodiky. Tomu se bráníme jednak fyzickým oddělením jednotlivých fází vyšetření (izolace nukleových kyselin, příprava reakčních směsí, vlastní PCR reakce a následná analýza produktů PCR) do různých místností, prací v boxech a likvidací kontaminací UV zářením. Ke všem krokům vyšetření používáme vyčleněné pipety, reagentie a další pomůcky, které se nesmí přenášet. Především však do reakce vždy zařazujeme pozitivní a negativní kontroly k vyloučení falešné positivity a potvrzení úspěšnosti amplifikace kontroly.

V diagnostice MRD můžeme využít PCR a RT-PCR k detekci specifických translokací a RT-PCR umožňuje průkaz specifické mRNA. Citlivost těchto metod je $1: 10^{5-6}$, jak je patrné z tabulky č.1 (*Hagenbeek A., 1992*). Citlivost a specifitu vyšetření můžeme zvýšit provedením „uhnížděné“ (nested) PCR nebo RT-PCR. Principem je použití dvou po sobě následujících PCR. Primery pro druhou reakci leží uvnitř od primerů první PCR a jako vzorek se využívá produkt první PCR.

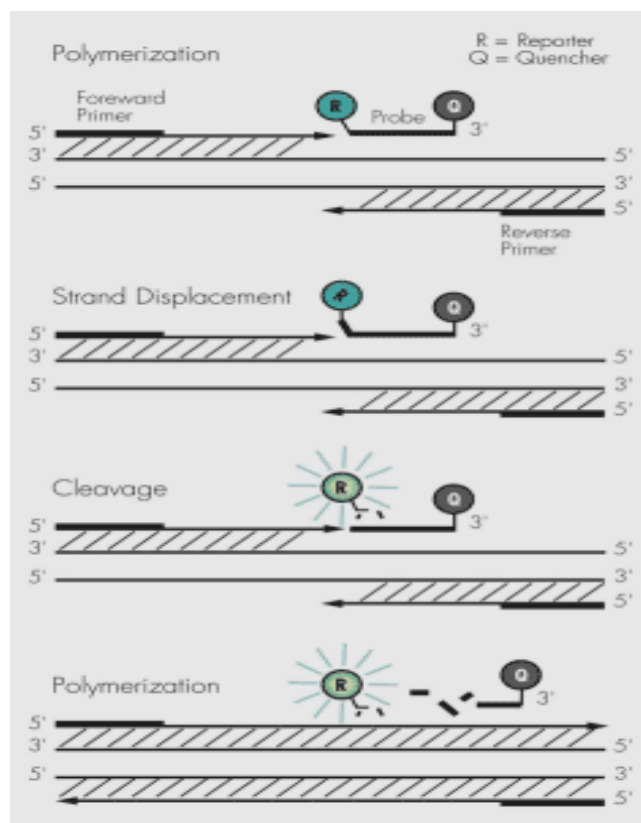
Kvantitativní PCR v reálném čase (QRT-PCR)

Technika je založena na použití fluorescenčně značených sond a detekčního systému, který je schopen měřit intenzitu fluorescence. Metoda kvantitativní PCR v reálném čase (QRT-PCR) využívá 5' nukleázové aktivity DNA polymerázy, fluorochromy značených sond specificky hybridizujících s cílovou sekvencí DNA a kontinuální detekce emitované fluorescence během amplifikační reakce. V průběhu amplifikační reakce sonda značená na svém 5' konci zvoleným fluorochromem (*reporter fluorescent dye* - FAM, VIC, TET atd.) a na 3' konci takzvaným "zhášečem" (*quencher*) hybridizuje s cílovou sekvencí DNA (je-li tato ve vyšetřovaném vzorku přítomna), následně se naváže primery a Taq DNA polymeráza syntetizuje definovanou cílovou sekvenci. Současně svou 5' nukleázovou aktivitou štěpí navázanou sondu s fluorofory. V nepřítomnosti odštěpeného "zhášeče" není záření fluoroforu redukováno a je v "reálném čase" zaznamenáno CCD kamerou. Narůstání fluorescence tak odpovídá narůstání množství amplikonů v průběhu reakce (obrázek 6). Pro vznik fluorescenčního signálu je nutná specifická hybridizace sondy s cílovou sekvencí, tudíž nespecificky amplifikované artefakty signál negenerují (tzn. jsou eliminovány post-PCR kroky nutné k ověření specifity PCR produktu). U intaktní, nenavázané sondy je díky Försterovu rezonančnímu přenosu energie v prostoru emise fluorescence z fluorochromu na 5' konci sondy redukována zhášečem a neovlivňuje vlastní reakci. Jinak řečeno, jestliže jsou oba fluorochromy přítomny na jedné molekule, nedochází k žádnému vyzařování fluorescence.

Reakce není charakterizována konečným množstvím PCR produktu po fixním počtu cyklů, ale parametrem C_T (*threshold cycle*). C_T je bod v té části cyklu, kdy se poprvé detekuje amplifikovaný PCR produkt a zároveň se zaznamená vzestup fluorescence nad hodnotu, kterou označujeme jako práh (*threshold*). Kvantifikace množství DNA ve vzorku dosáhneme měřením hodnoty C_T a použitím standardní křivky k určení počátečního množství kopií softwarem počítače. Základní princip kvantifikace prostřednictvím PCR v reálném čase je jednoduchý: čím větší je počáteční množství cílové DNA, tím dříve je detekována akumulace produktu v PCR procesu a hodnota C_T je nižší. Prahová hodnota se stanovuje v exponenciální fázi PCR (reakční komponenty nejsou limitujícím faktorem), což zajišťuje vysokou reprodukovatelnost hodnoty C_T .

Kvantifikaci neznámého množství templátu ve vzorku určíme srovnáním ze standardní křivkou známého ředění templátu nebo kalibrátoru. V reakci používáme rovněž endogenní kontroly, kterými se normalizují jednak rozdíly v množství RNA přidané do každé cDNA reakce a stejně tak i rozdíly v účinnosti reverzní transkripce.

Metoda kvantitativní PCR v reálném čase (QRT-PCR) je vysoce reprodukovatelná, relativně nenáročná na provedení, nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady na přístrojové vybavení.



Obrázek 6, QRT-PCR umožňuje kvantitativně měřit množství produktu (5' exonukleázová aktivita termostabilní DNA polymerázy štěpí sondu s navázanými fluorochromy. V nepřítomnosti zhášedce (quencher) je emitována fluorescence. Intenzita fluorescence je kontinuálně monitorována během amplifikační reakce.

VLASTNÍ METODIKA DETEKCE MRD

Manipulace se vzorky

Výsledky vyšetření významně ovlivňuje již vlastní odběr vzorku, jeho zpracování a uchování. Chybná manipulace se vzorkem může snadno vést k jeho znehodnocení, nejčastěji z důvodu degradace nukleových kyselin (především RNA).

Standardizace preanalytické fáze vyšetřovacího postupu je tedy nezbytná. Na našem pracovišti odebíráme vzorky aspirátu kostní dřeně a krve do EDTA, produkt separace PBPC obsahuje citrátové antikoagulans s glukózou (ACD-A), které se používá při vlastní cytaferéze. Odebrané vzorky jsou ihned transportovány do laboratoře, uchovány při 4°C a zpracovány nejpozději do 24 hodin. Buňky ze vzorku izolujeme selektivní osmotickou lýzou erytrocytů, k lýze erytrocytů používáme hypotonický roztok chloridu amonného (*Izraeli, S. a kol., 1991*). Peleta promytých buněk je uchována při - 70°C v hlubokomrazícím boxu k vyšetření. K uvedenému kroku můžeme uvést, že sama izolace jaderných buněk pomocí osmotické lýzy erytrocytů, nebo na hustotním gradientu Ficoll-Hypaque může vést ke ztrátě nádorových buněk ze vzorku, jak bylo prokázáno opakovaně v experimentu (*Burchill, S.A. a kol., 1999*). Jako nejvhodnější se v citované práci zaměřené na detekci MRD u neuroblastomu v periferní krvi jevila izolace totální RNA z plné krve pomocí kitu Ultraspec (Biogenesis, UK) doplněná o izolaci poly A+ RNA. Tato metodika se však běžně neuvádí pro svoji technickou a především ekonomickou náročnost.

Kvalita a rychlost zpracování vzorku má zásadní význam i při vyšetření tkání. Při vyšetření bioptického vzorku nebo resekátu nádoru postupujeme tak, že odebraný nativní, nefixovaný materiál je ihned po odběru chirurgem předán patologovi, který zhodnotí makroskopický nález a podle možností provede sterilní odběr části vzorku na cytogenetické vyšetření (RPMI medium) a pro průtokový cytometr (fyziologický roztok). Paralelní tkáň ke vzorku odebranému na cytogenetické vyšetření se zamrazí (v tekutém dusíku) a z tohoto vzorku, po nakrájení v kryostatu a obarvení řezů (hematoxylin-eosin, Giemsa) je připraven zmrazený řez, ze kterého patolog může stanovit předběžnou pracovní diagnózu a zároveň ověřit, zda je v odebraných vzorcích skutečně zastoupena nádorová tkáň. Zmrazenou tkáň je možné dále použít k dalším molekulárně-biologickým vyšetřením (např. PCR, RT-PCR, Western blot atd.). Zbývající tkáň je fixována a následně zpracována klasickou histopatologickou technikou.

Je nutné zdůraznit, že prostá fixace tkáně ve formolu na chirurgickém či ortopedickém sále, což je nadále častá praxe, je postup zcela nevhodný a může znemožnit řadu vyšetření, která mají význam nejen diagnostický, ale i prognostický (*Kodet, R., 2003*). U řady onemocnění je molekulární diagnostika k jednoznačnému potvrzení diagnózy již vyžadována.

Izolace RNA

K izolaci totální RNA používáme Trizol Reagent (Gibco BRL-Life Technologies Inc., USA) využívající metodu Chomczynskiho & Sacchi. Při izolaci postupujeme podle návodu výrobce, metodika využívá lýzy buněk v guanidinium izothiokyanátu následovanou fázovou separací proteinů a nukleových kyselin chloroformem a precipitací RNA izopropanolem. Po promytí RNA etanolem je peleta rozpuštěna ve vodě prosté RNáz. Čistotu a koncentraci izolované RNA ověřujeme spektrofotometricky při A260 a A280. Vždy doplňujeme i elektroforézu totální RNA na 1.5% agarózovém gelu k ověření integrity izolované RNA.

Metodu používáme k izolaci RNA z buněk kostní dřeně (případně krve), štěpů PBPC i k izolaci z tkání, nejčastěji po homogenizaci tkáně v tekutém dusíku, případně z kryostatových řezů zmrazené nádorové tkáně.

RT-PCR (t(11;22) a t(21;22))

K reverzní transkripci (RT) metodou náhodných hexamerů používáme 1 μ g totální RNA do celkového objemu 20 μ l. Reakci provádíme za podmínek doporučených výrobcem použitého kitu (Gene Amp®RNA PCR Core Kit, Perkin-Elmer). RT probíhá při teplotě 37°C po dobu 60 minut, poté je MULV reverzní transkriptáza degradována zahřátím vzorku na 95°C po dobu 5 minut. Získaná cDNA je následně použita k vlastní PCR reakci.

. Pro vlastní PCR používáme kit (Gene Amp®RNA PCR Core Kit, Perkin-Elmer). Reakční podmínky jsou následující. PCR probíhá při koncentraci 2mM MgCl₂, 50 pmol každého primeru a 5 μ l cDNA v celkovém finálním objemu 25 μ l. Pro první kolo PCR používáme jako primery oligonukleotidy EWS1 a FLI^{1/2} případně ERG2 (*Meier, V.S. a kol., 1998*). Přehled sekvencí primerů udává tabulka 13. V prvním kole probíhá 35 reakčních cyklů za následujících podmínek: denaturace 95°C 1 minuta, annealing 62°C 1 min, elongace 72°C 1 minuta. Pro 2. kolo PCR byly použity nested primery (*Meier, V.S. a kol., 1998*). Podmínky pro druhé kolo: 5% produktu z prvního kola jsme použili pro 30 cyklů při denaturaci 95°C 1 min, annealingu 63°C 1 min a elongaci 72°C 1 min.

Jako kontrolu reverzní transkripce využíváme gen pro Beta-aktin a B₂-mikroglobulin. V každé reakci je řazena negativní kontrola pro zjištění případné kontaminace vzorků. Vzorky vyšetřujeme paralelně i bez proběhlé reverzní transkripce k vyloučení amplifikace kontaminující genomové DNA (pseudogeny).

Do každé reakce je zařazena také pozitivní kontrola (buněčné linie TC32, případně IARC EW-2). Linie odvozené od ES jsme získali prostřednictvím Dr. Susan Burchill (St. James Hospital, Leeds, UK) – linie TC 32 a doc. Heinricha Kovara (CCRI, St. Anne Kinderspital, Vídeň, Rakousko).

Výsledný produkt ověřujeme elektroforeticky na 1,5% agarózovém gelu. Citlivost RT-PCR pro detekci buněk Ewingových tumorů přítomných v KD jsme ověřili pomocí série dilučních experimentů s buňkami linie Ewingova sarkomu „ředěnými“ do normálních leukocytů. Po prvním kole byl chimerický transkript detekován v koncentraci nádorových buněk 1×10^{-3} až 1×10^{-4} . Při použití „nested“ PCR byla citlivost metody vyšší o 2-3 řády a prokázali jsme jednu nádorovou buňku mezi 10^5 - 10^6 normálních buněk kostní dřeně. V naší modifikaci dosáhla tedy citlivost metody RT-PCR pro detekci buněk nádorů ze skupiny Ewingova sarkomu průkazem fúzních genů *EWS/FLI-1* a *EWS/ERG* úrovně odpovídající literárním údajům.

| <i>Název primeru</i> | <i>Sekvence</i> |
|----------------------|-------------------------------|
| EWS1 | 5'-GCAGCAGCCTCCCCTAGTTACC-3' |
| FLI1/2 | 5'-CAGGTGATACAGCTGGCGTTGG-3' |
| ERG2 | 5'-CAGGTGATGCAGCTGGAGTTGG -3' |
| EWS2 | 5'-CTGGATCCTACAGCCAAGCTCC-3' |
| FLI1/1 | 5'-CAGGAGGAATTGCCACAGCTGG-3' |
| ERG1 | 5'-CAGGAGGAACTGCCAAAGCTGG -3' |

Tabulka 13, Přehled primerů k průkazu translokací *t(11;22)(q24;q12)* a *t(21;22)(q22;q12)* metodou nested RT-PCR. K průkazu *t(11;22)* se používají primery *EWS1* a *FLI1/2* a k druhému kolu *EWS2* a *FLI1/1*, k průkazu *t(21;22)* *EWS1* a *ERG2* a k druhému kolu *EWS2* a *ERG1* (Meier, V.S. a kol., 1998).

Multiplex RQ-PCR (EWS/ETS fúzní geny)

Na klinice dětské hematologie a onkologie jsme zavedli metodiku multiplex RQ-PCR k detekci pěti základních translokací charakterizující nádory skupiny ES. Metodika byla navržena francouzskými autory z Institute Curie (M.Peter, E. Gilbert, O. Delattre), tak aby byly zastíženy nejen uvedené fúzní geny (*EWS/FLI1*, *EWS/ERG*, *EWS/FEV*, *EWS/ETV1*, *EWS/E1AF*), ale i všechny varianty fúzních transkriptů podmíněné variabilitou zlomových míst ve vztahu k exonům především genů *EWS* a *FLI1* (Peter, M. a kol., 2001).

Výsledkem je metodika, která zásadní použití při vyšetřování nádorové tkáně při diferenciální diagnóze sarkomů měkkých tkání a „nádorů z malých tmavých buněk“, ale vzhledem k velikosti generovaného produktu PCR reakce (>500 pb) není příliš vhodná k detekci reziduální nádorové choroby pro nižší senzitivitu.

Nejprve jsme zavedli metodiku pouze k detekci všech typů *EWS/FLII* fúzních transkriptů a následně jsme reakci rozšířili o další fúzní geny odpovídající translokacím t(21;22), t(7;22), t(2;22) a t(17;22).

K izolaci RNA z nádorové tkáně používáme metodiku popsanou výše. Při reverzní transkripci jsme použili 1 µg RNA, kterou jsme metodou náhodných hexametrů převedli ve finálním objemu 20 µl na cDNA. K reverzní transkripci používáme MultiScribe reverzní transkriptázu (TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA), tabulka 14. Reverzní transkripce probíhá v cyklu při teplotě 48°C po dobu 60 minut.

| <i>Reagencie</i> | <i>Objem (µl)</i> | <i>Finální koncentrace</i> |
|---|-------------------|----------------------------|
| 10x PCR reaction buffer A | 2,00 | 1x |
| 25mM MgCl ₂ | 4,40 | 5,5 mM |
| 10mM dNTP mix | 2,00 | 1 mM |
| RNAse Inhibitor (20 U/µl) | 0,50 | 10 U |
| 50 µM Random Hexamer Primers | 1,00 | 2,5 µM |
| Multi Scribe Reverse Transcriptase ((50 U/µl) | 0,50 | 25 U |
| <i>Mezisoučet</i> | 10,40 | - |
| RNA vzorek (1µg) | 5,00 | - |
| DEPC H ₂ O | 4,60 | - |
| <i>Součet (total cDNA)</i> | 20,00 | - |

Tabulka 14, Protokol reverzní transkripce k multiplex RQ-PCR

K vlastní RQ-PCR jsme použili 2,5 µl cDNA z reverzní transkripce ve finálním objemu 25 µl v přítomnosti po 200 µM dATP, dCTP a dGTP, 400 µM dUTP, 200 nM každého primeru, 100 nM sondy EWSS2, 0,75U AmpliTaq Gold DNA polymerázy a 0,25U AmpErase (Uracil-N-Glycosyláza) a reakčního pufru A, viz tabulka 15 (vše Applied Biosystems, USA).

| Reagencie | 1 vzorek (µl) | 1 vzorek (µl) - dublet | 1 vzorek (µl) - triplet | Finální koncentrace |
|------------------------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| 10x PCR Reaction Buffer A | 2,500 | 5,000 | 7,500 | 1x |
| 25 mM MgCl ₂ | 3,000 | 6,000 | 9,000 | 3,0 mM |
| amperase (1U/µl) | 0,250 | 0,500 | 0,750 | 0,25 U |
| 10 mM dATP | 0,500 | 1,000 | 1,500 | 200 µM |
| 10 mM DTP | 0,500 | 1,000 | 1,500 | 200 µM |
| 10 mM dGTP | 0,500 | 1,000 | 1,500 | 200 µM |
| 20 mM dUTP | 0,500 | 1,000 | 1,500 | 400 µM |
| 50 µM forw. primer EWS 3 tgm | 0,100 | 0,200 | 0,300 | 200 nM |
| 50 µM rev. primer FLI 3 tgm | 0,100 | 0,200 | 0,300 | 200 nM |

| Reagencie | 1 vzorek (μl) | 1 vzorek (μl) - dublet | 1 vzorek (μl) - triplet | Finální koncentrace |
|------------------------------|---------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|
| 50 μM rev. primer ERG 3 tgm | 0,100 | 0,200 | 0,300 | 200 nM |
| 50 μM rev. primer FEV 3 tgm | 0,100 | 0,200 | 0,300 | 200 nM |
| 50 μM rev. primer ETV1.1 tgm | 0,100 | 0,200 | 0,300 | 200 nM |
| 50 μM rev. primer E1AF.1 tgm | 0,100 | 0,200 | 0,300 | 200 nM |
| 20 μM probe EWSS2 tgm | 0,125 | 0,250 | 0,375 | 100 nM |
| AmpliTag Gold DNA Polymerase | 0,150 | 0,300 | 0,450 | 0,75 U |
| DEPC H ₂ O | 14,375 | 28,750 | 43,125 | - |
| Total Mix | 23,000 | 2x 23,000 | 3x 23,000 | - |
| cDNA | 2,000 | 2 x 2,000 | 3 x 2,000 | - |
| Součet | 25 μl | 2 x 25 μl | 3 x 25 μl | - |

Tabulka 15, Protokol multiplex RQ-PCR reakce k detekci fúzních genů EWS/ETS u nádorů rodiny ES/pNETu

Primery i sonda byly připraveny firmou Applied Biosystems, sonda hybridizující z genem *EWS* je značena FAM/TAMRA (reporter/quencher). Sekvence primerů a sondy uvádí tabulka 16. K vlastní detekci fúzních transkriptů *EWS/ETS* jsme použili přístroj pro "real time PCR" ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, USA).

| Název primeru | Sekvence |
|---------------|--|
| EWS 3 tgm | 5'- GTCAACCTCAATCTAGCACAGGG - 3' |
| FLI 3 tgm | 5'- CTGTTCGGAGAGCAGCTCCAG- 3' |
| ERG 3 tgm | 5'- CTGTCCGACAGGAGCTCCAG - 3' |
| FEV 2 tgm | 5'- GAAACTGCCACAGCTGGATC - 3' |
| ETV1.1 tgm | 5'- TAAATTCCATGCCTCGACCAG -3' |
| E1AF.1 tgm | 5'- AACTCCATTCCCCGGCC - 3' |
| Název sondy | Sekvence |
| EWSS2tgm | 6-FAM - CTCCTACCAGCTATTCCTCTACACAGCCGACT - TAMRA |

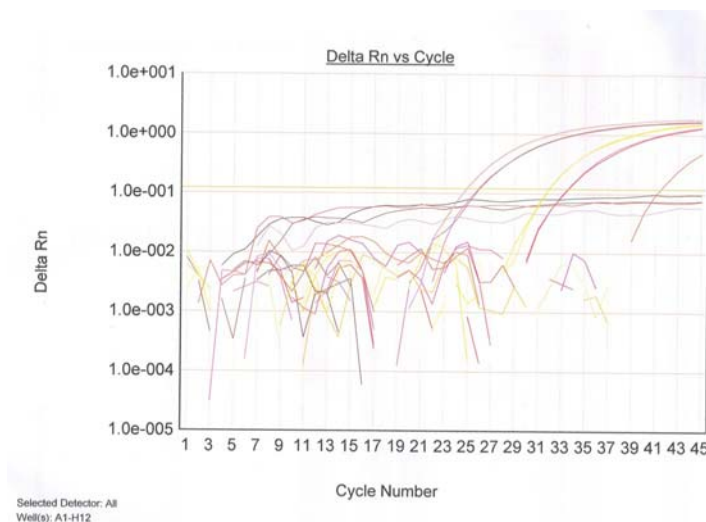
Tabulka 16, Sekvence primerů a sondy k detekci fúzních transkriptů EWS/ETS při multiplex RQ-PCR

Vlastní reakce začíná krokem 50°C trvajícím 2 minuty, který optimalizuje aktivitu uracyl-N-glykosylázy (prevence kontaminace produkty předchozí PCR reakce), následuje 10 minut při 95°C aktivující AmpliTaq Gold DNA polymerázu a inaktivující UNG. Poté následuje 50 cyklů zahrnujících 15 sekund při 95°C (denaturace) a 30 vteřin při 66°C (annealing primerů a syntéza) a 1 minutu při 72°C k dokončení syntézy PCR produktu (Peter, M. a kol., 2001).

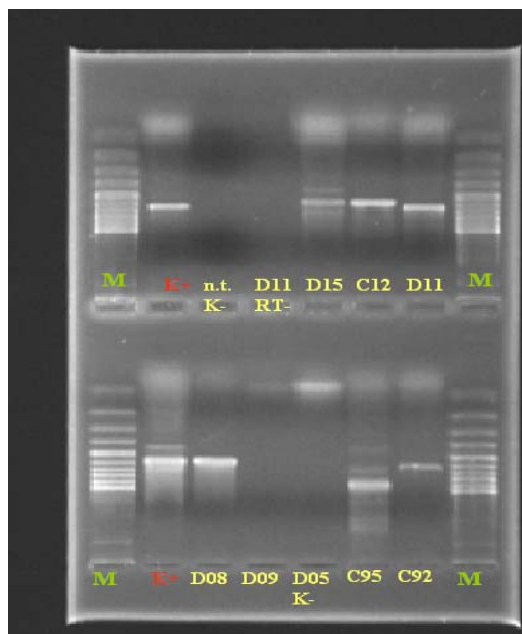
V uvedeném případě není cílem kvantifikace produktu PCR reakce, ale průkaz přítomnosti fúzních genů.

Jako kontrolní gen k ověření kvality izolace RNA a průběhu RT jsme použili kvantitativní průkaz mRNA enzymu *GAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza) za použití komerčních primerů a sondy (Human *GAPDH* PreDeveloped TaqMan Assay Reagents, Applied Biosystems, USA) a postupovali podle pokynů výrobce.

Paralelně jsme vyšetřovali i vzorky bez reverzní transkripce k vyloučení kontaminující genomické DNA a všech reakcích jsme zařadili vzorky prokazatelně pozitivní (buněčné linie odvozené od ES) i negativní kontroly.



Obrázek 7. Příklad amplifikačních křivek multiplex RQ-PCR k detekci fúzních genů *EWS/ETS* u *ES*



Obrázek 8, Elektroforéza produktu RQ-PCR reakce na agarózovém gelu, M – velikostní marker, D11, C12, D15, D8, C92, C95 – vzorky nádorů, zařazeny negativní (K-), pozitivní (K+) kontroly, i kontrola bez předchozí reverzní transkripce. Specifita PCR produktu je zajištěna hybridizací sondy, elektroforéza slouží pouze k ověření přítomnosti PCR produktu. Velikosti PCR odpovídají typu I (*EWS* exon 7, *FLII* exon 6) a typu II (*EWS* exon 7, *FLII* exon 5). Fúzní transkript vzorek C95 odpovídá kombinaci *EWS* exon 5, *EWS* exon 10 – ověřeno přímým sekvenováním PCR produktu.

VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ KLINICKÝCH VZORKŮ

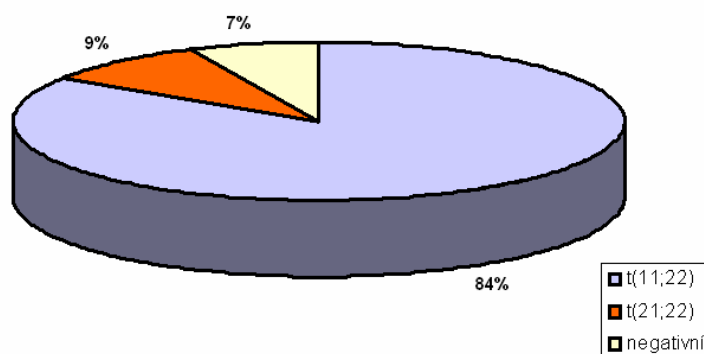
Nádory ze skupiny ES/PNETu

Celkem jsme na klinice dětské onkologie metodou RT-PCR vyšetřili od roku 1999 vzorky histologicky ověřených nádorů rodiny ES/PNETu od 44 pacientů. V pěti případech se jednalo o biopsii vzdálené metastázy, 39x jsme vyšetřili vzorek primárního nádoru získaného v době stanovení diagnózy (36) nebo při relapsu, případně progresi onemocnění (3).

Celkem 37x jsme prokázali fúzní gen *EWS/FLI-1*, 4x fúzní gen *EWS/ERG*. Celkem 3x jsme uvedené fúzní geny nedetekovali, přestože vyšetřovaný vzorek obsahoval vitální nádorovou tkáň a izolace RNA byla úspěšná. Možnou příčinou negativního výsledku vyšetření je přítomnost některé z variantních, málo frekventních translokací (t(2;22), t(7;22), t(17;22)), které použitá metodika není schopna zachytit. V uvedených třech případech nebylo bohužel výtěžné ani cytogenetické vyšetření nádorové tkáně. Výsledky RT-PCR shrnuje obrázek 9.

V uvedeném období jsme vyšetřili také řadu dalších vzorků (20) jiných typů dětských nádorů, především nádorů „z malých tmavých buněk“: neuroblastomu, sarkomů měkkých tkání (rabdomyosarkom, extraskeletální chondrosarkom, liposarkom, synoviosarkom atd.) a kostí (osteosarkom, osteoklastom atd.). U žádného z uvedených typů nádorů jsme fúzní transkript *EWS/FLI-1* ani *EWS/ERG* neprokázali.

Zastoupení jednotlivých translokací u ES vyšetřených na KDHO (1999-2005)



Obrázek 9, V období 1999-2005 jsme vyšetřili vzorky nádorové tkáně u 44 pacientů s histologicky potvrzeným nádorem z rodiny ES/PNETu. Fúzní geny *EWS/FLI-1* a *EWS/ERG* jsme prokázali u 93% vyšetřených nádorů.

Multiplex RQ-PCR u ES

Multiplex RQ-PCR k průkazu fúzních genů *EWS/FLI1*, *EWS/ERG*, *EWS/ETV1*, *EWS/E1AF* a *EWS/FEV* jsme dosud vyšetřili 17 nádorů ze skupiny ES/PNETu s identickým výsledkem vyšetření jako u standardní RT-PCR. Vzorky ve kterých jsme standardní metodikou neprokázali přítomnost fúzních transkriptů *EWS/ETS* nebyly zatím v multiplexové reakci vyšetřeny.

Cytogenetické vyšetření nádorové tkáně

Cytogenetické vyšetření bylo v období 1999-2005 úspěšné u 23 pacientů. Srovnání některých výsledků RT-PCR a cytogenetického vyšetření podává tabulka 17. Pacienti jsou v tabulce řazeni pod číslem odpovídajícím tabulce 19.

Cytogenetické vyšetření průkazem specifické chromozomální aberace potvrzuje diagnózu nádoru z rodiny ES, navíc může odhalit další významné sekundární aberace, které mají prognostický význam, jako jsou trizomie 8 a 12 chromozómu, del 1p případně nebalancovaná translokace t(1;16). Na druhé straně v některých případech, zvláště při nálezů velmi komplexního karyotypu nemusí být diagnosticky přínosné (např. pacienti 8, 9, 29, 35) a průkaz fúzního transkriptu metodou RT-PCR je nezbytný. Translokace t(21;22)(q22;q12) není zpravidla běžným karyotypováním detekovatelná, nejčastěji jsou v tomto případě přítomny komplexní změny karyotypu (pacienti 9, 18).

U všech cytogenetických nálezů, které odhalili *EWS/ETS* přestavbu jsme stejnou chromozomální aberaci prokázali metodou RT-PCR. Cytogenetické vyšetření v tomto případě může sloužit i jako kontrola našeho výsledku.

| Pacient | Fúzní gen | Cytogenetické vyšetření |
|---------|------------------|--|
| 8 | <i>EWS/FLI-1</i> | 4x 48, XX, +12,+21; 1x 50, XX, +2,+12, +14, +18, +20, +M, -19, -21; 1x 54, XX, +2, +4, +8, +14, +16, +18, +20, +21; 1x 55, XX, +2,+8, +8, +12, +12, +14, +15, +21, +21 |
| 9 | <i>EWS/ERG</i> | 1x 48, XX,+21,2xM; 1x 54,XX,+5,?+5,+4,+6,-9,+15, +20,+21,+21,-22, +2x M1; 1x 54,+5,+5,+6,-9,+12,+X,+20,+21,-22, 2x M1, +M2 |
| 10 | <i>EWS/FLI-1</i> | 47, XX, t(11;22)(q24;q12),+8 |
| 11 | <i>EWS/FLI-1</i> | 46, XX, t(11;22)(q24;q12) |
| 12 | <i>EWS/FLI-1</i> | 47, XY, t(11;22)(q24;q12),+12 |
| 15 | <i>EWS/FLI-1</i> | 46, XX, t(11;22)(q24;q12) der(5p) |
| 16 | <i>EWS/FLI-1</i> | 46, XY, t(11;22)(q24;q12) |

| <i>Pacient</i> | <i>Fúzní gen</i> | <i>Cytogenetické vyšetření</i> |
|----------------|------------------|---|
| 18 | <i>EWS/ERG</i> | 47, XY, der(16), t(1;16)(q12;q24) |
| 19 | <i>EWS/FLI-1</i> | 46, XY, t(11;22)(q24;q12) |
| 28 | <i>EWS/FLI-1</i> | 48, XY, t(11;22)(q24;q12), +2, +8 |
| 29 | <i>EWS/FLI-1</i> | 48-51, XX, změny 1q a 1p, +7, -9, izo 9q, add(11p), add(22q), + M=?9p |
| 31 | <i>EWS/FLI-1</i> | 45, XX, t(11,22)(q24,q21), -16, ?add(18p), t(16;18) |
| 34 | <i>EWS/FLI-1</i> | 46, XX, t(11;22)(q24;q12) |
| 35 | <i>EWS/FLI-1</i> | stabilní změny : +del (3q)x2, del (9q)?, t(9;11), -16, del (17p), del (22q) |
| 39 | <i>EWS/FLI-1</i> | 48, XY, t(11;22)(q24;q12), +8, +21 |

Tabulka 17, Srovnání výsledku RT-PCR (průkaz *t(11;22)* a *t(21;22)*) a cytogenetického vyšetření (1999-2003). Pořadí pacientů odpovídá tabulce 19. Cytogenetické vyšetření se většinou zdařilo u pacientů s rozsáhlými nádory pánve a hrudní stěny, kdy je přítomna velká měkko tkáňová složka, zatímco u nádorů kostí je kultivace často neúspěšná.

Detekce MRD u pacientů s ES

U pacientů jsme dále vyšetřovali minimální nádorovou infiltraci kostní dřeně v době stanovení diagnózy a přítomnost minimální nádorové choroby v průběhu protinádorové léčby. Pro vyhodnocení klinického významu průkazu jsme skupinu omezili na pacienty léčené v letech 1999-2003, kdy jsme používali výlučně výše uvedenou metodiku a všichni žijící pacienti jsou sledováni minimálně 12 měsíců od ukončení léčby. Limitujícím faktorem analýzy dat je skutečnost, že v uvedeném období byly použity k léčbě celkem tři různé terapeutické protokoly (POG 3567, MMT95, EuroEwing99), navíc léčba v rámci jednotlivých protokolů je stratifikována podle rizikových faktorů definovaných protokolem a intenzita léčby se tak liší. Proto je vyhodnocení klinického významu MRD obtížné.

V letech 1999-2003 jsme na Klinice dětské hematologie a onkologie léčili 45 pacientů s nově diagnostikovaným nádorem ze skupiny ES/pPNETu. Ve skupině bylo 19 chlapců a 26 dívek s mediánem věku 12,9 roku (4,2 - 23,5 roku). U celkem 31 pacientů bylo onemocnění v době stanovení diagnózy lokalizované, u 2 jsme prokázali postižení regionálních lymfatických uzlin a u 12 vzdálené metastázy.

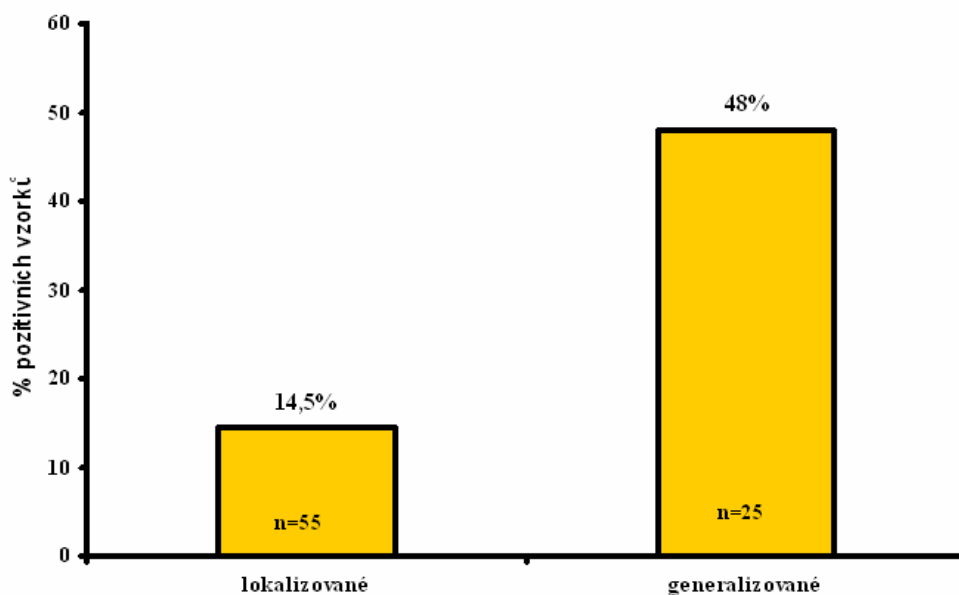
V době stanovení diagnózy jsme vyšetřili 80 vzorků aspirátu KD od 44 pacientů. U jedné pacientky z extraskeletálním Ewingovým sarkomem v oblasti retroperitonea s metastatickým

postižením retroperitoneálních a mediastinálních lymfatických uzlin a s postižením plic, jsme neměli vstupní vzorky kostní dřeně k dispozici.

Metodou RT-PCR jsme prokázali infiltraci kostní dřeně u sedmi ze 33 vyšetřených pacientů (21,2%) s lokalizovaným onemocněním (do této skupiny jsme zahrnuli 2 pacienty s postižením regionálních LU) a u šesti z 11 vyšetřených (54,5%) pacientů se vzdálenými metastázami. Pouze u dvou pacientek byly přítom nádorové buňky prokazatelně zastiženy i při cytomorfoloickém vyšetření KD (4,4%), u jedné byl nález suspektní (ověřený RT-PCR) a u ostatních byl nález normální. Výsledky vyšetření shrnuje tabulka 18 a obrázek 10.

| | <i>Počet pacientů / MRD pozitivních (%)</i> | <i>Počet vzorků / MRD pozitivních (%)</i> |
|--------------------------|---|---|
| Lokalizované ES | 33 / 7 (21,2%) | 55 / 8 (14,5%) |
| Generalizované ES | 11 / 6 (54,5%) | 25 / 12 (48,0%) |

Tabulka 18, Infiltrace KD detekovaná metodou RT-PCR u pacientů s ES v době stanovení diagnózy



Obrázek 10, Infiltrace KD metodou RT-PCR u pacientů s ES v době stanovení diagnózy s lokalizovaným a generalizovaným onemocněním. U pacientů s generalizovaným onemocněním byla infiltrace častější.

Podrobně výsledky vyšetření KD metodou RT-PCR v době stanovení diagnózy uvádí tabulka 19. Z tabulky vyplývá, že u sedmi pacientů byl v době stanovení diagnózy pozitivní jen jeden vzorek aspirátu KD ze dvou odebraných (1x dva pozitivní ze tří odebraných). Tento výsledek poukazuje na ložiskové postižení kostní dřeně buňkami ES a podtrhuje nutnost provedení více diagnostických odběrů z různých míst.

| Pacient | Pohlaví | Věk (roky) | Diagnóza | Lokalizace primárního nádoru | Metastázy | Vzorků KD / pozitivních | Klinický stav | Follow up (měsíce) |
|---------|---------|------------|----------|------------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------|--------------------|
| 1 | F | 17 | PNET | k. křížová | Ne | 1 / 0 | Exitus/DOC | 6 |
| 2 | M | 15 | ES | k. lýtková | Ne | 2 / 0 | CR | 79 |
| 3 | M | 9 | ES | pánev (lopata k.kyčelní) | Ne | 1 / 0 | CR | 76 |
| 4 | M | 13 | ES | k. stehenní | Ne | 2 / 0 | Exitus | 11 |
| 5 | F | 15 | ES | pánev (lopata k.kyčelní) | Ne | 1 / 0 | CR | 55 |
| 6 | F | 12 | PNET | obratle L3-S1 | L | 2 / 0 | Exitus/DOC | 1 |
| 7 | F | 10 | ES | k. stehenní | Ne | 2 / 1 | Exitus | 37 |
| 8 | F | 7 | ES | Lopatka | Ne | 2 / 0 | CR | 73 |
| 9 | F | 12 | ES | hrudní stěna | LN | 1 / 0 | CR | 82 |
| 10 | F | 13 | ES | pánev (lopata k.kyčelní) | Ne | 1 / 0 | CR | 78 |
| 11 | F | 14 | ES | pánev (lopata k.kyčelní) | Ne | 1 / 0 | Exitus/TRD | 10 |
| 12 | M | 16 | ES | k. stydká | B, L, LN | 2 / 0 | Exitus | 24 |
| 13 | F | 12 | EOS ES | měkké tkáně hlavy | Ne | 2 / 0 | CR | 76 |
| 14 | F | 9 | PNET | VDN | Ne | 2 / 0 | CR | 79 |
| 15 | F | 10 | EOS PNET | Ledvina | BM± | 2 / 2 | Exitus/DOC | 5 |
| 16 | M | 5 | ES | obratle L5-S2 | Ne | 2 / 0 | CR | 71 |
| 17 | M | 15 | ES | k. pažní | LN | 2 / 1 | CR | 70 |
| 18 | M | 22 | PNET | Lopatka | B, L, LN | 3 / 2 | Exitus | 13 |
| 19 | M | 18 | ES | k. stehenní | Ne | 2 / 0 | CR | 67 |
| 20 | M | 6 | ES | k. lýtková | Ne | 2 / 2 | CR | 68 |
| 21 | M | 15 | ES | k. pažní | Ne | 2 / 1 | AWD | 68 |
| 22 | F | 9 | ES | k. stehenní | Ne | 2 / 1 | CR | 67 |
| 23 | F | 16 | ES | k. lýtková | L | 2 / 2 | CR | 63 |
| 24 | M | 10 | ES | k. stehenní | Ne | 2 / 0 | AWD | 67 |
| 25 | F | 15 | ES | k. patní | Ne | 2 / 1 | CR | 53 |
| 26 | F | 15 | ES | pánev (lopata k.kyčelní) | Ne | 2 / 0 | CR | 54 |
| 27 | M | 16 | ES | k. lýtková | Ne | 2 / 0 | CR | 54 |
| 28 | M | 16 | PNET | hrudní stěna | nádorové buňky ve výpotku | 2 / 0 | CR | 56 |
| 29 | F | 15 | ES | pánev (lopata k.kyčelní) | L,B, BM | 2 / 2 | Exitus | 15 |
| 30 | M | 12 | ES | hrudní stěna | Ne | 2 / 0 | CR | 54 |
| 31 | F | 23 | ES | hrudní stěna | Ne | 1 / 0 | Exitus | 18 |

| Pacient | Pohlaví | Věk (roky) | Diagnóza | Lokalizace primárního nádoru | Metastázy | Vzorků KD / pozitivních | Klinický stav | Follow up (měsíce) |
|---------|---------|------------|----------|------------------------------|-----------|-------------------------|---------------|--------------------|
| 32 | M | 17 | ES | k. holenní | B | 2 / 0 | Exitus | 25 |
| 33 | M | 7 | ES | k. pažní | Ne | 2 / 0 | AWD | 51 |
| 34 | F | 10 | PNET | hrudní stěna | B, BM | 2 / 2 | Exitus | 19 |
| 35 | M | 11 | ES | pánev (lopata k.kyčelní) | L,RLN | 2 / 2 | Exitus | 15 |
| 36 | F | 4 | ES | k. stehenní | Ne | 1 / 0 | AWD | 48 |
| 37 | F | 13 | ES | k. stehenní | Ne | 2 / 0 | CR | 47 |
| 38 | F | 10 | ES | IV.metatars | Ne | 2 / 0 | CR | 43 |
| 39 | M | 20 | PNET | hrudní stěna | L | 2 / 0 | Exitus | 28 |
| 40 | F | 15 | ES | k. patní | Ne | 1 / 0 | CR | 40 |
| 41 | F | 10 | EOS PNET | retroperitoneum | L, LN | Ne | CR | 39 |
| 42 | F | 8 | EOS PNET | hrudní stěna | Ne | 2 / 1 | CR | 35 |
| 43 | M | 18 | EOS ES | bérec (měkké tkáně) | Ne | 2 / 0 | CR | 37 |
| 44 | F | 13 | EOS ES | bérec (měkké tkáně) | Ne | 2 / 0 | CR | 35 |
| 45 | F | 13 | EOS PNET | retroperitoneum | Ne | 2 / 0 | CR | 32 |

Tabulka 19, Údaje o pacientech s ES nově diagnostikovaných a léčených na KDHO v letech 1999-2003 vyšetřených metodou RT-PCR na přítomnost nádorových buněk v kostní dřeni v době stanovení diagnózy. Pouze dvě pacientky (č. 29 a 34) měly pozitivní nález při cyto-morfologickém vyšetření aspirátu kostní dřene (vyšetřen vždy stejný vzorek KD).

**EOS - extraoseální ES/PNET (z měkkých tkání), B - metastázy do skeletu, BM – postižení KD při cytomorfolgickém vyšetření, L - metastázy do plic, LN - metastázy do lymfatických uzlin, CR - 1. kompletní remise, DOC – „died of complications“ – úmrtí na komplikace protinádorové terapie, TRD – „transplant related death“ – úmrtí na komplikace spojené s megachemoterapií a autologní transplantací KD, AWD – žije s aktivním onemocněním
Follow up k 1.7.2006**

V průběhu probíhající protinádorové léčby jsme vyšetřili dalších 101 vzorků aspirátů kostní dřene odebraných 18 pacientům s lokalizovaným onemocněním a sedmi pacientům s generalizovaným onemocněním (někteří pacienti byli vyšetřeni vícekrát). Celkem sedm vzorků z 55 vyšetřených (12,7%) u pacientů s lokalizovaným onemocněním bylo pozitivních. Všechny pozitivní vzorky (7) pocházely od tří pacientů, z nichž pacientka (č.31) neměla iniciálně MRD v kostní dřeni detekováno. Již při ukončení indukční chemoterapie byla u této pacientky zjištěna progresse primárního nádoru hrudní stěny a pacientka zemřela 18 měsíců od zahájení terapie na další progresi základního onemocnění. U zbylých dvou pacientů (č.17 a 20) jsme postupně dosáhli PCR negativity v KD a oba pacienti žijí v 1. kompletní remisi 70 a 68 měsíců od zahájení léčby.

U pacientů s generalizovaným onemocněním jsme vyšetřili v průběhu léčby 46 aspirátů KD z nichž bylo 7 pozitivních (15%), pouze jednou byl vzorek pozitivní i při cytomorfolgickém

vyšetření. Pozitivní vzorky pocházely od dvou pacientů a tito pacienti zemřeli na progresi základního onemocnění (pacienti 18, 29).

Přehled vyšetření v průběhu protinádorové léčby udává tabulka 20.

| | <i>Počet pacientů / MRD pozitivních (%)</i> | <i>Počet vzorků / MRD pozitivních (%)</i> |
|--------------------------|---|---|
| Lokalizované ES | 18 / 3 (16,7%) | 55 / 7 (12,7%) |
| Generalizované ES | 7 / 2 (28,6%) | 46 / 7 (15,2%) |

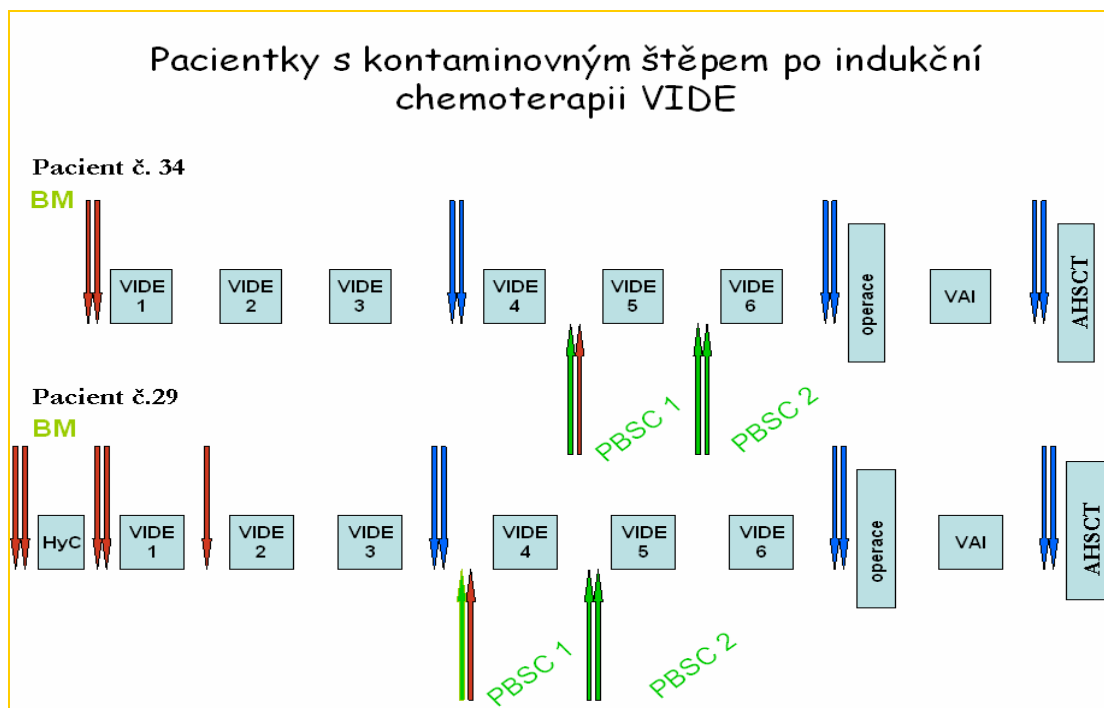
Tabulka 20, Přítomnost MRD ve vzorcích KD detekovaná metodou RT-PCR u pacientů s ES v průběhu probíhající protinádorové léčby.

Vzorky KD v průběhu protinádorové léčby nebyly vzhledem k různým léčebným protokolům odebírány v pevných časových bodech, přesto celkem u 18 pacientů souboru byla aspirace KD provedena před separací periferních hematopoetických kmenových buněk. Pouze v jediném případě jsme prokázali přítomnost MRD při vyšetření vzorků KD (n=35) odebraných před separací PBSC (standardně odebírány po 3-5 cyklu chemoterapie). Přítomnost MRD jsme u tohoto pacienta následně prokázali i ve vyšetřeném štěpu PBSC.

Naproti tomu u dvou pacientek jsme přes negativitu vyšetření KD před separací PBSC prokázali přítomnost buněk ES ve štěpu hematopoetických kmenových buněk. Tato skutečnost svědčí pro ložiskové postižení KD u solidních nádorů a připouští možnost mobilizace nádorových buněk do cirkulace v průběhu aplikace hematopoetických růstových faktorů před separací, jak je popsáno u pacientek s karcinomem mammy (*Brugger, W. a kol., 1994*).

Vzhledem k tomu, že pacientky byly léčeny již novým protokolem Euro-E.W.I.N.G.99 a odběry KD byly prováděny opakovaně prezentujeme nálezy ve schématu (obrázek 11).

Přítomnost nádorových buněk ve štěpu u obou pacientek je nepochybně podmíněna velkou nádorovou masou v době stanovení diagnózy, obě uvedené pacientky měly prokázané postižení kostní dřeně v době stanovení diagnózy i cytomorfoloogickým vyšetřením. To je také důvod frekventního monitorování KD v průběhu terapie, které není u pacientů se solidními nádory obvyklé (obrázek 11).



Obázek 11, Schematické znázornění vyšetření MRD v KD a ve štěpu PBSC u dvou pacientek s ES (č.29 a 34). Barevné šipky představují jednotlivé odběry KD a PBSC, červené značí pozitivní záchyt MRD, modré – KD bez detekované MRD, zelené – PBSC bez detekované MRD. Obě pacientky dosáhly v průběhu léčby kompletní remise (vč. PET vyšetření), obě však po megachemoterapii a AHSCT prodělaly recidivu a zemřely za 15 a 19 měsíců od zahájení léčby.

V průběhu léčby celkem 33 pacientů skupiny podstoupilo separaci periferních hematopoetických kmenových buněk. Zatímco stávající protokol Euro-E.W.I.N.G.99 doporučuje provést odběr PBSC u všech pacientů z ES, dříve používané protokoly odběr nevyžadovaly. Nebyl prováděn především u pacientů nízkého rizika (definované jako lokalizované onemocnění, kdy primární nádor je chirurgicky radikálně odstranitelný), zatímco u rozsáhlých lokalizovaných nádorů pánve a hrudní stěny a generalizovaných nádorů, kde jsme s možností megachemoterapie počítali, byly separace PBSC prováděny. V několika případech nebyla separace PBSC provedena pro progresi onemocnění, případně pro komplikace léčby vylučující následné provedení megachemoterapie.

Celkem jsme provedli 58 leukaferéz PBSC u 33 pacientů (průměrně 1,7 na pacienta, rozmezí 1-5). V všech pacientů jsme získali dostatečný štěp k autologní transplantaci. Na přítomnost MRD ve štěpu jsme vyšetřili produkt každé separace (pokud byl pacient separován 3 následující dny po sobě, byly vyšetřeny vzorky ze všech 3 dnů). Celkem jsme vyšetřili 40 vzorků PBSC od 23 pacientů s lokalizovaným onemocněním, z nichž jeden vzorek byl pozitivní (2,5%). U některých pacientů jsme navíc vyšetřili i více vzorků z jednoho vaku, výsledky vyšetření byly shodné. Dále jsme vyšetřili 18 vzorků PBSC od deseti pacientů s generalizovaným onemocněním, tři vzorky (16,6%) od tří pacientů (30%) byly pozitivní. Vždy se jednalo o jeden vzorek odebraný

při opakovaných odběrech PBSC ve dvou dnech, zatímco vzorek z následujícího dne byl negativní. Tato skutečnost může být způsobena mobilizací nádorových buněk do štěpu při prvním odběru, nebo kontaminací štěpu na hranici citlivosti metodiky, kdy jeden štěp je reprodukovatelně pozitivní, zatímco druhý negativní (*Brugger, W. a kol., 1998, Fischmeister G. a kol., 1999*).

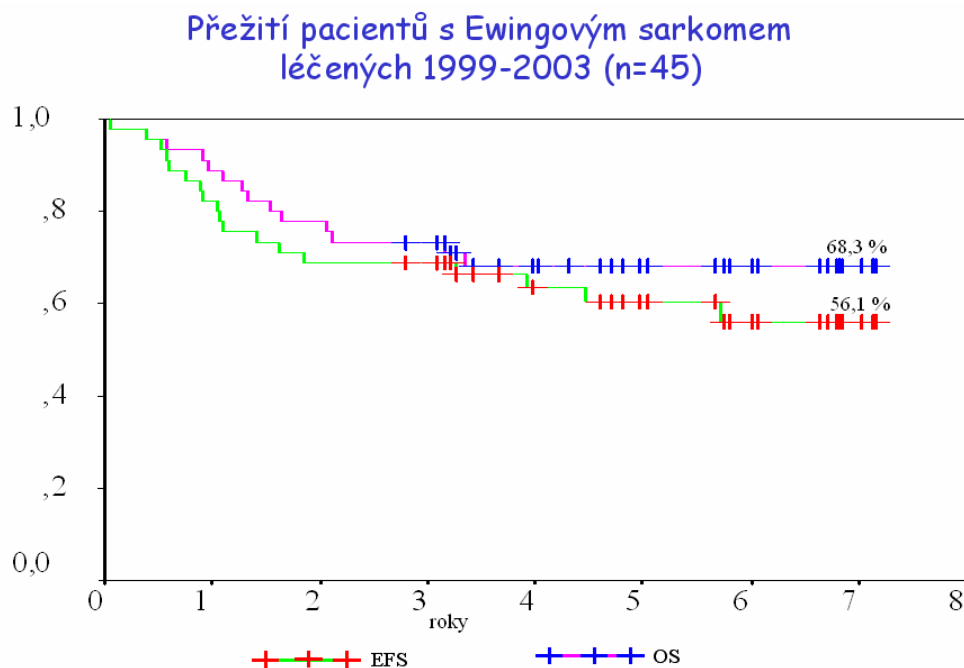
Výsledky detekce buněk ES ve štěpu PBSC uvádí tabulka 21.

| | <i>Počet pacientů / MRD pozitivních (%)</i> | <i>Počet vzorků / MRD pozitivních (%)</i> |
|--------------------------|---|---|
| Lokalizované ES | 23 / 1 (4,3%) | 40 / 1 (2,5%) |
| Generalizované ES | 10 / 3 (30,0%) | 18 / 3 (16,6%) |

Tabulka 21, Přítomnost MRD ve vzorcích PBSC detekovaná metodou RT-PCR u pacientů s ES

U všech čtyř pacientů jsme po další chemoterapii (in vivo purging) dosáhli PCR negativity ve štěpu při dalším odběru. Pacienty č. 29 a 34 zemřely po megachemoterapii na relaps onemocnění, pacienta č.18 jsme netransplantovali pro časnou progresi onemocnění, pacienta č. 17 s ES pažní kosti s postižením regionálních lymfatických uzlin, patologickou frakturou kosti v nádoru a nedostatečnou histologickou odpovědí na předoperační chemoterapii jsme transplantovali a pacient žije v kompletní remisi 70 měsíců od zahájení léčby.

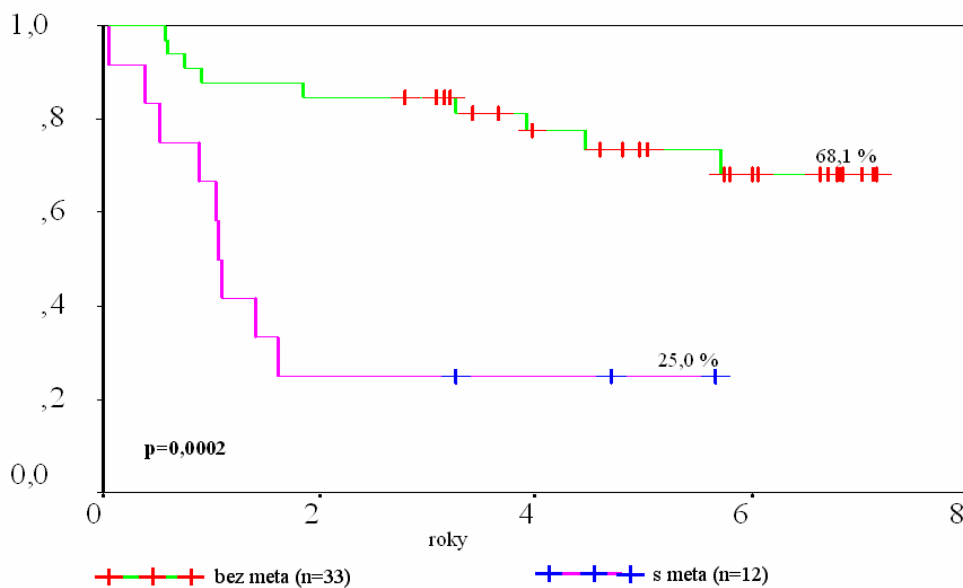
Pravděpodobnost přežití jsme hodnotili Kaplan-Meierovou analýzou (*Kaplan, E.L., Meier, P., 1958*) od okamžiku stanovení diagnózy do události – „eventu“ („event“ – „přežití do selhání“ tzn. progrese, relaps, smrt v remisi, sekundární malignita) případně k datu poslední kontroly (sledování jsme omezili k 1.7.2006). Do analýzy jsme zařadili všechny pacienty. S mediánem sledování 48 měsíců žije bez „eventu“ - EFS (Event Free Survival) 56,1 %, celkem žije (OS – Overall Survival) 68,3 % pacientů s Ewingovým sarkomem (obrázek 13).



Obrázek 13, Pravděpodobnost přežití pacientů s nádory rodiny ES/pPNETu lčených na Klinice dětské hematologie a onkologie v letech 1999-2003.

Ve skupině pacientů s ES žije bez „eventu“ 68,1 % pacientů s lokalizovaným onemocněním a 25,0 % pacientů se vstupně detekovatelnými metastázami (EFS 68,1 %, SE 9,2 vs. EFS 25,0 %, SE 12,5; $p=0,0002$, log rank). Pravděpodobnost přežití pacientů podle přítomnosti metastáz v době stanovení diagnózy zobrazuje obrázek 14.

Přežití pacientů s ES léčených 1999-2003 (n=45),
 lokalizované vs. metastatické onemocnění



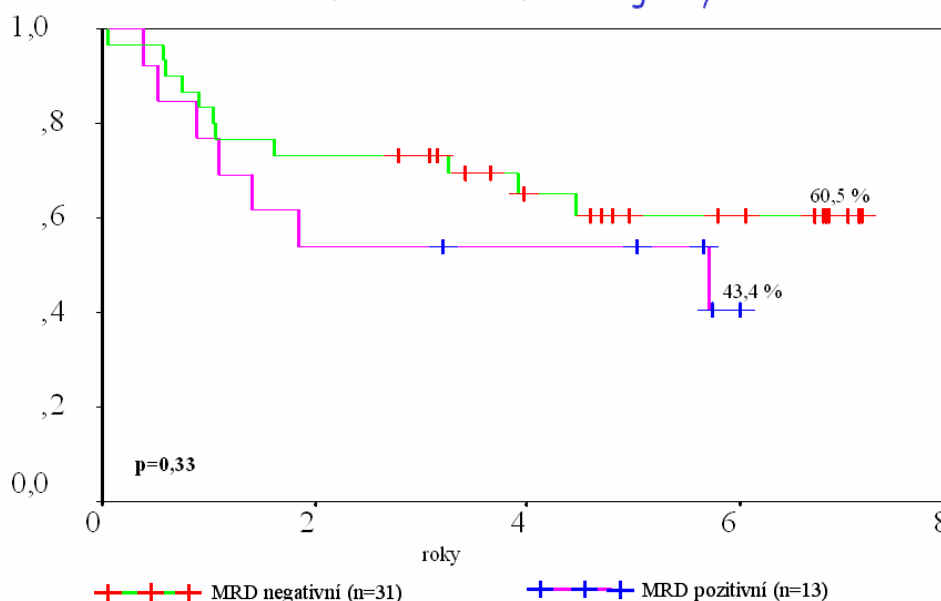
Obrázek 14, Pravděpodobnost přežití pacientů (EFS) s nádory rodiny ES/pPNETu v závislosti na přítomnosti metastáz v době stanovení diagnózy.

Minimální infiltraci kostní dřeně metodou RT-PCR v době stanovení diagnózy u pacientů s nádory rodiny ES prokazujeme podle literárních údajů přibližně u 20% pacientů (0 -31 %), kteří podle výsledků konvenčních zobrazovacích vyšetření vzdálené metastázy nemají a u většiny pacientů (33 – 75%) s generalizovaným onemocněním (*Athale, U.H. a kol., 2001, Fagnou, C. a kol., 1998, Sumerauer, D. a kol., 2001, Schleiermacher, G. a kol., 2003*). Odpovídající frekvenci pozitivity vyšetření jsme dokumentovali i u pacientů léčených na Klinice dětské hematologie a onkologie a výsledky publikovali (*Sumerauer, D. a kol., 2001*).

U skupiny našich pacientů s nově diagnostikovaným ES léčených v letech 1999-2003 jsme nicméně nepotvrdili prognostický význam minimální infiltrace kostní dřeně v době stanovení diagnózy. Ve skupině MRD negativní přežívá bez známek onemocnění (EFS) 60,4% pacientů, ve skupině MRD pozitivních 43,4% (p=0,33; NS, log rank), pravděpodobnost přežití obou skupin uvádí obrázek 15.

Podobně u pacientů s lokalizovaným onemocněním (n=33) jsme neprokázali klinický význam minimální infiltrace KD prokázané metodou RT-PCR. Pravděpodobnost přežití bez eventu (EFS) ve skupině s lokalizovaným onemocněním a bez prokázané MRD ve dřeni (n=26) je 66,4%; SE 10,2, ve skupině MRD+ (n=7) je 64,3%; SE 21; (p=0,9 ; NS).

Přežití pacientů s ES v závislosti na infiltraci KD (RT-PCR) v době stanovení diagnózy



Obrázek 15, Přežití pacientů s nádory rodiny ES/pPNETu v závislosti na průkazu minimální infiltrace kostní dřeně metodou RT-PCR v době stanovení diagnózy.

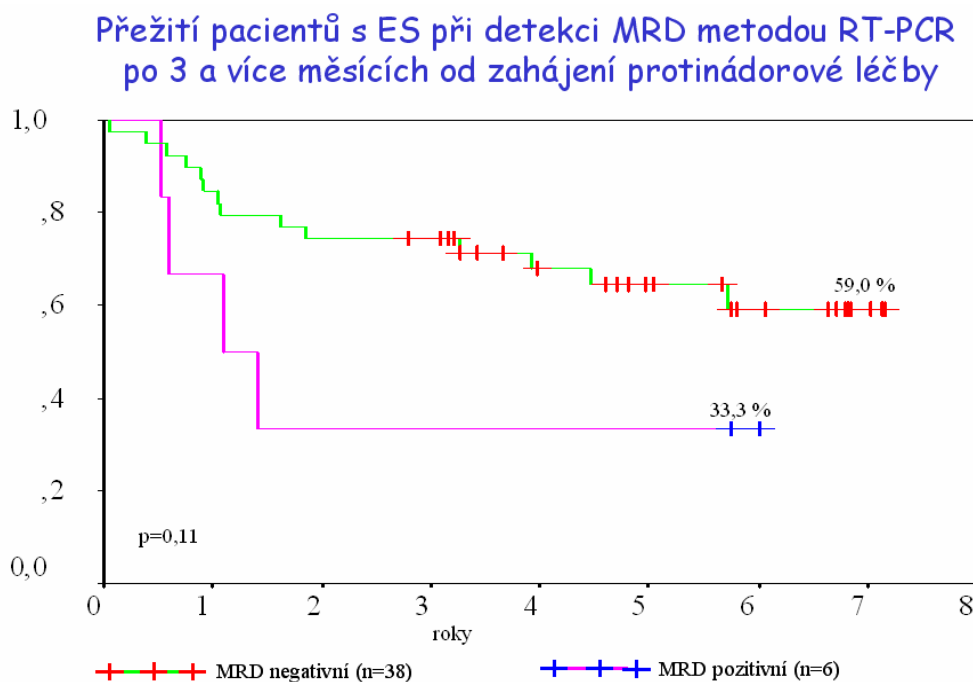
Studie francouzských autorů hodnotících význam minimální infiltrace KD v době stanovení diagnózy u skupiny 172 identicky léčených pacientů s ES (92 z nich s lokalizovaným onemocněním) prokázala, že přítomnost nádorových buněk detekovaných metodou RT-PCR ve dření je asociována se signifikantně horším přežitím celé skupiny pacientů i skupiny pacientů s lokalizovaným onemocněním při samostatném hodnocení (*Schleiermacher, G. a kol., 2003*). Pravděpodobnost přežití pacientů MRD negativních a pacientů s prokázanou minimální infiltrací KD byla 76% a 43% ($p=0,007$, medián sledování 27 měsíců). Výsledky získané v uvedené studii podporují hypotézu, že vyšetření KD metodou RT-PCR může být důležité pro určení rozsahu onemocnění (vstupní staging) a odhad prognózy dětí s Ewingovým sarkomem. Naproti tomu, jiná studie s nižším počtem pacientů (35) prognostický význam minimální infiltrace KD v době stanovení diagnózy neprokazuje (*Zoubek, A. a kol., 1998*). Prognostický význam minimální infiltrace KD u 26 pacientů s lokalizovaným ES v době stanovení diagnózy neprokázali ani izraelští autoři (*Avigad, S. a kol., 2004*).

Výsledky vyšetření v naší skupině pacientů s ES ovlivňuje především skutečnost, že všichni pacienti nebyli léčeni podle jednoho léčebného protokolu a tedy stejně intenzivní terapií. Rozdíly v přežití tak mohou být modifikovány tím, že intenzivnější protinádorová terapie u některých pacientů eliminovala vyšší riziko minimální infiltrace KD.

Vzhledem k různým léčebným protokolům, různé intenzitě terapie a různým časovým bodům odběru vzorků není možné řádně vyhodnotit význam MRD v průběhu terapie. Zaměřili jsme

se na pacienty u kterých jsme minimálně po 3 sériích indukční chemoterapie prokázali MRD (v KD nebo ve štěpu PBSC). Ani ve skupině s perzistující MRD (n=6) jsme neprokázali signifikantní rozdíl v pravděpodobnosti přežití (59% vs. 33,3%, p=0,11, NS), obrázek 16.

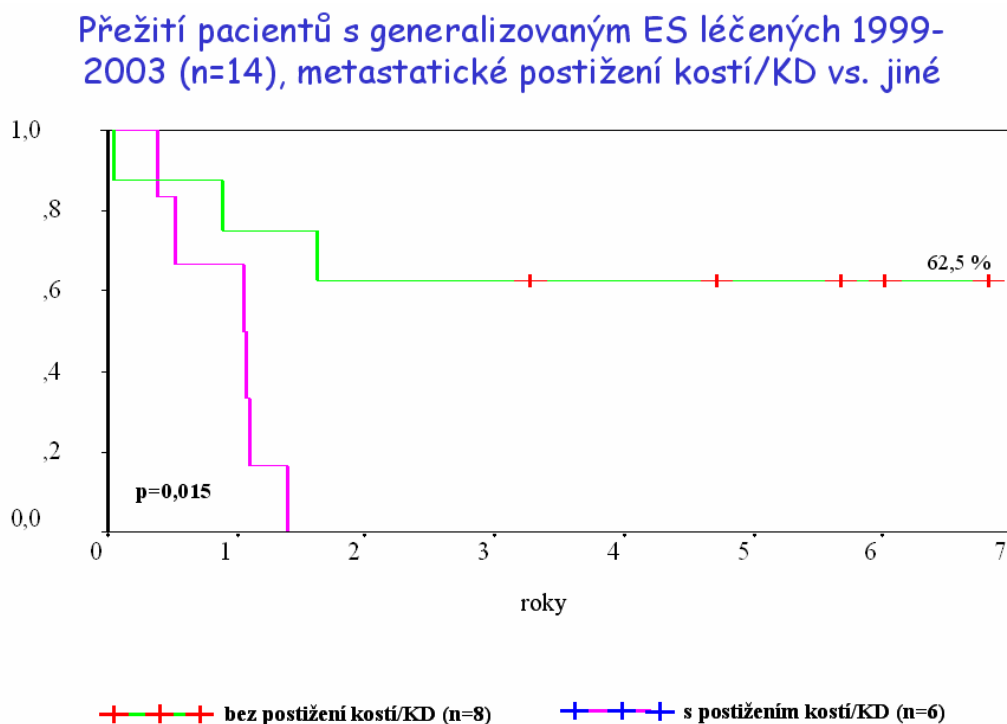
Jedinou studií, která sleduje význam MRD u pacientů s Ewingovým sarkomem v průběhu terapie je studie Avigada a spol. (Avigada, S. a kol., 2004). Autoři uvádí signifikantní rozdíl v přežití pacientů, u kterých detekovali chimerický fúzní transkript *EWS/FLI1* v KD a periferní krvi a pacientů trvale negativních (p= 0.0028). Velmi zajímavá je skupina sedmi pacientů, u kterých byla opakovaně prokazována přítomnost nádorových buněk ES v kostní dřeni metodou RT-PCR a u kterých při další léčbě tato vymizela. Šest pacientů žije dlouhodobě v remisi, pouze u jednoho onemocnění recidivovalo. Podobný vývoj jsme dokumentovali u dvou našich pacientů s lokalizovaným onemocněním, které jsme opakovaně testovali na přítomnost nádoru pro předchozí pozitivitu. U obou jsme dosáhli PCR negativity a oba žijí v remisi 70 a 68 měsíců.



Obázek 16, Přežití pacientů s nádory rodiny ES/pNETu v závislosti na průkazu perzistující nebo de novo detekované MRD v kostní dřeni a ve štěpech PBSC po třech a více měsících od zahájení protinádorové léčby.

Ačkoliv jsme v našem souboru neprokázali prognostický význam detekce minimální nádorové infiltrace v kostní dřeni v době stanovení diagnózy, postižení KD při cytomorfoloickém vyšetření, podobně jako postižení skeletu a extrapulmonální viscerální metastázy identifikují skupinu pacientů, která má velmi špatnou prognózu a je stávajícími léčebnými postupy prakticky nevyléčitelná (Meyers, P.A. a kol., 2001, Rodrigues-Galindo, C. a kol., 2003). V našem souboru mělo šest pacientů metastázy ve skeletu a kostní dřeni v době stanovení diagnózy, dalších šest pacientů plicní metastázy a dva pacienti izolované postižení regionálních lymfatických uzlin. I

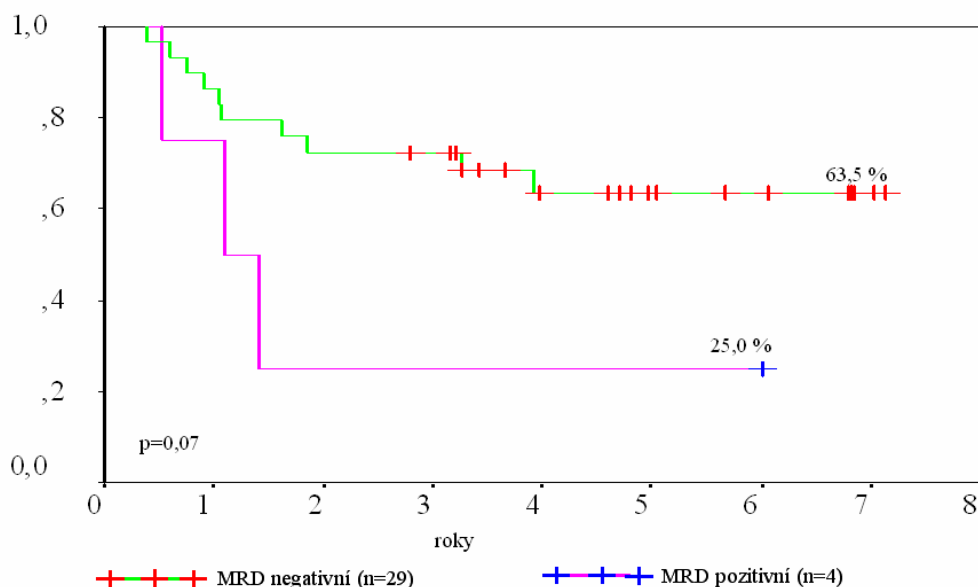
v naší malé skupině pacientů s generalizovanými nádory z rodiny ES/pNETu jsme prokázali negativní prognostický význam postižení KD (cytologie) a skeletu. Pravděpodobnost přežití (EFS) u pacientů s metastázami v době stanovení diagnózy podle udává obr. Rozdíl v přežití je zřejmý (EFS 62,5% vs. 0%, $p=0,015$, log rank), obrázek 17.



Obázek 17, Přežití pacientů s primárně generalizovaným ES léčených v letech 1999-2003 v závislosti na metastatickém postižení kostí a kostní dřeně (cytologie) v době stanovení diagnózy.

Jak jsme již uvedli, vyšetřili jsme celkem 40 vzorků PBSC od 23 pacientů s lokalizovaným ES, jeden štěp (2,5%) od jednoho pacienta (4,3%) byl pozitivní. U pacientů s generalizovaným ES jsme vyšetřili 18 vzorků PBSC od deseti pacientů. Celkem tři vzorky štěpů (16,6%) od tří pacientů (30%) byly pozitivní. Pozorovali jsme nesignifikantní trend k častější kontaminaci štěpů u pacientů s primárně generalizovaným onemocněním ($p=0,06$; NS, t-test). Prokázaná kontaminace štěpu PBSC (odebraného po 3.-5. cyklu chemoterapie) je pravděpodobně asociována s horším přežitím, ačkoliv rozdíl není statisticky významný (EFS 63,5% vs. 25,0 %, $p=0,07$). Příčiny perzistence nádoru a následné kontaminace štěpu PBSC jsou pravděpodobně velká nádorová masa v době stanovení diagnózy a rezistence nádoru k použité léčbě.

Přežití pacientů s ES v závislosti na kontaminaci štěpu PBSC (n=33)

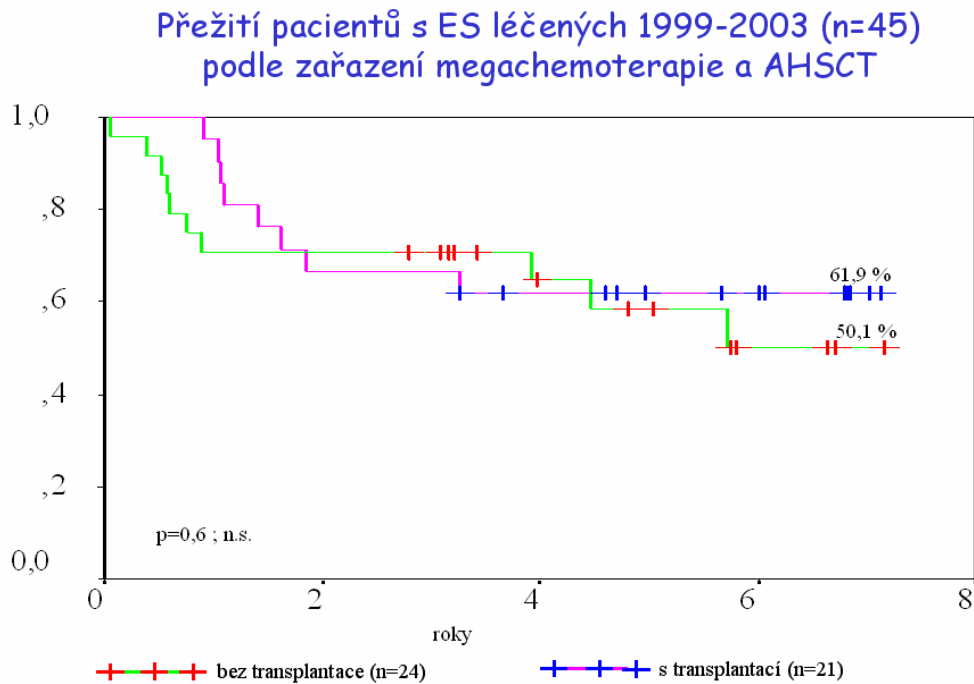


Obrázek 18, Pravděpodobnost přežití pacientů s ES v závislosti na kontaminaci štěpu PBSC

Kontaminaci štěpu PBSC jsme prokázali ve stejné frekvenci jako další autoři (*Fischmeister, G. a kol., 1999, Montanaro, L. a kol., 1999*). Vyšší procento kontaminace štěpů prokázal ve své práci Leung (*Leung, W. a kol., 1998*), který detekoval nádorové buňky ve štěpech PBSC u 82% pacientů s ES a neuroblastomem. K průkazu nádorových buněk ovšem použil PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5), jehož vhodnost použití k detekci MRD u maligních neuroektodermálních nádorů, je některými autory zpochybněna (*Corrias, M.V. a kol., 2004*). Podobně vysokou frekvenci kontaminace štěpů pozorovali izraelští autoři u skupiny 11 pacientů, kdy všichni pacienti měli minimálně jeden vzorek štěpu (vyšetřeno 27 vzorků štěpů od 11 pacientů) kontaminovaný nádorem, detekovaným průkazem fúzního transkriptu *EWS/FLII*. Skupinu pacientů v tomto případě tvořili z části pacienti s generalizovaným onemocněním a u dalších byl štěp odebrán až při léčbě recidivy onemocnění. Není tak možné přesně posoudit stav pacienta ani intenzitu léčby před vlastním odběrem štěpu a skupina pacientů se tak významně odlišuje od ostatních (*Yaniv, I. a kol., 2005*).

Megachemoterapie a autologní transplantace KD zůstává nadále v léčbě Ewingova sarkomu experimentálním postupem vyhrazeným pro klinické studie. Protokol Euro-E.W.I.N.G. 99 megachemoterapii zařazuje v léčbě pacientů s primárně generalizovaným onemocněním, s velkým objemem primárního nádoru a pacientů s nedostatečnou histologickou odpovědí nádoru na předoperační chemoterapii. U pacientů s ES léčených na Klinice dětské hematologie a onkologie v období 1999-2003 podle zařazení megachemoterapie a autologní transplantace přežívá 61,9 % transplantovaných a 50,1% pacientů, kteří byli léčeni konvenční chemoterapií (obrázek 19). Rozdíl

v přežití není statisticky významný, nicméně je třeba zdůraznit, že megachemoterapie a transplantace byla zařazena u pacientů, které hodnotíme jako rizikové. Skutečný význam megachemoterapie u ES, indikace zařazení i význam kontaminace autologního štěpu PBSC nádorovými buňkami ozřejmí vyhodnocení uvedené celoevropské prospektivní klinické studie, na které Klinika dětské onkologie a hematologie aktivně participuje.



Obrázek 19, Pravděpodobnost přežití pacientů s nádory rodiny ES/pPNETu podle zařazení megachemoterapie a autologní transplantace hematopoetických kmenových buněk.

VÝSLEDKY VYŠETŘENÍ ŠTĚPŮ URČENÝCH KE KLINICKÉMU POUŽITÍ

V průběhu řešení projektu jsme provedli purging třinácti autologních štěpů určených ke klinickému použití u dvanácti pacientů. U jedenácti pacientů jsme čistili PBSC, u jednoho dítěte se jednalo o štěp hematopoetických kmenových buněk kostní dřeně odebraný z lopat kostí kyčelních.

Ex vivo purging jsme prováděli dvouhodinovou inkubací s etoposidem v koncentraci 40 µg/ml po patnáctiminutové preinkubaci ethyolem v koncentraci 4 mg/ml. U jedné pacientky jsme neprováděli preinkubaci s ethyolem z technických důvodů.

Parametry štěpů jsou shrnuty v tabulce 22, změny hodnot po purgingu vyjadřuje obrázek 20.

Je patrné, že množství celkových jaderných buněk a CD34+ progenitorů se výrazněji nemění, téměř o polovinu však klesá počet buněk tvořících kolonie. Rozdíl mezi výrazným poklesem buněk tvořících kolonie (kultivační vyšetření) a prakticky neměnným počtem CD34+ buněk po purgingu prokazuje, že je po ex vivo manipulaci štěpu, vždy nutné provádět kultivační vyšetření. Podle řady autorů totiž v nemanipulovaných štěpech postačuje vyšetření počtu CD34+ buněk.

Tabulka 23 znázorňuje výsledky vyšetření kontaminace štěpů nádorovými buňkami. Z tabulky je vidět, že u většiny pacientů jsme byli schopni prokázat MRD. Rozdíl mezi relativně častým výskytem infiltrace kostní dřeně v době stanovení diagnózy a méně častým průkazem MRD ve štěpech kmenových hematopoetických buněk nádorovými buňkami prokázal efektivitu “in vivo purgingu”. Tento rozdíl může rovněž podporovat hypotézu o nižším riziku kontaminace štěpů z periferní krve.

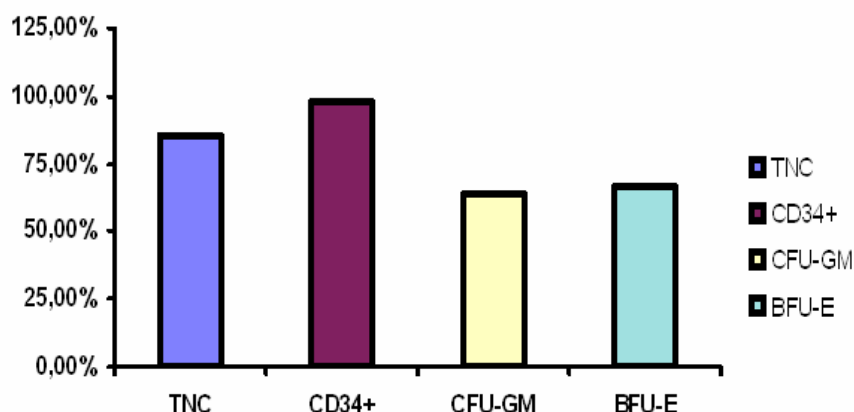
Lze tedy uzavřít, že použití etoposidu v koncentraci 40 µg/ml s patnáctiminutovou preinkubací ethyolem v koncentraci 4 mg/ml nesníží ve štěpech množství buněk tvořících kolonie pod doporučenou hranici. Po ex vivo manipulaci je nezbytné vždy doplnit kultivační hodnocení hematopoetických kolonií CFU-GM a BFU-E.

Současné molekulárně biologické metody jsou u většiny pacientů schopny detekovat minimální množství nádorových buněk. U většiny pacientů se podařilo chemoterapií snížit množství kontaminujících nádorových buněk pod hranici detekce použité metodiky ($1:10^5$ - 10^6).

| | Věk/ pohlaví | Diagnóza | Typ štěpu | Před purginem | | | | Po purgingu | | | | Transplantace | Stav |
|-------|-----------------|------------------------|--------------|------------------|-------|--------|--------|----------------|-------|--------|--------|---------------|--------|
| | | | | jad.bb. | CD34+ | CFU-GM | BFU-E | jad.bb. | CD34+ | CFU-GM | BFU-E | | |
| 1 | 9/F | NBL, IV.KS | PBSC | 9,17 | 3,58 | 116,40 | 101,80 | 7,35 | 3,84 | 88,20 | 81,20 | Ne | exitus |
| 2 | 1/M * | NBL, IV.KS | PBSC | 3,21 | 4,72 | 116,99 | 122,90 | 2,95 | 5,85 | 77,13 | 59,42 | Ano | exitus |
| 3 | 1/M * | NBL, IV.KS | PBSC | 3,33 | 3,69 | 106,39 | 80,49 | 3,24 | 3,34 | 52,13 | 44,69 | Ano | exitus |
| 4 | 5/M | NBL, IV.KS | PBSC | 4,16 | 4,47 | 166,40 | 155,15 | 3,89 | 6,02 | 139,91 | 117,56 | Ne | exitus |
| 5 | 1/M | NBL, IV.KS | KD | 1,94 | 2,38 | 59,13 | 25,08 | 1,14 | 4,61 | 10,70 | 9,70 | Ano | exitus |
| 6 | 5/M | ES, III. KS | PBSC | 8,39 | 20,66 | 474,50 | 392,5 | 5,10 | 14,02 | 142,96 | 144,24 | Ano | CR |
| 7 | 10/M | ES, IV. KS relaps | PBSC | 2,18 | 6,61 | 312,35 | 82,93 | 2,19 | 6,62 | 134,31 | 64,69 | Ano | exitus |
| 8 | 15/M | ES, III. KS | PBSC | 4,20 | 3,77 | n.d. | n.d. | 3,36 | 2,66 | 510,10 | n.d. | Ne*** | CR |
| 9 | 15/M | ES, III. KS | PBSC | 6,35 | 9,90 | 190,97 | 128,97 | 4,74 | 7,10 | 126,30 | 82,90 | Ne | CR |
| 10 ** | 14/F | ES, III. KS | PBSC | 4,89 | 7,83 | 141,27 | 139,93 | 4,20 | 1,98 | 74,99 | 97,74 | Ano | CR |
| 11 | 16/M | ES, IV.KS | PBSC | 3,49 | 7,12 | 117,51 | 185,04 | 2,86 | 4,46 | 48,10 | 83,35 | Ano | CR |
| 12 | 9/M | RMS, IV. KS relaps | PBSC | 4,71 | 3,58 | 82,90 | 50,85 | 4,88 | 4,20 | 82,48 | 51,24 | Ano | exitus |
| 13 | 4/M | NHL, III. KS relaps | PBSC | 12,45 | 11,58 | n.d. | n.d. | 8,38 | 8,29 | 173,10 | 146,60 | Ne**** | CR |

Tabulka 22, Charakteristiky štěpů před a po purgingu. Věk v rocích, pohlaví: M - mužské, F – ženské, diagnózy: NBL- neuroblastom, ES- nádor ze skupiny Ewingova sarkomu, NHL- ne Hodgkinský lymfom (ALCL). Typ štěpu – PBPC - periferní progenitorové buňky, KD - kostní dřev. Všechny hodnoty jsou vyjádřeny na kg: jaderné buňky $\times 10^8$ /kg, CD34+ buňky $\times 10^6$ /kg, CFU-GM a BFU-E $\times 10^4$ /kg * štěpy 2 a 3 byly odebrány jednomu pacientovi, ** purging jsme prováděli bez preinkubace amifostinem, * - transplantován štěpem získaným po další chemoterapii (PCR negativní), **** - před transplantací zjištěn relaps onemocnění, po další chemoterapii transplantován alogenně od nepříbuzného dárce, žije v remisi 48 měsíců od transplantace**

Průměrné výtěžky štěpů PBSC čištěných kombinací
amifostin / etoposid (40 µg/ml)



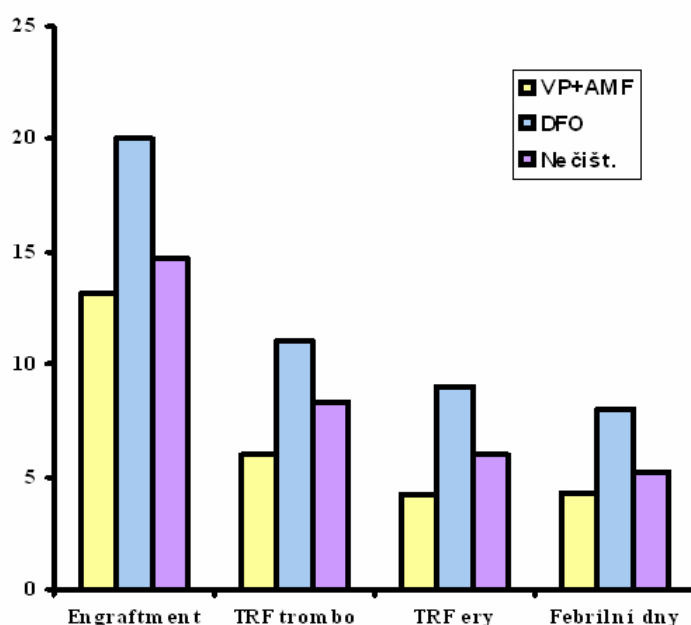
Obrázek 20, Změny počtu celkových jaderných buněk - TNC, CD34+ buněk a buněk tvořících kolonie - CFU-GM (granulocytární a monocytární) a BFU-E (erytroidní řady) po purgingu. Vyjádřeno v procentech původní hodnoty.

| | Diagnóza | Metoda detekce | Detekovaný znak | Infiltrace v době dg. | MRD ve štěpu Před purgingem | MRD ve štěpu po purgingu |
|----|-------------------------|----------------|-------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|
| 1 | NBL, IV.KS | RT-PCR | TH | ++ | Neg | Neg |
| 2 | NBL, IV.KS | FISH RT-PCR | N-myc ampl. TH | ++ | Neg Neg | Neg Neg |
| 3 | NBL, IV.KS | FISH RT-PCR | N-myc ampl. TH | ++ | Neg Neg | Neg Neg |
| 4 | NBL, IV.KS | RT-PCR | TH | ++ | Neg | Neg |
| 5 | NBL, IV.KS | FISH RT-PCR | N-myc ampl. TH | ++ | Neg Neg | Neg Neg |
| 6 | ES, III. KS | RT-PCR | t(11;22) | - | Neg | Neg |
| 7 | ES, IV. KS, relaps | RT-PCR | t(11;22) | n.d. | Neg | Neg |
| 8 | ES, III. KS | RT-PCR | t(11;22) | + | Pos | Pos |
| 9 | ES, III. KS | RT-PCR | t(11;22) | - | Neg | Neg |
| 10 | ES, III. KS | RT-PCR | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 11 | ES, IV.KS | RT-PCR | t(11;22) | - | Neg | Neg |
| 12 | RMS, IV. KS, relaps | RT-PCR | t(2;13) | - | Neg | Neg |
| 13 | NHL, III. KS, relaps | RT-PCR | t(2;5) | + | Pos | Pos |

Tabulka 23, Průkaz nádorových buněk v čištěných štěpech. NBL - neuroblastom, ES - nádor ze skupiny Ewingova sarkomu, RMS - rhabdomyosarkom, NHL - ne Hodgkinův lymfom. Infiltrace kostní dřeně v době stanovení diagnózy - + minimální množství nádorových buněk prokazatelné molekulárně biologickými metodami, ++ - infiltrace kostní dřeně prokazatelná cytologicky, nd - minimální zbytková choroba nebyla vyšetřena

VÝSLEDKY TRANSPLANTACÍ

Vcelku jsme uskutečnili osm transplantací u sedmi pacientů (chlapec s generalizovaným neuroblastomem byl transplantován dvakrát) štěpy čištěnými etoposidem za současné protekce progenitorových buněk amifostinem, přehled údajů o transplantaci udává tabulka 24. Srovnání doby přihojení, potřeby transfuzí erymasy a trombocytů a febrilních dnů u souboru pacientů transplantovaných štěpem čištěným etoposidem s preinkubací amifostinem jsme provedli s kontrolní skupinou padesáti jedna pacientů transplantovaných v letech 2000 a 2001. Výsledky znázorňuje obrázek 21. Současně pro srovnání uvádíme i starší výsledky ex vivo manipulovaných štěpů KD inkubovaných s deferoxaminem, technikou používanou na Klinice dětské hematologie a onkologie u pacientů s vysoce rizikovým neuroblastomem (*Koutecký J. a kol., 1998*).



Obrázek 21, Přihojení (dny), potřeby transfuzí erymasy a trombocytů a febrilních dnů u souboru pacientů transplantovaných štěpem čištěným Vepesidem s preinkubací amifostinem, s kontrolní skupinou transplantovanou nečištěnými štěpy v letech 1999 a 2000 a dvaceti pacientů s neuroblastomem transplantovaných štěpem čištěným deferoxaminem.

Ve sledovaných parametrech nebyl statistický rozdíl (nepárový t-test) mezi kontrolní skupinou a dětmi transplantovanými štěpem čištěným etopozidem s preinkubací amifostinem. Naopak všechny sledované parametry byly příznivější u pacientů transplantovaných čištěným štěpem. Naproti tomu doba přihojení, potřeba substitutce krevními deriváty a časné potransplantační infekce byly významně (nepárový t-test, $p < 0,05$) ovlivněny při purgingu deferoxaminem ve srovnání s kontrolní skupinou. Mezi skupinou pacientů transplantovaných

štěpem čištěným etopozidem s preinkubací amifostinem a pacientů s neuroblastomem transplantovaných štěpem čištěným deferoxaminem byl významný rozdíl (nepárový t-test, $p < 0,05$) pouze v počtu transfuzí erymasy.

Závažnější komplikace se vyskytly pouze u jediného pacienta (pacient č. 1) kde jsme museli pro neobnovující se leukopoezu podat záložní štěp. U tohoto chlapce s generalizovaným neuroblastomem se objevila infekce gastrointestinálního traktu vyvolaná *Clostridium difficile*. U ostatních pacientů byl potransplantační průběh bez vážnějších komplikací.

U zbylých šesti pacientů nebyla megachemoterapie a autologní transplantace čištěným štěpem provedena z různých důvodů. Dva pacienti s vysoce rizikovým neuroblastomem nebyli transplantováni pro snížení srdeční funkce u jednoho pacienta a přítomnost vyzrávajícího neuroblastomu gr. I u druhého v biopsii kostních metastáz, pro který byla zvolena biodiferenciační léčba retinoidy. U pacienta s recidivujícím velkobuněčným anaplastickým Ki+ nehodgkinským lymfomem jsme před transplantací prokázali relaps onemocnění a chlapec byl po další chemoterapii transplantován alogenně od nepříbuzného dárce. Po transplantaci žije v remisi 48 měsíců. Zbývající pacienti nebyli transplantováni pro odmítnutí zákonných zástupců (1 pacient) a druhý chlapec s ES byl transplantován nečištěným štěpem odebraným v druhé době pro přetrvávající pozitivitu štěpu po ex vivo purgingu.

Výsledky lze tedy uzavřít, že purgingem prováděným etopozidem s preinkubací amifostinem lze získat štěp zajišťující bezpečné přihojení. Podmínkou je získání dostatečného množství hematopoetických progenitorových buněk. Množství CD34+ buněk před manipulací se štěpem by mělo být nejméně 6×10^6 , tedy dvojnásobně vyšší než je nezbytné pro zajištění dobrého přihojení po transplantaci nemanipulovaným štěpem.

| <i>Pac. č.</i> | <i>Věk při AHSCT</i> | <i>Diagnóza</i> | <i>Stav před AHSCT</i> | <i>Engraftment</i> | <i>TRF trombo</i> | <i>TRF ery</i> | <i>Počet febrilních dní</i> | <i>Komplikace</i> | <i>CFU-GM na kg x 10⁴</i> | <i>CD34+ bb. na kg x 10⁶</i> |
|----------------|----------------------|--|------------------------|--------------------|-------------------|----------------|-----------------------------|--|--------------------------------------|---|
| 2 | 1 r / 6 m | NBL (meta do skeletu a KD) | 1.VGPR | 21 * | 10 | 7 | 10 | sepsse gr.II-III neutrop.enterocolitis mukozitida gr.II | 52,13 | 3,34 |
| 5 | 1 r / 5 m | NBL (meta do skeletu, KD, jater, retroperitoneálních lymfatických uzlin) | 1.CR | 13 | 4 | 5 | 3 | sepsse gr. II, mukozitida gr.II, kožní reakce na engraftment | 10,70 | 4,61 |
| 6 | 5 r / 7 m | ES obl. L5-S1 (inoperabilní) | 1. VGPR | 11 | 2 | 2 | 4 | sepsse gr.III, mukozitida gr.II, exantém gr. II, SIADH | 142,96 | 14,02 |
| 7 | 10 r / 6 m | ES/PNET relaps (meta do plic) | DP | 11 | 3 | 4 | 0 | mukozitida gr.I | 134,31 | 6,62 |
| 10 | 15 r / 3 m | ES/PNET (pánev) | 1.VGPR | 11 | 3 | 0 | 5 | mukozitida gr.III | 74,99 | 1,98 |
| 11 | 16 r / 3 m | PNET hrudní stěny, nádorové buňky ve výpotku | 1.CR | 15 | 11 | 3 | 11 | sepsse gr. II, mukozitida gr. II | 48,10 | 4,46 |
| 12 | 9 r / 4 m | alv. RMS (relaps) | 2.CR | 12 | 14 | 7 | 4 | hepatopatie gr.III, sepsse gr.II, mukozitida gr.II | 82,90 | 4,20 |
| Průměr s.d. | / | / | / | 13,42 3,37 | 6,71 4,46 | 4,0 2,39 | 5,26 3,61 | | | |

Tabulka 24, Přehled klinických údajů o transplantacích provedených čištěnými štěpy, znovu uvedeny i charakteristiky čištěných štěpů.

*** - engraftment 21 den (10 dnů po podání „back up“ – záložního štěpu) podaného pro závažnou infekci gastrointestinálního traktu a trvající neutropenii. CR – kompletní remise, VGPR – velmi dobrá parciální remise, DP – progrese onemocnění**

ZÁVĚRY

Experimentální farmakologický purging

- 1, Mafosfamid i etopozid významně redukovaly počty koloniformních jednotek CFU-GM a BFU-E, změny počtu jaderných buněk a CD34+ buněk nebyly významné (*nález potvrzuje nutnost kultivačního vyšetření všech ex vivo manipulovaných štěpů !*)
- 2, Experimenty prokázaly, že použití etoposidu v koncentraci 40 µg/ml s patnáctiminutovou preinkubací ethyolem v koncentraci 4 mg/ml neredukuje neúnosně počet buněk obnovujících krvetvorbu a redukuje počet nádorových buněk, které mohou štěp kontaminovat. Obdobný efekt má purging mafosfamidem v dávce 150 µg/ml, ten jsme však nemohli použít ke klinickému purgingu pro obtíže s dodávkami od výrobce léku.
- 3, Ochranný vliv amifostinu na hematopoetické kolonie nedosáhl statistické významnosti ($p < 0,1$; t-test)
- 4, V žádném experimentu jsme neprokázali ochranný vliv amifostinu na buňky nádorových linií ES a neuroblastomu
- 5, Pozorovali jsme nesignifikantní trend ($p < 0,1$; t-test) k potenciaci protinádorového účinku mafosfamidů amifostinem u nádorových linií neuroblastomu i ES

Klinický farmakologický purging

- 1, Čištěním štěpu PBSC prováděným etopozidem s preinkubací buněk štěpu amifostinem lze získat štěp zajišťující bezpečné přihojení. Vždy však ponecháváme část štěpu nečištěnou, jako zálohu pro případ selhání čištěného štěpu.
- 2, Srovnáním s kontrolní skupinou pacientů (transplantovaní v letech 2000-2001) nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v době přihojení, potřeby transfuzí erymasy a trombocytů ani v počtu febrilních dnů.

MRD v autologních štěpech PBSC u pacientů s ES

- 1, Prokazujeme kontaminaci štěpů PBSC ve shodě s literárními údaji
- 2, Častěji jsme prokázali kontaminaci štěpů PBSC u pacientů s primárně generalizovaným ES (30 % vs. 4,5 %), rozdíl nicméně nedosáhl statistické významnosti ($p = 0,06$; NS, t-test).
- 3, Kontaminace štěpu se jeví nepříznivým prognostickým znakem (přenos recidivy při transplantaci, známka rezistence nádoru)

LITERATURA

1. Almici, C., Manoni, L., Carlo-Stella, C. a kol., Natural killer cell regeneration after transplantation with mafosfamide purged autologous bone marrow, *Bone Marrow Transplant*, 16, 1995, s. 95-101
2. Allen Greave J.L., De Alarcon, P.A., Sato, Y. a kol., Miliary pulmonary neuroblastoma a risk of autologous bone marrow transplantation?, *Cancer*, 62, 1988, s. 2125-7
3. Armengol, G. Tarkkanen M., Virolainen, M. a kol., Recurrent gains of 1q, 8 and 12 in the Ewing family of tumours by comparative genomic hybridisation, *Br J Cancer*, 75, 1997, s. 1403-7
4. Athale, U.H., Shurtleff, S.A., Jenkins, J.J. a kol., Use of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosis and staging of alveolar rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma family of tumors and desmoplastic small round cell tumour, *J Ped Hematol Oncol*, 23, 2001, s. 99-104
5. Avigad, S., Cohen, I.J., Zilberstein, J. a kol., The predictive potential of molecular detection in the non metastatic Ewing Family of Tumors, *Cancer*, 100, 2004, s. 1053-8
6. Balzarotti, M., Grisanti, S., Granzow, K. a kol., Ex vivo manipulation of hematopoietic stem cells for transplantation, the potential role of amifostine, *Sem Oncol*, 26, Suppl.7, 1999, s. 66-71
7. Bedrnicek, J., Vicha, A., Jarosova, M. a kol., Characterization of drug-resistant neuroblastoma cell lines by comparative genomic hybridization, *Neoplasma*, 52, 2005, s. 415-9
8. Blystad, A.K., Holte, H., Kvaloy, S. a kol., Infused CD34+ cell dose, but not tumour cell content of peripheral blood progenitor cell grafts, predicts clinical outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma grade 3 with high dose chemotherapy, *Br J Haematol*, 125, 2004, s. 605-612
9. Brenner, M.K., Rill, D.R., Holladay, M.S. a kol., Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation, *Lancet* 341, 1993, s. 85-86
10. Brugger, W., Bross, K.J., Glatt, M., a kol., Mobilisation of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors, *Blood* 83, 1994, s. 636-40
11. Bullock, G., Tang, C., Tourkina, E. a kol., Effect of combined treatment with interleukin 3 and interleukin 6 on 4-hydroperoxycyclophosphamide-induced programmed cell death or apoptosis in human myeloid leukemia cells, *Exp Hematol*, 21, 1993, s. 1640-7
12. Burchill, S.A., Lewis, I.J., Selby, P.J., Improved methods using the reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect tumour cells, *Br J Cancer*, 79, 1999, s. 971-7

13. Burchill, S.A., Selby, P.J., Molecular detection of low level disease in patients with cancer, *J Pathol*, 190, 2000, s. 6-14
14. Cagnoni, P.J., Jones, R.J., Bearman, S.I., a kol., Use of amifostine in bone marrow purging, *Semin Oncol*, 23 (Suppl 8), 1996, s. 44-8
15. Capizzi, R.L., Oster, W., Protection of normal tissue from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine, *Clinical Experiences*, *Eur J Cancer*, 31A, Suppl. 1, 1995, s. S8-S13
16. Carlo-Stella, C., Mangoni, L., Almici, C. a kol., Differential sensitivity of adherent CFU-blast, CFU-mix, BFU-E and CFU-GM to mafosfamide: implications for adjusted dose purging in autologous bone marrow transplantation, *Exp Hematol*, 20, 1992, s. 328-35
17. Cooper, B.W., Moss, T.J., Ross, A.A. a kol., Occult tumor contamination of hematopoietic stem cell products does not affect clinical outcome of autologous transplantation in patients with metastatic breast cancer, *J Clin Oncol*, 16, 1998, s. 3509-17
18. Corrias, M.V., Faulkner, L.B., Pistorio, A. a kol., Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood by different techniques: accuracy and relationship with clinical features of patients, *Clin Cancer Res*, 10, 2004, s. 7978-88
19. Cullinane C.J., Burchill S.A., Primitive neuroectodermal tumours, In: Cullinane, C.J, Burchill, S.A, Squire, J.A., O'Leary, J.J. and Lewis, I.J. (eds.), *Molecular Biology and Pathology of Paediatric Cancer*, Oxford University Press Inc, New York, 2003, s. 171-185
20. Deisseroth, A.B., Zu, Z., Claxton, D. a kol., Genetic marking shows that Ph⁺ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow transplantation in CML, *Blood*, 83, 1994, s.3068-76
21. Delattre, O., Zucman, J., Melot, T. a kol., The Ewing family of tumors - a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts, *N Engl J Med*, 331, 1994, s. 294-9
22. Douay, L., Hu, C., Giarratana, M.C. a kol., Amifostine (WR-2721) protects normal hematopoietic stem cells against cyclophosphamide derivatives toxicity without compromising their antileukaemic effects, *Eur J Cancer*, 31A (Suppl.1), 1995 (a), s. S14-S16
23. Douay, L., Hu, C., Giarratana, M.C. a kol., Amifostine improves the antileukemic therapeutic index of mafosfamide: implications for bone marrow purging, *Blood*, 86, 1995 (b), s. 2849-55
24. Downing, J.R., Head, D.R., Parham, D.M. a kol., Detection of the t(11;22)(q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction, *Am J Pathol*, 143, 1993, s. 1294-300

25. Eckschlager, T., Bartůňková, J., Průtoková cytometrie v klinické praxi, Grada Publishing, Praha, 1999
26. Eckschlager, T., McClain, K., Comparison of fluorescent in situ hybridization (FISH) and the polymerase chain reaction (PCR) for detection of residual neuroblastoma cells, *Neoplasma*, 43, 1996, s. 301-3
27. Fagnou, C., Michon, J., Peter, M. a kol., Presence of tumor cells in bone marrow but not in blood is associated with adverse prognosis in patients with Ewing's tumor. *Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique, J Clin Oncol*, 16, 1998, s. 1707-11
28. Faulkner, L.B., Garaventa, A., Paoli, A. a kol., In vivo cytoreduction studies and cell sorting enhance tumor cell detection in high-risk neuroblastoma patients: Implications for leukapheresis strategies, *J Clin Oncol*, 18, 2000, s. 3829-36
29. Fischmeister, G., Zoubek, A., Jugovic, D. a kol., Low incidence of molecular evidence for tumour in PBPC harvests from patients with high risk Ewing tumors, *Bone Marrow Transplant*, 24, 1999, s. 405-9
30. Fouillard, L., Laporte, J.P., Labopin, M. a kol., Autologous stem cell transplantation for non-Hodgkin's lymphomas: the role of graft purging and radiotherapy posttransplantation - results of retrospective analysis on 120 patients autografted in a single institution, *J Clin Oncol*, 16, 1998, s.2803-16
31. Ginsberg, J.P., de Alava, E., Ladanyi, E. a kol., EWS-FLI1 a EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma, *J Clin Oncol*, 17, 1999, s. 1809-14
32. Gorin, N.C., Aegerter, P., Auvert B. a kol., Autologous bone marrow transplantation for acute myelocytic leukemia in first remission. An European survey of the role of marrow purging, *Blood*, 75, 1990, s.1606-14
33. Gorin, N.C., Labopin, M., Meloni, G. a kol., Autologous bone marrow transplantation for acute myeloblastic leukemia in Europe: further evidence of the role of marrow purging by mafosfamide. European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT), *Leukemia*, 5, 1991, s. 896-904.
34. Gorin, N.C., Autologous stem cell transplantation in acute myelocytic leukemia, a review, *Blood*, 92, 1998, 1073-86
35. Gorin, N.C., Lanolin, M., Laporte, J.P. a kol., Importance of marrow dose on posttransplant outcome in acute leukemia: models derived from patients autografted with mafosfamide purged marrow at a single institution, *Exp Hematol*, 27, 1999, s. 1822-30
36. Grdina, D.J., Shigematsu, N., Dale P. a kol., Thiol and disulfide metabolites of the radiation protector and potential chemopreventive agent WR-2721 are linked to both its anti-cytotoxic and anti-mutagenic mechanisms of action, *Carcinogenesis*, 16, 1995, s. 767-74
37. Gribben, J.G., Neuberg, D., Freedman, A.S. a kol., Detection by PCR of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after

- autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma, *Blood*, 81, 1993, s. 3449-57
38. Gulati, S.C., Acaba, L., Yahalom, Y. a kol., Autologous bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia using 4-hydroperoxycyclophosphamide and VP-16 purged bone marrow, *Bone Marrow Transplant*, 10, 1992, s. 129-34
 39. Hagenbeek, A., Minimal residual disease in leukemia: state of the art 1991, *Leukemia*, 6, Suppl. 2, 1992, s. 12-16
 40. Handretinger, R., Leung, W., Ihm, K. a kol., Tumour cell contamination of autologous stem cell grafts in high-risk neuroblastoma, the good news?, *Br J Cancer*, 88, 2003, s. 1874-7
 41. Hattinger, C.M., Rumpler, S., Strehl, S. a kol., Prognostic impact of deletions at 1p36 and numerical aberrations in Ewing tumors, *Genes Chromosomes Cancer*, 24, 1999, s. 243-54
 42. Helman, L.J., Malkin, D., *Molecular Biology of Childhood Cancers*, In: De Vita, Jr., V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. (eds.), *Cancer, Principles and Practice of Oncology* (7th Ed.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2005, s. 1889-98
 43. Cheung, I.Y., Lo Piccolo, M.S., Kushner, B.H. a kol., Quantitation of GD2 synthase mRNA by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction: clinical utility in evaluating adjuvant therapy in neuroblastoma, *J Clin Oncol*, 21, 2003, s. 1087-93
 44. Izraeli, S., Pflleiderer C., Lion, T., Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood, *Nucleic Acid Res*, 19, 1991, s. 6051-5
 45. Janossy, G., Campana, D., Amlot P.L., Leukaemia and lymphoma treatment with autologous bone marrow transplantation: preclinical studies, *Cancer Detect Prev*, 12, 1988, s. 597-604
 46. Kaneko, Y., Yoshida, K., Handa, M. a kol., Fusion of an ETS-family gene, E1AF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy, *Genes Chromosomes Cancer*, 15, 1996, s. 115-21
 47. Kaplan, E.L., Meier, P., Nonparametric estimation from incomplete observations, *J Am Stat Assoc*, 53, 1958, s. 457-81
 48. Kavan, P., Staňková, J., Koutecký, J. a kol., Ex-vivo čištění hematopoetických kmenových buněk deferoxaminem, *Transfúze dnes*, 18, 1996, s. 3-6
 49. Kavan, P., Transplantace hematopoetických kmenových buněk u lymfomů a solidních nádorů u dětí, In: Vaňásek, J., Starý, J., Kavan, P., Vaňásek jr., J. (eds.), *Transplantace kostní dřeně*, Galén, Praha, 1996, s. 151-65
 50. Klener, P., *Protinádorová chemoterapie*, Galén, Praha, 1996

51. Kluin-Nelemans, H.C., Martens, A.C., Lowenberg, B. a kol., No preferential sensitivity of clonogenic AML cells to ASTA-Z-7557, *Leuk Res*, 8, 1984, s. 723-8
52. Kodet, R., Patologie nádorů v dětském a dospívajícím věku ve světle nových diagnostických postupů, *Klinická onkologie*, 16, Suppl. 1, 2003, s. 103-6
53. Koutecký, J., Autologní transplantace ex vivo čištěné kostní dřeně u dětí s high risk neuroblastomem, *Závěrečná zpráva grantu IGA MZ ČR*, Praha 1998
54. Koutecký J., Specifika nádorů dětského věku a mladistvých, In: Koutecký, J., Kabíčková, E., Starý, J. (eds.), *Dětská onkologie pro praxi*, Triton, Praha, 2002, s. 17-8
55. Koutecký J., Epidemiologie nádorů dětí a mladistvých, In: Koutecký, J., Kabíčková, E., Starý, J. (eds.), *Dětská onkologie pro praxi*, Triton, Praha, 2002, s. 19-21
56. Kramer, B., Makrynika, V., Bradstock K., Effects of mafosfamide on the clonogenic cells in precursor B acute lymphoblastic leukemia, significance for ex vivo purging of bone marrow. *Prog Clin Biol Res*, 377, 1992, 41-7
57. Kushner, B.H., Meyers, P.A., How effective is dose-intensive/ myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/pPNET metastatic to bone or bone marrow?. The Memorial Sloan-Kettering experience and literature review, *J Clin Oncol*, 19, 2001, s. 870-80
58. Laporte, J.P., Douay, L., Lopez, M. a kol., One hundred twenty-five adult patients with primary acute leukemia autografted with marrow purged by mafosfamide: a 10-year single institution experience, *Blood*, 84, 1994, s. 3810-18
59. Lemoli, R.M., Gulati, S.C., In vitro cytotoxicity of VP-16-213 and nitrogen mustard: Agonistic on tumor cells but not on normal human bone marrow progenitors, *Exp Hematol*, 18, 1990, s. 1008-12
60. Lemoli, R.M., Curti, A., Tura, S., Negative selection of autologous peripheral blood stem cells, *Bailliere's Clinical Hematology*, 12, 1999, s. 57-69
61. Leung, W., Chen, A.R., Klann, R.C. a kol., Frequent detection of tumor cells in hematopoietic grafts in neuroblastoma and Ewing's sarcoma, *Bone Marrow Transplant*, 22, 1998, s. 971-9
62. Lewis, I.J., An introduction to children's cancer and the patients pathway, In: Cullinane, C.J., Burchill, S.A, Squire, J.A., O'Leary, J.J. and Lewis, I.J. (eds.), *Molecular Biology and Pathology of Paediatric Cancer*, Oxford University Press Inc, New York, 2003, s. 1-14
63. List, A.F., Heaton, R., Gibson-Glinsmann B. a kol., Amifostine protects primitive hematopoietic progenitors against chemotherapy cytotoxicity, *Sem Oncol*, 23, 1996, s. 58-63
64. Lode, H.N., Handretinger, R., Schuermann, U. a kol., Detection of neuroblastoma cells in CD34+ selected peripheral stem cells using a combination of tyrosine

hydroxylase nested RT-PCR and anti-ganglioside GD₂ immunocytochemistry, *Eur J Cancer*, 33, 1997, s. 2024-30

65. Lo Piccolo, M.S., Cheung, N.K. a Cheung, I.Y., GD2 synthase: a new molecular marker for detecting neuroblastoma, *Cancer*, 92, 2001, s.924-31
66. Mastrangelo T., Modena, P., Tornielli, S. a kol., A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor, *Oncogene*, 19, 2000, s. 3799-104
67. Matthay, K.K., O'Leary, M.C., Ramsay, N.K. a kol., Role of myeloablative therapy in improved outcome for high risk neuroblastoma: review of recent Children's Cancer Group results, *Eur J Cancer*, 31, 1995, s. 572-5
68. Maurici, D., Perez-Atayde, A., Grier, H.E. a kol., Frequency and implications of chromosome 8 and 12 gains in Ewing sarcoma, *Cancer Genet Cytogenet*, 100, 1998, s.106-10
69. May, W.A., Gishizky, M.L., Lessnick, S.L. a kol., Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1993, s. 5752-6
70. Meier, V.S., Kuhne, T., Jundt, G. a kol., Molecular diagnosis of Ewing tumors: improved detection of EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric transcripts and rapid determination of exon combinations, *Diagn Mol Pathol*, 7, 1998, s. 29-35
71. Meyers, P.A., Krailo, M.D., Ladanyi, M. a kol., High-dose melphalan, etoposide, total body irradiation and autologous stem cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis, *J Clin Oncol*, 19, 2001, s. 2812-20
72. Miller, C.B., Rowlings, P.A., Zhang, M.J. a kol., The effect of graft purging with 4-hydroperoxycyclophosphamide in autologous bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia, *Exp Hematol*, 29, 2001, s. 1336-46
73. Montanaro, L., Pension, A., Trere, D. a kol., Detection of EWS chimeric transcripts by nested RT-PCR to allow reinfusion of uncontaminated peripheral blood stem cell in high-risk Ewing's tumor in childhood, *Haematologica*, 84, 1999, s.1012-5
74. Moss, T.J., Clinical relevance of minimal residual cancer in patients with solid malignancies, *Cancer Metastasis Rev*, 18, 1999, s. 91-100
75. Moss, T.J., Sanders, D.G., Lasky, L.C. a kol., Contamination of peripheral blood stem cell harvests by circulating neuroblastoma cells, *Blood*, 9, 1990, s. 1879-83
76. Motta, M.R., Mangianti, S., Rizzi, S. a kol., Pharmacological purging of minimal residual disease from peripheral blood stem cell collections of acute myeloblastic leukemia patients: preclinical studies, *Exp Hematol*, 25, 1997, s. 1261-9
77. Nagai, J., Ishida, Y., Koga, N. a kol., A new sensitive and specific combination of CD81/CD56/CD45 monoclonal antibodies for detecting circulating neuroblastoma

cells in peripheral blood using flow cytometry, *J Pediatr Hematol Oncol*, 22, 2000, s. 20-6

78. Noga, S.J., Graft engineering, *Semin Oncol*, 27, 2000, s. 15-21
79. Olivieri, A., Poloni, A., Montanami, M. a kol., Pharmacologic bone marrow purging: Is there any place for etoposide?, In vitro comparison with mafosfamide, *J Hematotherapy*, 6, 1997, s. 137-144
80. O'Regan, S., Diebler, M.S., Meunier, M.F. a kol., Ewing's sarcoma cell line showing some, but not all, of the traits of a cholinergic neuron, *J Neurochem*, 64, 1995, s. 69-76
81. Pedrazzoli, P., Battaglia, M., Da Prada, G.A. a kol., Role of tumor cells contaminating the graft in breast cancer recurrence after high-dose chemotherapy, *Bone Marrow Transplant*, 20, 1997, s. 167-9
82. Peter, M., Gilbert, E., Delattre, O., A multiplex real-time PCR assay for the detection of gene fusions observed in solid tumors, *Lab Invest*, 81, 2001, s. 905-12
83. Peters, G.J., van der Vijgh, W.J.F., Protection of normal tissue from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by amifostine (WR-2721): preclinical aspects, *Eur J Cancer*, 31A, Suppl. 1, 1995, s. S1-S7
84. Picci, P., Böhling, T., Bacci, G. a kol., Chemotherapy induced tumor necrosis as a prognostic factor in localised Ewing's sarcoma of the extremities, *J Clin Oncol*, 15, 1997, s. 1553-9
85. Pizzo, P.A., Poplack, D.G., Principles and Practice of Pediatric Oncology, 5th Ed, Lippincott, Philadelphia, 1997
86. Reynolds, C.P., Detection and treatment of minimal residual disease in high-risk neuroblastoma, *Pediatr Transplantation*, 8 (Suppl. 5), 2004, s. 56-66
87. Riccardi R., Lasorella, A., Mastrangelo, R., Principles of cancer chemotherapy in children, In: Voute, P.A., Kalifa, C., Barrett, A. (eds.), *Cancer in children, Clinical Management* (4th ed.), Oxford University Press, Oxford - New York - Tokyo, 1998, s. 44-59
88. Rill, D.R., Santana, V.M., Roberts, W.M. a kol., Direct demonstration that autologous bone marrow transplantation for solid tumors can return a multiplicity of tumorigenic cells, *Blood*, 84, 1994, s.380-3
89. Rizzoli, V., Carlo-Stella, C., Stem cell purging: an intriguing dilemma, *Exp Hematol*, 23, 1995, s.296-302
90. Rizzoli, V., Carlo-Stella, C., Stem cell manipulation: why and how performing peripheral blood progenitor cell purging, *Crit Rev Oncol/Hematol*, 26, 1997, s.101-15

91. Robinson L., General principles of the epidemiology of childhood cancer, in: Pizzo, Poplack, Principles and Practice of Pediatric Oncology, 3-11, 2nd edition, J.B. Lippincott, USA, 1993
92. Rodrigues-Galindo, C., Spunt, S.L., Pappo, A.S., Treatment of Ewing sarcoma family of tumors: Current status and outlook for the future, *Med Pediatr Oncol*, 40, 2003, 276-87
93. Rowley, S.D., Jones, R.J., Piantadosi, S. a kol., Efficacy of ex vivo purging for autologous bone marrow transplantation in the treatment of acute non-lymphoblastic leukemia, *Blood*, 74, 1989, s. 501-6
94. Sandberg, A.A., Bridge, J.A., Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumours, *Cancer Genet Cytogenet*, 123, 2001, s. 1-26
95. Seeger, R.C., Villablanca, J.G., Matthay, K.K., Intensive chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for poor prognosis neuroblastoma, v Evans A.D., D'Angio, G.J., Knudson, A.G. (eds.), *Advances in Neuroblastoma Research 3*, New York, Wiley-Liss, 1991, s. 527-33
96. Sharkis, S.J., Santos, G.W., Colwin, M., Elimination of acute myelogenous leukemia cells from marrow and tumor suspension in the rat with 4-hydroperoxycyclophosphamide, *Blood* 55, 1980, 521-6
97. Sharp, J.G., Joshi, S.S., Armitage, J.O. a kol., Significance of detection of occult non-Hodgkin's lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by a culture technique, *Blood*, 79, 1992, s. 1074-80
98. Shimoni, A., Körbling M., Tumor cell contamination in re-infused stem cell autografts: does it have clinical significance?, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 41, 2002, s. 241-250
99. Schleiermacher, G., Peter, M., Oberlin, O. a kol., Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastases and circulating tumor cells in localised Ewing tumor, *J Clin Oncol*, 21, 2003, s. 85-91
100. Siena, S., Bregni, M., Brando, M. a kol., Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients, *Blood*, 77, 1991, s. 400-9
101. Shpall, E.J., Stemmer, S.M., Hami, L. a kol., Amifostine (WR-2721) shortens the engraftment period of 4-HC-purged bone marrow in breast cancer patients receiving high dose chemotherapy with autologous bone marrow support, *Blood*, 83, 1994, s. 3132-7
102. Stark, B., Mor, C., Jeison, M. a kol., Additional chromosome 1q aberrations and der(16)t(1;16), correlation to the phenotypic expression and clinical behavior of the Ewing family of tumors, *J Neurooncol*, 31, 1997, s. 3-8
103. Starý, J., Akutní lymfoblastická leukemie v dětském věku, In: Mayer, J., Starý, J. (eds.), *Leukemie*, Grada Publishing, spol. s r.o., Praha, 2002, s. 279-299

104. Stiff, P.J., Koester, A.R., In vitro chemoseparation of leukemic cells from murine bone marrow using VP-16-213, importance of stem cell assays, *Exp Hematol*, 15, 1987, s. 263-8
105. Sugimoto, T., Umezawa, A., Hata J.I., Neurogenic potential of Ewing's sarcoma cells, *Virchows Arch*, 430, 1997, s. 41-6
106. Sumerauer, D., Matejckova, S., Hrubá, A. a kol., Manipulace se štěpy hematopoetických progenitorových buněk a jejich použití v klinické praxi, *Čas Lék Česk*, 141, 2002, s. 411-6
107. Sumerauer, D., Vícha, A., Kučerová, H. a kol., Detection of minimal bone marrow infiltration in patients with localised and metastatic Ewing sarcoma using RT-PCR, *Folia Biologica (Praha)*, 47, 2001, s. 206-10
108. Tarkkanen, M., Kiuru-Kuhlefelt, S., Blomqvist, C. a kol., Clinical correlations of genetic changes by comparative genomic hybridisation in Ewing sarcoma and related tumors, *Cancer Genet Cytogenet*, 114, 1999, s. 35-41
109. Thomson, B., Hawkins, D., Felgenhauer J. a kol., RT-PCR evaluation of peripheral blood, bone marrow, and peripheral blood stem cells in children and adolescents undergoing VACIME chemotherapy for Ewing's sarcoma and rhabdomyosarcoma, *Bone Marrow Transplant*, 24, 1999, s. 527-33
110. Tchirkov, A., Kanold, J., Combaret, V. a kol., Immunological and molecular detection of tumor contamination in leukapheresis products from children with disseminated neuroblastoma: implication for evaluation of tumor cell depletion after CD 34 selection, *Bone Marrow Transplant*, 23, 1999, 229-230
111. Van Engeland, M., Nieland, L., Ramaekers, F. a kol., Annexin V affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserin exposure, *Cytometry*, 31, 1998, s. 1-12
112. West, D.C., Ewing sarcoma family of tumors, *Curr Opin Oncol*, 12, 2000, s. 323-9
113. Willeke, F., Sturm, J.W., Minimal residual disease in soft tissue sarcomas, *Semin Surg Oncol*, 20, 2001, s. 294-303
114. Yaniv, I., Cohen, I.J., Stein, J. a kol., Tumor cells are present in stem cell harvests of Ewing's sarcoma patients and their persistence following transplantation is associated with relapse, *Pediatr Blood Cancer*, 42, 2004, s. 404-9
115. Zoubek, A., Pfliegerer, C., Salzer-Kuntschik, M. a kol., Variability of EWS chimaeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data, *Br J Cancer*, 70, 1994, s. 908-13
116. Zoubek, A., Ladenstein, R., Windhager, R. a kol., Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR: a preliminary evaluation, *Int J Cancer*, 79, 1998, s. 56-60

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Publikace v časopisech s IF

Kučerová H., Stejskalová E., Vicha A., Tichý M., Cháňová M., **Sumerauer D.**, Koutecký J., Eckschlager T., Gene aberrations in childhood brain tumors, *Folia Biologica (Praha)*, 46(5):187-190, 2000

Sumerauer D., Vicha A., Kučerová H., Kodet R., Housková J., Bedrníček J., Eckschlager T., Detection of minimal bone marrow infiltration in patients with localized and metastatic Ewing's sarcoma using RT-PCR, *Folia Biologica (Praha)*, 47(6): 206-210, 2001

Kučerová H., **Sumerauer D.**, Drahokoupilová E., Pisková M., Bedrníček J., Eckschlager T., Significance of P-glycoprotein expression in childhood malignant tumors, *Neoplasma*, 48(6):472-478, 2001

Vicha A., Stejskalova E., **Sumerauer D.**, Kodet R., Malis J., Kucerova H., Bedrnicek J., Koutecky J., Eckschlager T., Malignant peripheral primitive tumor of the kidney, *Cancer Genet Cytogenet*, 139 (1), 67-70, 2002

Krutilkova V., Trkova M., Fleitz J., Gregor V., Novotna K., Krepelova A., **Sumerauer D.**, Kodet R., Siruckova S., Plevova P., Bendova S., Hedvicakova P., Foreman N.K., Sedlacek Z., Identification of five new families strengthens the link between childhood choroid plexus carcinoma and germline TP53 mutations, *Eur J Cancer*, 41(11):1597-603, 2005

Krskova L., Mrhalova M., **Sumerauer D.**, Kodet R., Rhabdomyosarcoma: molecular diagnostics of patients classified by morphology and immunohistochemistry with emphasis on bone marrow and purged peripheral blood progenitor cells involvement, *Virchows Arch*, 448(4): 449-458, 2006

Kabickova E., **Sumerauer D.**, Cumlivska E., Drahokoupilova E., Nekolna M., Chanova M., Hladikova M., Kodet R., Belohlavek O., Comparison of (18)F-FDG-PET and standard procedures for the pretreatment staging of children and adolescents with Hodgkin's disease, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, DOI 10.1007/s00259-005-0019-9 (Epub ahead of print), 2006

Sumerauer, D., Vicha A., Zuntova A., Stejskalova E., Krskova L., Kabickova E., Kodet R., Eckschlager T., Teratoma in an adolescent with malignant transformation into embryonal rhabdomyosarcoma: case report, *J Pediatr Hematol Oncol*, přijato k publikaci 2006

Publikace v recenzovaných časopisech

Vicha A., **Sumerauer D.**, Eckschlager T., Koutecký J., Kavan P., Šmelhaus V., Staňková J., Gajdoš P., Stejskalová E., Detekce minimální reziduální nemoci u Ewingova sarkomu pomocí RT-PCR, *Čas Lék čes*, 139, 685-689, 2000

Eckschlager T., Vojáčková J., **Sumerauer D.**, Válková J., Koutecký J., Odběry periferních hematopoetických buněk u malých dětí – osmileté zkušenosti kliniky dětské onkologie, *Transfúz. Hematol dnes*, 8, 30-34, 2002

Sumerauer D., Matějčková Š., Hrubá A., Eckschlager T., Manipulace se štěpy hematopoetických progenitorových buněk a jejich použití v klinické praxi, Čas Lék čes, 141(13), 411-416, 2002

Zuntová A., **Sumerauer D.**, Teslík L., Koutecký J., Dysgerminomy ovarií u dětí a dospívajících, Čas Lék čes, 143(4): 246–252, 2004

Zuntová A., **Sumerauer D.**, Teslík L., Kabíčková E., Koutecký J., Smíšené germinální nádory ovaria u dětí a dospívajících – retrospektivní klinicko-patologická studie, Čes.-slov. Patol., 40 (3), 92-101, 2004

Publikovaná abstrakta – výběr

Matějčková Š., Hrubá A., **Sumerauer D.**, Eckschlager T., Kavan P., Kobyłka P., Farmacological purging of autologous grafts: protection of hemopoietic stem cells using amifostine in children suffering from neuroblastoma and Ewing sarcoma, 27th Annual Meeting EBMT, Maastricht 25-28.3.2001, publikovaný abstrakt, Bone Marrow Transplant, 2001, 27: Supplement 1, S237

Sumerauer D., Matějčková Š., Hrubá A., Eckschlager T., Kavan P., Kobyłka P., Farmacological purging of autologous grafts: molecular detection of occult tumor cells present in bone marrow harvests and apheresis products, 27th Annual Meeting EBMT, Maastricht 25-28.3.2001, publikovaný abstrakt, Bone Marrow Transplant, 2001, 27: Supplement 1, S239-240

Sumerauer D., Kodet R, Jašínská J Vicha A., Detekce minimální infiltrace kostní dřeně u Ewingových sarkomů - je přínosem pro další postup?, sborník abstrakt, XXV. Brněnské onkologické dny, Brno 30.5.-1.6.2001, str. 274-275, poster obdržel Cenu Masarykovy onkologické nadace za nejlepší poster BOD

Hrubá A., Matějčková Š., **Sumerauer D.**, Eckschlager T., Kavan P., Čištění autologních hemopoetických štěpů u dětí s neuroblastomem a Ewingovým sarkomem, sborník abstrakt, XV. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, Olomouc 7.-9.6.2001, str.12

Sumerauer D., Vicha A., Krsková L., Kodet R., Eckschlager T., Kontaminace štěpů určených k autologním transplantacím, sborník abstrakt, XXVI. Brněnské onkologické dny, Brno 2002, str. 26

Eckschlager T., **Sumerauer D.**, Vicha A., Bedrnicek J., In vivo purging in Ewing sarcoma family of tumors – important information for apheresis timing, ESFH 14th Congress, sborník abstrakt, HK CREDIT s.r.o., Praha/Hradec Králové, 2003, s. 13

Sumerauer D., Vicha A., Kabickova E., Matejckova S., Hrubá A., Eckschlager T., Low frequency of PBPC harvest contamination with tumor cells in Ewing sarcoma patients treated with VIDE induction regimen, 30th Annual Meeting EBMT, Barcelona, 28.-31.3.2004, publikovaný abstrakt, Bone Marrow Transplant, 2004, 33: Supplement 1, S165-166

Kabickova E., **Sumerauer D.**, Chanova M., Prausova J., Kobyłka P., Smelhaus V., Koutecky J., Use of amifostine as a chemoprotectant during high dose chemotherapy plus autologous blood stem cell transplantation for children and adolescents with solid tumor, 30th Annual Meeting EBMT, Barcelona, 28.-31.3.2004, publikovaný abstrakt, Bone Marrow Transplant, 2004, 33: Supplement 1, S64

Příloha 1,

Sumerauer D., Vicha A., Kučerová H., Kodet R., Housková J., Bedrníček J., Eckschlager T., Detection of minimal bone marrow infiltration in patients with localized and metastatic Ewing sarcoma using RT-PCR, Folia Biologica (Praha), 47(6): 206-210, 2001

Detection of Minimal Bone Marrow Infiltration in Patients with Localized and Metastatic Ewing Sarcoma Using RT-PCR

(Ewing sarcoma / micrometastases / minimal residual disease / RT-PCR / chromosomal translocations)

D. SUMERAUER, A. VÍCHA, H. KUČEROVÁ, R. KODET¹, J. HOUSKOVÁ², J. BEDRNÍČEK, T. ECKSCHLAGER

Department of Paediatric Oncology, ¹Pathology and ²Haematology, 2nd Medical School, Charles University, Prague, Czech Republic

Abstract. Ewing sarcoma and related neoplasias are characterized by the presence of specific chromosomal translocations resulting in *EWS/ETS* gene rearrangements. Created *EWS/ETS*-oncogene fusion transcripts can be detected in up to 98% of ESFT and provide tumour-specific markers useful in diagnostics. Using RT-PCR for detection of this aberration we can reveal minimal amounts of tumour cells contaminating BM, blood or apheresis products. We have examined BM samples from 22 patients (21 newly diagnosed and one recurrent disease) with histologically confirmed ESFT for the presence of contaminating tumour cells in BM at the time of diagnosis. Sixteen patients presented with localized disease, six had distant metastases at the first presentation. Ewing sarcoma cells were detected in the BM of 5/16 (31%) patients with localized disease and 3/6 (50%) with clinically detectable metastases at diagnosis. BM smears prepared from the same aspirates evaluated by light microscopy were all negative, even in two patients with multiple bone disease. We have confirmed the high sensitivity of the RT-PCR assay for detection of minimal BM infiltration in localized and metastatic ESFT. We have found that more than a quarter of patients with localized ESFT have minimal BM infiltration. Although the clinical significance of the minimal disease detected at the molecular level remains unknown, RT-PCR evaluation may enable better stratification of patients into risk groups in the future.

The Ewing sarcoma family of tumours (ESFT) consists of highly malignant neoplasms of bone and soft tissues affecting mostly children and young adults. The ESFT includes classic Ewing sarcoma of bone, extraosseous Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors (pPNET) of bones or soft tissues (Horowitz et al., 1997; West 2000; Sandberg and Bridge, 2001). These malignancies share a common neural histogenesis and tumour genetics; ESFT is believed to be derived from postganglionic parasympathetic primordial cells (Horowitz et al., 1997). Although often presented as localized solid malignancy, ESFT is most probably a systemic disease with micrometastases at the time of diagnosis, as evidenced by a 10% cure rate in a historical group of patients, treated with local therapy only (Horowitz et al., 1997; de Alava and Gerald, 2000). Intensive multimodal treatment protocols combining surgery, systemic chemotherapy and radiotherapy improved event-free survival rates up to 60% (Jürgens et al., 1998). Approximately 1/4 of patients with ESFT have detectable metastatic disease at the time of diagnosis, and this group still do poorly despite intensive multimodality therapy, with 5-year overall survival below 20% (Jürgens et al., 1998; Kovar, 1998; Kushner and Meyers, 2001).

The primary genetic event in ESFT is chromosomal translocation resulting in fusion of the *EWS* gene at chromosome 22 with a member of the *ETS* gene family of transcription factors (Delattre et al., 1994; Zoubek et al., 1994; Sandberg and Bridge, 2001). The most frequent translocations are t(11;22)(q24;q12) and t(21;22)(q22;q12). The former translocation results in fusion of *EWS* to *FLI-1* (most frequent in ESFT, 90–95%), the latter generates chimaeric transcripts between *EWS* and *ERG* (5–10%), both creating new fusion proteins associated with tumour cell formation. The discovery of specific chromosomal translocations enables high sensitivity detection of tumour cells in various biologic material by means of reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), which is now used in the

Received August 21, 2001. Accepted September 14, 2001.

Supported in part by grants No. 5239-3 of the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic and No. 301/001394 of the Grant Agency of the Czech Republic, and by Ministry for Education, Youth and Physical Education, grant No. 111300005.

Corresponding author: Tomáš Eckschlager, Department of Paediatric Oncology, V Úvalu 84, University Hospital Motol, 150 06, Prague 5, Czech Republic.
E-mail: tomas.eckschlager@lfmotol.cuni.cz.

Abbreviations: BM – bone marrow, ESFT – Ewing sarcoma family of tumours, MRD – minimal residual disease, pNET – peripheral primitive neuroectodermal tumour, RT-PCR – reverse-transcriptase polymerase chain reaction.

Folia Biologica (Praha) 47, 206-210 (2001)

diagnostics of these malignancies (Peter et al., 1995; Meier et al., 1998; Zoubek et al., 1998). In rare instances of ESFT, *EWS* is fused to the *ETS* domains of *ETV-1*, t(7;22) (p22;q12), *EIAF*, t(17;22) (q22;q12) or *FEV*, t(2;22) (q33;q12) or complex translocations occur affecting 22q12 and 11q24 (de Alava and Gerald, 2000; Llombart-Bosch et al. 2000; Sandberg and Bridge, 2001). The new chimaeric *EWS/ETS* molecules, chimaeric fusion proteins, modulate the transcription of some specific target genes (critical target genes for *EWS/ETS* oncoproteins are being investigated) and these events initiate and maintain tumorigenesis in ESFT (Ohno et al., 1993; Desmaze, 1997; Kovar, 1998). In experiments evaluating the ability of fusion proteins to cause neoplastic transformation, the chimaeric molecules have been shown to affect the growth characteristics of some cell lines. Transfection of mouse fibroblasts with *EWS/FLI-1* or *EWS/ERG* can transform cells, so that they acquire tumour-like properties, such as growth in soft agar and immunodeficient mice (May et al., 2000). This and other findings suggest the key role of chimaeric proteins in the development, growth, clinical heterogeneity and behaviour of ESFT (de Alava et al., 1998; Ginsberg et al., 1999; Lin et al., 1999).

Bone marrow (BM) examination is a routine part of staging in ESFT. Positive results of cytological examination indicate an advanced-stage disease with severe consequences for patient treatment and prognosis. The frequency of BM involvement at the time of the first presentation is not precisely known and only a few reports exist about the use of RT-PCR for detection of minimal BM infiltration (Oberlin et al., 1995; Peter et al., 1995; Pfeleiderer et al., 1995; Horowitz et al., 1997; Zoubek et al., 1998). The aims of this study were to verify the applicability of RT-PCR for detection of minimal BM infiltration and to investigate the incidence of BM infiltration in ESFT patients with RT-PCR.

Material and Methods

BM aspirates were obtained at the time of diagnosis from patients with histologically confirmed ES/pPNET. All samples were collected in ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) before starting the treatment. BM smears were evaluated by light microscopy as well. Trephine biopsies were not performed. Two distinct groups of patients were established, the first with localized disease (defined as those with no evidence of distant

Table 1. Patients' characteristics

| Patient No. | Age/Sex | Histology/mol.biology | Localization | Metastases | RT-PCR | | Outcome | Follow up (month) |
|-------------|---------|-----------------------|---------------|------------|-------------|--------------|--------------|-------------------|
| | | | | | No. samples | No. positive | | |
| 1 | 12F | ES (EWS/ERG) | ribs | reg. LN | 1 | 0 | CR1 | 19 |
| 2 | 6M | ES (EWS/ERG) | fibula | No | 2 | 2 | CR1 | 8 |
| 3 | 2M | ES (EWS/FLI-1) | fibula | No | 2 | 0 | CR1 | 11 |
| 4 | 15M | ES (EWS/FLI-1) | humerus | No | 2 | 1 | CR1 | 8 |
| 5 | 9M | ES (EWS/FLI-1) | femur | No | 2 | 0 | CR1 | 6 |
| 6 | 12F | pPNET - n.d. | head - EET | No | 2 | 0 | CR1 | 18 |
| 7 | 22M | pPNET (EWS/ERG) | scapula - EET | L, B | 3 | 2 | POD syst | 10 |
| 8 | 12F | ES (EWS/FLI-1) | femur | No | 2 | 0 | POD loc+syst | 11 |
| 9 | 14F | ES - n.d. | pelvis | No | 1 | 0 | CR1 | 23 |
| 10 | 12F | pPNET (EWS/ERG) | L3 - S1 | L | 2 | 0 | DOC | 1 |
| 11 | 10F | ES - n.d. | femur | No | 2 | 1 | POD loc+syst | 22 |
| 12 | 15F | ES (EWS/FLI-1) | fibula | L | 2 | 2 | CR1 | 6 |
| 13 | 15F | ES - negative | neck -EET | L | 2 | 0 | POD syst | 7 |
| 14 | 14F | ES (EWS/FLI-1) | pelvis | No | 1 | 0 | TRD | 11 |
| 15 | 13F | ES (EWS/FLI-1) | pelvis | No | 1 | 0 | CR1 | 18 |
| 16 | 16F | ES - n.d. | sacrum | No | 1 | 0 | DOC | 7 |
| 17 | 9F | pPNET (EWS/FLI-1) | kidney | No | 2 | 2 | DOC | 5 |
| 18 | 9F | ES - n.d. | femur | No | 2 | 1 | CR1 | 7 |
| 19 | 15M | ES (EWS/FLI-1) | pelvis | L, B | 2 | 0 | POD syst | 16 |
| 20 | 15M | ES - n.d. | humerus | LN | 2 | 1 | CR1 | 10 |
| 21 | 17M | ES (EWS/FLI-1) | femur | No | 2 | 0 | CR1 | 8 |
| 22 | 15M | ES (EWS/FLI-1) | tibiae | No | 2 | 0 | CR1 | 21 |

B - bones, CR - complete remission, DOC - died of complications, EET - extraosseous tumour, ES - Ewing sarcoma, L - lungs, LN - lymph nodes, loc - localized, n.d. - not done, POD - progressive disease, syst - systemic, TRD - transplant-related death.

metastases with imaging techniques and cytomorphologic examination of BM aspirates), and the second with known metastatic disease, who were evaluated separately. Samples were collected from twenty-two patients, 21 newly diagnosed and one relapsed, treated previously in another institution before entering our department. The snap-frozen primary tumour tissues, collected during open surgical biopsy, were available to confirm the presence of disease-specific gene rearrangement in 15 cases. Patients' characteristics including clinical and molecular data are shown in Table 1.

Total RNA was isolated from BM (10×10^6 nucleated cells per sample). RNA extraction was based on the modified guanidium isothiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987) using the TRIzol reagent (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY) and subjected to reverse transcription and PCR in search of EWS/FLI-1 and EWS/ERG fusion transcripts. The assay was performed using 1–3 μ g of total RNA as a template, GeneAmp RNA@PCR Core Kit (Perkin-Elmer, Foster City, NY) following the manufacturer recommendations and oligonucleotide primers originally published by Meier, 1998 (EWS1: 5'-GCAGCAGCCTCCCACTAGTTACC-3', FLI1/2: 5'-CAGGTGATACAGCTGGCGTTGG-3', ERG2: 5'-CAGGTGATGCAGCTGGAGT TGG -3' and primers for nested PCR, EWS2: 5'-CTGGATCCTACAGC-CAAGCTCC-3', FLI1/1 : 5'-CAGGAGGAATTGC-CACAGCTGG-3', ERG1: 5'-CAGGAGGAACTGCCAAAGCTGG -3'). Briefly, aliquots of total RNA were reverse-transcribed with random hexamers using Moloney murine leukaemia virus (M-MULV) reverse transcriptase. Reverse transcription included incubation at 37°C for 50 min followed by a 5 min period at 95°C to denature the enzyme. The quality of cDNA synthesis was confirmed by amplification of ubiquitous β -actin gene in every studied case. The first round of PCR was then performed with an initial denaturation step of 95°C for 10 min, followed by 35 cycles, including denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 62°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min, with a further 7 min extension step after completion of the last cycle. The second round (nested) of PCR was performed using internal primers and 1 μ l of the initial PCR product. Assays were performed in a Perkin Elmer 9600 automated cyclor. PCR products were analysed by 1.5% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining and detected using Gel Doc 2000 TM (Bio-Rad, Hercules, CA). Positive (cell line IARC-EW2) and negative controls were carried through all PCR reactions steps. We have also evaluated BM samples obtained at the time of diagnosis from patients with other malignant solid tumours of childhood. BM samples from patients with neuroblastoma (5 patients), rhabdomyosarcoma (3), osteosarcoma (2) and synovialosarcoma (1), and samples

from healthy controls (5) were all negative, thus confirming the high specificity of our method.

Results

We performed molecular detection of EWS/FLI-1 and EWS/ERG fusion transcripts in 40 samples of BM aspirates, obtained from twenty-two ESFT patients at the time of the first presentation. The primary tumour tissue was available in fifteen cases to confirm the presence of t(11;22) or t(21;22) translocations. Light microscopy evaluation of BM smears did not confirm BM involvement in any of our studied cases. Among the group of sixteen patients with localized ESFT, five were positive in BM (31%, altogether 27 samples/7 positive, see Table 2). Of six patients with clinically apparent metastatic disease at the time of diagnosis (relapse), we proved tumour cells in BM of three (50%, altogether 13 samples/6 positive).

Discussion

The stage of disease at the time of diagnosis remains the most powerful independent predictive factor of patient prognosis in ESFT. Distant metastases detected and visualized by imaging techniques or BM infiltration revealed by cytology examination place the patient into an unfavourable prognostic group. The most unfavourable prognosis is for patients with ES/pPNET metastatic to bone and/or BM (Horowitz et al., 1997; Jürgens et al., 1998; Kushner and Meyers, 2001). However, the group of patients with localized disease may contain some high-risk cases with minimal metastatic diseases invisible to these detecting tools. Previous identification of tumour cell-specific chimaeric gene transcripts in ESFT gives an opportunity for high-sensitivity detection of minimal amounts of contaminating cells in blood, BM or autologous grafts using RT-PCR (Peter et al., 1995; West et al., 1997; Zoubek et al., 1998).

In the work presented here, we were looking for minimal BM infiltration at the time of diagnosis (or disease relapse in one patient) by means of RT-PCR in patients diagnosed with ESFT. We have shown that it is possible to detect chimaeric transcripts by RT-PCR in BM in patients with ES/pPNET with high sensitivity and we confirmed the usefulness of RT-PCR for minimal residual disease (MRD) detection. In our group, 31% of patients

Table 2. Results of RT-PCR detection for the EWS/FLI-1 and EWS/ERG transcripts in BM samples of ESFT patients.

| Patient group | Patients No. / Positive No. | BM samples No. / Positive No. |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Localized | 16 / 5 (31 %) | 27 / 7 (26%) |
| Metastatic | 6 / 3 (50 %) | 13 / 6 (46%) |
| All | 22 / 8 (36 %) | 40 / 13 (33%) |

Table 3. BM infiltration in Ewing sarcoma at the time of diagnosis - results of different groups

| Source | Patients | | Localized sarcoma | | Metastatic sarcoma | |
|-----------------|-----------|------------|-------------------|------------|--------------------|------------|
| | No+/total | % positive | No+/total | % positive | No+/total | % positive |
| Fagnou 1998 | 14/43 | 33% | 6/28 | 21% | 8/15 | 53% |
| Zoubek 1998 | 16/35 | 46% | 7/23 | 30% | 9/12 | 75% |
| Pfleiderer 1995 | 6/16 | 38% | 1/9 | 11% | 5/7 | 71% |
| West 1997* | 5/22 | 23% | 3/16 | 19% | 2/6 | 33% |
| Athale 2001** | 7/26 | 27% | 0/11 | 0% | 7/15 | 47% |
| Our results | 8/22 | 36% | 5/16 | 31% | 3/6 | 50% |

* t(21;22) not evaluated, ** including rhabdomyosarcomas and desmoplastic small-round-cell tumours

with non-metastatic disease were RT-PCR positive for the marker mRNA in BM, a result in consent with observations (approx. 20%–30%) reported by others (Pfleiderer et al., 1995; West et al., 1997; Fagnou et al., 1998; Zoubek et al., 1998; Athale et al., 2001). Table 3 gives a summary of results published by different investigating groups to date.

Six patients in our study presented distant metastases, three in the lungs solely, one in the lymph nodes and two had lung and multiple bone metastases. We found minimal BM infiltration in only three of six patients with metastatic disease. The tumour tissue sample was available in five cases with advanced disease. In a 15-year-old girl (case 13) with systemically relapsed soft tissue ESFT arising in her neck, we were unable to confirm neither t(11;22), nor t(21;22) in the primary tumour. This particular patient should therefore be excluded from our final analysis. The failure to detect EWS/FLI-1 or EWS/ERG mRNA in this case can be explained in several ways. It may contain another rare alternative EWS/ETS rearrangement not tested in our study – t(7;22), t(17;22) or t(2;22)), or previous chemotherapy and local radiotherapy led to neural differentiation and absence of detectable EWS/ETS gene expression (West et al., 1997; Knezevich et al., 1998). In the four remaining cases, two had EWS/ERG rearrangements documented in the tumour tissue, and two patients had multiple bone metastases without BM involvement in light microscopy evaluation. The presence of tumour cells with t(21;22) in BM had been documented in one case with RT-PCR. The BM of the second patient (case 19) was RT-PCR negative. This finding is in contrast to the results published by Zoubek et al. (1998), who reported RT-PCR positivity in BM for all five patients with bone metastases and for 50% of patients with lung metastases. West et al. (1997) found two of six patients with metastatic disease positive in BM and 5 of 10 positive in peripheral blood, which he interpreted as 50% presence of micrometastases in their group of patients with advanced disease. Unfortunately, no information on metastatic sites was given, so that

comparison between the results is impossible like in other groups.

Despite the given findings, it should be noted that there are many factors which can affect the RT-PCR analysis and the correct interpretation of results. Possible factors affecting analysis are: sampling errors due to inappropriate anticoagulants used, excessive BM dilution by blood, under-sampling due to the focal BM involvement in ESFT, and others (Kovar, 1998).

During every evaluation, strict precautions were taken to avoid cross-contamination, pre- and post-amplification steps were separated from each other, negative and positive controls were included in reaction steps and all positivities were reproducible. Moreover, amplified products corresponded to those resulting from tumour tissue if available.

In five of eight positive cases, we detected tumour cells only in some samples taken at the same time from different sites (one out of two samples four times and two out of three samples in one patient). This demonstrates the importance of collecting several BM samples for more precise staging and better MRD detection.

Our results confirmed that more than 1/4 of the patients with presumed localized ESFT have minimal BM infiltration. The presence of a low number of cancer cells in BM, detected by sensitive molecular biology techniques including RT-PCR, is not a reason for applying more intensive therapy at the present time (in patients with localized disease), and the clinical significance of minimal BM infiltration at the time of disease diagnosis is unknown. In the future, some new therapeutic protocols might be designed with targeted therapy for patients with proved minimal BM infiltration.

Acknowledgements

We thank Dr. H. Kovar (Children's Cancer Research Institute – CCRI, St. Anna Kinderspital, Vienna, Austria) for providing Ewing sarcoma cell line IARC EW-2.

References

- Athale, U. H., Shurtleff, S. A., Jenkins, J. J., Poquette, C. A., Tan, M., Downing, J. R., Pappo, A. S. (2001) Use of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosis and staging of alveolar rhabdomyosarcoma, Ewing sarcoma family of tumours and desmoplastic small round cell tumour. *J. Ped. Hematol. Oncol.* **23**, 99-104.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- de Alava, E., Gerald, W. L. (2000) Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour family. *J. Clin. Oncol.* **18**, 204-213.
- de Alava, E., Kawai, E., Healey, J. H., Fligman, I., Meyers, P. A., Huvois, A. G., Gerald, W. L., Jhanwar, S. C., Argani, P., Antonescu, C. R., Pardo-Mindan, F. J., Ginsberg, J., Womer, R., Lawlor, E. R., Wunder, J., Andrulis, I., Sorensen, P. H. B., Barr, F. G., Ladanyi, M. (1998) EWS-FLI-1 fusions transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **16**, 1248-1255.
- Delattre, O., Zucman, J., Melot, T., Garau, X. S., Zucker, J. M., Lenoir, G. M., Ambros, P. F., Sheer, D., Turc-Carel, C., Triche, T. J., Aurias, A., Thomas, G. (1994) The Ewing family of tumours - a subgroup of small-round-cell tumours defined by specific chimeric transcripts. *N. Engl. J. Med.* **331**, 294-299.
- Desmaze, C., Brizard, F., Turc-Carel, C., Melot, T., Delattre, O., Thomas, G., Aurias, A. (1997) Multiple chromosomal mechanisms generate an EWS/FLI-1 or an EWS/ERG fusion gene in Ewing tumours. *Cancer Genet. Cytogenet.* **97**, 12-19.
- Fagnou, C., Michon, J., Peter, M., Bernoux, A., Oberlin, O., Zucker, J. M., Magdelenat, H., Delattre, O. (1998) Presence of tumour cells in bone marrow but not in blood is associated with adverse prognosis in patients with Ewing's tumour. *J. Clin. Oncol.* **16**, 1707-1711.
- Ginsberg, J. P., de Alava, E., Ladanyi, M., Wexler, L. H., Kovar, H., Kovar, H., Paulussen, M., Zoubek, A., Dockhorn-Dworniczak, B., Jürgens, H., Wunder, J. S., Andrulis, I. L., Malik, R., Sorensen, P. H. B., Womer, R. B., Barr, F. G. (1999) EWS-FLI-1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **17**, 1809-1814.
- Horowitz, M. E., Malawer, M. M., Woo, S. Y., Hicks, M. J. (1997) Ewing's sarcoma of bone and soft tissue and the peripheral primitive neuroectodermal tumours. In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, eds. Pizzo, P. A., Poplack, D. G., pp. 831-864, Lippincott, Philadelphia.
- Jürgens, H., Barrett, A., Dockhorn-Dworniczak, B., Winkelmann, W. (1998) Ewing's sarcoma. In: *Cancer in Children*, eds. Voute, P. A., Kalifa, C., Barrett, pp. 232-258, Oxford University Press, Oxford.
- Knezevich, S. R., Henderson, G., Mathers, J. A., Carpenter, B., Lopez-Terrada, D., Brown, K. L., Sorensen, P. H. B. (1998) Absence of detectable EWS/FLI-1 expression after therapy induced neural differentiation in Ewing sarcoma. *Hum. Pathol.* **29**, 289-294.
- Kovar, H. (1998) Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumours after their genetic union. *Curr. Opin. Oncol.* **10**, 334-342.
- Kushner, B. H., Meyers, P. A. (2001) How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumour metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and literature review. *J. Clin. Oncol.* **19**, 870-880.
- Lin, P. P., Brody, R. I., Hamelin, A. C., Bradner, J. E., Healey, J. H., Ladanyi, M. (1999) Differential transactivation by alternative EWS-FLI-1 fusion proteins correlates with clinical heterogeneity in Ewing's sarcoma. *Cancer Res.* **59**, 1428-1432.
- Llombart-Bosch, A., Pellin, A., Carda, C., Noguera, R., Navarro, S., Peydró-Olaya, A. (2000) Soft tissue Ewing sarcoma-peripheral primitive neuroectodermal tumour with atypical clear cell pattern shows a new type of EWS-FEV fusion transcript. *Diagn. Mol. Pathol.* **9**, 137-144.
- May, W. A., Lessnick, S. L., Braun, B. S., Klemsz, M., Lewis, B. C., Lusford, L. B., Hromas, R., Denny, C. T. (2000) The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7393-7398.
- Meier, V. S., Kühne, T., Jundt, G., Gudat, F. (1998) Molecular diagnosis of Ewing tumours: improved detection of EWS-FLI-1 and EWS-ERG chimeric transcripts and rapid combination of exon combinations. *Diagn. Mol. Pathol.* **7**, 29-35.
- Oberlin, O., Bayle, C., Hartmann, O., Terrier-Lacombe, M. J., Lemerle, J. (1995) Incidence of bone marrow involvement in Ewing's sarcoma: value of extensive investigation of bone marrow. *Med. Ped. Oncol.* **24**, 343-346.
- Ohno, T., Rao, V. N., Reddy, S. P. (1993) EWS/FLI-1 chimeric protein is a transcriptional activator. *Cancer Res.* **53**, 5859-5863.
- Peter, M., Magdelenat, H., Michon, J., Melot, T., Oberlin, O., Zucker, J. M., Thomas, G., Delattre, O. (1995) Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Br. J. Cancer* **72**, 96-100.
- Pfleiderer, C., Zoubek, A., Gruber, B., Kronberger, M., Ambros, P. F., Lion, T., Fink, F. M., Gadner, H., Kovar, H. (1995) Detection of tumour cells in peripheral blood and bone marrow from Ewing tumour patients by RT-PCR. *Int. J. Cancer* **64**, 135-139.
- Sandberg, A. A., Bridge, J. A. (2001) Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumours: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumours. *Cancer Genet. Cytogenet.* **123**, 1-26.
- West, D. C. (2000) Ewing sarcoma family of tumours. *Curr. Opin. Oncol.* **12**, 323-329.
- West, D. C., Grier, H. E., Swallow, M. M., Demetri, G. D., Granowetter, L., Sklar, J. (1997) Detection of circulating tumour cells in patients with Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumour. *J. Clin. Oncol.* **15**, 583-588.
- Zoubek, A., Pfleiderer, C., Salzer-Kuntschik, M., Amann, G., Windhager, R., Fink, F. M., Koscielniak, E., Delattre, O., Strehl, S., Ambros, P. F., Gadner, H., Kovar, H. (1994) Variability of EWS chimeric transcripts in Ewing tumours: a comparison of clinical and molecular data. *Br. J. Cancer* **70**, 908-913.
- Zoubek, A., Ladenstein, R., Windhager, R., Amann, G., Fischmeister, G., Kager, L., Jugovic, D., Ambros, P. F., Gadner, H., Kovar, H. (1998) Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumour patients by RT-PCR: a preliminary evaluation. *Int. J. Cancer* **79**, 56-60.

Příloha 2

Vicha A., Stejskalova E., Sumerauer D., Kodet R., Malis J., Kucerova H., Bedrnicek J., Koutecky J., Eckschlager T., *Malignant peripheral primitive tumor of the kidney, Cancer Genet Cytogenet*, 139 (1), 67-70, 2002



Cancer Genetics and Cytogenetics 139 (2002) 67–70

CANCER GENETICS
AND
CYTOGENETICS

Short communication

Malignant peripheral primitive neuroectodermal tumor of the kidney

Ales Vicha^a, Eva Stejskalova^a, David Sumerauer^a, Roman Kodet^b, Josef Malis^a, Hana Kucerova^a, Jiri Bedrnicek^a, Josef Koutecky^a, Tomas Eckschlager^{a,*}

^aDepartment of Pediatric Oncology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic
^bDepartment of Pathology, Second Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

Received 18 April 2002; accepted 24 April 2002

Abstract

Ewing family of tumors is a group of highly aggressive neoplasias that occur most commonly in the first two decades of life. These tumors are most frequently localized in bones, less frequently in soft tissues. They usually appear as undifferentiated small round-cell tumors. With current treatment regimens, 5-year disease-free survival rates exceed 60% in patients with a localized disease. Patients with metastatic disease at the time of their first presentation have a poor prognosis. We describe a rare case of visceral primitive neuroectodermal tumor with the involvement of the kidney in a 9-year-old girl. The tumor was studied with immunohistochemistry, cytogenetics, and molecular biology methods. Strong expression of protein MIC₂ by immunohistochemistry (antibody HBA 71) with subsequent demonstration of a translocation consistent with t(11;22)(q24;q12) using cytogenetic and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) confirmed the histopathological diagnosis of peripheral primitive neuroectodermal tumor. We detected minimal residual disease in bone marrow using RT-PCR. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Ewing sarcoma family tumors (ESFT) constitute a group of small round-cell tumors of presumed neuroectodermal origin, most often present as bone or soft tissue masses in the trunk or axial skeleton in children and young adults [1]. ESFT consist of osseous and extraosseous Ewing sarcoma, peripheral primitive neuroectodermal tumor (pPNET) and Askin tumor of the thorax [2]. Rarely, pPNET, have been described to arise in the genitourinary system, such as kidney, testis, ovary, uterus, or cervix [1,3].

The histopathological diagnosis of ES and pPNET is based on a combination of light microscopic, immunohistochemical, and, if necessary, electron microscopic features. Other valuable diagnostic methods are cytogenetics and molecular biology analysis. Ewing sarcomas are well characterized by unique chromosomal aberrations t(11;22)(q24;q12), t(21;22)(q22;q12), t(7;22)(p22;q12), t(17;22)(q12;q12), and t(2;22)(q33;q12). In more than 95% of cases

of ESFT, the gene fusion is *EWS-FLI-1* (90–95%), because of a t(11;22), or the gene fusion is *EWS-ERG* (5–10%), because of a t(21;22). Three other translocations have been found in rare cases of ES and pPNET [4]. These chromosomal aberrations result in a fusion of the *EWS* gene on chromosome 22 with *ETS* family genes (*FLI-1* at 11q24, *ERG* at 21q22, *ETV1* at 7p22, *EIAF* at 17q12, and *FEV* at 2q33) [4–6]. The detection of the above-mentioned translocations is helpful in distinguishing Ewing sarcomas from other small round-cell tumors. A correct diagnosis is important for the choosing of therapeutic protocol and significantly influences the results of therapy [7].

2. Case report

The case is a 9-year-old girl with pPNET of the kidney. She presented with a painless abdominal distension lasting one week. She was found to have a right-side abdominal mass. Her history was unremarkable. On physical examination, a large, firm, nontender mass was palpated in the right side of the abdomen. An ultrasound scan revealed a mixed solid and cystic mass arising from the right kidney measuring 15 × 14 × 11 cm. She was immediately operated on because of the risk of tumor rupture. Bone scintigraphy showed no evidence of abnormal radiotracer uptake, while

* Corresponding author. Department of Pediatric Oncology, 2nd Faculty of Medicine, V uvalu 84, Prague 5-Motol, Czech Republic. Tel.: +420-2-24436494; fax: +420-2-24436420.

E-mail address: tomas.eckschlager@lfmotol.cuni.cz (T. Eckschlager).

other examinations showed no evidence of metastatic disease. With the use of reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) we detected a chimeric *EWS/FLI-1* transcript in the bone marrow indicating tumor cell involvement. Following the nephrectomy, the patient received part of a treatment for a high-risk ES consisting of chemotherapy (Ifosfamide, VP-16, Cyclophosphamide, Adriamycin, Vincristine), local therapy (surgical), and a high dose of chemotherapy with autologous bone marrow transplantation. Five months later, the patient died of treatment complications. No evidence of disease was seen at autopsy.

3. Materials and methods

3.1. Histology and immunohistochemistry (IHC)

Standard histology protocol was utilized with hematoxylin and eosin (H & E) and periodic acid-Schiff (PAS) staining. Histology and immunohistochemistry (IHC) investigation was performed to confirm the diagnosis of pPNET/ES using antibodies against the CD99 molecule, cytokeratin AE1/3, chromogranin B, synaptophysin, NB84, LCA, vimentin and actin HHF35 (DAKO, Glostrup, Denmark). A standardized IHC protocol was applied using a LSAB kit containing secondary biotinylated mixed mouse and rabbit antibodies. Next, a complex streptavidine-horse radish peroxidase was applied. In the final step, diaminobenzidine was used to visualize the positive product.

3.2. Cytogenetics

The biopsy specimen, received in an RPMI-1640 medium was transferred into a Petri dish. The specimen was mechanically disaggregated and three T25 flasks each with 10 mL of cell suspension in RPMI-1640 + 15% fetal calf serum (FCS) and ATB were cultured for 3 and 6 days. They were exposed to Colcemid for 1 hour (final concentration of 0.05 $\mu\text{g/mL}$) and harvested by standard cytogenetic techniques using a hypotonic solution and a 3:1 methanol/acetic acid solution. Part of the sample was cultured as a monolayer culture in a MEM medium + 15% FCS. Slides were made according to conventional techniques, trypsin-Giemsa banded and 20 metaphases were analyzed.

3.3. Molecular genetics

We performed RT-PCR to detect chimeric *EWS/FLI-1* mRNA. Total RNA was extracted from fresh tumor tissue, from cells obtained from cytogenetic primoculture, and bone marrow nuclear cells using the TRIzol extraction kit (GIBCO BRL, Life Technologies). One microgram of total RNA was reverse transcribed using random hexamers (GeneAmp RNA PCR kit, Perkin Elmer). Complementary DNA (cDNA) was PCR amplified using primers 11.3 and 22.3 and internal control was provided by nested PCR using primers 11.4 and 22.4 [8]. The first round of PCR included 35 cycles (denaturation 94°C 30 seconds, annealing at 65°C 1 minute, elongation 72°C 1 minute), while nested PCR was performed with 30 cycles (same condition except of anneal-

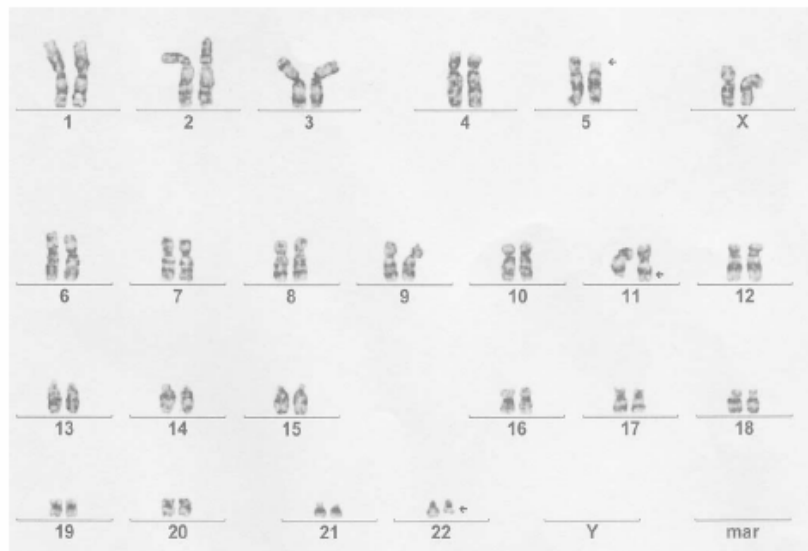


Fig. 1. G-banded karyotypes of pPNET of kidney: 46,XX,del(5)(p11),t(11;22)(q24;q12). The abnormalities shown were observed consistently in all metaphases. Arrow indicates abnormal chromosomes.

ing at 67°C 1 minute). Amplified products were analyzed on 1.5% agarose gels. The positive control was IARC EW2 cell line. Positive and negative controls were carried through all analysis steps.

4. Results

4.1. Morphology and IHC

The tumor involved a large portion of the middle part of the kidney. It measured 15 × 14 × 11 cm at its greatest diameter. The tumor had a grayish-white, homogenous appearance, and it was well demarcated from the adjacent kidney. The histology showed a monomorphous tumor consisting of sheets of polygonal cells with round cell nuclei, small nucleoli, and ill-defined cell margins. PAS staining revealed a small amount of diastase sensitive material (glycogen) in the tumor cell cytoplasm. Mitotic activity was low. The cells did not resemble the blastema characteristic of a Wilms tumor in that they were larger and contained glycogen. No epithelioid formations, tubule or glomerular formations were seen in the tumor. The stromal component included small vessels and a little perivascular collagen. Immunohistochemistry showed a moderate positivity of vimentin and a strong membrane staining with anti-CD99. It was negative for cytokeratin, chromogranin B, synaptophysin, and NB84. The tumor cells were negative for littoral cell angioma (LCA) and actin. The histopathological diagnosis was that of ES/pPNET.

4.2. Cytogenetics

A karyotype of 46,XX,del(5)(p11),t(11;22)(q24;q12) was found in all analyzed cells. The detected t(11;22) is a diagnostically important cytogenetic rearrangement typical for ES/pPNET tumors. The aberration found on 5p is either a partial 5p deletion or possibly an interstitial deletion on 5p (Fig. 1).

4.3. Molecular biology

The PCR amplified a product that corresponded to type 2 *EWS/FLI* fusion transcripts with fusion of *EWS* exon 7 to *FLI-1* exon 5 [5]. The size of all PCR products obtained from the tumor tissue and samples of bone marrow aspirates were about 395 bp. ET cells were detected in bone marrow aspirate at the diagnosis (samples from both aspirates were cytologically negative and RT-PCR positive) (Fig. 2). Our results were confirmed by detection of PGP 9.5 m-RNA using RT-PCR.

5. Discussion

Renal pPNET appears to be a unique clinical entity that behaves more aggressively than pPNET arising at other sites. Series described in literature suggest that patients with renal pPNET are usually children and adolescents who commonly have metastatic disease at presentation and a poor

response to multimodal therapy [1]. The tumor diagnosis is based on a classical histological and immunohistochemical investigation complemented by a demonstration of specific chromosomal changes by cytogenetics and molecular analysis.

Recently ES/pPNET have been shown to express an antigen determined by the *MIC2* gene and detected by a monoclonal antibody HBA 71 (CD99) that has been demonstrated in more than 90% of these tumors [9,10]. The tumor in our case strongly expressed the CD99 antigen, which corresponded to the findings of other investigators in renal ES/pPNET [7]. Neuroectodermal origin of primary tumor and bone marrow infiltration was confirmed by detection of PGP 9.5, which is general marker specific for neuronal and neuroendocrine tissues.

Using RT-PCR we were able to confirm the histopathological diagnosis and to demonstrate a specific chimeric transcript in the primary tumor—a type 2 of *EWS/FLI-1* chimeric transcript. Moreover, we detected the tumor cells in the bone marrow. On the basis of this finding and the aggressivity of renal pPNET, we used a treatment for a high-risk ES.

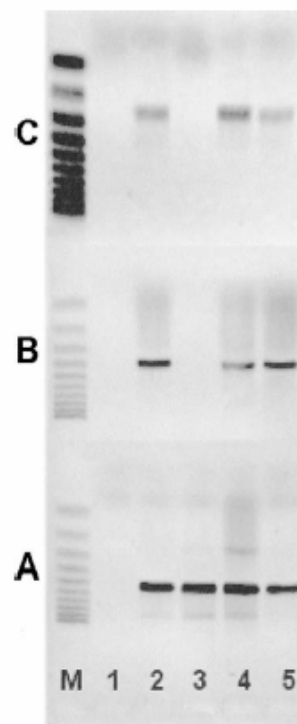


Fig. 2. Ethidium-stained gel of the nested RT-PCR results. RT-PCR was performed as described in the text. (A) Control gene expression (β -actin); (B) first round *EWS-FLI-1* RT-PCR; and (C) second round *EWS-FLI-1* RT-PCR. (M) A DNA molecular weight marker (100-bp ladder); lane 1: no reverse-transcriptase negative control; lane 2: Ewing cell line (IARC EW2); lane 3: rhabdomyosarcoma; lane 4: bone marrow at diagnosis; and lane 5: primary tumor of kidney.

Cytogenetic analysis of the reported renal tumor showed a reciprocal t(11;22)(q24;q12) typical of pPNET/ES with an additional del(5)(p11). Only a few cases of the kidney ES/pPNET have been confirmed using RT-PCR to date [11]. In summary, we report a case of ES/pPNET arising in the kidney whose diagnosis was confirmed by a typical morphology, CD99⁺ immunostaining, karyotypic analysis, and RT-PCR for *EWS/FLI-1* chimeric mRNA. We believe that this was the first described case of renal pPNET with RT-PCR verified bone marrow infiltration.

Acknowledgments

This work was supported by the Internal Grant Agency of Ministry of Health Care, grant no. MSM 111300005, and by the Grant agency of the Czech Republic grant no. 301/00/1394. The positive control IARC EW2 cell line was kindly provided by H. Kovar, Children's Cancer Research Institute, Vienna.

References

- [1] Rodriguez-Galindo C, Marina NM, Fletcher BD, Parham DM, Bodner SM, Meyer WH. Is primitive neuroectodermal tumor of the kidney a distinct entity? *Cancer* 1997;79:2243–50.
- [2] Sheaff M, McManus A, Scheimberg I, Paris A, Shipley J, Baithun S. Primitive neuroectodermal tumor of the kidney confirmed by fluorescence in situ hybridization. *Am J Surg Pathol* 1997;21:461–8.
- [3] Parham DM, Roloson GJ, Feely M, Green DM, Bridge JA, Beckwith JB. Primary malignant neuroepithelial tumors of the kidney: a clinicopathologic analysis of 146 adult and pediatric cases from the National Wilms' Tumor Study Group Pathology Center. *Am J Surg Pathol* 2001;25:133–46.
- [4] Sandberg AA, Bridge JA. Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;123:1–26.
- [5] Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, Aurias A, Thomas G. The Ewing family of tumors—a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 1994;331:294–9.
- [6] Ginsberg JP, de Alava E, Ladanyi M, Wexler LH, Kovar H, Paulussen M, Zoubek A, Dockhorn-Dwomiczak B, Juergens H, Wunder JS, Andrulis IL, Malik R, Sorensen PH, Womer RB, Barr FG. EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol* 1999;17:1809–14.
- [7] Takeuchi T, Iwasaki H, Ohjimi Y, Ohshima K, Kaneko Y, Ishiguro M, Hiratsuka Y, Sakamoto K, Kikuchi M. Renal primitive neuroectodermal tumor: a morphologic, cytogenetic, and molecular analysis with the establishment of two cultured cell lines. *Diag Mol Pathol* 1997;6:309–17.
- [8] Zoubek A, Pfeleiderer C, Salzer-Kuntschik M, Amann G, Windhager R, Fink FM, Koscielniak E, Delattre O, Strehl S, Ambros PF. Variability of EWS chimeric transcripts in Ewing sarcoma tumours: a comparison of clinic and molecular data. *Br J Cancer* 1994;70:908–13.
- [9] Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer* 1991;67:1886–93.
- [10] Perlman EJ, Dickman PS, Askin FB, Grier HE, Miser JS, Link MP. Ewing's sarcoma—routine diagnostic utilization of MIC2 analysis. *Hum Pathol* 1994;25:304–7.
- [11] Quezado M, Benjamin DR, Tsokos M. EWS/FLI-1 fusion transcripts in three peripheral primitive neuroectodermal tumors of the kidney. *Hum Pathol* 1997;28:767–71.

Příloha 3

Krskova L., Mrhalova M., Sumerauer D., Kodet R., Rhabdomyosarcoma: molecular diagnostics of patients classified by morphology and immunohistochemistry with emphasis on bone marrow and purged peripheral blood progenitor cells involvement, Virchows Arch, 448(4):449 – 458, 2006

Virchows Arch (2006) 448: 449–458
DOI 10.1007/s00428-005-0124-y

ORIGINAL ARTICLE

L. Krsková · M. Mrhalová · D. Sumerauer · R. Kodet

Rhabdomyosarcoma: molecular diagnostics of patients classified by morphology and immunohistochemistry with emphasis on bone marrow and purged peripheral blood progenitor cells involvement

Received: 8 September 2005 / Accepted: 21 September 2005 / Published online: 20 December 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract Two histologically distinct subtypes of rhabdomyosarcomas (RMS), embryonal and alveolar, are different in many aspects, such as age distribution, primary site, and clinical outcome. We analyzed a group of 30 patients with RMS. The aim was to broaden the spectrum of diagnostic tools in evaluating the primary tumors, their recurrences and/or metastases, and to extend the diagnostic boundary to bone marrow and purged peripheral progenitor blood cell samples. We have performed the RT-PCR assay to analyze RMS for the presence of expression of *MyoD1* gene and for the presence of chimeric transcripts PAX3/FKHR or PAX7/FKHR. *MyoD1* gene expression was found in all 30 patients in samples from primary tumors. The chimeric transcripts PAX/FKHR were identified in 13 of 15 patients with alveolar RMS. Furthermore, the fusion transcript PAX7/FKHR was identified in 2 of 15 patients with RMS classified as embryonal by histology. Bone marrow samples (12) and peripheral blood progenitor cell specimens (13) in ten patients were examined by RT-PCR. We were able to identify 7 patients with bone marrow involvement and/or with contamination of peripheral blood progenitor cells by the tumor cells. We demonstrate that employing molecular diagnostics has an impact on staging, therapy monitoring and recognition of malignant cells at the tumor resection margins.

Keywords Rhabdomyosarcoma · Immunohistochemistry · Molecular diagnosis · RT-PCR · Bone marrow · Peripheral blood progenitor cells

Introduction

Rhabdomyosarcomas (RMS) constitute a heterogeneous spectrum of tumors with respect to clinical behavior and also with respect to tumor morphology [36]. They are frequently composed of primitive cells, which show only a subtle evidence of a lineage-specific differentiation, but they may mature and in some cases may reach a stage close to terminal differentiation resembling myotubes of a developing skeletal muscle. Most RMS in childhood are of two histological subtypes—embryonal (80%) and alveolar (20%), which have distinct clinicopathological features [33]. Alveolar and undifferentiated variants portend an unfavorable prognosis [33, 42]. Because of a broad spectrum of tumor morphology and some overlapping features between the alveolar/undifferentiated and embryonal forms, it may be difficult to classify some of these tumors into an individual category. A standard approach to the diagnosis requires utilization of histology and immunohistochemistry [25, 30, 35], cytogenetical analysis, and molecular techniques [1, 2, 14, 16, 26, 28, 37, 45]. The immunohistochemical profile of RMS is well characterized. The embryonal and alveolar RMS share a similar spectrum of protein expression such as cytoskeletal filaments (vimentin, desmin), muscle-specific cytoplasmic proteins such as myoglobin, contractile filaments (actin, myosin), and regulatory proteins of muscle-specific differentiation (myoD1, myogenin).

The discovery of myogenic determination (*MyoD*) gene family has provided an insight in the regulation of myogenesis and has prompted a search for applicable markers that may assist in the diagnosis of RMS [7, 39]. The *MyoD* gene was first identified by virtue of its ability to convert nonmuscle cells into muscle cells [12]. The genes of the *MyoD* family represent a nodal point of early myogenesis by up-regulating the expression of other myogenic genes,

L. Krsková (✉) · M. Mrhalová · R. Kodet
Department of Pathology and Molecular Medicine,
2nd Medical School,
Charles University and Faculty Hospital in Motol,
Prague, Czech Republic
e-mail: lenka.krskova@lfmotol.cuni.cz
Tel.: +420-2-24435650
Fax: +420-2-24435620

D. Sumerauer
Department of Pediatric Hematology and Oncology,
2nd Medical School,
Charles University and Faculty Hospital in Motol,
Prague, Czech Republic

such as those coding for desmin, creatine kinase, and myosin [48]. Among the MyoD family genes, the expression of MyoD1 has been found to be the most consistent molecular feature of RMS. MyoD1 protein is a member of a basic helix-loop-helix protein family with nuclear localization and maps on chromosome 11p15. It is a DNA-binding nuclear protein that initiates muscle differentiation in mesenchymal stem cells at the earliest stage of their commitment to the striated muscle phenotype [31]. Although MyoD1 is an excellent molecular marker, there are problems with its immunohistochemical detection in histopathology; another member of myogenic transcriptional regulators, myogenin, is on the protein level consistently detectable in RMS [13].

Most cases of alveolar RMS are characterized by a chromosomal translocation t(2;13)(q35;q14) involving the *PAX3* gene at 2q and the *FKHR* gene at 13q. The *FKHR* gene is coding for a protein of the forkhead family of transcription factors. The FKHR protein contains a central forkhead DNA-binding domain, which is found in a number of different transcription factors including hepatic nuclear factor 3 and interleukin binding factor [17]. The *PAX3* gene is a member of a family of evolutionarily conserved and developmentally regulated genes coding for transcription factors [40]. PAX3 protein contains two discrete DNA-binding domains, a paired box and a paired-type homeodomain, and displays a unique coordinate DNA-binding specificity. This protein is expressed exclusively during embryogenesis, and it is thought to be important in the development of mesenchymal precursors destined to become myoblasts. In muscle progenitor cells, PAX3 is expressed even earlier than myogenic transcription factors, such as MyoD1 and Myf5, and gradually declines during muscle differentiation [5]. The fusion protein PAX3/FKHR exhibits an increased transcriptional potency relative to PAX3 due to swapping of PAX3 and FKHR C-terminal transactivation domains. Cell culture experiments demonstrated that the PAX3/FKHR protein has the capacity to induce phenotypic changes, including cellular transformation and inhibition of myogenic differentiation [10]. Some cases of alveolar RMS have been characterized by a variant translocation t(1;13)(q36;p14), which fuses the *PAX7* gene with FKHR [11, 15, 42]. This chimeric gene transcript is similar in structure and function to that of the PAX3/FKHR. The tumors with the PAX7/FKHR fusion transcript show a predilection for younger patients and appear to have a more favorable prognosis [3, 4].

In this study, we present data on 30 patients with RMS characterized by morphology and by immunohistochemistry. We bring some insights on the specificity of the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of the *MyoD1* gene expression and on the practical diagnostic utilization of molecular events such as the demonstration of the t(2;13)-encoded PAX3/FKHR chimeric transcript and t(1;13)-encoded PAX7/FKHR fusion transcript in primary tumors, bone marrow specimens, and in purged peripheral blood stem cells intended for autologous transplantation.

Material and methods

Seventy-two samples from 30 patients with histological diagnosis of RMS were analyzed (Table 1). All samples from the primary tumors and their recurrences were obtained from fresh tissue, snap frozen and stored at -80°C . All specimens were from the Pediatric Tumor Registry in the Department of Pathology and Molecular Medicine in Prague. Samples of bone marrow or peripheral blood progenitor cells (PBPCs) were collected in ethylenediaminetetraacetate (EDTA) at the time of tumor diagnosis and, in some cases, during chemotherapy. The tumors were diagnosed by light microscopy using hematoxylin and eosin staining complemented by immunohistochemistry. A panel of primary antibodies included vimentin, desmin, sarcomeric actin, MyoD1 protein, myogenin, and anti-CD99 (all obtained from DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Super sensitive kit using alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase and fast red (BioGenex, San Ramon, CA, USA) was utilized to visualize the results.

RNA extraction

RNA was extracted from $10 \times 5 \mu\text{m}$ thick sections of the frozen tumor tissue or from bone marrow samples using Tri-Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions.

Polymerase chain reaction analysis

A total of $1 \mu\text{g}$ of RNA was reverse-transcribed in a $20 \mu\text{l}$ reaction volume using 10 pmol of random hexamers as primers and $1 \mu\text{l}$ of Moloney murine leukemia virus (MMLV) Reverse Transcriptase (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, USA) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription included an incubation period of 60 min at 42°C .

Two microliters of cDNA products was then tested for the expression of the regulation gene *MyoD1* (F-MyoD1: 5'AGC ACT ACA GCG GCG ACT, R-MyoD1: 5'GCG ACT CAG AAG GCA CGT C, MyoD1 cDNA probe: 5' GCT ACG AAG GCG CCT ACT ACA ACG AGG CGC) and for the presence of the t(2;13) and t(1;13) translocations using seminested PCR with primers PAX3, PAX7, FKHR-A, and FKHR-B (PAX3: 5' AGC TAT ACA GAC AGC TTT GT, PAX7: 5' GCT TCT CCA GCT ACT CTG AC, FKHR-A: 5' CTC TGG ATT GAG CAT CCA CC, FKHR-B: 5' TCC AGT TCC TTC ATT CTG CA).

Each PCR reaction was carried out with an initial denaturation step at 95°C for 5 min, annealing for 30 s, and extension at 72°C for 30 s, followed by 30 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing for 5 s, and extension at 72°C for 5 s. Undiluted PCR product ($1 \mu\text{l}$) was added to the seminested reaction mix for the second round of 30 cycles. The quality of the isolated RNA was assayed with the A2 and A3 oligonucleotide primers to detect the

Table 1 Characteristics of the patients

| Patient number | Age (years) | Sex | Histology | Translocation | Fusion type | MyoD1 | Follow-up (years) | Outcome |
|----------------|-------------|-----|-------------|---------------|-------------|-------|-------------------|---------|
| 1 | 7 | F | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 5.5 | AW |
| 2 | 6.5 | M | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 5.5 | DD |
| 3 | 14 | F | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 4 | AW |
| 4 | 9 | F | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 4 | AD |
| 5 | 10 | F | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 2.5 | AW |
| 6 | 2.5 | F | A-RMS | – | – | + | 7.5 | DD |
| 7 | 7 | F | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 1 | DD |
| 8 | 10.5 | M | A-RMS | t(1;13) | PAX7 | – | 2 | DD |
| 9 | 18 | F | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 8.5 | AW |
| 10 | 13 | M | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 5 months | DD |
| 11 | 3.5 | F | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 8 | AW |
| 12 | 1 month | M | A-RMS | – | – | + | 1 month | DD |
| 13 | 13.5 | F | A-RMS | t(2;13) | PAX3 | + | 4 | DD |
| 14 | 6.5 | M | A-RMS | t(1;13) | PAX7 | + | 4 | DD |
| 15 | 2.5 | F | A-RMS | t(1;13) | PAX7 | + | 3 | DD |
| 16 | 10 | M | E-RMS | – | – | + | 1.5 | DD |
| 17 | 2 | M | E-RMS | – | – | + | 4.5 | AW |
| 18 | 10.5 | M | E-RMS | – | – | + | 4 | DD |
| 19 | 0.5 | F | E-RMS | – | – | + | 3.5 | AW |
| 20 | 17.5 | M | E-RMS | – | – | + | 2 | DD |
| 21 | 1 | F | E-RMS | – | – | + | 3.5 | AW |
| 22 | 14.5 | F | E-RMS | – | – | + | 2 | DD |
| 23 | 1 | M | E-RMS | t(1;13) | PAX7 | + | 6.5 | AW |
| 24 | 6 | F | E-RMS | – | – | + | 5.5 | AW |
| 25 | 5 | M | E-RMS | – | – | + | 18 | DOC |
| 26 | 4 | F | E-RMS | – | – | + | 2 | DD |
| 27 | 7.5 | M | E-RMS | – | – | + | 6.5 | AD |
| 28 | 10 | F | E-RMS/A-RMS | t(1;13) | PAX7 | + | 1.5 | DD |
| 29 | 8.5 | F | E-RMS | – | – | + | Lost | Lost |
| 30 | 4 | F | E-RMS | – | – | + | 1 | DD |

A-RMS alveolar histology, *AD* alive with disease, *AW* alive and well, *DD* died of tumor progression, *E-RMS* embryonal histology, *E-RMS/A-RMS* residual tumor with alveolar histology after chemotherapy, *F* female, *M* male

ubiquitously expressed cABL kinase (primers A2: 5' TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG ACT T and A3: 5' TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGA GCT TTT). Negative controls lacking either RNA or RT were routinely included. Products were identified using 1.5% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

The specificity of the PCR products was confirmed by Southern blot hybridization using AlkPhos Direct Kit (Amersham Biosciences Trading GmbH, Austria) according to the manufacturer's instructions.

Results

Morphology

The embryonal RMS were characterized by a variable cellularity and haphazard cell orientation. Rhabdomyoblastic differentiation was discernible in 12 cases (Fig. 1a). Three cases were characterized as a botryoid subtype. None

of the cases had features of the spindle cell variant [29]. Alveolar RMS had a typical appearance of predominantly round-celled tumors with a characteristic pattern of tumor cell adhesion to the fibrovascular stroma. Two cases had an almost entirely solid morphology, but the alveolar pattern was still focally discernible (Fig. 1b). On the basis of the morphological examination of the primary tumors, the original classification was that of embryonal RMS in 15 patients and alveolar RMS also in 15 patients. The distribution of cases with embryonal and alveolar RMS differs from that known from a large series of cases [33] and may be caused, at least partially, by patient distribution in health service referral centers.

Immunohistochemical findings

The results of immunohistochemical staining are summarized in Table 2. Tumor cells stained positively for vimentin and desmin in the majority of cases tested and

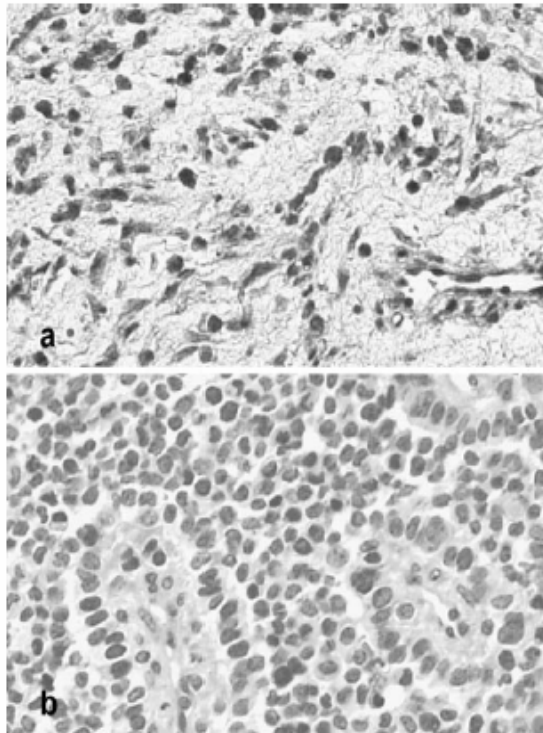


Fig. 1 **a** Embryonal RMS showing haphazardly oriented primitive and maturing tumor cells in a loose stroma, original magnification $\times 100$. **b** Alveolar RMS with perivascular palisading of the tumor cells and solid arrangement of the remaining sheets of undifferentiated tumor cells, original magnification $\times 200$

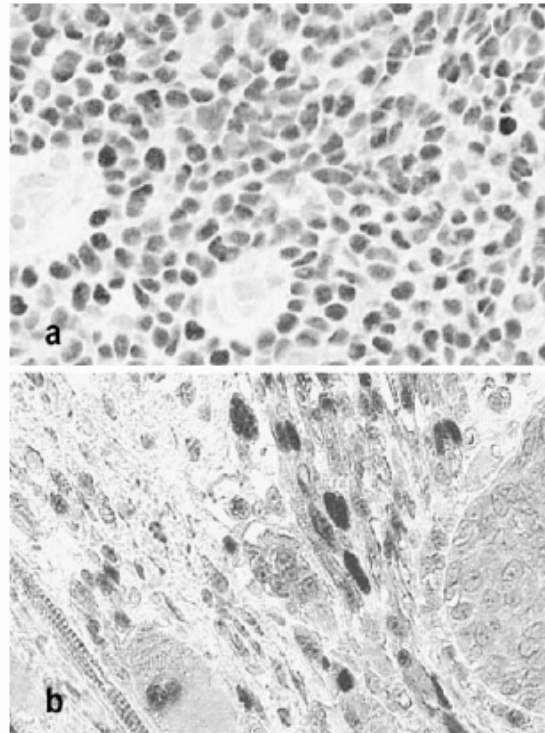


Fig. 2 Immunohistochemical staining demonstrating myogenin. **a** Alveolar RMS is uniformly positive in the tumor cell nuclei, original magnification $\times 200$. Alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase, fast red. **b** Undifferentiated tumor cells of embryonal RMS of the urinary bladder show occasional nuclear positivity. The more differentiated tumor cells with abundant cytoplasm are weakly stained or negative, original magnification $\times 200$

less frequently for sarcomeric actin. In addition, rhabdomyoblasts were positive for myogenin in 90% of cases (27/30) and MyoD1 in 60% (18/30). The intensity of myogenin positivity was uniform and strong in alveolar RMS regardless of the degree of differentiation, and even cases with no myoblastic maturation at the hematoxylin-eosin staining level were positive (Fig. 2a). In embryonal RMS, the staining for myogenin varied in individual tumor cells, and they were generally less positive than in the alveolar RMS (Fig. 2b). MyoD1 was positive in a smaller percentage of cases, the pattern of staining was not distinctive when embryonal and alveolar RMS were compared. Moreover, in some cases, the expression of MyoD1 was weak, most likely due to inadequate formalin fixation or other technical problems prior to the immunohistochemical procedure. All tumors were negative for CD99.

Molecular findings

All 30 RMS samples from primary tumors expressed the MyoD1 transcript, which hybridized to the 3' end of the MyoD1 cDNA probe. The absence of MyoD1 expression confirmed by negative RT-PCR and Southern Blot hybridization with non-radioactive-labeled cDNA probe was detected in one patient (case 20) with embryonal RMS after chemotherapy (Fig. 3). This tumor also failed to manifest nuclear immunoreactivity for MyoD1 and myogenin.

The t(2;13) and t(1;13) translocations were identified in cases of RMS having alveolar histology. The fusion transcript PAX3/FKHR indicating the translocation t(2;13) was found in ten patients with the diagnosis of alveolar RMS (Fig. 4), and the fusion transcript PAX7/FKHR indicating the t(1;13) was detected in three histologically diagnosed

Table 2 Results of immunohistochemistry (RMS diagnosed by morphology prior to reclassification of two cases of embryonal RMS into alveolar RMS)

SA sarcomeric actin

| Tumor type | Vimentin | Desmin | SA | Myogenin | MyoD1 | CD99 |
|------------|----------|--------|-------|----------|-------|------|
| RMS-A | 14/15 | 14/15 | 9/15 | 14/15 | 11/15 | 0/15 |
| % | 93.3 | 93.3 | 60 | 93.3 | 73.3 | 0 |
| RMS-E | 15/15 | 13/15 | 11/15 | 13/15 | 7/15 | 0/15 |
| % | 100 | 86.7 | 73.3 | 86.7 | 46.7 | 0 |

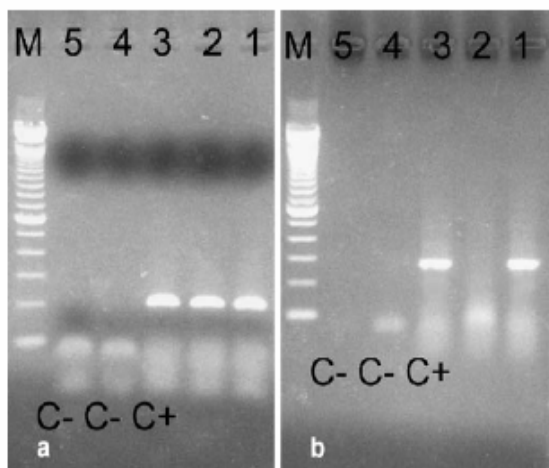


Fig. 3 RT-PCR analysis of RMS (case 20) for the transcription of MyoD1. **a** c-ABL RNA was amplified as a control for amplifiable RNA (209 bp). Lines: 1 expression c-ABL in the primary tumor, 2 expression c-ABL in the residual tumor after chemotherapy, 3 positive control for c-ABL transcript, 4 negative control for reverse transcription, 5 negative control for PCR. **b** Lines: 1 expression of MyoD1 in the primary tumor (264 bp), 2 absence of MyoD1 transcript in the residual tumor after chemotherapy, 3 positive control for MyoD1 transcript, 4 negative control for reverse transcription, 5 negative control for PCR

alveolar RMS. Furthermore, the fusion transcript PAX7/FKHR, suggesting the diagnosis of alveolar RMS, was found in 2 of 15 patients with RMS classified as embryonal by histology.

One of the latter patients (case 28) had no evidence of alveolar differentiation in the first biopsy, but the morphological features of alveolar RMS were revealed in the second biopsy taken from a residual tumor after chemotherapy (Fig. 5). This tumor was reclassified as mixed RMS; the alveolar component was most probably disclosed by a more extensive tissue sampling, although the possibility that the treatment induced changes in the tumor may have played a role. The other patient (case 23) had the tumor composed of a relatively uniform mixture of undifferentiated short spindle cells and round cells organized in diffuse sheets (Fig. 6). The vasculature and the stroma were inconspicuous. There was a tissue edema diminishing the tumor cell density. The myoblastic differentiation was apparent only at a level detected by immunohistochemistry (variably positive desmin and myogenin). The case was considered to fit the diagnosis of embryonal RMS at the time of diagnosis. After establishing the PAX7/FKHR fusion transcript, we reevaluated the findings, and, admittedly, some features of the tumor may fulfill the criteria of the so-called solid alveolar category [44]. The presence of spindle cells was, however, unusual.

Two cases had alveolar morphology, but there was no evidence of either t(2;13) or t(1;13) fusion transcripts. The first fusion-negative case was a patient with a congenital manifestation of alveolar RMS (case 12). The second was a 2-year-old girl (case 6) with botryoid RMS in the vagina. This

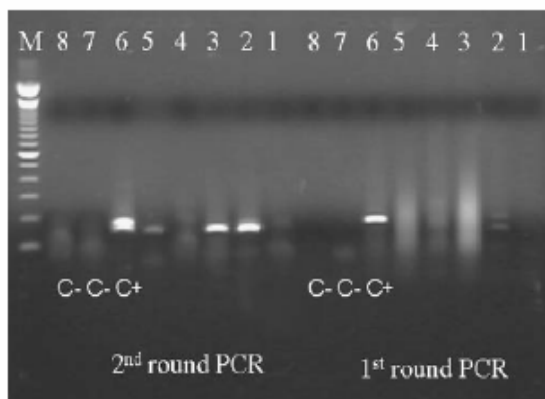


Fig. 4 Detection of the PAX3/FKHR transcript in bone marrow samples and PBPC (case 4, patient with alveolar RMS) using nested RT-PCR (188 bp first round RT-PCR and 158 bp second round RT-PCR). Lines: 1 negative sample of bone marrow after chemotherapy, 2 PAX3/FKHR transcript in the bone marrow sample at the time of the tumor recurrence, 3 PAX3/FKHR transcript in PBPC sample, 4 negative sample of the peripheral blood, 5 PAX3/FKHR transcript in PBPC sample after purging, 6 positive control for the PAX3/FKHR transcript, 7 negative control for reverse transcription, 8 negative control for PCR

patient had no evidence of alveolar differentiation in the first biopsy (from the vagina), but the morphological features of alveolar RMS were revealed in the biopsy taken from a metastatic disease in the inguinal lymph node 14 months after diagnosis and from lung metastasis 5 years later.

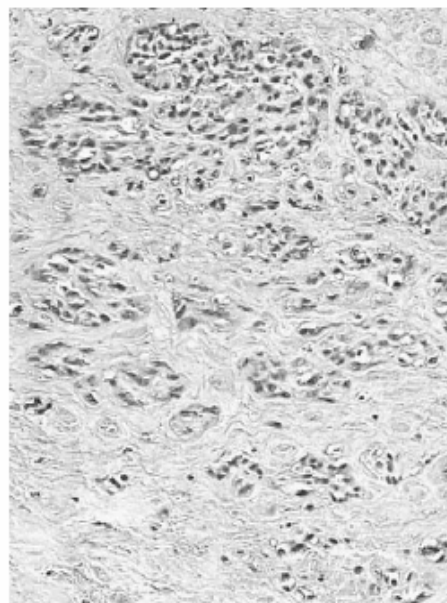


Fig. 5 Case 28. The original diagnosis was that of embryonal RMS. The post-therapy excision of the residual tumor showed a hyaline stroma with foci of the tumor having solid alveolar appearance, original magnification $\times 50$. RT-PCR revealed PAX7/FKHR fusion transcript in this patient, confirming the diagnosis of alveolar RMS

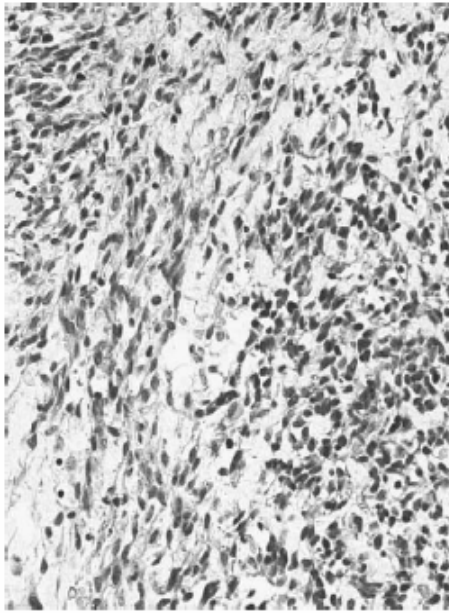


Fig. 6 Case 23. The tumor was composed of a mixture of round and spindle cells with a haphazard orientation. The tissue edema present in the tumor separated the cells in a similar fashion as seen in some embryonal RMS. The fibrovascular stroma was inconspicuous, and no features of alveolar morphology were revealed after sampling the entire tumor mass, original magnification $\times 100$. The original morphological interpretation was that of embryonal RMS. RT-PCR revealed PAX/FKHR fusion transcript. The diagnosis was then reevaluated, and the tumor was reclassified as "solid alveolar RMS" with awareness that such tumors may need further analysis in future

In one patient with alveolar RMS (case 13), the presence of the PAX3/FKHR fused gene was detected in the primary tumor and in two subsequent recurrences. We used RT-PCR to identify malignant cells in the resection margin of the tumor at the time of the second recurrence. Two of nine samples taken from the tumor margin, which were shown to be microscopically free of tumor or uncertain whether they contain tumor cells or not on frozen section histology, revealed the fusion transcript PAX3/FKHR of the same size as detected in the primary tumor. In this patient, bone marrow aspirates were also positive for the fusion transcript in the nested RT-PCR.

Although the number of patients with alveolar RMS was small to analyze clinical data such as the differences of the primary tumor sites and the outcome of the patients, we noticed that the age of patients with the PAX7/FKHR fusion was lower than the age of patients with PAX3/FKHR rearrangement. For the former group, it ranged from 1 to 10.5 years (median 6.5 years), while the latter group had the age range from 3.5 to 18 years (median 9.5 years).

Bone marrow samples

Bone marrow samples (12) and PBPC samples (13) in ten patients with alveolar RMS were examined by the RT-PCR technique using the specific primers.

Six of 12 bone marrow samples (from four patients) and 7 of 13 PBPC samples (from five patients) were shown to be positive for the fusion transcript. Four patients had the PAX3/FKHR and two had the PAX7/FKHR fusion product of the same size as detected previously in the primary tumors. One patient with the PAX3/FKHR fusion transcript (case 3) had no detectable fusion transcript in bone marrow samples at the time of diagnosis, but we found the MyoD1 transcript. A relatively weak transcript PAX3/FKHR was repeatedly detected in the primary tumor. Cytogenetic analysis performed in this patient failed to demonstrate t(2;13), probably because der(2) was lost and the small der(13) could not be identified. The cytogenetic analysis of the bone marrow samples showed tetra- and octaploidy. The discrepant findings may be explained by an existence of one clone carrying t(2;13) and by an appearance of secondary clones with different ploidy status and secondary chromosomal changes.

Follow up of patients with bone marrow and PBPC samples tested by RT-PCR is summarized in Table 3. Of the seven patients in whom we were able to identify bone marrow involvement or contamination of PBPCs by the tumor cells, six died of progressive disease, and one lives with a complete remission 3 years after the treatment start. Three patients had no detectable tumor by RT-PCR technique in the bone marrow. Two patients are alive without evidence of the disease. One patient, a boy aged 6 years, had a primary tumor of the paranasal sinuses. His recurrent tumor infiltrated the orbit. The therapy at the time of the tumor recurrence included surgical excision, chemothera-

Table 3 Follow-up of patients with bone marrow and PBPC samples tested by RT-PCR

| Case | Fusion product in primary tumor | Bone marrow | PBPC | Follow-up |
|------|---------------------------------|-------------|------|-----------|
| 1 | PAX3/FKHR+ | - | ND | AW |
| 2 | PAX3/FKHR+ | + | - | DD |
| | | | - | |
| | | | + | |
| 3 | PAX3/FKHR+ | + - | ND | AW |
| 4 | PAX3/FKHR+ | - | + | DD |
| | | + | + | |
| | | - | | |
| | | + | | |
| 5 | PAX3/FKHR+ | - | ND | DD |
| 8 | PAX7/FKHR+ | + | + | DD |
| 10 | PAX3/FKHR+ | ND | + | DD |
| | | | - | |
| 13 | PAX3/FKHR+ | + | - | DD |
| | | + | + | |
| 14 | PAX7/FKHR+ | - | - | DD |
| 15 | PAX7/FKHR+ | ND | + | DD |

+ - PAX3/FKHR negative but MyoD1 positive in a bone marrow sample, AW alive and well, DD died of tumor progression, ND not done, PBPC peripheral blood progenitor cells

py, and autologous stem cell transplantation. His bone marrow and peripheral progenitor cells at the time of the recurrent disease showed no evidence of the fusion product PAX7/FKHR. The patient died of a local progression of the tumor 7 months after autologous stem cell transplantation.

Discussion

RMS represent a group of sarcomas challenging investigators for decades to improve their diagnostic approach. Histological classification is well established [33, 34], but in practical diagnostics, there are many causes why the diagnosis is not always straightforward. One of diagnostic caveats in RMS rests in overlapping features between the subsets of RMS, and an incorrect interpretation of histological findings may lead to a choice of inadequate treatment intensity. Current treatment of patients with RMS is based on histopathology subtype, staging, size, and patient's age, those with advanced disease and unfavorable histology (alveolar RMS) require a more aggressive approach.

The immunohistochemical investigations are helpful and are performed routinely virtually in all cases of RMS and related neoplasms. In this study, we may confirm observations showing that there are differences between a strong and uniform pattern of myogenin positivity in alveolar RMS, whereas the pattern in embryonal RMS is more heterogeneous [6, 13, 27]. As has been pointed out, the difference in the intensity of staining cannot be used as a sole criterion discriminating the alveolar from embryonal RMS [6]. The problem with interpreting immunohistochemistry for myogenin, and for MyoD1, also arises in samples showing post-therapy changes. It has been demonstrated that skeletal muscle, especially regenerating or atrophic muscle fibers, may display myogenin positivity [6]. Such a phenomenon may be misleading in the interpretation of the local residual disease when investigated by morphology alone. The most frequent subtypes in children, alveolar and embryonal RMS, are entities associated with different genomic changes. Therefore, molecular analysis helps to define the nature of these tumors more precisely.

All 30 patients with RMS analyzed in this study expressed the MyoD1 transcript in their primary tumors. The absence of MyoD1 expression using RT-PCR and Southern Blot hybridization with a non-radioactive-labeled cDNA probe was detected only in one patient with embryonal RMS after treatment. This residuum of the tumor failed to manifest nuclear immunoreactivity for MyoD1 and myogenin in spite of the presence of well-defined myoblasts in the tissue. The tumor cell differentiation was particularly pronounced in tissues obtained from postchemotherapy patients, and their tumors were often composed of differentiated rhabdomyoblast, a phenomenon recognized by other authors [8, 9]. Downregulation of nuclear regulatory proteins myogenin and MyoD1 in therapy-induced differentiation of rhabdomyoblasts has been noticed by Wang et al. [47].

Data on specificity of MyoD1 expression are contradictory. Frascella et al. [19] considered MyoD1 a sensitive

and specific marker for the molecular diagnosis of RMS. In our study, in accordance with observations published by Gattenloehner et al. [21], we found that the MyoD1 transcript is not entirely specific for RMS. We found weak expression of MyoD1 in normal skeletal muscles. Furthermore, other neoplasms used as a control tissue (teratomas, synovial sarcoma, Ewing tumor/primitive neuroectodermal tumor (PNET), some non-Hodgkin's B cell lymphomas) revealed MyoD1 expression (data not shown). To test the specificity and to minimize the possibility of PCR contamination, we analyzed peripheral bloods and bone marrow aspirates without tumor cell contamination, all of them with negative results of MyoD1 expression. We also analyzed, simultaneously with samples of RMS, other neoplasms (epiteloid sarcoma, aggressive fibromatosis, non-Hodgkin's T cell lymphomas, and carcinomas) which were negative for all tested molecules by RT-PCR. This diminishes the usefulness of MyoD1 investigation in the diagnosis of RMS. Further studies are necessary to address this issue.

Chimeric transcripts and gene fusions can be detected in samples by RT-PCR and are of a great diagnostic significance in RMS. The molecular analysis appears superior to classical cytogenetics, because conventional karyotyping of these tumors is often unyielding [18].

Using RT-PCR, we disclosed PAX/FKHR transcripts in primary RMS in 13 of 15 patients diagnosed as alveolar RMS by histology, which underscores a good correlation between morphological and molecular diagnostics. Two patients with alveolar histology were, however, negative for PAX3/FKHR and PAX7/FKHR transcripts. It is possible that these cases harbored an uncommon variant translocation associated with alveolar RMS such as t(2;11)(q37;q13) [31], t(8;13)(p21;q14) [15], t(2;2)(q35;p23) [46], or had other types of genetic abnormalities that led to the activation of oncogenic pathways as do PAX-FKHR oncoproteins. Two tumors with t(1;13) were diagnosed originally as embryonal RMS by histology. Reexamination of the original material in one patient revealed embryonal type of RMS at presentation with no alveolar features, although multiple samples were taken. After chemotherapy, the residual tumor showed a hyalinized tumor with a focus of a well-defined alveolar RMS, which was underestimated at the time of the residual tumor description. Following the molecular analysis revealing the PAX7/FKHR fusion transcript, the tumor was reclassified as mixed embryonal/alveolar RMS. The second case diagnosed as embryonal RMS retained its morphology as observed in the biopsy of the recurrent tumor, and we were unable to redefine this tumor as a classical alveolar type. The tumor best fitted the category described by Tsokos [44] as a solid alveolar form, although the mixture of undifferentiated round and spindle cells would be rather uncommon for this subtype. Such cases should be possibly classified separately until more detailed data on their molecular profile are gathered.

The potential clinical value of determining minimal (submicroscopic) residual disease in situ by detection of fusion transcripts PAX3/FKHR and PAX7/FKHR by nested RT-PCR was confirmed by our findings, showing

fusion transcripts in microscopically tumor-free resection borders. The tendency to recur locally often observed in RMS may well find its explanation in tumor cells located distant from the main tumor mass and obscured from microscopical identification. This approach also helps to distinguish residual tumor cells with advanced differentiation (post-therapy changes) from atrophic and regenerating muscle cells at the site of the tumor removal.

Fusion transcripts generated through chromosomal translocations have been demonstrated to represent excellent targets for monitoring minimal residual disease in hematological malignancies [20, 32, 43]. Many studies suggest a direct correlation between the numbers of residual tumor cells and the prognosis of the patients. Dissemination of tumor cells in the bone marrow and peripheral blood has been observed also in patients with solid malignancies [22, 49]. The presence of metastases is the most adverse prognostic factor in RMS [38], and the bone marrow is a frequent site of tumor dissemination, particularly in the alveolar subtype [23, 41]. Assessment of bone marrow dissemination by light microscopy has a limited sensitivity. Using the RT-PCR technique, we were able to identify bone marrow involvement in 7 of 12 bone marrow samples and in 7 of 13 PBPC samples. Assessment of a potential tumor cell infiltration of bone marrow grafts or PBPCs destined for stem cell transplantation after myeloablative regimen is important for a selection of tumor cell-free grafts.

The prognostic value of the identification of fusion transcripts in bone marrow aspirates or in PBPC samples has to be proven in further prospective studies. Our results detecting the fusion transcripts typical of alveolar RMS in the bone marrow and PBPC suggest that patients with positive findings are at a high risk of the tumor progression. Similarly, results described by Kelly [23] suggest that RT-PCR assay in alveolar RMS may identify a group of patients who are at a high risk despite having histologically negative bone marrows.

The identification of the translocation variants in alveolar RMS appears to be of prognostic significance [24]. The t(1;13) has been reported to occur in alveolar RMS affecting younger individuals, and the prognosis may be somewhat less unfavorable than that for patients with t(2;13) [24]. Our group of patients is too small to draw conclusions in this respect. However, the age of patients with t(1;13) was lower in the reported series of patients than that in patients with t(2;13). Of patients with t(1;13), one of five presented with metastatic disease at the time of diagnosis, whereas five of ten patients with t(2;13) were diagnosed with a generalized disease. A further follow up of the patients is under way.

In conclusion, the application of RT-PCR techniques in the classification of childhood RMS may help to resolve histological controversies in some cases by the use of criteria based on genetic differences between the alveolar and embryonal RMS. Alveolar histology may be focal within an embryonal tumor and, admittedly, may be missed by an incomplete sampling either by a surgeon or by a

pathologist. From that reason, proper handling of the tumor specimens submitted for histopathological examination remains a high-priority task to avoid misinterpretations. When employing the RT-PCR analysis into the diagnostic support, we may detect fusion gene transcripts, and, therefore, chromosomal translocations specific for the alveolar type of RMS. Beside the histopathological classification, the RT-PCR has a significant impact on specification of diagnosis and on selecting an optimal therapeutic approach. RT-PCR techniques may have a role in staging, in monitoring the effects of therapy, in recognizing malignant cells at the tumor resection margins, in assessing the efficacy of purging protocols for autologous stem cell transplantation, and in post-therapy follow up.

Acknowledgements The study was supported by the Grant FN Motol IG 9746, the Research Project of the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic No. 0021620813 and by the Research Project of the Ministry of Health No. 00000064203. We thank Dr. E. Štejskalova, Department of Pediatric Oncology, for the cytogenetic evaluation of case number 3. The authors wish to thank William A. Newton, Jr., M.D., president of the International Consortium for Cure of Childhood Cancer in China, Columbus, OH, USA, and Stephen J. Qualman, M.D., Head of the Department of Pathology, Children's Hospital, Columbus, OH, USA, for valuable comments to the manuscript.

References

1. Afify A, Mark HF (1999) Trisomy 8 in embryonal rhabdomyosarcoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 108:127–132
2. Anderson J, Gordon A, Pritchard-Jones K, Shipley J (1999) Genes, chromosomes, and rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 26:275–285
3. Barr FG (1997) Molecular genetics and pathogenesis of rhabdomyosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 19(6):483–491
4. Barr FG (1999) The role of chimeric paired box transcription factors in the pathogenesis of pediatric rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 59(7 Suppl):1711–1715
5. Bober E, Franz T, Arnold HH, Gruss P, Tremblay P (1994) PAX3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of demomyotomal muscle progenitor cells. *Development* 120:603–612
6. Cessna MH, Zhou H, Perkins SL, Tripp SR, Pickering D, Daines C, Coffin CM (2001) Are myogenin and MyoD1 expression specific for rhabdomyosarcoma? A study of 150 cases, with emphasis on spindle cell mimics. *Am J Surg Pathol* 25:1150–1157
7. Chen B, Dias P, Jenkins JJ III, Savell VH, Parham DM (1998) Methylation alterations of the MyoD1 upstream region are predictive of subclassification of human rhabdomyosarcomas. *Am J Pathol* 152(4):1071–1079
8. Coffin CM, Rulon J, Smith L, Bruggers C, White FV (1997) Pathologic features of rhabdomyosarcoma before and after treatment: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 10:1175–1187
9. d'Amore ES, Tollot M, Stracca-Pansa V, Menegon A, Meli S, Carli M, Ninio V (1994) Therapy associated differentiation in rhabdomyosarcomas. *Mod Pathol* 7:69–75
10. Davis RJ, Barr FG (1997) Fusion genes resulting from alternative chromosomal translocations are overexpressed by gene-specific mechanisms in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8047–8051

11. Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG (1994) Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 54 (11):2869–2872
12. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51(6):987–1000
13. Dias P, Chen B, Dilday B, Palmer H, Hosoi H, Singh S, Wu C, Li X, Thompson J, Parham D, Qualman S, Houghton P (2000) Strong immunostaining for myogenin in rhabdomyosarcoma is significantly associated with tumors of the alveolar subclass. *Am J Pathol* 2:399–408
14. Douglass EC, Valentine M, Etcubanas E, Paraham D, Webber BL, Houghton PJ, Houghton JA, Green AA (1987) A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet Cell Genet* 45:148–155
15. Douglass EC, Rowe ST, Valentine M, Paraham DM, Berkow R, Bowman WP, Maurer HM (1991) Variant translocations of chromosome 13 in alveolar rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 3(6):480–482
16. Douglass EC, Shapiro DN, Valentine M, Rowe ST, Carroll AJ, Raney RB, Ragab AH, Abella SM, Paraham DM (1993) Alveolar rhabdomyosarcoma with the t(2;13): cytogenetic findings and clinicopathologic correlations. *Med Pediatr Oncol* 21:83–87
17. Downing JR, Khandekar A, Shurtleff SA, Head DR, Paraham DM, Webber BL, Pappo AS, Hulshof MG, Conn WP, Shapiro DN (1995) Multiplex RT-PCR assay for the differential diagnosis of alveolar and Ewing's sarcoma. *Am J Pathol* 146 (3):626–634
18. Fletcher JA, Kozakewich HP, Hoffer FA (1991) Diagnostic relevance of clonal cytogenetic aberrations in malignant soft-tissue tumors. *N Engl J Med* 324:436–442
19. Frascella E, Toffolatti L, Rosolen A (1998) Detection of the MyoD1 transcript in rhabdomyosarcoma cell lines and tumor samples by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 152(2):577–582
20. Gabert J (1999) Detection of recurrent translocations using real time PCR: assessment of the technique for diagnosis and detection of minimal residual disease. *Haematologica* 84:107–109
21. Gattenloehner S, Dockhom-Dwomiczak B, Leuschner I, Vincent A, Muller-Hermelink HK, Marx A (1999) A comparison of MyoD1 and fetal acetylcholine receptor expression in childhood tumors and normal tissue. *J Mol Diagn* 1(1):23–31
22. Israeli RS, Miller WH, Su SL, Powell CT, Fair WR, Samadi SD, Huryk RF, DeBlasio A, Edwards ET, Wise GJ (1994) Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells. Comparison of prostate specific membrane antigen and prostate specific antigen-based assay. *Cancer Res* 54:6306–6310
23. Kelly KM (1996) Minimal disease detection in patients with alveolar rhabdomyosarcoma using a reverse transcription polymerase chain reaction method. *Cancer* 15:1320–1327
24. Kelly KM (1997) Common and variant gene fusions predict distinct clinical phenotypes in rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 15(5):1831–1836
25. Kodet R (1989) Rhabdomyosarcoma in childhood. An immunohistochemical analysis with myoglobin, desmin and vimentin. *Pathol Res Pract* 185:207–213
26. Kullendorff CM, Donner M, Mertens F, Mandahl N (1998) Chromosomal aberrations in a consecutive series of childhood rhabdomyosarcoma. *Med Pediatr Oncol* 30:156–159
27. Kumar S, Perlman E, Harris CA, Raffeld M, Tsokos M (2000) Myogenin is a specific marker for rhabdomyosarcoma: an immunohistochemical study in paraffin-embedded tissues. *Mod Pathol* 13:988–993
28. Kushner BH, LaQuaglia MP, Cheung NK, Kramer K, Hamelin AC, Gerald WL, Ladanyi M (1999) Clinically critical impact of molecular genetic studies in pediatric solid tumors. *Med Pediatr Oncol* 33:530–535
29. Leuschner I, Hams D, Matke A, Koscieniak E, Treuner J (2001) Rhabdomyosarcoma of the urinary bladder and vagina: clinicopathologic study with emphasis on recurrent disease: a report from the Kiel Pediatric Tumor Registry and the German CWS Study. *Am J Surg Pathol* 25:856–864
30. Miettinen M, Rapola J (1989) Immunohistochemical spectrum of rhabdomyosarcoma and rhabdomyosarcoma-like tumors. Expression of cytokeratin and 68-kD neurofilament protein. *Am J Surg Pathol* 13:120–132
31. Miki H, Kobayashi S, Kushida Y, Sasaki M, Haba R, Hirakawa E, Ogura K, Ohmori M (1999) A case of infantile rhabdomyofibrosarcoma with immunohistochemical, electron microscopical, and genetic analyses. *Hum Pathol* 30(12):1519–1522
32. Mitterbauer G, Zimmer C, Pirc-Danoewinata H, Haas OA, Hojas S, Schwarzinger I, Greinix H, Jager U, Lechner K, Mannhalter C (2000) Monitoring of minimal residual disease in patients with MLL-AF6-positive acute myeloid leukaemia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 109(3):622–628
33. Newton WA, Gehan EA, Webber BL, Marsden HB, van Unnik AJ, Hamoudi AB, Tsokos MG, Shimada H, Hams D, Schmidt D (1995) Classification of rhabdomyosarcomas and related sarcomas. Pathologic aspects and proposal for a new classification—an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study. *Cancer* 75 (6):1073–1085
34. Parham DM (2001) Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlation with molecular studies. *Mod Pathol* 14:506–514
35. Parham DM, Webber B, Holt H, Williams WK, Maurer H (1991) Immunohistochemistry of childhood rhabdomyosarcomas and related neoplasms. Results of an Intergroup Rhabdomyosarcoma Study project. *Cancer* 67:3072–3080
36. Qualman SJ, Bowen J, Parham DM, Brantom PA, Meyer WH (2003) Protocol for the examination of specimens from patients (children and young adults) with rhabdomyosarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 127:1290–1297
37. Rowe D, Gerrard M, Gibbons B, Malpas JS (1987) Two further cases of t(2;13) in alveolar rhabdomyosarcoma indicating a review of the published chromosome breakpoints. *Br J Cancer* 56:379–380
38. Ruyman FB, Newton WA, Ragab AH, Donaldson HM, Foulkes M (1984) Bone marrow metastases at diagnosis in children and adolescents with rhabdomyosarcoma. *Cancer* 53:368–373
39. Scrabble H, Witte D, Shimada H, Seemayer T, Sheng WW, Soukup S, Koufos A, Houghton P, Lampkin B, Cavenee W (1989) Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1(1):23–35
40. Stuart ET, Gruss P (1996) PAX: developmental control genes in cell growth and differentiation. *Cell Growth Differ* 7(3):405–412
41. Thomson B, Hawkins D, Felgenhauer J, Radich J (1999) RT-PCR evaluation of peripheral blood, bone marrow and peripheral blood stem cells in children and adolescents undergoing VACIME chemotherapy for Ewing's sarcoma and alveolar rhabdomyosarcoma. *Bone Marrow Transplant* 24(5):527–533
42. Tobar A, Avigad S, Zoldan M, Morc C, Goshen Y, Zaizov R (2000) Clinical relevance of molecular diagnosis in childhood rhabdomyosarcoma. *Diagn Mol Pathol* 9(1):9–13
43. Tobal K, Moore H, Macheta M, Yin JA (2001) Monitoring minimal residual disease and predicting relapse in APL by quantitating PML-RARalpha transcripts with a sensitive competitive RT-PCR method. *Leukemia* 15(7):1060–1065
44. Tsokos M (1994) The diagnosis and classification of childhood rhabdomyosarcoma. *Semin Diagn Pathol* 11:26–38
45. Turc-Carel C, Lizard-Nacol S, Justrabo E, Favrot M, Philip T, Tabone E (1986) Consistent chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 19:361–362

46. Wachtel M, Dettling M, Koscielnik E, Stegmaier S, Treuner J, Simon-Klingenstein K, Buhlmann P, Niggli FK, Schafer BW (2004) Gene expression signatures identify rhabdomyosarcoma subtypes and detect a novel t(2;2)(q35;p23) translocation fusing PAX3 to NCOA1. *Cancer Res* 64(16):5539–5545
47. Wang NP, Marx J, McNutt MA, Rutledge JC, Gown AM (1995) Expression of myogenic regulatory proteins (myogenin and MyoD1) in small blue round cell tumors of childhood. *Am J Pathol* 147(6):1799–1810
48. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S (1991) The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251(4995):761–766 (Review)
49. Weitz J, Kienle P, Lacroix J, Willeke F, Benner A, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M (1998) Dissemination of tumor cells in patient undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 4:343–348

Sumerauer D., Matějčková Š., Hrubá A., Eckschlager T., Manipulace se štěpy hematopoetických progenitorových buněk a jejich použití v klinické praxi, Čas Lék čes, 141(13), 411-416, 2002

ČASOPIS LÉKARŮ ČESKÝCH, 141, 2002, č. 13

PŘEHLEDNÝ ČLÁNEK

MANIPULACE SE ŠTĚPY HEMATOPOETICKÝCH PROGENITOROVÝCH BUNĚK A JEJICH POUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI

Sumerauer D., ¹Matějčková Š., ¹Hrubá A., Eckschlager T.
Klinika dětské onkologie 2. LF UK a FNM, Praha
¹ÚHKT, Praha

SOUHRN

Vysokodávkovaná chemoterapie s následným převodem progenitorových hematopoetických buněk kostní dřeně nebo periferní krve se úspěšně používá v léčbě řady dětských i dospělých pacientů s leukémiemi a solidními nádory. Štěpy k autologní transplantaci buněk kostní dřeně a periferních kmenových buněk mohou být kontaminovány reziduálními nádorovými buňkami, které následně mohou způsobit relaps v potransplantačním období. Proto se používají postupy, které mají případně kontaminující nádorové buňky odstranit. Manipulace se štěpy jsou využívány i u alogenních transplantací, kde odstranění T lymfocytů ze štěpů snižuje riziko vzniku reakce štěpu proti hostiteli. V příspěvku uvádíme přehled v současné době využívaných postupů se zaměřením na potenciální výhody a rizika každého z nich.

Klíčová slova: negativní selekce, pozitivní selekce, transplantace hematopoetických buněk, minimální nádorová choroba.

SUMMARY

Sumerauer D., Matějčková Š., Hrubá A., Eckschlager T.: Processing the Hematopoietic Progenitor Grafts and Their Use in Clinical Practice

Autologous stem cell transplantation has been successfully used in treatment of various hematological malignancies and solid tumors in children and adults. Published data have confirmed that bone marrow harvests and peripheral blood stem cell collections frequently contain a significant number of tumor cells. Contaminating tumor cells can contribute to the disease relapse in posttransplant period, so attempts are made to eliminate contaminating tumor cells from autografts. In the case of allogenic transplantation, T-lymphocytes depletion from graft decreases the risk of the graft versus host disease after transplantation. In this article we comment techniques available and method used for elimination of tumor cells. Commentary is aimed on potential benefits and risks of every method.

Key words: *ex vivo* purging, bone marrow transplantation, minimal residual disease.

Su.

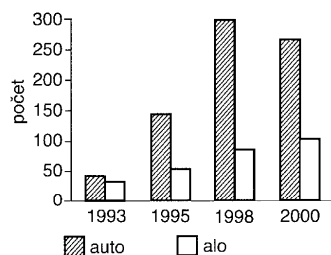
Čas. Lék. čes., 141, 2002, No. 13, p. 411-416.

Vysokodávkovaná chemoterapie s převodem hematopoetických progenitorových buněk (dále jen transplantace) zlepšuje prognózu pacientů s některými leukémiemi, lymfomy a solidními nádory (souhrnně 32). Zdrojem štěpu (kostní dřeně (KD) nebo periferních hematopoetických progenitorových buněk (PBPC)) může být sám pacient – autologní transplantace – nebo jiná osoba (identické dvojče, HLA shodný nebo haploidentický sourozenec nebo jiný rodinný příslušník, HLA shodný nepříbuzný dárce) – alogenní transplantace. Trendy vývoje počtu transplantací v období let 1993–2000 a zastoupení jednotlivých indikací v České republice na základě údajů trans-

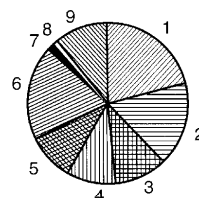
plantační sekce hematologické a onkologické společnosti ČLS JEP (62) zobrazuje graf 1a a 1b.

Výhody autologních transplantací: 1) Není nutné vyhledávat vhodného dárce, kterého se ne vždy podaří najít; 2) Nevzniká reakce štěpu proti hostiteli, a proto není nutná imunosupresivní terapie; 3) Obnova krvetvorby a imunity je podstatně rychlejší; 4) Výskyt a závažnost peritransplantačních komplikací je menší; 5) Finanční náklady jsou výrazně nižší.

Na druhé straně má autologní transplantace také některé nevýhody: 1) Není přítomna reakce štěpu proti nádoru; 2) Tento typ transplantace lze využít pouze u nádorů, ale ne



Graf 1a. Trend vývoje počtu autologních a alogenních transplantací



Graf 1b. Indikace k transplantacím (společně autologní i alogenní) v ČR v období 1993–2000

1 – NHL, 2 – mnohočetný myelom, 3 – Hodgkinova choroba, 4 – AML, 5 – CML, 6 – solidní nádory, 7 – aplastická anémie, 8 – autoimunitní choroby, 9 – ostatní

u nenádorových chorob a 3) **Je riziko přítomnosti nádorových buněk ve štěpu.**

Přenos vitálních klonogenních nádorových buněk štěpem, které mohou dát vznik relapsu, je v současnosti považován u některých nádorů (neuroblastom, AML, karcinom prsu) za prokázány. V minulosti se vedly spory o to, zda relapsy po autologních transplantacích způsobují nádorové buňky, které perzistují v organizmu, protože unikly megaterapii, nebo nádorové buňky přenesené s podaným štěpem. Klinicko-experimentální studie se značením štěpů geny prokázaly, že alespoň za část relapsů u neuroblastomu, AML a lymfomů jsou odpovědné nádorové buňky přenesené se štěpem (3, 10, 52). Podstatou těchto důkazů je vnesení bakteriálního genu do buněk štěpu a detekce tohoto genu metodou PCR v buňkách recidivujícího nádoru. K nepřímým důkazům přenosu relapsu štěpem patří údaje o častějším výskytu relapsů u B non-Hodgkinských lymfomů a karcinomu prsu po autologních transplantacích nádorem kontaminovanými štěpy (7, 23, 50, 58). Dále tento původ recidiv podporuje výskyt atypických plicních metastáz neuroblastomu po autologní transplantaci (43). Další indicií je i vyšší výskyt relapsů po autologních než po alogenních nebo syngenních transplantacích u sarkomů a neuroblastomu (31, 43). Na druhé straně jsou uveřejněny i práce, které neprokázaly horší prognózu pacientů po transplantaci kontaminovanými štěpy (8). Riziko kontaminace štěpů kostní dřeně i periferních progenitorových buněk je poměrně značné. Některé údaje o výskytu kontaminace autologních štěpů kostní dřeně a periferních progenitorových buněk u nádorů, u kterých je indikovaná transplantace, shrnuje tabulka 1. Jednou z předpokládaných výhod transplantace periferních progenitorových buněk, ve srovnání s transplantací kostní dřeně, je nižší stupeň kontaminace nádorovými buňkami (46, 55). Tento předpoklad nebyl dosud jednoznačně potvrzen a je pravděpodobné, že rozdíl je pouze v množství nádorových buněk kontaminujících štěpy.

Dosud také není jasné, u kterých nádorů kontaminace štěpu nádorovými buňkami představuje riziko přenosu relapsu. Rovněž nejasná je otázka, jaké množství kontaminujících nádorových buněk představuje riziko. Proto se zatím musí vycházet z pracovní hypotézy, že jakákoli přítomnost nádorových buněk ve štěpu je u všech nádorů riziková. Snížení rizika kontaminace štěpů kostní dřeně i periferních progenitorových buněk se dosahuje intenzivní chemoterapií před odběrem štěpu – tzv. „*in vivo purging*“, někdy ještě doplněné o odstranění nádoro-

vých buněk manipulací se štěpem – „*ex vivo purging*“. V tomto sdělení se budeme nadále zabývat pouze problematikou „*purgingu ex vivo*“.

Ten vychází ze dvou možností: 1) selekce hematopoetických progenitorových buněk, při které se odstraní všechny ostatní, tedy i nádorové buňky – pozitivní selekce; 2) odstranění nádorových buněk – depleční (negativní) čištění.

Cílem tohoto sdělení je podat informace o možnostech a limitacích hlavních metod *ex vivo* čištění. Stále totiž není známa ideální metoda *purgingu*, která splňuje požadavky: 1) likvidovat všechny nádorové buňky ve štěpu u širokého spektra nádorů; 2) nepoškodit progenitorové buňky a 3) být technicky a ekonomicky přijatelná.

V současnosti je nejpoužívanější metodou čištění pozitivní selekce hematopoetických progenitorových buněk exprimujících CD34 antigen. K dispozici jsou komerčně vyráběné přístroje umožňující selekci CD34 pozitivních buněk. Z porovnání tří systémů selekce CD34+ buněk (imunoabsorpční technika založená na vazbě avidin-biotin, selekce ferro-dextranovými partikulami nebo paramagnetickými mikročásticemi s navázanou protilátkou a magnetickým polem) vyplývá, že magnetické selekce jsou výhodnější pro menší ztráty progenitorových buněk (29). Při magnetických selekcích je výtěžek CD34+ buněk 40–65 % vstupní hodnoty, u imunoabsorpční techniky pouze 30 %. Během magnetické selekce dochází především ke ztrátám diferencovaných progenitorů, nezadané progenitorové buňky zůstávají z převážné části zachovány. Naopak při imunoabsorpční metodě se ztrácí časné nezadané progenitory, což se vysvětluje nerovnováhou mezi silnou vazbou avidin-biotin a nedostatečným uvolněním CD34+ buněk z kolony. Pozitivní selekci lze získat štěpy, v nichž je až 99 % CD34+ buněk, obvykle se však čistota selektovaného štěpu pohybuje mezi 70–90 %. Tím se odstraňují nežádoucí buňky včetně nádorových (4, 6, 40). Tento způsob *purgingu* se používá u NHL, B-CLL nebo karcinomu prsu k redukci nádorových buněk (26). Významné je rovněž využití u alogenních transplantací pro snížení počtu T lymfocytů ve štěpu s cílem zabránit vzniku reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). Získaná data však ukazují, že samotná pozitivní selekce je nedostatečná pro eliminaci nádorových buněk ze štěpu, zejména pokud maligní buňky v některé fázi maturace exprimují antigen CD34 (29). Řešením může být dvoustupňová pozitivní/negativní selekce s použitím protilátky proti specifickému znaku nádorových buněk. Kom-

Tab. 1. Výskyt kontaminace štěpů periferních progenitorových buněk a kostní dřeně podle literárních údajů i vlastních zkušeností kliniky dětské onkologie (označeno). Frekvence kontaminace se liší podle použitého *in vivo purgingu* i podle metody detekce.

| Nádor | typ štěpu | metoda detekce | % kontaminovaných štěpů | citace |
|-------------------------------------|-----------|---------------------------|-------------------------|---------------|
| Ewingův sarkom | PBPC | RT PCR | 7 | 16 |
| Ewingův sarkom | PBPC | RT PCR | 13 | KDO |
| Ewingův sarkom + neuroblastom | PBPC | RT PCR + imunohistochemie | 82 | nepublik. 37 |
| germinální nádory | PBPC | RT PCR | 35 | 27 |
| karcinom prsu 2. a 3. KS | PBPC | RT PCR | 70 | 38 |
| karcinom prsu 4. KS | PBPC | imunocytochemie | 100 | 5 |
| karcinim prsu 4. KS | PBPC | imunohistochemie | 50 | 40 |
| neuroblastom | PBPC | RT PCR | 77 | 61 |
| neuroblastom | PBPC | imunohistochemie | 14 | 47 |
| neuroblastom | PBPC | FISH | 13 | KDO |
| neuroblastom | KD | FISH | 28 | nepublik. KDO |
| pokročilý malobuněčný karcinom plic | PBPC | imunohistochemie | 50 | nepublik. 5 |

binace pozitivní a negativní selekce vede k optimální depleci maligních buněk ze štěpu.

Problémy se zaváděním selekce se týkají především získání vstupního produktu. U pacientů, kteří absolvovali více cyklů chemoterapie, bývá obtížné získat PBPC nebo kostní dřeň s vyšším zastoupením CD34+ buněk (podmínkou pro selekci je nejméně 0,8 %), stejně jako dostatečnou celkovou dávku progenitorových buněk. K transplantaci CD34 selektovaným štěpem je nutné získat nejméně 8×10^6 CD34+ buněk/kg, u štěpů k autologní transplantaci nemanipulovaným štěpem stačí $3\text{--}5 \times 10^6$ CD34+ buněk/kg. Dalším problémem jsou i vysoké finanční náklady na selekci. Se selekcí CD34+ buněk jsou zkušenosti i v ČR. V ÚHKH provádíme CD34 selekci magnetickým polem, u lymfoproliferací doplněnou odstraněním zbylých nádorových B nebo T buněk. Rovněž u alogenních transplantací s vysokým rizikem reakce štěpu proti hostiteli provádíme depleci T lymfocytů.

K negativní selekci jsou imunologické techniky specifitější než čištění cytostatiky. Využívají rozdíly v povrchových znacích mezi normálními hemopoetickými prekurzory a nežádoucími buňkami, které chceme ze štěpů odstranit. Nástrojem jsou specifické, původně polyklonální, nyní nejčastěji monoklonální protilátky. Protilátka se naváže na cílovou buňku a v přítomnosti komplementu vyvolá její lýzu nebo donese k buňce toxin či magnetickou partikuli, která umožní selekci buněk. První pokusy o čištění hematopoetických štěpů byly zaměřeny na redukci reakce štěpu proti hostiteli po alogenních transplantacích kostní dřeně odstraněním T lymfocytů. Využívalo se antilymfocytární nebo antitymocytní sérum, případně z něj separované globuliny. Protilátky byly nejčastěji koňské nebo králičí a k lýze buněk se přidával morčecí nebo králičí komplement. V současnosti se pro čištění alogenních štěpů od haploidentických a nepříbuzných dárců, kde je riziko vzniku reakce štěpu proti hostiteli nejvyšší, využívají monoklonální protilátky proti různým znakům T lymfocytů (41).

Čištění autologních štěpů monoklonálními protilátkami a komplementem se často používá u pacientů s lymfomy, protože lymfocytární znaky jsou dobře prostudované a je možné proti nim získat řadu dobře definovaných monoklonálních protilátek. Řada autorů popsala čištění autologních štěpů pacientů s lymfomy, neuroblastomem nebo s karcinomem prsu protilátkou (22, 63, 64). Pokusy o eliminaci leukemických buněk s mnohočetnou lékovou rezistencí byly prováděny monoklonální protilátkou proti P-glykoproteinu v kombinaci s farmakologickým čištěním etoposidem (1).

Pro účinnou eliminaci všech maligních buněk z kontaminovaného štěpu se doporučuje použít směs protilátek a cyklus čištění několikrát opakovat. Tento postup ale zvyšuje ztráty hematopoetických progenitorových buněk ve štěpu a je značně časově i finančně náročný (28). Proto se někdy čištění protilátkami a komplementem doplňuje farmakologickým čištěním (9). Na protilátky je také možné navázat radionuklidy (17), rostlinné nebo bakteriální toxiny, cytostatika, případně látky schopné indukovat apoptózu. Cílem je, aby se účinná látka během transportu k cílové buňce neuvolnila a nepoškozovala normální buňky, ale uvolnila se v účinné formě až na povrchu nebo uvnitř cílových buněk.

Původní imunotoxiny měly na sobě vázaný ricinový toxin. Na protilátky antiCD2 nebo antiCD30 byl navázán protein saponin inaktivující ribozomy, který odstranil maligní T, respektive B lymfomové buňky ze selektovaných CD34+ hemopoetických buněk (35). Pro čištění alogenních štěpů bylo navrženo použití pseudomonádový exotoxin navázaný na protilátku proti receptorům pro IL-2. Tímto postupem se podařilo redu-

kovat reakci štěpu proti hostiteli při zachování reaktivity štěpu proti leukémii (44). Protilátky jako směrovací agens pro zavedení daunomycinu vázaného na polymery k cílovým buňkám použila Říhová et al. (57).

Do určité míry je možné sem zařadit i *ex vivo* čištění štěpů pomocí látek s afinitou ke znakům vyskytujícím se na nežádoucích buňkách. Z látek, které se navazují na receptory exprimované na nádorových buňkách, můžeme jmenovat Shiga-like toxin, který se váže na znak CD77 a působí buněčnou smrt. Hematopoetické prekurzory nejsou tímto toxinem ovlivněny (33). Objevily se první zprávy o selektivní indukci apoptózy u nádorových buněk ligandem TRAIL (42).

V současné době se objevují *in vitro* experimenty s využitím stimulovaných imunokompetentních buněk k purgingu. První pokusy spočívaly ve stimulaci lymfocytů extrakty nádorových buněk (60), později byla stimulace prováděna cytokiny, například interleukinem-2 (12). Dobrý efekt interferonu gama byl popsán při čištění autologních štěpů od pacientů s CML (45). Značná pozornost se také věnuje dendritickým buňkám, které prezentují antigen ostatním buňkám imunitního systému (25).

Poslední z metod purgingu používaných v praxi je inkubace štěpu s cytostatiky – purging farmakologický. Ideální chemoterapeutikum použité k farmakologickému čištění autologních štěpů progenitorových buněk by mělo splňovat následující kritéria: 1) Citlivost hematopoetických buněk k použitému chemoterapeutiku je podstatně nižší než buněk nádorových; 2) Cytostatikum lze odstranit před podáním štěpu pacientovi; 3) Při *in vitro* manipulaci lze použít vyšších koncentrací chemoterapeutika než při podání *in vivo* (53, 54). Ačkoliv uvedené podmínky jsou obtížně splnitelné, *ex vivo* manipulace používající k eliminaci nádorových buněk ze štěpů chemoterapeutika nebo jejich kombinací, se poměrně široce využívají. Nejčastěji používanými chemoterapeutiky jsou deriváty cyklofosfamidu (4-hydroperoxy-cyklofosamid (4-HC) a mafosfamid), méně často další alkylační činidla (N-mustard), etoposid, u leukémií a lymfomů kortikoidy. Experimentálně je zkoušena řada dalších látek (36, 48). Mafosfamid a 4-HC jsou používány především u AML, méně u ALL a non-Hodgkinských lymfomů, kde je možnost čištění monoklonálními protilátkami. Oba preparáty byly použity i u řady solidních nádorů, u dětí především u neuroblastomu, u dospělých u karcinomu prsu. Klinická použitelnost farmakologického purgingu štěpů deriváty cyklofosfamidu je podpořena řadou publikovaných studií (20, 34).

Uvedené studie rovněž odhalily rizika vyplývající z nežádoucího účinku cytostatik na hematopoetické progenitorové buňky. Výsledkem je prodloužení období dřeňové aplazie a možné zvýšení peritransplantační morbidity a mortality. Proto musíme před farmakologickým čištěním zajistit bohatý štěp stejně jako před CD34 selekcí. Takový štěp umožní agresivní purging a dostatečnou eliminaci kontaminujících nádorových buněk (34). Význam velikosti dávky štěpu předaného k čištění dokumentoval Gorin u pacientů s akutní leukémií. Skupina pacientů s bohatým štěpem měla nižší mortalitu spojenou s léčbou a vyšší přežití celkové i delší trvání remise, než měli pacienti se štěpy s nižší hodnotou CFU-GM. Pacienti, kteří byli transplantováni štěpem s méně než 0,004 % původní hodnoty CFU-GM po čištění mafosfamidem, měli nižší riziko relapsu. V této retrospektivní studii 229 dospělých pacientů léčených pro akutní leukémii byly dávka dřeně použitá k čištění a intenzita čištění nejdůležitějším faktorem předurčujícím přežití (21). Nepřímou závislost mezi podanou dávkou CFU-GM a počtem relapsů po transplantaci čištěným štěpem potvrdili u AML a NHL i další autoři (18, 56).

V současné době se zavádí postupy selektivně zvyšující odolnost progenitorových hematopoetických buněk a umožňují tak zvýšit účinnost purgingu. Nejčastěji používanou látkou je amifostine (Ethyol), aminothioli, jehož aktivní metabolit selektivně chrání hematopoetické buňky před toxickými účinky řady různých cytostatik. Amifostin neinterferuje s protinádorovým účinkem chemoterapeutik, naopak v některých experimentech s leukemickými liniemi potencuje protinádorový účinek (13, 14, 51). V klinických studiích bylo prokazatelně prodloužení neutropenie a trombocytopenie i doby hospitalizace u pacientů s karcinomem prsu, transplantovaným štěpem čištěným samotným 4-HC oproti skupině se štěpem čištěným stejnou dávkou 4-HC po protekci progenitorů amifostinem. U obou skupin pacientů však nebyl zjištěn rozdíl v počtu kompletních remisí a relapsů onemocnění (59). Amifostin byl spolu s 4-HC úspěšně použit u skupiny pacientů s NHL, Hodgkinovou chorobou a karcinomem prsu, jejichž štěp byl inkubován s amifostinem, Cognoni opět dokumentoval rychlejší přihojení a vyšší výtěžky kolonií CFU-GM, oproti skupině se štěpy čištěnými pouze 4-HC (7). V současné době probíhá prospektivní randomizovaná studie, která má prokázat význam použití amifostinu při čištění štěpů u pacientů s AML (2). Prokázány jsou určité protektivní účinky dalších molekul (AS101, DTC, mofarotene) na hematopoetické kmenové buňky a jejich použití při *ex vivo* čištění se připravuje (24).

Přes řadu nedostatků a kontroverzí je farmakologický purging používán a má významné místo mezi *ex vivo* manipulačními autologními štěpy.

Jednou z dalších, zatím spíše experimentálně ověřovanou možností, je kultivace štěpu za podmínek, které jsou nevýhodné pro nádorové buňky, ale umožňují růst progenitorových buněk. Na našich pracovištích jsme získali zkušenost s odstraňováním neuroblastomových buněk ze štěpů deplecí železa chelátem (deferroxamin) i s jejich klinickým použitím. Buňky tohoto nádoru jsou totiž zvláště citlivé na nedostatek železa (30). Jinou, zatím pouze experimentálně ověřovanou možností, je hypertermie – inkubace štěpu při 39–43 °C (49).

Jak bylo již výše naznačeno, každá manipulace se štěpem snižuje počet progenitorových buněk, a tím prodlužuje zotavení krvetvorby po transplantaci a zvyšuje výskyt většiny peritransplantačních komplikací (11). Proto je někdy obtížné získat štěp (KD nebo PBPC) s dostatečným množstvím progenitorových buněk pro *ex vivo* manipulaci. Hlavní problém odběru štěpu je v jeho vhodném načasování. Vždy je nutné provést odběr štěpu v období, kdy nejsou nádorové buňky detekovány (monitorování MRD v průběhu léčby). U těžce předléčených pacientů ale často obtížně získáváme dostatečný počet progenitorů (15), navíc citlivost kmenových buněk k cytostatiku použitému k čištění může být u těžce předléčených pacientů zvýšena. Proto je hledání optimální doby odběru kompromisem mezi dvěma protichůdnými požadavky – co nejintenzivnějším „*in vivo* purgingem“ a zachováním co největšího počtu progenitorových buněk.

O schopnosti jednotlivých technik snížit množství nádorových buněk v laboratorních modelech i ve skutečných štěpech o jeden až čtyři řády je velké množství literárních údajů (28, 53, 54). Nicméně skutečný efekt purgingu, tedy prokazatelné zlepšení přežití, bylo prokázáno pouze u lymfomů (18, 22), AML (19) a karcinomu prsu (39).

V závěru lze shrnout, že jedním z postupů, který napomáhá ke zlepšení prognózy pacientů s vybranými zhoubnými nádory, je autologní transplantace čištěným štěpem. U některých leukémií, lymfomů, ale i nenádorových chorob je využitelná alogenní transplantace po T depleci. Stále však zbývá vyřešit

řadu technických problémů, ale hlavně zjistit indikace, ve kterých je transplantace čištěným štěpem skutečně pro pacienta přínosná. Domníváme se, že tuto otázku mohou vyřešit pouze rozsáhlé randomizované multicentrické studie.

Zkratky

| | |
|--------|---|
| ALL | – akutní lymfoblastická leukémie |
| AML | – akutní myeloidní leukémie |
| B-CLL | – chronická lymfocytární leukémie B typu |
| CFU-GM | – granulomonocytární koloniformní jednotky |
| CML | – chronická myeloidní leukémie |
| GVHD | – reakce štěpu proti hostiteli |
| KD | – kostní dřeň |
| MRD | – minimální zbytková choroba (minimal residual disease) |
| NHL | – non-Hodgkinské lymfomy |
| PBPC | – periferní hematopoetické progenitorové buňky |

LITERATURA

- Aihara, M., Aihara, Y., Schmidt-Wolf, G. et al.: A combined approach for purging multidrug-resistant leukemic cell lines in bone marrow using a monoclonal antibody and chemotherapy. *Blood*, 77, 1991, s. 2079-2084.
- Balzarotti, M., Grisanti, S., Granzow, K. et al.: *Ex vivo* manipulation of hematopoietic stem cells for transplantation: The potential role of amifostine. *Semin. Oncol.*, 26, 1999 (Suppl. 7), s. 66-71.
- Brenner, M. K., Rill, D. R., Moen, R. C. et al.: Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone-marrow transplantation. *Lancet*, 341, 1993, s. 85-86.
- Brockmeyer, C., Moss, T. J., Prilutskaya, M. et al.: Incidence of breast cancer cells in the CD34 negative fractions of PBSC harvests after Isoplex 300 separation. *Bone Marrow Transplant.*, 19, 1997 (Suppl. 1), s. P156.
- Brugger, W., Bross, K. J., Glatt, M. et al.: Mobilisation of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood*, 83, 1994, s. 636-640.
- Civin, C. I., Trischmann, T., Kadan, N. S. et al.: Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J. Clin. Oncol.*, 14, 1996, s. 2224-2233.
- Cagnoni, P. J., Jones, R. J., Bearman, S. I. et al.: Use of amifostine in bone marrow purging. *Semin. Oncol.*, 23, 1996 (Suppl. 8), s. 44-48.
- Cooper, B. W., Moss, T. J., Ross, A. A. et al.: Occult tumor contamination of hematopoietic stem cell products does not affect clinical outcome of autologous transplantation in patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 16, 1998, s. 3509-3517.
- De Fabritiis, P., Bregni, M., Lipton, J. et al.: Elimination of clonogenic Burkitt's lymphoma cells from human bone marrow using 4-hydroperoxycyclophosphamide in combination with monoclonal antibodies and complement. *Blood*, 65, 1985, s. 1064-1070.
- Deisseroth, A. B., Zu, Z., Claxton, D. et al.: Genetic marking shows that Ph+ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood*, 83, 1994, s. 3068-3076.
- Demirer, T., Gooley, T., Buckner, C. D. et al.: Influence of total nucleated cell dose from marrow harvested on outcome in patients with acute myelogenous leukemia undergoing autologous transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 15, 1995, s. 907-911.
- Dickinson, A. M., Middleton, S., Latham, J. et al.: Cytokine treatment of human bone marrow activates anti-leukemia effector cells: monitoring of purging by PCR and DNA analysis. *Leukemia*, 9, 1995, s. 444-449.
- Douay, L., Hu, C., Giarratana, M. C. et al.: Amifostine (WR-2721) protects normal hematopoietic stem cells against cyclophosphamide derivatives toxicity without compromising their antileukaemic effects. *Eur. J. Cancer*, 31A, 1995 (Suppl. 1), s. S14-S16.
- Douay, L., Hu, C., Giarratana, M. C. et al.: Amifostine improves the antileukemic therapeutic index of mafosfamide: implications for bone marrow purging. *Blood*, 86, 1995, s. 2849-2855.
- Eckschlager, T., Staňková, J., Gajdoš, P. et al.: Možnosti zlepšení výtěžků separací periferních progenitorových buněk - zkušenosti kliniky dětské onkologie. *Transfuzie dnes*, 6, 2000, s. 44-48.
- Fischmeister, G., Zoubek, A., Jugović, D. et al.: Low incidence of molecular evidence for tumour in PBPC harvests from patients with high risk Ewing tumors. *Bone Marrow Transplant.*, 24, 1999, s. 405 až 409.

Seznam použitých zkratek

| <i>Zkratka</i> | <i>Popis</i> |
|---------------------------|--|
| ALL | Akutní lymfoblastická leukemie |
| AML | Akutní myeloidní leukemie |
| Anti GD2 (14G2a) | Protilátka proti disialogangliosidu GD2 (u neuroblastomu) |
| BFM | Pracovní skupina Berlin-Frankfurt-Münster |
| BFU-E | Colony Burst Forming Unit - Erythrocyte |
| CCG | Severoamerická skupina dětské onkologie, Children´s Cancer Group |
| CFU-GM | Colony-Forming Unit Granulocyte-Macrophage |
| CFU-GEMM | Colony-Forming Unit Granulocyte-Erythrocyte - Monocyte -Macrophage |
| CML | Chronická myeloidní leukémie |
| cDNA | Komplementární jednovláknová DNA, syntetizovaná podle RNA |
| CGH | Komparativní genomová hybridizace, Comparative Genomic Hybridization |
| CML | Chronická myeloidní leukemie |
| CNS | Centrální nervový systém |
| CR | Kompletní remise, Complete Remission |
| DFS | Období bez onemocnění, Disease Free Survival |
| DNA | Kyselina deoxyribonukleová |
| dNTP | Směs nukleotidů, dATP, dTTP, dGTP, dCTP |
| EDTA | Kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EOS | Extraoseální Ewingův sarkom |
| EFS | Doba přežití pacienta bez události, Event Free Survival |
| ERG | Gen ETS rodiny kódující transkripční faktor. |
| ES | Ewingův sarkom |
| ETS | Superrodina onkogenů kódujících transkripční faktory |
| Euro-E.W.I.N.G. 99 | Evropský protokol pro léčbu Ewingova sarkomu |
| EWS | Gen ETS rodiny kódující transkripční faktor |
| EWS-ERG | Fúzní gen u nádorů rodiny Ewingova sarkomu podmíněný t(21;22)(q22;q12) |
| EWS-FLI1 | Fúzní gen u nádorů rodiny Ewingova sarkomu podmíněný t(11;22)(q24;q12) |
| FISH | Fluorescenční in situ hybridizace |
| FLI1 | Murine Friend Leukemia Integration Site 1 lokus |
| FRET | Fluorescence Resonance Energy Transfer |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza |
| GD2 | GD2 syntetáza, GalNaAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-Cer - β -1,4-N-acetyl-galactosamyltransferáza |

| Zkratka | Popis |
|---------------------------|---|
| GVHD | Reakce štěpu proti hostiteli, Graft versus Host Disease |
| GVT | Reakce štěpu proti nádoru/leukémii, Graft versus Tumor |
| 4-HC | 4-hydroperoxyklofosfamid |
| HR | Vysoké riziko, High Risk |
| HR-NBL-1/ESIOP | Evropský protokol pro léčbu neuroblastomu |
| IARC EW-2 | Buněčná linie odvozená od Ewingova sarkomu |
| KD | Kostní dřev |
| LDH | Laktátdehydrogenáza |
| LR | Nízké riziko, Low Risk |
| MRD | Minimální reziduální nemoc, Minimal Residual Disease |
| mRNA | Informační ribonukleová kyselina, Messenger Ribonucleic Acid |
| NBL | Neuroblastom |
| nested RT-PCR | Uhnížděná RT-PCR |
| NGF | Neurotrofní růstový faktor |
| NSE | Neuronspecifická enoláza |
| PBSC | Periferní kmenové hematopoetické buňky, Peripheral Blood Stem Cells |
| PBS | Pufrovaný fosfátový roztok, Phosphate Buffer Solution |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce, Polymerase Chain Reaction |
| PGP 9.5 | Protein Gene Product 9.5 |
| POG | Severoamerická skupina dětské onkologie, Pediatric Oncology Group |
| pPNET, PNET | Periferní primitivní neuroektodermální nádor |
| QRT-PCR | kvantitativní PCR v reálném čase, Quantitative Real Time PCR |
| RNáza | Ribonukleáza |
| RT-PCR | Reverzně transkripční PCR, Reverse Transcription PCR |
| S.D. | Směrodatná odchylka |
| SE | Standardní chyba, Standard Error |
| SIADH | Syndrom nepřiměřené sekrece antidiuretického hormonu |
| SIOP | Mezinárodní organizace dětské onkologie, Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique |
| Taq DNA polymeráza | Termostabilní DNA Polymeráza |
| TH | Tyrosin hydroxyláza |
| UKF-NB-1, 2, 3 | Buněčné linie odvozené od HR neuroblastomu |
| UNG | Uracil-DNA glykosyláza |