

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni

NÁDOROVÉ MARKERY V DIAGNOSTICE A
MONITOROVÁNÍ LÉČBY SE ZAMĚŘENÍM NA DĚTSKOU
ONKOLOGII

Dizertační práce

MUDr. Ing. Tomáš Votava

Plzeň 2011

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni

NÁDOROVÉ MARKERY V DIAGNOSTICE A
MONITOROVÁNÍ LÉČBY SE ZAMĚŘENÍM NA DĚTSKOU
ONKOLOGII

Dizertační práce

Autor: MUDr. Ing. Tomáš Votava
Dětská klinika FN Plzeň

Školitel: Prof.MUDr.Ondřej Topolčan,DrSc.

Plzeň 2011

Souhrn

Úvod: Leukémie a lymfomy tvoří většinu nádorových onemocnění v dětském věku. V průběhu posledních 20 let došlo k výraznému pokroku v oblasti terapie a zlepšila se tak prognóza těchto pacientů. Zůstává však otevřena otázka, zda existují spolehlivé laboratorní markery, které pomohou rozlišit tato onemocnění od benigních chorob a zda lze pomocí těchto vyšetření předpovědět prognózu pacienta, nebo zda mohou tyto markery včas odhalit počínající relaps základního onemocnění. V případě použití biochemických a radioimunologických metod se tak nabízí alternativa k molekulárně genetickým metodám.

Soubor a metody: V této studii jsme monitorovali hladiny thymidin kinázy (TK) a beta(2)-microglobulinu (β 2MG) u dětských pacientů s leukémiemi (58 dětí) a s lymfomy (14 dětí). Kontrolní skupinu tvořilo 45 zdravých dětí a pro diferenciálně diagnostické účely 109 pacientů s benigními onemocněními patřícími do diferenciálně diagnostické skupiny leukémií nebo lymfomů (lymfadenopatie, infekce a autoimunní onemocnění). Snažili jsme se vyhodnotit klinický význam sledovaných markerů.

Výsledky: Naše pozorování prokázala, že hladiny TK i β 2MG byly při diagnóze leukémie výrazně zvýšeny (mediány TK - 409 U/l, β 2MG - 1,96 mg/l). Zvýšení obou sledovaných parametrů bylo oproti skupině s benigními onemocněními statisticky signifikantní ($p < 0,0001$). Pro prognózu však nebyl žádný z markerů stanovených při diagnóze statisticky významný. Zjistili jsme, že při relapsu akutní leukémie (7 případů) došlo ke zvýšení hladin obou markerů. Zvýšení hladin bylo u relapsů také statisticky významné $p < 0,02535$ (TK) a $p < 0,04551$ (β 2MG). Ke zvýšení docházelo s 3-9 měsíčním předstihem před klinickým vzplanutím relapsu. Ve skupině pacientů s lymfomy jsme ověřili, že pomocí diagnostické hladiny β 2MG lze spolehlivě odlišit lymfom od nenádorové lymfadenopatie ($p < 0,0019$), pro tuto skupinu však všechna ostatní pozorování nebyla statisticky významná.

Závěr: Monitorování hladin TK a β 2MG u dětských pacientů má význam při diferenciální diagnostice leukémií a lymfomů a je důležité pro časně rozpoznání relapsu u pacientů po léčbě.

Summary

Background: Leukemia and lymphoma is common pediatric oncology disease. Monitoring of these diseases by laboratory technique is difficult. Thymidine kinase (TK) is involved in nucleic acid synthesis and is therefore considered to be an important proliferation tumor marker. Our main goal was to determine significance of elevated TK levels in the context of prognosis, differential diagnosis, monitoring after treatment and relapse marker during follow up in children suffering from acute leukemia and lymphoma. Another marker beta(2)-microglobulin (β 2MG) was studied for the same purpose. **Patients and Methods:** TK and β 2MG serum levels in 58 children with acute leukemia and 14 children with lymphoma were determined using radio-receptor analysis (TK) and ELISA assay (β 2MG). Control group included 109 patients with benign disease for leukemia group and 35 patients with benign lymphadenitis for lymphoma group. **Results:** Our results showed that especially TK serum levels at the time of diagnosis of acute leukemia were extremely elevated (median - 409 U/l) as well as β 2MG (median – 1.96 mg/l). Both markers clearly discriminated acute leukemia from benign diseases ($p < 0.0001$). In the term of prognosis, none of the markers reached significant p-value. During relapse of acute leukemia (7 cases), the marker levels increased considerably above the individual remission level and were statistically significant $p < 0.02535$ (TK) and $p < 0.04551$ (β 2MG). These results allowed to predict relapse three and more months before it burned. In lymphoma group, we observed that diagnostic level of β 2MG could distinguish between lymphoma and benign lymphadenitis ($p < 0.0019$); all other data were not significant. **Conclusion:** We assume that tumor markers have different informative value in acute leukemia and lymphoma. In acute leukemia, TK serum level is very helpful for differential diagnosis and prediction of relapse in follow up. In lymphoma, β 2MG represents a very good marker for discrimination between lymphoma and benign lymphadenitis.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně s použitím citované literatury. Svoluji k zapůjčení této práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli.

Obsah

1	ÚVOD	10
1.1	Struktura práce	
1.2	Proliferace	
2	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	12
2.1	Epidemiologie, klasifikace a etiologie onemocnění vztahujících se k problematice monitorace TK1	
2.1.1	Leukémie v dětském věku	
2.1.2	Lymfomy v dětském věku	
2.1.3	Lymfadenopatie v dětském věku	
2.1.4	Infekční onemocnění u dětí	
2.2	Thymidin kináza	
2.2.1	Monitorace thymidin kinázy u karcinomu prsu	
2.2.2	Monitorace thymidin kinázy u nádoru kolorekta	
2.2.3	Monitorace thymidin kinázy u hematologických malignit	
2.2.4	Thymidin kináza jako marker odpovědi na léčbu u solidních tumorů	
2.2.5	Thymidin kináza u lymfadenopatie	
2.2.6	Thymidin kináza jako marker zánětu	
3	CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	29
4	METODIKA	30
4.1	Soubory pacientů a použité klinické hodnocení	
4.1.1	Kontrolní skupiny pacientů	
4.1.2	Soubor pacientů s leukémií	
4.1.2.1	Charakteristika klinického stavu v průběhu follow up	
4.1.2.2	Remise	
4.1.2.3	Relaps	
4.1.2.4	Klinická data, údaje o léčbě a přežití	
4.1.3	Soubor pacientů s lymfomem	
4.1.4	Soubor pacientů s lymfadenitidou	
4.2	Stanovení nádorových markerů	
4.2.1	Metodika stanovení TK1 v séru	
4.2.2	Metodika stanovení β 2MG v séru	
4.2.3	Odběry pro stanovení nádorových markerů	
4.3	Statistická analýza	

5	VÝSLEDKY	37
5.1	Kontrolní skupina dětí s benigním onemocněním	
5.2	Soubor pacientů s leukémiemi	
5.2.1	Hladiny sledovaných markerů při diagnóze leukémie - diferenciálně diagnostický význam	
5.2.2	Hladiny sledovaných markerů při diagnóze leukémie - senzitivita a specificita	
5.2.3	Hladiny sledovaných markerů při diagnóze leukémie - prognostický význam	
5.2.4	Hladiny sledovaných markerů v průběhu follow up	
5.2.5	Srovnání výsledků MRD získaných molekulárně genetickými metodami a hladiny aktivity TK1	
5.3	Soubor pacientů s lymfomy	
5.3.1	Hladiny sledovaných markerů při diagnóze lymfom - diferenciálně diagnostický význam	
5.3.2	Hladiny sledovaných markerů při diagnóze lymfom - senzitivita a specificita	
6	DISKUSE	50
7	ZÁVĚR	57
8	ZÁVĚR PRO PRAXI	59
9	POUŽITÁ LITERATURA	61
10	PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ AUTORA	72
11	PŘÍLOHA 1	75

Seznam zkratek

ADP - adenosin – difosfát
AHL - akutní hybridní leukémie
AIDS - syndrom získaného selhání imunity
AIHA - autoimunní hemolytická anémie
ALL - akutní lymfoblastická leukémie
ALP - alkalická fosfatáza
AML - akutní myeloidní leukémie
ATB - antibiotikum
ATL - akutní leukémie/lymfom z T-buněk
ATP - adenosin – trifosfát
AZT - azidothymidin
b2MG - beta2 mikroglobulin
CA 15-3 - cancer antigen nebo carbohydrate antigen
CD4 - povrchový glykoprotein na T-lymfocytech
CEA - karcinoembryonální antigen
CLL - chronická lymfocytická leukémie
CML - chronická myeloidní leukémie
CMMoL - chronická myelomonocytární leukémie
CMV - cytomegalovirus
CNS - centrální nervová soustava
ČR - Česká republika
d4T – stavudin - nukleosidový inhibitor reverzní transkriptázy
DFI - distant relapse-free interval
DK - dětská klinika
DNA - kyselina deoxynukleová
DSS - disease-specific survival
dTh - deoxythymidin
dTMP - deoxythymidin-monofosfát
dUMP - deoxyuridin-monofosfát
EBV - virus Epstein a Barrové
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay
FACS - fluorescence-activated cell scanner = průtoková cytometrie
FN – fakultní nemocnice
HIV - virus lidské imunodeficiency
HL - hodgkinské lymfomy
HR - hormonální receptory
IgH – těžký řetězec imunoglobulinu
IPI - International Prognostic Index
ITP – imunní trombocytopenická purpura
kDa – kilodalton
KDHO – Klinika dětské hematologie a onkologie
KO - krevní obraz
LDH - laktát dehydrogenáza
MDS - myelodysplastický syndrom
MLL - myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
MRD – minimal residual disease
mRNA – mediátorová RNA
NHL - nehodgkinské lymfomy
NSE - neuron specifická enoláza
ONM - Oddělení nukleární medicíny
OS - overall survival

PET – pozitronová emisní tomografie
PFS - progression-free survival
PgR - progesteronové receptory
pNPP - p-nitrofenyl fosfát
RA - refrakterní anémie
RAEB - refrakterní anémie s převahou blastů
RAEB-T - refrakterní anémie s převahou blastů v transformaci
RAI - relativní index avidity
RARS - refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty
REA – radio enzymatická analýza
RFS - relapse-free survival
ROC - receiver operating characteristic = rozlišovací operační křivka (závislost seznátnivita a specifity stanovení)
sCD27 – povrchový antigen
sIL-2R - solubilní receptor pro IL-2
SN - seznátnivita
SP - specifita
TCR – receptor T lymfocytů
TEL - onkogen ETV6 = ets variant 6
TK - thymidin kináza
TTP - thymidin trifosfát
WHO – World Health Organisation

Poděkování: Na tomto místě bych chtěl poděkovat týmu pracovníků radioimunoanalytických laboratoří FN Plzeň pod vedením Prof.MUDr. Ondřeje Topolčana, DrSc za zpracování všech vzorků a profesoru Topolčanovi osobně za mnoho cenných rad. Doc.MUDr.Luboši Holubcovi,PhD děkuji za pomoc při zpracování publikací a dizertační práce, Ing.Stanislavu Kormundovi,PhD za statistické zpracování dat a hlavně primářce MUDr.Zdeňce Černé, bez jejíž pomoci by tato práce nemohla vzniknout, za podporu, pomoc při sběru dat a zařazování pacientů do studie.

1 Úvod

1.1 Struktura práce

Disertační práce na téma „**Nádorové markery v diagnostice a monitorování léčby se zaměřením na dětskou onkologii**“ byla řešena v rámci výzkumného záměru MSM 0021620819 Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni a Fakultní nemocnice Plzeň.

Práce je rozčleněna obvyklým způsobem do následujících kapitol:

- V úvodní kapitole „**Současný stav problematiky**“ je základní přehled epidemiologie, klasifikace sledovaných klinických jednotek. Podrobně je rozebrána současná problematika thymidin kinázy a její role v biologii proliferujících buněk.
- V kapitole „**Metodika**“ jsou charakterizovány jednotlivé sledované skupiny pacientů. Je zde popsán způsob klinického hodnocení, způsob sběru dat, metodika stanovení nádorových markerů a statistické zpracování výsledků.
- V kapitole „**Výsledky**“ jsou analyzovány výsledky získané během sledování v letech 1996 – 2009.
- V kapitole „**Diskuse**“ jsou naše výsledky porovnány s údaji v odborné literatuře a je zde diskutován význam stanovení nádorových markerů a význam stanovení thymidin kinázy u neonkologických onemocnění.

1.2 Proliferace

Jedním z atributů dětského věku je růst. Během dětského období několikrát dojde k prudkému zrychlení a zpomalení růstového tempa, což je dáno převážně hormonálními vlivy. Vlastní růst je charakterizován výraznou proliferační aktivitou buněk organismu. Kromě výše zmíněné, zcela

fyziologické proliferační aktivity, však v organismu může docházet k proliferacím patologickým, například při nádorovém bujení, zánětech nebo při reparačních procesech ve tkáních apod. Ne vždy je snadné tyto proliferační procesy od sebe odlišit nebo je monitorovat za pomoci laboratorních markerů. Vlastní jednotlivé výše uvedené stavy máme možnost monitorovat více či méně specifickými laboratorními markery, např. u bakteriálního zánětu se osvědčila hodnota C-reaktivního proteinu, interleukinu-6, interleukinu-8, prokalcitoninu apod. (1), u některých typů nádorového bujení plní obdobnou funkci nádorové markery (2), a u růstu organismu jako celku například insulinu podobný růstový hormon (3). Jednou z dalších možností jak monitorovat proliferační procesy v organismu je využití proliferačních markerů – například stanovování hladin enzymu thymidin kinázy, což je dosud v pediatrii poměrně málo prozkoumané téma.

2 Současný stav problematiky

2.1 Epidemiologie, klasifikace a etiologie onemocnění vztahujících se k problematice monitorace TK1

2.1.1 Leukémie v dětském věku

Akutní leukémie představují 31% maligních onemocnění v dětském věku do 15 let (4). U této skupiny pacientů je nejčastějším podtypem akutní lymfoblastická leukémie (ALL), která představuje až 80% ze všech leukemií. Incidence dětských leukemií (0-19 let) v České republice je 20,6 na 100 tisíc dětí, což představuje ročně okolo 60 nových případů, viz tabulka 1.

Tabulka 1 - Incidence dětských leukemií v jednotlivých věkových kategoriích na 100 tisíc obyvatel (převzato z Mayer J., Starý J – Leukémie)(12)

Věková skupina (roky)	ALL		AML		CML		Ostatní leukémie		Leukémie celkem	
	Chlapci	Dívky	Chlapci	Dívky	Chlapci	Dívky	Chlapci	Dívky	Chlapci	Dívky
0 - 4	5,5	4,6	0,7	0,7	0,1	0,1	0,1	0,2	6,4	5,7
5 – 9	2,6	2,4	0,8	0,7	0,1	0,0	0,0	0,1	3,5	3,2
10 – 14	2,0	1,7	0,6	0,6	0,1	0,1	0,1	0,1	2,8	2,4
15 – 19	1,3	0,5	0,7	0,6	0,3	0,2	0,2	0,0	2,5	1,4

Na základě biologických charakteristik nádorových leukemických buněk se dělí akutní leukémie na další podskupiny. ALL lze klasifikovat dle imunofenotypu na leukémii z B-buněk, která je u dětí častější a na leukémii z T-buněk. Tyto podskupiny jsou dále děleny dle stádia diferenciací leukemických buněk a to pro B řadu na akutní leukémii z B-prekursorových buněk

(proB, common ALL, praeB) a ze zralých B-buněk. Pro T řadu je klasifikace analogická. Akutní myeloidní leukémie (AML) je druhá nejčastější leukémie v dětském věku, její klasifikace je založena na morfologických charakteristikách leukemických buněk a dělí se na 8 podskupin: M0 – AML s minimální diferenciací, M1 – AML bez vyzrávání, M2 – AML s vyzráváním, M3 – akutní promyelocytární leukémie, M4 - akutní myelomonocytární leukémie, M5 – akutní monocytární leukémie, M6 – akutní erytroidní leukémie, M7 – akutní megakaryocytární leukémie.

Chronické leukémie se v dětském věku vyskytují velmi zřídka a pokud, tak se vždy jedná o chronickou myeloidní leukémii (CML).

Akutní leukémie je klonální onemocnění hematopoetického systému vznikající z mutace (mutací) v jedné buňce, která se dělením přenáší do dceřinných buněk. Vzniklý buněčný klon tímto získává výhodu a postupně začne dominovat v hematopoeze. U dětských leukémií jsou často v souvislosti s etiologií nebo patofyziologií onemocnění popisovány chromosomální abnormality (5). Nejčastěji jsou popisované translokace v MLL genu (11q23) a to převážně u kojenců s ALL i AML, dále pak t(8;21) u M2 AML, t(15;17) u M3 AML a trisomie chromosomu 8 u různých podtypů AML. U ALL se jedná především o t(12;21), t(9;22), t(1;19) a přítomnost hyperdiploidie u leukemických buněk (6). Je potvrzeno, že častější výskyt leukémie v dětském věku je spojen s určitými genetickými syndromy jako například Downův syndrom, kde je riziko vzniku leukémie zvýšeno až 20x pro ALL a AML, a až 600x pro AML typu M7 (7), z dalších se jedná o Bloomův syndrom, neurofibromatózu typu 1, ataxii teleangiektázií a další (8). Přestože frekvence prokázaných genetických změn u dětských leukémií je relativně vysoká, zatím není zcela jasná etiologická souvislost těchto změn s ohledem na vznik leukémie. Tímto problémem se ve světě zabývá řada vědeckých týmů, v ČR například docent Zuna, který se snaží o “backtracking“ u TEL/AML1 pozitivních leukémií a z jeho výsledků vyplývá, že část z těchto leukémií vzniká z preleukemického klonu, který je prokazatelně přítomen již při narození, což bylo prokázáno studiem Guthriho kartiček nebo pupečnickových krví (9,10). To znamená, že první zásah do genové výbavy buněk probíhá prenatálně a další rozvinutí leukémie během života je závislé na tzv. druhém zásahu do genetické výbavy buněk. V případě TEL/AML1 leukémií jde o delecii 12p, kde je

lokalizován druhý gen TEL a buňka tak ztratí heterozygotitu pro tento gen, což má za následek další kaskádu dějů, na jejichž konci je zástava diferenciací postižené buňky, a dojde k převaze proliferace nad diferenciací a následně buňka ztrácí schopnost apoptózy (11).

2.1.2 Lymfomy v dětském věku

Maligní lymfomy jsou třetím nejčastějším nádorovým onemocněním v dětském věku, po leukémiích a nádorech CNS, postihují 10-13% dětských onkologických pacientů. Jedná se o různorodou skupinu lymfoproliferativních onemocnění, která vznikají maligní transformací lymfocytů na různých úrovních vyžívání. Základní dělení maligních lymfomů je na Hodgkinské lymfomy (HL), které tvoří 45% a neHodgkinské lymfomy (NHL) (13).

Nejhomogennější a největší skupinu maligních lymfomů tvoří Hodgkinova choroba, která se vyskytuje nejčastěji mezi 15 a 30 rokem věku. Její příčina není známa, zvažují se genetické vlivy, neboť byla prokázána vyšší incidence tohoto onemocnění u sourozenců a blízkých příbuzných pacientů. Zároveň za predisponující faktor je považována imunodeficience (primární i sekundární) a v nádorové transformaci lymfocytů se pravděpodobně uplatňuje i infekce virem Epstein a Barrové (EBV), jehož genom, resp. jeho části jsou detekovány v nádorové tkáni u 20-50% nemocných (14). U NeHodgkinských lymfomů (NHL), které se vyskytují nejčastěji okolo 10 roku věku, je vzhledem k velké rozmanitosti této skupiny situace ještě méně přehledná. NHL může vycházet z prekursorů T, B nebo non-T event. non-B lymfoidní řady. Jedná se bezesporu o nejrychleji rostoucí nádory v dětském věku, které mohou časně infiltrovat CNS nebo leukemizovat. V rámci etiologie se i zde zvažuje vliv imunodeficitů, což dokladuje zvýšený výskyt NHL u ataxia-teleangiectasia, při Wiskott-Aldrichově syndromu, AIDS nebo u pacientů po transplantaci hematopoetickými kmenovými buňkami. U některých typů NHL hraje při vzniku pravděpodobně roli chronická stimulace imunitního systému. Příkladem je nejčastější dětský nádor v tropické Africe – Burkittův lymfom, jehož buňky obsahují v 80-90% genom EBV a jeho vznik souvisí s

infekcí *Plasmodium falciparum*, která naruší kontrolu proliferace B-lymfocytů infikovaných EBV (15).

2.1.3 Lymfadenopatie v dětském věku

Lymfadenopatie, zvětšení mízních uzlin, je v klinické praxi u dětí velmi často řešenou problematikou. Uzliny jsou součástí periferního mízního systému ještě spolu se slezinou, lymfatickou plicní tkání, lymfatickou tkání v okolí střev a Waldayerovým lymfatickým okruhem. K vlastnímu zvětšení uzliny může dojít dvěma způsoby, jednak proliferací vnitřních částí uzliny a jednak zevní infiltrací uzliny. Oba tyto mechanismy jsou popsány jak u benigní tak u maligní lymfadenopatie (16,17). Příčiny lymfadenopatie u dětí jsou velmi různorodé, lze je rozdělit na příčiny infekční, maligní, autoimunní, hypersenzitivní (iatrogenní reakce), granulomatózní choroby, ostatní benigní příčiny (18). Souvislost mezi lymfadenopatií a hladinou TK1 byla popsána pouze Hallekem v práci týkající se CLL (19), ale dosud nebyla publikována data související s nemaligní lymfadenopatií a hladinou TK1.

U lymfadenopatie, vzhledem k tomu že se většinou nejedná o vlastní onemocnění, ale pouze o příznak, je nejdůležitější zjistit, zda tento příznak souvisí s nějakým závažným onemocněním dítěte nebo zda jde o jev nezávažný, nevyžadující žádné další diagnostické, nebo terapeutické úsilí. S ohledem na výše uvedené bylo vypracováno mnoho algoritmů, jak dospět k tomuto rozhodnutí, například v klinické praxi dobře použitelný algoritmus uvádí Bubanská v článku: „Diferenciálna diagnostika lymfadenopatií u dětí“ (18).

2.1.4 Infekční onemocnění u dětí

Vlastní problematika infekcí dětského věku je velmi široká a s tématem disertační práce souvisí pouze okrajově, proto ji zde podrobněji nezmiňuji, ale zajímavá je problematika vztahu TK1 a HIV (viz dále).

Human Immunodeficiency Virus

V nedávné době byl studován vztah mezi sérovou hladinou TK1 (resp. enzymatickou aktivitou TK1 v mononukleárních buňkách periferní krve pacientů s HIV infekcí) a vývojem onemocnění. Klíčové je, že v rámci protivirové léčby pacientů s HIV infekcí se používá celá řada nukleosidových analogů jako je AZT nebo d4T. Většina těchto léků je podávána v neaktivní formě a do aktivní formy se transformují pomocí fosforylace, která probíhá intracelulárně za přítomnosti TK1. Studium TK1 bylo zjištěno, že po určité době podávání nukleosidových analogů (přibližně po 6 měsících) dochází k poklesu aktivity TK1 a tím se snižuje účinnost léků, což koreluje s následným vzestupem virové nálože a poklesem CD4 pozitivních T-lymfocytů (20). Tato zjištění vedla k tomu, že pokles aktivity TK1 je vnímán u HIV infekce jako marker snížené efektivity nukleosidových analogů a vede k nutnosti zařazení jiných než nukleosidových analogů do léčebných antivirových koktejlů.

2.2 Thymidin kináza

Historie a terminologie

Zařazení thymidinu do DNA struktury bylo popsáno již v 50-tých letech minulého století (21). Později bylo prokázáno, že tento proces je umožněn mimo jiné fosforylací thymidinu a jako klíčový enzym této reakce byla popsána thymidin kináza (TK) (22). Bylo prokázáno, že vyšší organismy mají v buňkách přítomny dvě izoformy tohoto enzymu, TK1 a TK2 (23). Historicky byla nejprve extrahována TK1 z fetální tkáně a později TK2 z adultní tkáně, proto dřívější terminologie používala názvy fetální a adultní TK (24). Následně bylo zjištěno, že TK1 je přítomna v cytoplasmě dělících se buněk a že její hladina je závislá na tomto cyklu na rozdíl od TK2, která je přítomna v mitochondriích a její hladina je na buněčném cyklu nezávislá (25). Dalším výzkumem byla prokázána souvislost mezi enzymatickou aktivitou TK a růstem a regenerací jaterní tkáně na kryším modelu (26).

Biochemický mechanismus

Syntéza deoxythymidin-monofosfátu (dTMP) *de novo* je za normálních podmínek katalyzována thymidilát syntetázou z deoxyuridin-monofosfátu (dUMP) za přítomnosti kyseliny listové a vitamínu B₁₂. TK je klíčový enzym jiné reakce, kterou vzniká dTMP, a to tzv. „pyrimidinové záchranné cesty“ katalyzující přechod terminálního fosfátu z adenosin – trifosfátu (ATP) na 5'hydroxylovou skupinu deoxythymidinu (dTh) za vzniku dTMP a ten je poté vmezeřen do nově syntetizované DNA. Schématicky TK katalyzuje reakci: $dTh + ATP \rightarrow dTMP + ADP$.

TK hraje klíčovou roli při regulaci koncentrace nitrobuněčného thymidinu během buněčného cyklu. Jak bylo již řečeno, v lidských buňkách jsou přítomny 2 izoenzymy TK. TK1 je v buněčné cytoplasmě a jeho nejvyšší koncentrace je v S-fázi buněčného cyklu a je přítomen pouze u proliferujících buněk. Aktivita TK1 je největší ihned po skončení G1-S fáze buněčného cyklu a během G2 fáze rychle klesá, enzym je degradován intracelulárně a při normálním buněčném dělení se nedostává extracelulárně do tělních tekutin (27). Zpětná regulace enzymatické aktivity TK1 je zajištěna inhibiční funkcí thymidin trifosfátu (TTP), což je produkt předchozí reakce fosforylace thymidinu (28). Pomocí tohoto mechanismu je dosaženo rovnováhy v množství TTP potřebné k syntéze nukleové kyseliny a nedochází tak k přesycení systému TTP. TK1 se vyskytuje buď jako homodimer nebo homotetramer, z nichž každá podjednotka má velikost 24 kDa (29-31). Ve skutečnosti je většina enzymu v tkáních ve formě dimerů, které mohou být aktivovány ATP, poté se konvertují na tetramery. TK1 může fosforylovat i pyrimidinová analoga s modifikací na N-3 nebo C-5 pozici pyrimidinového kruhu a na 3' pozici ribózy, proto může fosforylovat i klinicky důležitá nukleosidová analoga včetně 5-flouoro 2'-dideoxythimin a 3'-azido-2',3'-dideoxythimin (AZT, azidothymidin) (31-33). Druhá izoforma TK, mitochondriální (adultní) TK2, je na buněčném cyklu nezávislá. Mitochondriální TK2 může také fosforylovat thymidin a deoxyuridin. Koncentrace TK2 ve tkáních nekoreluje s proliferací. TK2 hraje klíčovou roli v syntéze mitochondriální DNA a její porucha se vyskytuje u některých mitochondriálních chorob (34). Je zřejmá jistá substrátová specifická TK2 v porovnání s TK1, například thymidinová analoga jako AZT jsou TK2 fosforylována výrazně méně než TK1 (31,32).

Je prokázáno, že mechanismus fosforylace dTh za vzniku TMP a tím zajištění „záchranné cesty“ syntézy DNA není zcela univerzální. Toto dokládá práce z Essenského pracoviště, kde bylo popsáno, že tento mechanismus nefunguje u dělicích se buněk jater a lymfocytů sviště lesního. Experimentem *ex vivo* bylo vyloučeno, že by se mohlo jednat o supresi TK1 aktivity zpětně vazebným ovlivněním nadbytečnou tvorbou thymidinových nukleotidů *de novo* syntézou, neboť tato *de novo* tvorba byla zablokována methotrexátem. Autoři však v závěru zdůrazňují, že patobiochemická relevance těchto poznatků musí být ještě ověřena dalším studiem (35).

Molekulárně genetické souvislosti

V lidských buňkách je gen pro TK1 lokalizován na chromosomu 17 a gen pro TK2 na chromosomu 16 (36). Informace o vlastnostech různých forem TK narůstají a bylo již popsáno, jak chování jednotlivých TK při elektroforéze tak jejich kinetické vlastnosti při různých stupních purifikace. TK1 byla nedávno vyextrahována v čisté formě z buněk tkáňové kultury HeLa a bylo ověřeno, že se jedná o polypeptidový tetramer o hmotnosti 24 kDa.

Dále byly prostudovány mechanismy regulace buněčného cyklu na genové úrovni za pomoci naklonovaného genu pro TK1 (37). Intenzita transkripce TK1 genu se mnohonásobně zvyšuje při růstové stimulaci jinak neproliferujících buněk (38). Kim a Lee našli promotor genu pro lidskou thymidin kinázu, který obsahuje 20 bazí a je zodpovědný za transkripční aktivitu TK1 genu (39,40). Jiní prokázali, že aktivita TK1, počas TK1 mRNA a TK1 proteinu jsou také regulovány post-transkripčními a post-translačními mechanismy (30,41,42). Například u CLL buněk byla nalezena vysoká exprese TK-mRNA, ale bez přítomnosti zvýšené hladina aktivního enzymu, což ukazuje na blok v post-transkripční, translační nebo post-translační regulaci (43). Výrazný regulační vliv na post-translační úrovni byl prokázán i u HeLa buněk, kde bylo zjištěno, že stabilita TK1 mRNA je regulována signální 40 aminokyselinou sekvencí na C konci TK1 proteinu, která determinuje specifickou degradaci enzymu během mitózy (44). Delece nebo mutace v této signální sekvenci vede k blokaci degradace a dokonce k expresi TK1 během G0 fáze (45). Post-transkripční modifikace hrají roli i v regulaci aktivity TK1. Například u HL60 buněk byly prokázány změny v

aktivitě TK1, která souvisela se silou fosforylace serinového zbytku proteinu TK1 (46). Všechna tato zjištění ukazují na velmi komplikovanou regulaci exprese TK1, avšak přesný mechanismus regulace není zatím objasněn. Další chybějící údaj je přesná funkce TK1, neboť existují buňky v níž se TK1 vůbec nevyskytuje a přitom jejich růst a vývoj nejsou narušeny.

Metodika stanovování TK1 a jednotky

Hladina TK1 v séru je velmi nízká, a proto nejcitlivější měření je stanovení její enzymatické aktivity. Komerčně dostupné testy jsou založeny na inkubaci séra se substrátovým analogem pro TK1. Radioenzymatická metoda (TK REA) využívá radiododeoxyuridin, u kterého byla methylová skupina thymidinu nahrazena radioaktivním ^{125}I . Tento substrát je katalyzován TK1 a uvolněná radioaktivita odpovídá množství enzymu v séru (47). Novější neizotopové metody využívají jiné analogy jako je například bromo-deoxyuridin nebo 3'-amino-2',3'-deoxythymidin nebo substráty podobné AZT. Doposud jediným neizotopovým dostupným systémem je kit pro LIAISON přístroj od firmy DiaSorin (48). Tato dvoukolová metoda (TK ELISA) je založena na principu ELISA metody a stanovuje enzymatickou aktivitu TK1 (25). V prvním kroku se TK1 (přítomná v séru pacienta) fosforyluje AZT na 5'-monofosfát (AZTMP) a množství AZTMP je měřeno kompetitivní ELISA pomocí specifických protilátek proti AZTMP. Výhodou AZTMP je jeho stabilita v krvi i séru a není dále degradován nebo fosforylován (49,50). Důležité je také, že tato metodika je specifická pro TK1, protože k fosforylaci AZT pomocí TK2 dochází pouze minimálně (31). Další neizotopová metoda (která je ještě ve stádiu výzkumu) je test DiviTum od firmy Biovica využívající jako substrát pro TK bromdeoxyuridin, který je fosforylován na jeho monofosfát a následně až na trifosfát další kinásou přítomnou v reakční směsi. Tento trifosfát je imobilizován DNA syntézou při níž je polyA řetězec kovalentní vazbou ukotven na mikrotitrační destičce a slouží jako templát pro reverzní transkriptázu. Po proběhlé reakci je destička opláchnuta a je přidána protilátka anti-bromdeoxyuridin, která je konjugována s alkalickou fosfatase (ALP). Navázané množství ALP tedy odpovídá aktivitě TK ve vzorku. Množství alkalické fosfatasy je stanoveno reakcí, při které ALP katalyzuje přidaný chromogenní substrát p-nitrofenyl fosfát (pNPP). Tato metoda eliminuje zpětnovazebnou inhibici produktem, využívá saturovanou

koncentraci substrátu, a proto vykazuje nejméně 10krát vyšší citlivost pro detekci rostoucí rakovinné masy. Série standardů přítomných na destičce zjednodušuje hodnocení výsledků a zajišťuje dobrou reprodukovatelnost (51).

Aktivita TK je vyjadřována jako nanogramy na litr. To však neznamena, že skutečné množství enzymu odpovídá této hodnotě, ale že aktivita enzymu ve vzorku je stejná jako v referenčním vzorku, který obsahuje toto množství rekombinantní TK-ref. U všech metod to tedy značí měření enzymatické aktivity, ale přesto výrobci poskytují výsledky v mezinárodních jednotkách (IU/l). Avšak toto vyjádření nebere v úvahu časový interval, během kterého bylo měření prováděno, proto by používaná jednotka měla být IU na litr za hodinu (52). Tento parametr byl udáván na přechodné období firmou Immunotech (Praha), okolo 2000 ($IU=1.2 \times 10^{-12}$ mol/s). V současnosti žádná firma dodávající komerční kity nezohledňuje tento parametr.

TK byla detekována i v tkáňových vzorcích po extrakci tkáně. Standardní metoda pro extrakci tkáně nebyla zatím vyvinuta. Výsledky ukazují, že zde není žádný vztah mezi tkáňovou TK v nádorové tkáni a maligním charakterem nádoru. Praktické využití této metodiky nebylo zatím nalezeno.

Dále jsou k dispozici protilátky proti TK pro imunohistologickou detekci. Frekvence pozitivních signálů v tkáni odráží míru proliferace, toto ale není standardní metoda pro stanovení malignosti nádoru (53-55).

Vybrané příklady chorob, kde byla monitorována TK1

Výsledky u kontrolních zdravých jedinců a pacientů se zánětlivými chorobami, benigním nádorem prsu a střeva jsou shrnuty v tabulce 2. Tabulka ukazuje, že značně zvýšená hladina TK v séru je nalézána u pacientů s virovými infekty, hlavně s herpes simplex a zoster, autoimunitními chorobami a benigními granulomatosními onemocněními (např. u chronické hepatitis) a částečně u perniciosní anémie (52,56-58).

Tabulka 2 - Hladiny TK1 (IU/l) u chorob různé etiologie a u zdravých dospělých jedinců (52,56,57,58)

Soubor/ Onemocnění	Počet	Medián [IU/l]	Rozmezí [IU/l]
Zdraví jedinci	100	4	1-6
Bakteriální infekce	100	10	4-15
Virové infekce	100	54	12-164
Autoimunitní choroby	40	28	2-56
Benigní nádor prsu	40	9	0-30
Benigní nádor trávicího traktu	20	10	0-12

Zvýšená sérová hladina TK1 byla detekována u řady solidních nádorů a byla prokázána její korelace s progresí onemocnění.

2.2.1 Monitorace thymidin kinázy u karcinomu prsu

Invazivní karcinom prsu je jeden z nejčastějších nádorů u žen v západní Evropě. Prognostické a prediktivní faktory jsou u tohoto onemocnění důležité z hlediska odhadu případné rekurence nádoru a odpovědi na léčbu. Jako prognostické faktory byly doposud stanoveny velikost nádoru (T), postižení lymfatických uzlin (N), přítomnost hormonálních receptorů (HR), histologický grade a věk při diagnóze. Je prokázáno, že proliferace nádorových buněk karcinomu prsu (monitorována pomocí biochemických proliferačních markerů) je asociována s růstem nádoru, progresí choroby, rizikem metastáz (59).

Zvýšená hladina TK1 zjištěná u pacientů s karcinomem prsu, byla v několika studiích testována jak z hlediska prognostického tak i prediktivního (60-62). Prognostický význam byl prokázán v souboru 290 pacientek, kde vysoká vstupní aktivita TK1 korelovala s vysokým gradem a negativitou progesteronových receptorů (PgR) a predikovala horší relapse-free survival (RFS) u podskupiny pacientek v pre/peri-menopauze a horší overall survival (OS) u podskupiny pacientek v post-menopauze (54). Prediktivní význam TK byl dále hodnocen ve dvou retrospektivních studiích zahrnujících téměř 2000 pacientek (54,63). V první studii byla zvýšená hladina TK1 predikcí pro horší RFS a OS nezávisle na léčbě. Ve druhé zmíněné studii zvýšená hladina TK1 predikovala lepší

disease-specific survival (DSS) a distant relapse-free interval (DFI) u N-negativních pacientek léčených chemoterapií s antracykliny v porovnání s neléčenými pacientkami (63).

Z domácích zkušeností je třeba zmínit dospělé onkologické centrum ve FN Plzeň, kde byla sledována hladina TK1 u 400 pacientek s nádorem prsu před odstraněním nádoru a průměrná hodnota TK1 se signifikantně lišila od zdravých jedinců. Avšak TK1 citlivost byla 35% při 95% specificitě (64,65). Citlivost TK1 se v průběhu progresu choroby zvyšovala a vykazovala vyšší citlivost než markery CA 15-3 a CEA. Současné sledování TK1 a CA 15-3 přispívá dle plzeňských zkušeností k časnějšímu záchytu relapsu (64).

Veškeré zmíněné výsledky dokumentují, že zvýšená hladina TK může sloužit jako marker pro predikci progresu a rekurence tohoto nádoru viz tabulka 3.

Tabulka 3 - Hladiny TK1 a citlivost při 95% specificitě pro predikci progresu choroby 9,6 a 3 měsíce před relapsem a v době klinické manifestace relapsu (čas 0) u pacientek s nádorem prsu (52)

TK1 [IU/l]	9 měsíců	6 měsíců	3 měsíce	relaps
Medián	4,3	11	18	24
Rozmezí	2-11	4-23	5-24	17-46
Citlivost [%]	5	34	47	69

2.2.2 Monitorace thymidin kinázy u kolorektálního nádoru

Kolorektální nádor je třetím nejčastějším nádorem ve vyspělých zemích. Jen malý počet případů je diagnostikován v lokalizovaném stádiu (39%) s 90% přežitím. Většinou je choroba zjištěna buď ve stádiu regionálního postižení nebo v generalizovaném stádiu se vzdálenými metastázami s mnohem horším přežitím 67% resp. 10% (66).

V Plzeňském centru je TK1 systematicky sledována u pacientů s nádorem kolorekta před a po odstranění nádoru a během pooperačního období (56-58, 67-69). Hladiny TK1 před operací byly vyšší, ale nedosahovaly statistické významnosti. Pooperační hladiny TK1 byly zvýšené nezávisle na etiologii nádoru (benigní nebo maligní). Po operacích malého rozsahu (např. operace kýly)

zůstává hladina TK1 nízká, což dokumentuje, že pooperační zvýšení hladiny TK1 souvisí spíše s reparačními procesy v tkáních než s vlastní nádorovou proliferací. Hodnoty TK1 v remisi se nelišily od kontrolních hladin zdravých jedinců (57,58). Během progresu onemocnění zvýšení hladiny TK1 předcházelo klinické manifestaci relapsu a citlivost TK1 byla od 30% do 60%, což byly hodnoty vyšší než hodnoty citlivosti CEA a CA 19-9 ve stejné době sledování viz tabulka 4 (56,58).

Tabulka 4 - Hladiny TK a citlivost při 95% specificitě pro predikci progresu choroby 9,6 a 3 měsíce před relapsem a v době klinické manifestace relapsu (čas 0) u pacientů s kolorektálním nádorem (52)

TK1 [IU/l]	9 měsíců	6 měsíců	3 měsíce	Relaps
Medián	3,3	13	19	26
Rozmezí	2-9	8-27	12-34	17-56
Citlivost [%]	14	29	48	60

Ve studii W. Thomase byly hladiny TK1 sledovány u pacientů s asymptomatickým kolorektálním adenomem, asymptomatickým kolorektálním karcinomem a pacientů s jaterními metastázami kolorektálního karcinomu. U pacientů s adenomem a jaterními metastázami byla hladina TK1 vyšší v porovnání s kontrolní skupinou, avšak zvýšení nebylo detekováno u pacientů s kolorektálním karcinomem (70).

2.2.3 Monitorace thymidin kinázy u hematologických malignit

Hlavním charakteristickým rysem hematologických malignit je buněčná proliferace, vzhledem k tomuto faktu TK1 nachází na tomto poli významné uplatnění.

Chronická lymfocytická leukémie (CLL) má často „doutnavý“ průběh, může mít velmi variabilní klinické projevy a očekávaná délka přežití s touto chorobou je velmi rozdílná – od 1,5 roku od stanovení diagnózy až po normální délku života. Vzhledem k tomuto velmi obtížně předvídatelnému chování, je v popředí snaha o nalezení nějakého klinicky použitelného prognostického markeru (71). Jedním takovým parametrem je hladina TK1, která přímo koreluje s proliferací aktivitou nádoru (72). Aktivita TK1 se ve zdravých buňkách projeví pouze v krátkém

období během S-fáze buněčného cyklu, zatímco její aktivita v patologicky proliferujících buňkách je mnohonásobně vyšší (73). Bylo provedeno několik studií u lymfoproliferativních onemocnění, které potvrdily prognostický význam TK1. Například u pacientů s non-Hodgkinskými lymfomy nebo s mnohočetným myelomem hladina TK1 koreluje s gradem malignity, stádiem choroby a délkou přežití (74-76). U CLL hladina TK1 koreluje nejenom se stádiem dle RAI klasifikace, ale také s fází choroby a dovoří tak rozlišit mezi agresivním a indolentním onemocněním (77). Další studie dokazují, že sérová hladina TK1 je nezávislým markerem, který predikuje délku trvání CLL do progresu (19,78). Jinou z prací zabývajících se tímto problémem je práce Raimonda, který měřil hladinu TK1 u 188 pacientů s CLL v aktivní nebo pokročilé fázi onemocnění (79). V této práci autoři našli statisticky signifikantní korelaci mezi hladinou TK1, odpovědí na léčbu i přežitím pacientů. Jako hranici odpovědi zvolili autoři hladinu TK1 10 U/l, přičemž 83% pacientů s TK1 < 10 U/l zareagovalo na léčbu narozdíl od pacientů s TK1 > 10 U/l, kde reagovalo pouze 45% ($p < 0,01$). Tento rozdíl byl signifikantní, ale až poté co pacienti byli rozděleni na skupinu, která již byla předléčena a na skupinu dosud neléčených pacientů a zároveň byli rozděleni podle klasifikace Binet. Důležitým se zdá být i fakt, že ze skupiny s TK1 < 10 U/l dlouhodobě přežívalo 65% narozdíl od skupiny s TK1 > 10 U/l, kde to bylo pouze 22% pacientů. Z výsledků autoři vyvozují, že informace z monitorace hladiny TK1 jsou prognosticky významné a mohly by například vést i k větší individualizaci léčby, přičemž pacienti s TK1 > 10 U/l by vzhledem k horší prognóze měli projít agresivnější léčbou. V další studii se autoři zabývali prognostickým významem dosud neléčených pacientů s CLL, kteří byli v době diagnózy ve stádiu A dle Bineta. V tomto souboru bylo 122 pacientů a po statistickém zpracování bylo zjištěno, že pouze 3 ze sledovaných markerů byly prognosticky významné ve smyslu předpovědi progression-free survival (PFS): hladina TK1 > 7,1 U/l, přítomnost lymfadenopatie a přítomnost leukocytózy > 75000 / μ l. Zajímavé výsledky byly publikovány také v případě, když se pacienti z výše uvedeného souboru rozdělili na 2 skupiny dle charakteru choroby a to na doutnající nebo nedoutnající typ CLL. U nedoutnající CLL pacienti s TK1 > 7,1 U/l měli medián PFS 8 měsíců, zatímco u pacientů s TK1 < 7,1 U/l to bylo 49 měsíců ($p < 0,001$), obdobné rozdíly byly zjištěny i pro skupinu doutnajících CLL. Z výsledků je patrné, že

hladina TK1 je nezávislý prognostický faktor v rámci podskupin doutnajících event. nedoutnajících CLL stádia Binet A (78).

Lymfomy s ohledem na monitoraci TK1 byly studovány hlavně mezi lety 1980 a 1990. Tyto práce prokazovaly zvýšenou hladinu TK1 u lymfomů, ale bez další korelace se stádiem onemocnění nebo prognózou. U non-Hodgkinských lymfomů (NHL), což je velmi heterogenní skupina nádorů, mohou nádorové markery pomoci nalézt skupinu vysoce rizikových pacientů, kteří budou profitovat s agresivnější léčby. Takovými markery se zdají být solubilní CD27 (sCD27) a TK1. sCD27 koreluje s velikostí nádorové masy a TK1 s proliferační aktivitou. Ve studii u 79 pacientů s NHL byly nalezeny 4 parametry, které korelovaly se stádiem choroby, mezinárodním prognostickým indexem (International Prognostic Index =IPI) a přežitím, byly to: sCD27, TK1, β 2MG a hladina laktát dehydrogenázy (LDH) v okamžiku diagnózy. Z těchto markerů byl sCD27 nejlépe odpovídajícím k rozdělení do dvou rizikových skupin (vysoké a nízké riziko), zatímco hladina LDH nejlépe korelovala s prognózou. U indolentních nádorů se sCD27 osvědčil k hodnocení přežití bez progresu se statistickou významností na hladině $p=0,008$. Ze studie vyplývá, že v případě záměny LDH za sCD27 v IPI skórovacím systému by byly snáze rozpoznány indolentní formy lymfomů a zvýšila by se prognostická váha IPI skóre (80). V další studii u NHL byl prokázán rozdíl v přežití v případě, že hladina TK1 byla před léčbou < 10 U/l, tak 2 leté přežití bylo 83% narozdíl od pacientů s TK1 > 10 U/l, kde bylo pouze 47%. Z daných výsledků vyplývá, že TK1 může pomoci v monitoraci klinického vývoje NHL během léčby a předpovědět prognózu.

U mnohočetného myelomu pacienti ve stádiu I měli signifikantně nižší hladinu TK1 než pacienti v pokročilých stádiích ($p < 0,01$), zároveň bylo zjištěno, že hladina TK1 odpovídá i odpovědi na léčbu, v remisi klesá a při relapsu opět stoupá (81).

U hematologických onemocnění TK1 často koreluje s dalšími markery. Důkazem je například studie na 35 dospělých pacientech s leukémií/lymfomem z T-buněk (ATL). Ve skupině bylo 15 pacientů s ALL, 10 pacientů s lymfomem a 10 pacientů s chronickou leukémií. Diagnóza ATL byla stanovena na základě klinických projevů, hematologických nálezů, přítomností protilátek proti

ATL asociovaným antigenům a průkazem monoklonální integrace provirové DNA lidského T-lymfotropního viru typ I do leukemických buněk pacientů. Klinické subtypy ATL byly zařazeny dle kritérií japonské lymfomové skupiny. U pacientů byla zjišťována koncentrace TK1, sIL-2R a LDH. 43% pacientů s ATL mělo v séru pozitivní neuron specifickou enolázu (NSE). Sérová NSE byla signifikantně vyšší ve skupině pacientů s akutní leukémií a lymfomy narozdíl od chronické leukémie. Při porovnání NSE a ostatních sledovaných markerů vypovídajících o agresivitě onemocnění byly u NSE pozitivní skupiny vyšší hladiny TK1, sIL-2R i LDH narozdíl od NSE negativní skupiny (82). Sadamori svojí prací potvrdil korelaci mezi hladinou TK1 a odpovědí na léčbu u ATL, kdy u 52 pacientů s ATL hladina TK1 přímo korelovala jak se vstupní leukocytózou, tak s počtem atypických buněk v periferní krvi. Ale hlavně bylo možno pomocí hladiny TK1 rozlišit pacienty směřující léčbou do remise od pacientů, kteří nebudou reagovat na léčbu (83). Recentní práci publikoval O'Neil v jehož souboru bylo 33 pacientů s ALL, které porovnával se 49 zdravými jedinci a prokázal signifikantně vyšší hladinu TK1 u pacientů s ALL. Zároveň dokázal dle hladiny TK1 při diagnóze určit skupinu, která po léčbě pravděpodobně zrelabuje ($p < 0,05$) a zároveň u několika vybraných pacientů (4xALL, 5xAML) zaznamenal při monitoraci TK1 v průběhu léčby a po ní jednoznačný trend, totiž došlo-li k vzestupu TK1, znamenalo to, že pacient následně prodělá i hematologický relaps onemocnění (84)

U myelodysplastického syndromu (MDS) se snažil Musto s kolegy zjistit prognostickou váhu TK1, jakožto proliferačního markeru (85). Sérovou hladinu TK1 monitoroval u 90 pacientů s MDS (22x refrakterní anémie - RA, 17x refrakterní anémie s prstenčitými sideroblasty - RARS, 21x refrakterní anémie s převahou blastů - RAEB, 15x refrakterní anémie s převahou blastů v transformaci - RAEB-T a 15x chronická myelomonocytární leukémie - CMMoL). Střední hladina TK1 (U/l) při stanovení diagnózy byla $11,9 \pm 12,6$ pro RA, $11,4 \pm 13,6$ pro RARS, $19,9 \pm 28,4$ pro RAEB, $39,6 \pm 34,3$ pro RAEB-T a $77,7 \pm 69,7$ pro CMMoL. Pacienti s MDS se vstupní hladinou TK1 > 38 U/l měli signifikantně kratší přežití narozdíl od pacientů s TK1 < 38 U/l (8,2 versus 37,4 měsíce, $p < 0,0001$). Při další analýze skupiny pacientů s TK1 > 38 U/l v době diagnózy, bylo zjištěno, že u 81% z nich se rozvinula AML a u skupiny s TK1 < 38 U/l pouze u 13% ($p < 0,0001$).

Multivariantní analýzou bylo zjištěno, že TK1 je nezávislým prognostickým markerem jak pro celkové přežití tak pro riziko blastické transformace MDS (85).

2.2.4 Thymidin kináza jako marker odpovědi na léčbu u solidních tumorů

Bylo publikováno, že TK1 může být použita jako hodnotící marker léčebného efektu při léčbě melanomu (86). V této souvislosti bylo také studováno 257 pacientů s nádorem prsu pokročilého stádia, kde byl tamoxifen použit jako první léčebná modalita. Ze studie vyplynulo, že vysoká hladina TK1 během léčby tamoxifenem byla signifikantním markerem špatné klinického odpovědi na léčbu tamoxifenem. Ve studii byla zároveň monitorována thymidilát syntetáza, jejíž vysoká hladina byla naopak dobrým prediktorem příznivé odpovědi na léčbu 5-fluorouracilem, jež následovala po selhání léčby tamoxifenem (87). Ve FN Plzeň byla TK1 monitorována u 30 pacientů s kolorektálním karcinomem během adjuvantní nebo paliativní chemoterapie. Bylo zjištěno, že se hladina TK1 jako jediná ze sledovaných markerů typicky mění během chemoterapie tak, že na začátku chemoterapeutického cyklu je nízká a na konci vysoká. Dynamika vývoje hladin TK1 byla rozdílná u adjuvantní a paliativní chemoterapie. Z výsledků vyplynulo, že monitorace hladiny TK1 je velmi dobrým ukazatelem odpovědi jak na adjuvantní, tak na paliativní chemoterapii u kolorektálního karcinomu (88).

2.2.5 Thymidin kináza u lymfadenopatie

V literatuře nejsou dosud publikována žádná data vztahující se k monitoraci hladiny sérové TK1 a lymfadenopatii. TK1 však začíná být aktuální u lymfadenopatií s ohledem na to, že například podle van Waardeho radionuklidem značená TK1 spolu s radionuklidem značeným cholinem nebo methioninem představují lepší markery pro rozlišení mezi nádorovou infiltrací a zánětem při PET vyšetření, než dosud používaná fluorodeoxy glukóza (89).

2.2.6 Thymidin kináza jako marker zánětu

Ojedinele je v literatuře zmíněna sérová hladina TK1 jako marker infekce. TK1 byla studována v souvislosti s monitorací cytomegalovirové (CMV) infekce po transplantaci ledvin (90).

Autoři popisují retrospektivní studii na 20 pacientech po transplantaci ledviny od kadaverosního dárce, u 7 z nich se po transplantaci vyvinula cytomegalovirová infekce, všichni tito pacienti měli zvýšenou hladinu TK1 a její zvýšení odpovídalo tíži CMV infekce. Ve stejné práci byl studován i vztah hladiny TK1 a rejekcí transplantované ledviny a bylo zjištěno, že u většiny případů ireverzibilní rejekce štěpu také dochází ke zvýšení hladiny TK1. Toto zvýšení je však podstatně nižší než v případě CMV infekce a korelace hladiny TK1 a rejekce nebyla vyhodnocena jako signifikantní. V další studii bylo popsáno, že hladina TK1 dobře koreluje s odpovědí na léčbu CMV infekce virostatikem Foscarnet (91). Souvislost mezi thymidin kinázou a HIV infekcí byla již zmíněna výše.

3 Cíl disertační práce

1. Zhodnocení přínosu nádorového markeru TK1 pro:

- primární diagnostiku u leukémií a lymfomů u dětí
- prognózu dětských pacientů s leukémiemi a lymfomy
- včasný záchyt relapsu akutní leukémie

2. Vypracování optimálního způsobu interpretace výsledků hladiny TK1 při follow up u dětí po léčbě akutní leukémie

4 Metodika

4.1 Soubory pacientů a použité klinické hodnocení

4.1.1 Kontrolní skupiny pacientů

1. Kontrolní skupina zdravých dětí

Pro účely této studie byla použita skupina 45 zdravých dětí ve věkovém rozmezí 5-14 let, průměrný věk 10 let, medián věku 9 let. Charakteristiky hladin TK1 ve skupině byly: minimum 1,1 IU/l, maximum 5,6 IU/l, medián 3,5 IU/l, charakteristiky hladin β 2MG byly: minimum 0,2 mg/l, maximum 1,9 mg/l, medián 1,0 mg/l.

2. Kontrolní skupina dětí s benigním onemocněním

Kontrolní skupinu tvořilo 109 pacientů s benigními onemocněními vyšetřených event. sledovaných na Dětské klinice FN Plzeň. V této skupině bylo zahrnuto: 35 dětí s nenádorovou lymfadenitidou, 32 dětí s autoimunitním onemocněním (ITP, leukopenie, neutropenie, AIHA, Evansův syndrom, juvenilní idiopatická artritida, revmatoidní artritida), 27 dětí s prokázaným virovým infektem, 8 dětí s aplasií kostní dřeně, 7 dětí s prokázanou bakteriální infekcí. U žádného ze sledovaných dětí se během sledování nevyvinulo žádné hematoonkologické ani onkologické onemocnění.

4.1.2 Soubor pacientů s leukémií

Od dubna 1996 do ledna 2009 bylo na Dětské klinice FN Plzeň léčeno (a event. sledováno po léčbě) pro leukémii 86 dětí, z nich bylo do hodnoceného souboru zařazeno 58 dětí (35 chlapců, 23 dívek; průměrný věk 7 let), u kterých byla zjištěna diagnostická hladina sérové TK1 a byla k dispozici alespoň jedna další hladina TK1 po diagnostickém odběru. V tomto základním souboru nemocných mělo akutní lymfoblastickou leukémii 48 pacientů, akutní myeloidní leukémii 4 pacienti, chronickou myeloidní leukémii 2 pacienti, akutní hybridní leukémii 2 pacienti, juvenilní myelomonocytární leukémii 1 pacient a 1 pacient byl s AML při Downově syndromu viz tabulka 5. Průměrná doba sledování byla 5,8 let. Relaps onemocnění se vyskytl v 7 případech, z toho jedna

pacientka prodělala 2 relapsy onemocnění. V souboru zemřelo 5 pacientů, všichni v souvislosti se základním onemocněním. Sekundární malignita se vyskytla ve sledovaném souboru 1x, jednalo se o adenokarcinom průdušnice s odstupem 4 let od diagnózy leukémie. Všichni pacienti byli léčeni příslušnými národními protokoly pro danou diagnózu a daný věk, diagnóza byla vždy potvrzena druhým čtením v našem případě ve FN Motol.

Tabulka 5 - Souhrnná tabulka všech dětí s leukémií zařazených do studie

Diagnóza	Celkový počet N	Chlapci N	Dívky N	Procentuelní zastoupení
ALL	48	30	18	82%
AML	4	1	3	7%
AHL	2	2	0	3,5%
CML	2	1	1	3,5%
JMML	1	0	1	2%
AML+ Down	1	1	0	2%
Celkem	58	35	23	100%

4.1.2.1 Charakteristika klinického stavu v průběhu follow up

Klinický stav jsme hodnotili na základě ambulantního vyšetření dětským hematologem, v souvislosti se sledováním nádorových markerů jsme shromažďovali i údaje o prodělaných infekčních onemocněních v posledním měsíci před odběrem nádorových markerů.

4.1.2.2 Remise

Remise byla charakterizována v souladu s definicí WHO jako „no evidence of disease“, t.j. morfoloicky méně než 5% blastů v kostní dřeni, od roku 2000 pak i průtokovou cytometrií bez nálezů atypické populace v kostní dřeni a od roku 2002 bez průkazu přítomnosti nádorových buněk molekulárně-geneticky, t.j. nepřítomnost specifických přestaveb IgH a TCR v kostní dřeni. Aby byl

splněn požadavek na „no evidence of disease“, tak všechna výše uvedená laboratorní kritéria musela být ve shodě s klinickým nálezem, který nesvědčil pro nález probíhající leukémie.

4.1.2.3 Relaps

Relaps byl definován dle morfologických kritérií jako $\geq 25\%$ blastů ve vzorku kostní dřeně po předchozím dosažení remise onemocnění. Ve skupině sledovaných pacientů se vždy jednalo o izolovaný dřeňový relaps, proto definice mimodřeňových relapsů blíže nespecifikuji.

4.1.2.4 Klinická data, údaje o léčbě a přežití

Údaje o klinickém stavu pacientů, diagnózách a léčbě byly získány z vlastních pozorování, dále z chorobopisů, z klinického informačního systému dětské kliniky a FN Plzeň (přednosta dětské kliniky doc. MUDr. J. Kobr, PhD.) a údaje o follow up z databáze hematologické ordinace dětské kliniky (prim MUDr. Z. Černá).

4.1.3 Soubor pacientů s lymfomem

Od ledna 1999 do června 2007 bylo do souboru zařazeno 14 pacientů s lymfomem. Většina z nich byla léčena na Dětské klinice FN Plzeň, pouze u 2 pacientů byla sdílena péče s KDHO FN Motol. V souboru bylo 7 chlapců a 7 dívek a z celkového počtu 14 maligních lymfomů se jednalo ve 12 případech o Hodgkinův lymfom a ve 2 případech o non-Hodgkinský lymfom – oba T-lymfoblastický lymfom. Kritéria pro výběr pacientů do sledovaného souboru byla stejná jako u leukémií (viz výše). Ze sledované kohorty pacientů všichni dosáhli kompletní remise onemocnění a při době sledování 6 let nebyl zaznamenán žádný relaps nebo úmrtí. Hodnocení klinického stavu a follow up byl obdobný jako u skupiny pacientů s leukémiemi (viz výše). Procentuálně větší zastoupení Hodgkinských lymfomů ve sledované kohortě pacientů je dáno jednak tím, že tento typ lymfomu je v dětské populaci nejčastější a dále centralizací všech ostatních typů lymfomů do KDHO FN Motol.

4.1.4 Soubor pacientů s lymfadenitidou

Od února 2002 do července 2007 bylo do sledované skupiny zařazeno 35 dětských pacientů. Jednalo se ve všech případech o benigní lymfadenitidu, která byla verifikována histologickým vyšetřením postižené uzliny (6 případů) nebo byl prokázán etiologický infekční agens (4 případy), nebo nebyl splněn ani jeden z předcházejících bodů, ale přes extenzivní vyšetření nebyla zjištěna příčina lymfadenopatie a další klinický vývoj potvrdil její benigní charakter. Podle lokalizace lymfadenopatie se jednalo o krční lymfadenitidu (20 případů), tříselnou (4 případy), podpažní (1 případ), mesenterální (1 případ), kombinovanou – krční + tříselnou (6 případů), krční+podpažní (1 případ) a generalizovanou (2 případy).

4.2 Stanovení nádorových markerů

4.2.1 Metodika stanovení TK1 v séru

Použitá metoda je založena na *in vitro* radioenzymatickém stanovení aktivity thymidin kinázy - isoenzymu TK1. Při měření dochází k enzymatické fosforylaci radioaktivně značeného substrátu (5-[¹²⁵I]-deoxyuridin) pomocí thymidin kinázy obsažené ve vzorku. 5-[¹²⁵I]-deoxyuridin je přeměněn na 5-[¹²⁵I]-deoxyuridin monofosfát (5-[¹²⁵I]-dUMP). 5-[¹²⁵I]-dUMP je oddělen z reakční směsi adsorbci na ionexu a tato vázaná aktivita se poté měří na gama-čítači. Přístroj automaticky vypočítá pro každý vzorek hodnotu B-B0 (cpm vzorku -cpm blanku). Hodnoty B-B0 standardů jsou použity pro sestavení kalibrační křivky v logaritmických souřadnicích, k proložení se používá spline funkce. Podle hodnot B-B0 patientských vzorků a kontrol se na kalibrační křivce odečítají výsledky v jednotkách U/L. Pokud je naměřená aktivita TK ve vzorku vyšší než 80 U/L, je nutné vzorek 10x naředit (20 μl vzorku + 180μl pracovního roztoku pufru) a analyzovat naředěný roztok. Výsledek je pak nutno vynásobit 10x. K vyšetření byl používán kit firmy Immunotech Praha. Všechna měření probíhala v imunoanalytické laboratoři ONM FN Plzeň (vedoucí laboratoře prof.MUDr.O.Topolčan,DrSc.).

4.2.2 Metodika stanovení β 2MG v séru

Metoda stanovení β 2MG je založena na principu metody ELISA. Vyšetření probíhá na mikrodestičce s 96 reakčními jamkami, která je pokryta anti-h- β 2MG protilátkami. Vazba analytu na destičku, tvorba sendvičového komplexu a enzymatická barevná reakce probíhají ve 3 reakčních fázích. Nejprve se do jamek na mikrodestičce napipetují vzorky – kalibrační, kontroly a naředěný vzorek pacienta. Po 30 minutách inkubace se odmyjí z destičky nereagující sérové komponenty. V dalším kroku se napipetuje do jamek konjugační roztok anti-h- β 2MG-horseradish peroxidáza, který reaguje pouze s již navázanými komplexy anti-h- β 2MG protilátka + β 2MG. Po 15 minutách inkubace se přebytečný enzym odmyje. V posledním kroku se přidá do reakčních jamek chromogenní roztok obsahující 3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin. Během 15 minutové inkubace se roztok zbarví do modra, následně je přidán 1 molární roztok kyseliny chlorovodíkové, který reakci ukončí a barva roztoku se změní na žlutou. Množství barvy pak proporcionálně odpovídá koncentraci β 2MG v původním vzorku. Vzorek se proto na konci vyhodnotí v analyzátoru optické hustoty při použití 450nm filtru.

4.2.3 Odběry pro stanovení nádorových markerů

1. Diagnostický odběr – odběr provedený v den stanovení diagnózy, před zahájením vlastní léčby.
2. V průběhu follow up – odběr po dokončení intenzivní cytostatické části léčebného protokolu a při kontrolách v hematologické ordinaci DK v intervalu 3-6 měsíců.

Se všemi pacienty, resp. zákonnými zástupci, byl před zařazením do studie podepsán informovaný souhlas se zařazením do studie.

4.3 Statistická analýza

Pro klinické zhodnocení nádorových markerů jsou v práci používány následující statistické pojmy:

1. **Cut off** (hraniční /diskriminační/ hladina)
 - Při screeningu a primární diagnostice je definována jako hladina markeru pod kterou leží p % (většinou 97,5 %) hodnot zdravých osob
 - Při follow up je pro záchyt recidivy a progresu onemocnění definována jako hladina markeru, pod kterou leží p % (většinou 95 %) hodnot pacientů v kompletní remisi (= no evidence of disease)
2. **Senzitivita** (SN) - udává procento správně pozitivních výsledků v daném souboru
3. **Specifická** (SP) - udává procento správně negativních výsledků v daném souboru
4. **Relativní rizika** - udává, kolikrát se zvýší riziko progresu onemocnění u daného pacienta při hodnotě nádorového markeru nad stanovenou cut off oproti riziku progresu při hodnotě pod cut off.
5. **Bezpriznakové přežití** (disease free interval = DFI) - udává časový interval bez zjevných příznaků choroby v čase od primární terapie do prvních, klinicky zjistitelných známek progresu onemocnění.
6. **Celkové přežití** (overall survival = OS) - udává celkovou dobu přežití pacienta v době od primární terapie do jeho úmrtí.
7. **Konfidenční limit** (interval) - interval, kde se spolehlivostí 95 % (nebo 99 % či 90 %) leží správná hodnota odhadovaného parametru, například relativního rizika.
8. **ROC** (Receiver Operating Characteristic).- křivka, kde pro zvolený dělicí bod je dopočítána senzitivita a specifická testu.
9. **Box plot** (Křabicový diagram) – graf znázorňuje 25. až 75. percentil hodnot, s úsečkou uprostřed, která představuje medián. Úsečky vyběhající z diagramu dosahují

k minimálním a maximálním hodnotám. Odlehlé hodnoty jsou vyznačeny nad nebo pod úsečkami .

5 Výsledky

5.1 Kontrolní skupina dětí s benigním onemocněním

V tabulce 6 jsou uvedeny jednotlivé diagnózy u kontrolního souboru pacientů s benigním onemocněním, současně je v tabulce uvedena i frekvence výskytu patologických hodnot nádorových markerů (t.j. hodnot nad cut off u TK1 nad 8 U/I, u β 2MG nad 2 mg/l)

Tabulka 6- Přehled benigních onemocnění v kontrolní skupině a charakteristika četnosti zvýšení nádorových markerů v jednotlivých skupinách nad normu

Benigní onemocnění (Celkem 109 pacientů)	Počet N (%)	TK1 nad 8 U/I N (%)	β 2MG nad 2 mg/l N (%)
Lymfadenitis	35	27 (77%)	0
Autoimunitní onemocnění	32	28 (88%)	3 (9%)
Virová infekce	27	24 (89%)	12 (44%)
Bakteriální infekce	7	7 (100%)	1 (14%)
Aplasie kostní dřeně	8	8 (100%)	0

Tabulka 7 - Průměr, směrodatná odchylka, medián, minimum a maximum nádorových markerů u kontrolního souboru pacientů rozděleno podle jednotlivých onemocnění

Benigní onemocnění (Celkem 109)	Počet (N)	TK1			β 2MG		
		Průměr \pm SD	Medián	Min.- Max.	Průměr \pm SD	Medián	Min.- Max.
Lymfadenitis	35	17,5 \pm 11,4	16,5	1,7-59,9	1,27 \pm 0,25	1,26	0,85-1,81
Autoimunitní onemocnění	32	52,8 \pm 82,1	24,75	3,5-320,9	1,38 \pm 0,39	1,29	0,77-2,22
Virová infekce	27	166 \pm 190,2	55,8	6,9- 699,5	2,23 \pm 1,1	2,07	0,9- 5,41
Bakteriální infekce	7	31,4 \pm 17,1	25,5	13,9-52,2	1,47 \pm 0,58	1,34	0,97-2,22
Aplasie kostní dřeně	8	17,9 \pm 7,8	17,5	9,3-32,8	0,96 \pm 0,15	1,01	0,75-1,15

Z tabulek 6 a 7 vyplývá, že nejčastěji je TK1 zvýšena nad normu u skupiny bakteriálních infekcí a skupiny pacientů s aplasií kostní dřeně, avšak hodnoty mediánů v těchto skupinách jsou poměrně nízké, t.j. pouze 2-3 násobek normy. V literatuře nejsou publikována žádná obdobná data, se kterými bychom mohli naše výsledky porovnat, ale předpokládali jsme, že největší zvýšení TK1 bude u virových infekcí, což se potvrdilo a výsledek koreluje s literárními údaji (68,69). Vysoké procentuální zastoupení elevací TK1 nad normu ve skupině s bakteriální infekcí a aplasií kostní dřeně hodnotíme jako chybu malých čísel při málo početných skupinách pacientů. Pro další hodnocení je zároveň důležité, že ve skupině s nenádorovou lymfadenitidou je jednoznačně nejmenší hodnota vzestupu TK1 ze všech sledovaných kontrolních skupin pacientů. Pokud jde o β 2MG, pak vzestup tohoto parametru kopíruje vzestup TK1, t.j. nejvyšších dosahovaných hodnot je ve skupině virových zánětů.

5.2 Soubor pacientů s leukémiemi

5.2.1 Hladiny sledovaných markerů při diagnóze leukémie – diferenciálně diagnostický význam

Tabulka 8 - Základní deskriptivní statistika diagnostických hodnot sledovaných markerů při diagnóze

Marker	Počet (N)	Průměr \pm SD	Medián	Min.-Max.
TK1 [U/l]	55	597,2 \pm 815,5	409,9	5,8 – 5826
β 2MG [mg/l]	55	2,04 \pm 0,73	1,96	0,6 – 3,89

Z tabulky 8 vyplývá, že rozptyl výsledků je poměrně značný, ale medián hodnot parametrů při diagnóze (hlavně u TK1) je 40x zvýšen oproti normě. Výsledky byly dále analyzovány s cílem zjistit, zda pomocí hladiny jednotlivých markerů lze odlišit skupinu s leukémiemi od pacientů s neonkologickými onemocněními.

Porovnáním skupin pacientů s leukémiemi versus kontrolní skupina je zřejmé, že při diagnóze je zachycena výrazně vyšší hladina TK1 i β 2MG. Při statistickém zpracování neparametrickou ANOVOU bylo zjištěno, že rozdíly jsou v obou případech statisticky signifikantní pro TK1 i pro β 2MG ($p < 0,0001$). Z výsledků vyplývá, že pomocí TK1 a β 2MG lze velmi dobře odlišit pacienta s leukémií od pacienta s jiným neoncologickým onemocněním.

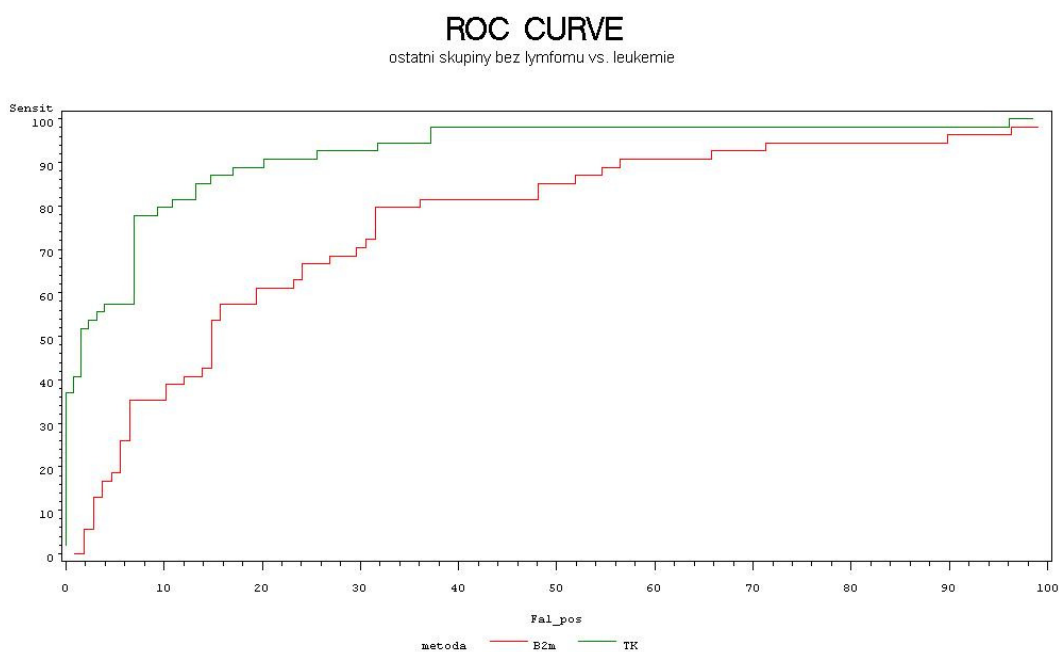
5.2.2 Hladiny sledovaných markerů při diagnóze leukémie – senzitivita a specifita

Pro námi sledovaný soubor pacientů jsme stanovili jako optimální specifitu 95%, hodnoty senzitivity při této doporučené specifitě jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 9 - Senzitivity hladin TK1 a β 2MG při specifitě 95% - vztaženo ke kontrolní skupině dětí s benigním onemocněním

Specifita	TK1 [U/l]		β 2MG [mg/l]	
	Cut off	Senzitivita	Cut off	Senzitivita
95%	300	75,9%	2,26	35,2%

Obrázek 1 - ROC křivka pro optimalizaci cut off – kontrolní skupina pacientů versus leukémie



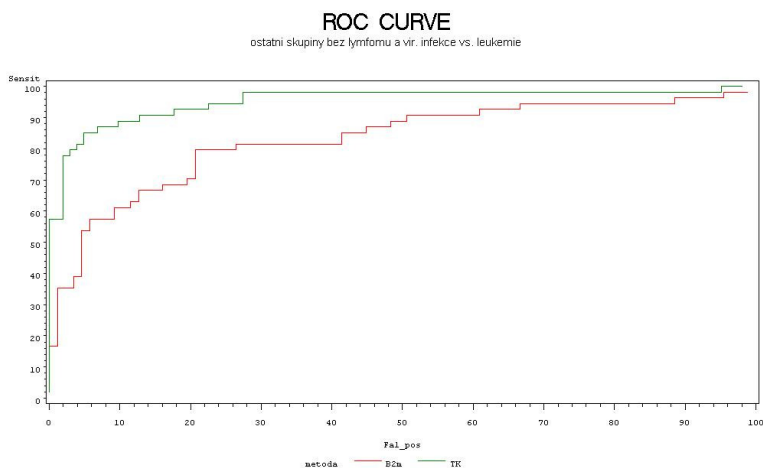
Z analýzy vyplývá, že při specifitě 95%, což je hodnota obecně udávaná jako optimální pro nádorové markery, se hodnota senzitivity pohybuje mezi 75% pro TK1 a 35% pro β 2MG, což považujeme za ne zcela dostačující v případě používání markerů pro cílené vyhledávání (viz. doporučení) (2).

S ohledem na výše uvedené jsme zvolili pro další analýzu jako kontrolní skupinu soubor dětí s benigním onemocněním, ze které jsme ale vyřadili pacienty s virovými infekty viz tabulka 10. To jsme provedli proto, že v rámci kontrolní skupiny právě u pacientů s virovou infekcí docházelo k největšímu vzestupu nádorových markerů a očekávali jsme tedy největší zlepšení senzitivity viz obrázek 2. Zároveň se jedná o skupinu pacientů, která je v praxi standardním virologickým vyšetřením snadno definovatelná a lze ji i bez použití nádorových markerů v rámci diferenciální diagnózy od leukémie spolehlivě odlišit.

Tabulka 10 - Senzitivity hladin TK1 a β 2MG při specifitě 95% vztahované ke kontrolní skupině dětí s benigním onemocněním s vyloučením virových infekcí

	TK1 [U/l]		β 2MG [mg/l]	
Specifita	Cut off	Senzitivita	Cut off	Senzitivita
95%	135,4	85,2%	1,94	53,7%

Obrázek 2 - ROC křivka – kontrolní skupina pacientů s vyloučením virových infekcí versus leukémie



Po vynechání hodnot nemocných s virovou infekcí došlo k výraznému zlepšení senzitivity a to až na 85% u TK1 a 53% u β 2MG při specificitě 95%, což považujeme u TK1 za dostatečné. Z analýzy vyplývá, že TK1 lze použít jako velmi dobrý nádorový marker pro aktivní vyhledávání a časnou diagnózu u dětí vyšetřovaných pro podezření na leukémii poté, co v prvním diagnostickém kroku vyloučíme u dítěte virovou infekci.

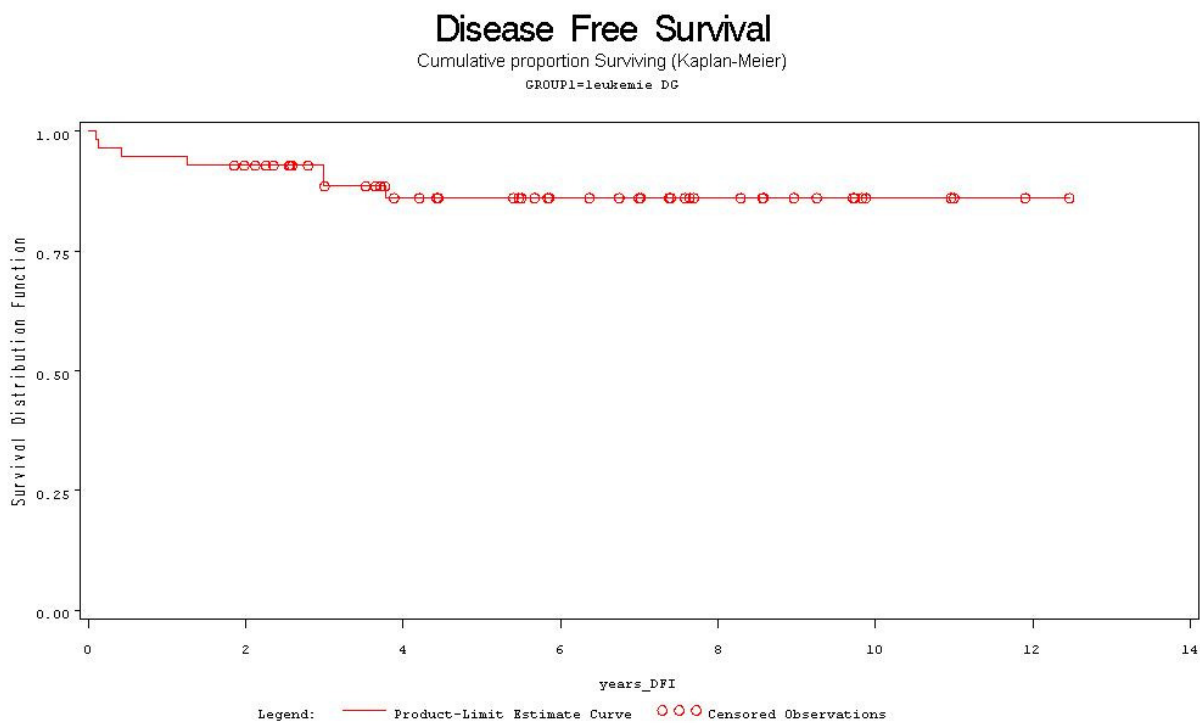
Tabulka 11 - Námí navrhované cut off pro follow up u leukémií

TK1 [U/l]		
Specificita	Cut off	Senzitivita
96,1%	199,4	81,5%
β 2MG [mg/l]		
Specificita	Cut off	Senzitivita
95,4%	1,94	53,7%

5.2.3 Hladiny sledovaných markerů při diagnóze leukémie – prognostický význam

Dalším cílem této práce bylo zjistit, zda hladina jednotlivých markerů při diagnóze koreluje s prognózou pacientů. V analyzované skupině pacientů během doby sledování došlo k 7 relapsům leukémie a 5 úmrtím. V souboru bylo dosaženo 3 letého přežití 92,4%, nicméně s ohledem na statistické hodnocení je to hodnoceno jako velmi málo událostí, a proto veškeré výsledky v této kapitole jsou pouze orientační.

Obrázek 3: Disease free survival u pacientů s leukémií zařazených do studie



Pomocí modelu Cox regression hazard byl hodnocen význam jednotlivých sledovaných markerů, t.j. TK1 a β 2MG pro odhad přežití. U obou parametrů jak TK1, tak β 2MG nebyla zjištěna souvislost s prognózou pacientů na hladině statistické významnosti.

Kromě výše zmíněných parametrů byla studována také otázka vlivu věku a pohlaví na přežití a u obou těchto parametrů se také nepodařilo prokázat souvislost s přežitím na hladině statistické významnosti.

Vzhledem k poměrně heterogenní skupině leukémií a malému počtu pacientů s některými podtypy leukémie, jsme pro další analýzu prognostického významu použili ze skupiny leukémií pouze skupinu pacientů s nejčastějším podtypem leukémie v dětském věku, t.j. akutní lymfoblastickou leukémií (ALL). V literatuře je přikládán v dětské populaci s ALL největší negativní prognostický význam přítomnosti fúzních genů BCR/ABL, MLL/AF4 a pomalé odpovědi na léčbu D+8 po prednisonové předfázi (hodnoceno absolutním počtem blastů v mikrolitru periferní krve 8 den léčby), resp. přetrvávající pozitivitě MRD po dokončeném

indukčním protokolu. S ohledem na výše uvedené jsme pro naši studii zvolili parametr léčebné odpovědi D+8, se kterým jsme porovnali hladiny nádorových markerů. Vzhledem k rozsáhlému časovému intervalu sběru dat nebylo možné použít k analýze přítomnost fúzních genů nebo hladinu MRD, neboť tato diagnostika byla dostupná pro naše pacienty až po roce 2001.

I při porovnání počtu blastů v periferní krvi v D+8, kdy jsme jako cut off zvolili standardně literárně udávaný počet 1000 blastů v mikrolitru periferní krve, jsme neshledali (narozdíl od literatury) tento parametr jako prognosticky významný.

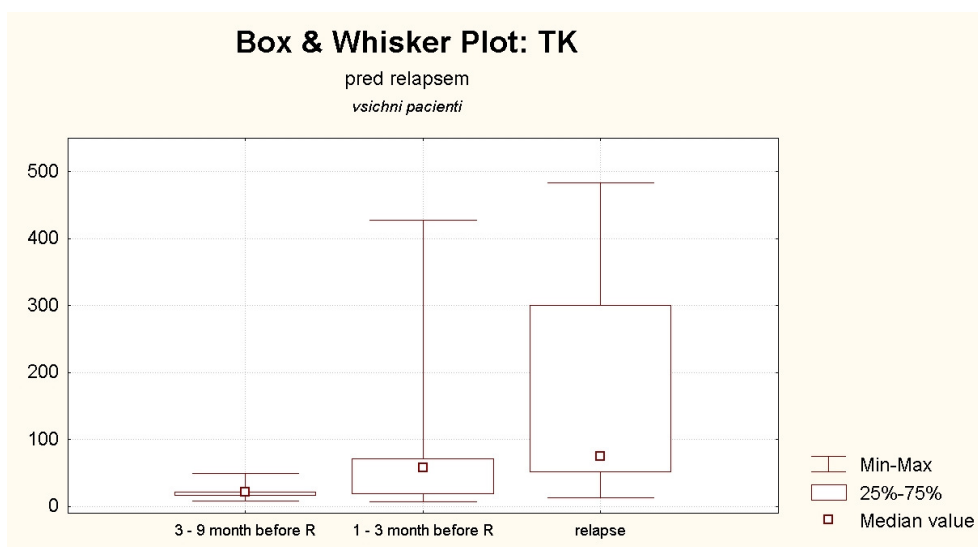
5.2.4 Hladiny sledovaných markerů v průběhu follow up

Při statistickém zhodnocení neparametrickou analýzou rozptylu ANOVA bylo zjištěno, že v průběhu sledování pacientů po dokončené léčbě akutní leukémie dochází, oproti kontrolní skupině pacientů, u dětí s leukémiemi ke statisticky signifikantnímu vzestupu obou sledovaných nádorových markerů (TK1, β 2MG) s předstihem 3-9 měsíců před vzplanutím relapsu onemocnění viz tabulka 12. U parametru TK1 bylo $p < 0,02535$ a u β 2MG bylo $p < 0,04551$.

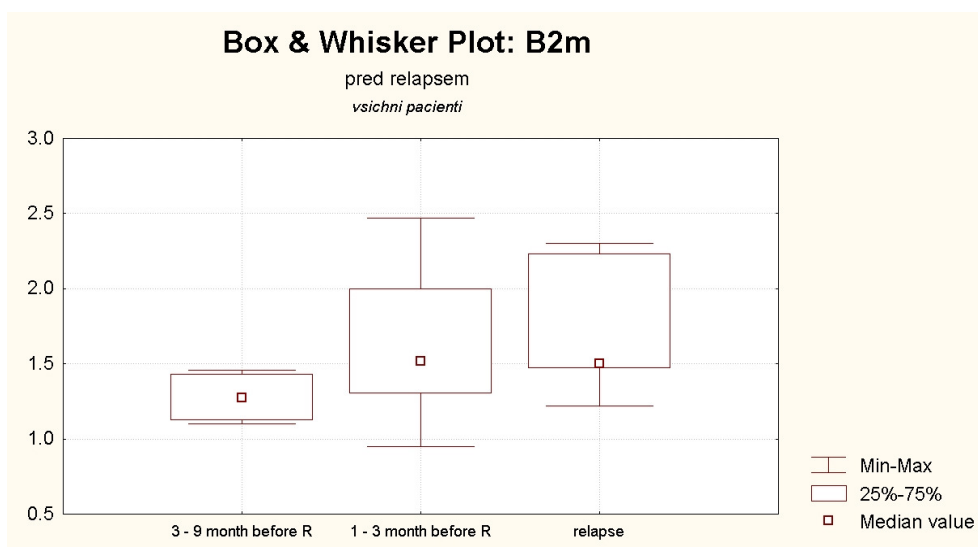
Tabulka 12 - Statistická deskripce skupiny s relapsy – TK1

Hladina TK1	Počet	Průměr	Variance	St. odchylka	Min.	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Max.
3 až 9 měsíců před relapsem	7	23,14	251,19	15,85	8,40	15,20	21,00	21,20	49,90
1 až 3 měsíce před relapsem	7	116,14	30 948,14	175,92	7,30	17,50	57,50	71,20	427,20
Relaps	7	184,10	40 459,80	201,15	13,30	50,10	74,30	300,00	482,80

Obrázek 4 - Grafické znázornění vývoje hladiny TK1 před relapsem

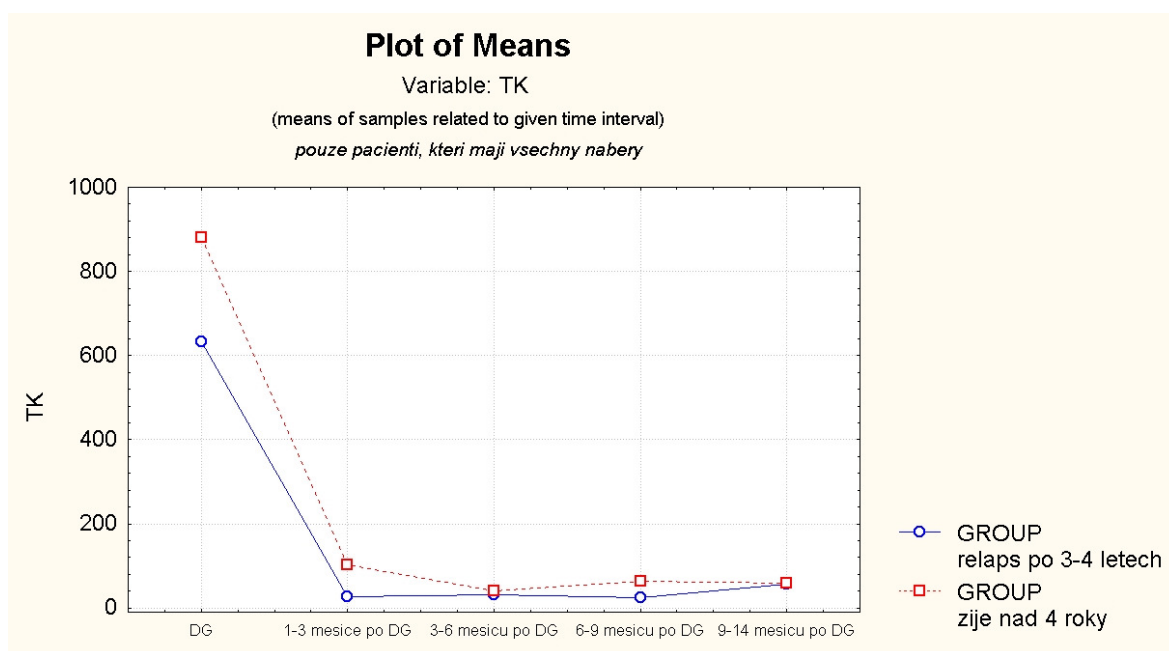
Tabulka 13 - Statistická deskripce skupiny s relapsy – β 2MG

Hladina β 2MG	Počet	Průměr	Variance	St. odchylka	Min.	Dolní kvartil	Medián	Horní kvartil	Max.
3 až 9 měsíců před relapsem	6	1,28	0,03	0,18	1,10	1,13	1,28	1,43	1,46
1 až 3 měsíce před relapsem	7	1,65	0,36	0,60	0,95	1,30	1,52	2,00	2,47
Relaps	7	1,74	0,24	0,49	1,22	1,47	1,50	2,23	2,30

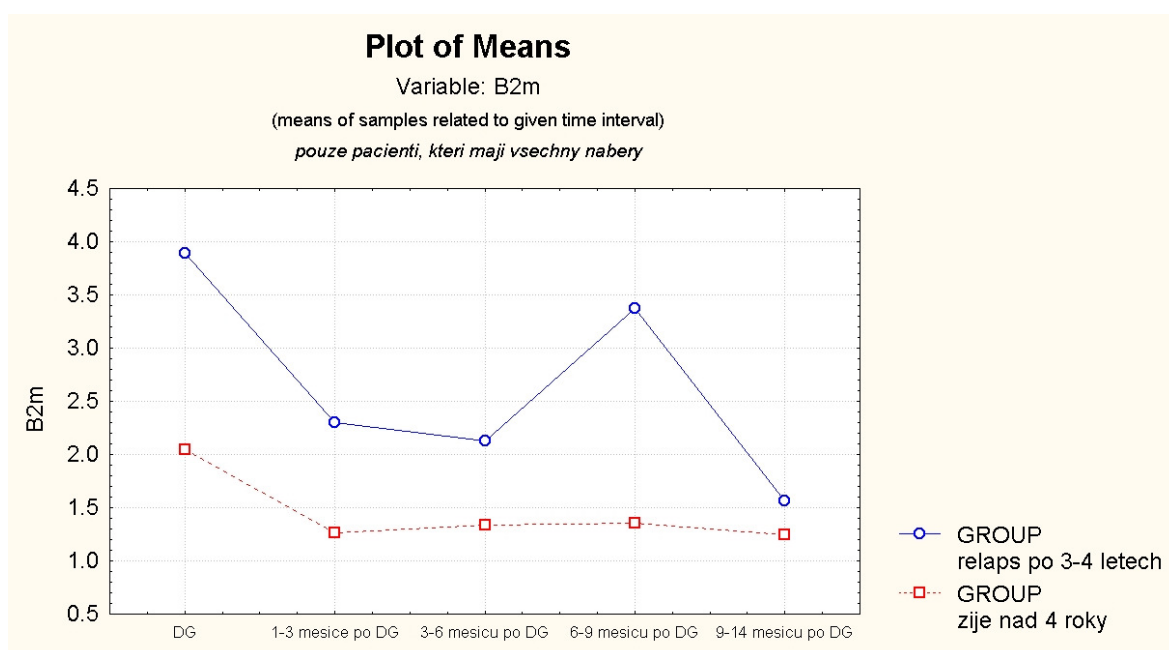
Obrázek 5 - Grafické znázornění vývoje hladiny β 2MG před relapsem

Při podrobnější analýze relapsů bylo zjištěno, že pokles hladiny TK1 neboli tzv. „clearance“ při léčbě leukémie je stejný pro obě skupiny pacientů jak skupinu s následným relapsem tak pro skupinu bez relapsu, ale u parametru β 2MG je zřejmé, že trend poklesu β 2MG při léčbě je u každé z výše uvedených skupin rozdílný. U skupiny pacientů, která později zrelabovala, totiž došlo k výrazně pomalejšímu poklesu β 2MG v průběhu prvního roku po stanovení diagnózy leukémie narozdíl od skupiny pacientů bez následného relapsu viz obrázky 6 a 7.

Obrázek 6 - Vývoj hladiny TK1 v prvních 14 měsících léčby – srovnání skupiny pacientů s následným relapsem a skupiny bez relapsu (skupiny se v „clearenci TK1“ neliší)



Obrázek 7 - Vývoj hladiny β 2MG v prvních 14 měsících léčby – srovnání skupiny pacientů s následným relapsem a skupiny bez relapsu (ve skupině s relapsem klesá po diagnóze β 2MG pomaleji než ve skupině bez následného relapsu)



Naše práce podporuje námi již dříve pozorované výsledky a totiž, že TK1 je velmi dobrý parametr pro sledování dětských pacientů po léčbě akutní leukémie s cílem zachytit včas relaps onemocnění. Dle našich zkušeností je diagnosticky nejpřínosnější vzestup TK1 3-6 měsíců před relapsem leukémie.

5.2.5 Srovnání výsledků minimální residuální nemoci a hladiny aktivity TK1

Tabulka 14 - Příklad porovnání hladiny TK1 a MRD v různých časových bodech u pacienta s diagnózou ALL, který měl relaps 3 roky od stanovení diagnózy

Fáze onemocnění	Dg.	D+33	W12			Konec léčby	Follow up			Relaps
Datum	15.7.03	18.8.03	13.10.03	17.9.04	31.3.05	19.7.05	6.10.05	3.11.05	4.5.06	11.7.06
VH3	-	2,9 ⁻⁴	neg	-	-	Neg	-	-	-	2,5 ⁻¹
Vkl	-	3,0 ⁻⁴	4,2 ⁻³	-	-	Neg	-	-	-	6,8 ⁻¹
TEL/AML1	133	-	-	-	-	0	-	-	-	27,8
TK1	300	111	128,8	199,4	54,8	49,4	70,9	21	57,5	50,1

Výše uvedená tabulka dokumentuje vývoj hladiny TK1 a kvantifikaci molekulárně genetických cílů - jednak specifických sekvencí těžkých řetězců imunoglobulinů a jednak TEL/AML1 fúzního genu u pacienta s relapsem ALL.

Porovnáním všech tří parametrů lze dospět k závěru, že při diagnóze a až po dosažení cytologické remise (D+33) jsou všechny sledované parametry vysoce pozitivní, do 12. týdne léčby (w12) dochází k poklesu v molekulárně genetických markerech, které jsou na konci léčby již zcela negativní, čemuž odpovídá i nižší hladina TK1. Více než 2 měsíce před stanovením diagnózy relapsu dochází ke zvýšení hladiny TK1 na dvojnásobek „bazální hodnoty“, následuje i zvýšení hladiny MRD molekulárně genetickými cíly, které nebyly v mezidobí před vzplanutím relapsu monitorovány.

5.3 Soubor pacientů s lymfomy

5.3.1 Hladiny sledovaných markerů při diagnóze lymfom – diferenciálně diagnostický význam

Tabulka 15 - Základní deskriptivní statistika diagnostických hodnot sledovaných markerů u lymfomů a u nenádorové lymfadenitidy

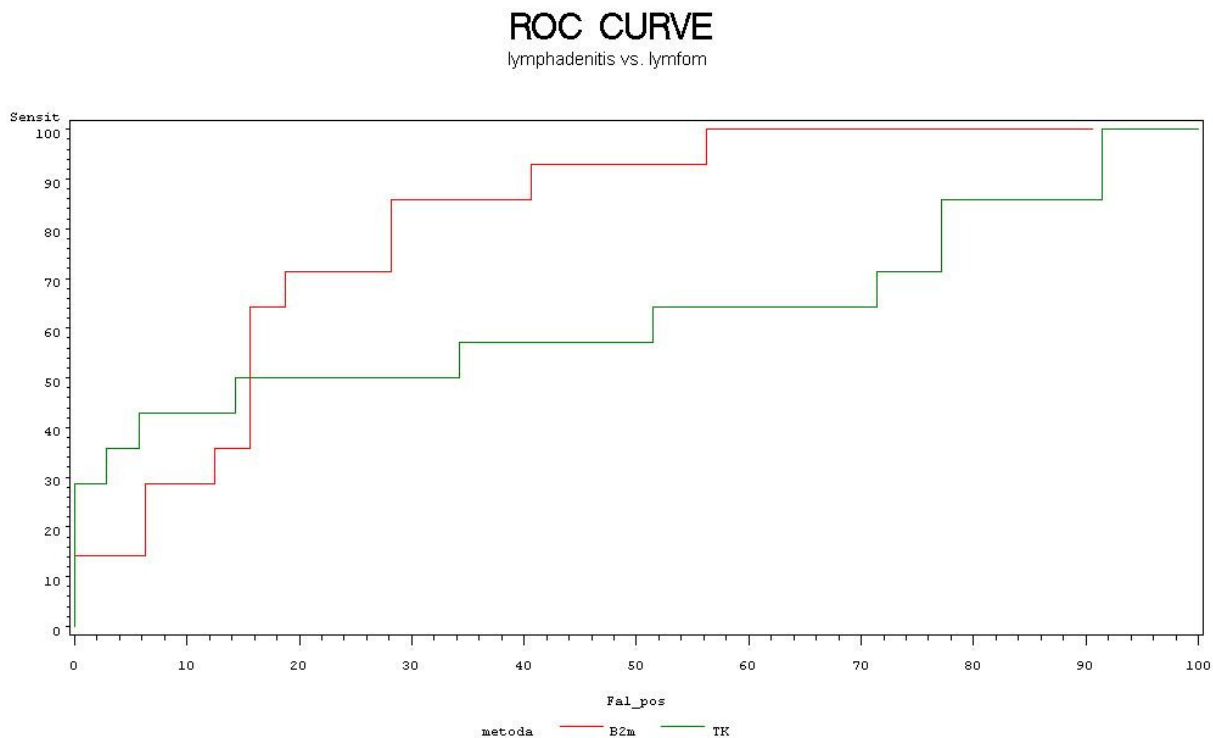
Lymfom				
Marker	N	Průměr ± SD	Medián	Min.-Max.
TK1 [U/l]	14	86,8 ± 139,7	21,65	5,0 – 480
β2MG [mg/l]	14	1,64 ± 0,44	1,56	1,23 – 3,01
Lymfadenitida				
Marker	N	Průměr ± SD	Medián	Min.-Max.
TK1 [U/l]	35	17,6 ± 11,4	16,5	1,7 – 59,9
β2MG [mg/l]	32	1,27 ± 0,25	1,26	0,85 – 1,81

Z tabulky 15 je zřejmé, že oba markery jsou u lymfomů zvýšeny v porovnání s kontrolní skupinou.

Porovnáním obou skupin a vyhodnocením neparametrickou ANOVOU bylo zjištěno že, zvýšení TK1 ve skupině s lymfomem a ve skupině s lymfadenitidou není statisticky signifikantní ($p < 0,08$) n rozdíl od β2MG, kde tento rozdíl signifikantní byl ($p < 0,0019$).

5.3.2 Hladiny sledovaných markerů při diagnóze lymfom – senzitivita a specificita

Při úvaze o použití výše zmíněných markerů pro rozlišení mezi lymfomem a lymfadenitidou jsme zjišťovali senzitivitu a specificitu jednotlivých markerů.



Z ROC křivky je zřejmé, že senzitivita i specifická obou parametrů jsou poměrně nízké, námi navrhané cut off jsou zobrazeny v následující tabulce 16.

Tabulka 16 – navrhaná cut off

β2MG [mg/l]		
Cut off	Specifická	Senzitivita
1,45	78,1%	71,4%
1,55	84,4%	57,1%
TK1 [U/l]		
Cut off	Specifická	Senzitivita
24	85,7%	50%
38,4	94,3%	42,9%

Z další statistické analýzy vyplývá například, že pro cut off β2MG=1,4 je riziko lymfomu 13x vyšší než u skupiny s lymfadenitidou a pro cut off TK1=30 U/l je riziko lymfomu 12x vyšší.

Dosažené výsledky považujeme za dostatečné pro doplňkovou metodu při rozhodování zda provést histologické vyšetření uzliny nebo ne. Na druhou stranu nepovažujeme za racionální provádět histologické vyšetření uzliny pouze na základě zvýšení TK1 nebo β2MG.

6 Diskuze

Narozdíl od většiny prací publikovaných na téma nádorových markerů je východiskem této práce retrospektivní analýza rutinních dat. Náš soubor nemocných s leukémiemi a lymfomy odpovídá zastoupením jednotlivých podskupin (u leukémií převaha ALL nad AML, u lymfomů HL nad ostatními) publikovaným údajům (70). Zastoupení jednotlivých pohlaví – u leukémii 62% chlapci, 38% děvčata, u lymfomů 53% chlapci a 47% děvčata odpovídá literatuře.

U dvou základních onkologických diagnóz, které jsme sledovali, tj. leukémií a lymfomů, je zřejmé, že prognóza onemocnění je závislá na časnosti stanovení diagnózy.

U lymfomů to platí absolutně, neboť prognóza pacientů léčených v lokalizovaném stádiu bez generalizace je lepší a navíc u časných stádií je intenzita léčby (i závažnost nežádoucích účinků) menší. V posledním desetiletí u lymfomů dochází ke snaze o deeskalaci léčby, t.j. maximální možné redukci chemoterapie a výrazný ústup je i od radioterapie. Důvody k deeskalaci léčby vyplývají z mnoha retrospektivních prací, které se zabývaly dlouhodobými následky léčby lymfomů. Je zřejmé, že při sledování 20 a více let od stanovení diagnózy lymfomu je velký problém vznik sekundárních malignit indukovaných léčbou. Z toho vyplývá i přežití, které u lymfomů je při krátké době sledování (několik let) excelentní a zhoršuje se v horizontu sledování deset a více let právě kvůli sekundárním malignitám (71). V tomto kontextu je časný záchyt onemocnění klíčový, neboť intenzita léčby je přímo úměrná klinickému stádiu onemocnění při diagnóze. Včasnou diagnózou (s nutností méně agresivní léčby) tedy lze jednoznačně preventivně působit proti vzniku sekundárních malignit, protože některá cytostatika mají prokázaný na dávce závislý mutagenní efekt. V naší skupině bylo 38% lymfomů diagnostikováno v pokročilém stádiu (t.j. III. a IV. stádiu), což odpovídá publikovaným údajům (73).

U leukémií je tento pozitivní efekt včasného záchytu obtížněji definovatelný a stále platí, že prognóza většiny pacientů závisí více na vlastní odpovědi na cytostatickou léčbu než na procentu infiltrace dřeně blasty, tedy přeneseně „pokročilosti onemocnění při diagnóze“. Výjimku z výše

uvedeného tvoří pacienti, kteří jsou v okamžiku diagnózy leukémie již v kritickém stavu a zemřou před projevením se pozitivního vlivu cytostatické léčby.

Přínos námi sledovaných markerů (TK1, β 2MG), k rychlejšímu stanovení diagnózy leukémie nebo lymfomu v nejasných případech (klinicky nebo laboratorně ne zcela standardních) je z našich zkušeností zřejmý (námi zatím nepublikovaná data).

Význam těchto nehematologických markerů se projeví při diferenciální diagnóze leukémie, neboť ta se může projevovat v dětském věku velmi polyvalentními obtížemi, jako jsou například bolesti kloubů a kostí, teploty, únava, bolesti břicha, pneumonie apod, což může oddálit včasnou diagnózu. Někdy se u dětí setkáváme s tzv. doutnající formou leukémie, kdy hodnoty v hematologických parametrech mohou vykazovat pouze minimální změny a stanovení správné diagnózy se oddaluje o několik týdnů do doby, kdy se onemocnění klinicky jednoznačně manifestuje, což teprve vede lékaře k provedení vyšetření kostní dřeně a ke stanovení správné diagnózy. V takovýchto případech další nehematologický marker může urychlit rozhodnutí o provedení vyšetření kostní dřeně a tím přispět k dřívějšímu stanovení diagnózy.

Naše výsledky, kdy z diagnostických vzorků lze jednoznačně a velmi dobře odlišit skupinu s leukémií od kontrolní skupiny, jsou obdobné jako u O'Neill, kde u 29 dospělých pacientů s ALL bylo zvýšení TK1 při diagnóze statisticky signifikantní (70).

U našeho souboru pacientů se senzitivity pro aktivní vyhledávání dětí a primární diagnostiku akutní leukémie pohybovaly u jednotlivých markerů 85% u TK1 a u β 2MG pod akceptovatelnou hladinou senzitivity, při doporučené specificitě 95% (po vyloučení virových infekcí), což pro diferenciálně diagnostické rozhodování zda v případě rozpaků provést pacientovi vyšetření kostní dřeně nebo ne, považujeme u TK1 za akceptovatelné.

Při hodnocení diagnostických hladin TK1 a β 2MG s ohledem na prognózu přežití pacientů s leukémiemi není překvapivé, že tento údaj vyšel jako nesignifikantní, což odpovídá i námi již dříve publikovaným poznatkům (75) a souvisí i s příznivou prognózou onemocnění. V literatuře se

obdobnou problematikou zabýval pouze N. Sadamori, který se však zabýval pouze podskupinou ALL z T buněk u dospělých a ve studii s 52 pacienty s T-ALL korelovaly TK1 i β 2MG s délkou přežití (71,72). Rozdílnost výsledků s naší studií může být dána jednak tím, že v našem souboru byly leukémie jak z B řady (40 pacientů), tak z T řady (8 pacientů) zařazeny do jedné skupiny a navíc je známo, že podskupina leukémií z T-buněk je prognosticky odlišná od ostatních ALL. Pacienti s T-ALL mívají v době diagnózy větší nálož blastů, mívají také častěji infiltrovány uzliny v mediastinu a hlavně se vyznačují vyšším počtem relapsů ve srovnání s ALL z B-buněk. Další možné vysvětlení je v tom, že naši pacienti byli děti, jejichž prognóza je výrazně lepší než u dospělých, s čímž souvisí i malý počet událostí (relaps, smrt) v námi sledované skupině. Hodnocení námi sledovaných markerů v této studii s ohledem na prognózu pacientů není možné přeceňovat, neboť při tak malém počtu událostí by k průkaznějšímu výsledku vedla až kohorta minimálně s několika sty pacientů. Nepřímý důkaz toho, že tento soubor prakticky nelze hodnotit ve smyslu prognostického náboje TK1 a β 2MG je i to, že jinak standardně uznávaný prognostický marker jako je absolutní počet blastů v periferní krvi v D+8 (8.den indukčního protokolu), v našem souboru vyšel jako prognosticky nevýznamný.

Porovnání hladin sledovaných nádorových markerů a molekulárně genetických cílů na leukemických buňkách s ohledem na rychlost odpovědi na léčbu a další sledování po léčbě nemáme ještě plně dokumentováno, protože výsledky sledování MRD molekulárně genetickými metodami je dosud poměrně krátké. Z naší zkušenosti je však patrné, že v období od stanovení diagnózy až do dosažení cytologické remise (týká se většinou 1. měsíce léčby) je nejvýznamnějším ukazatelem léčebného efektu cytologické vyšetření buď kostní dřeně event. periferní krve (D+8). Během druhé části indukční fáze léčby (ode dne 33 až do 12. týdne léčby) je zřejmé, že v rámci možnosti kvantifikace (event. účinnosti) léčby nabývá na významu sledování přítomnosti specifických genetických přestaveb těžkých řetězců imunoglobulinů a receptorů pro imunoglobuliny. Naopak v této fázi léčby zjevně nelze léčebný efekt sledovat hladinou TK1, neboť ta je ovlivněna podáváním koktejlů cytostatik s různou mírou suprese tvorby DNA a tím i falešně pozitivním ovlivňováním záchranné cesty tvorby DNA s následným zvýšením produkce TK1. V

další části léčby, t.j. od cca 7 měsíců od stanovení diagnózy do konce podávání udržovací cytostatické léčby, (t.j. do 2 let od stanovení diagnózy), je monitorace aktivity onemocnění velmi obtížná, protože molekulárně genetické cíle jsou v této fázi většinou již negativní, neboť citlivost těchto metodik se pohybuje na hranici 1×10^{-4} . V tomto období je zároveň hladina TK1 výrazně ovlivněna hepatopatiemi, které má většina pacientů na udržovací cytostatické léčbě (falešně zvýšená hladina TK1). V dalším období po skončení léčby je sledování pomocí TK1 již výhodnější, neboť se vyruší vliv cytostatické hepatopatie a výpovědnost tohoto markeru se výrazně zvýší. V této části léčby, resp. poléčebného sledování (follow up), nejde již o monitoraci léčby, ale význam a smysl sledování se přesouvá do roviny včasného zachycení eventuálního relapsu. Naše studie dokladuje, že význam TK1 je v této fázi nezastupitelný, kdy u naší skupiny pacientů došlo 3-9 měsíců před vzplanutím relapsu onemocnění ke statisticky signifikantnímu vzestupu hladiny TK1. Časový předstih tohoto zvýšení si vysvětlujeme v souvislosti s výraznou hyperproliferací aktivitou malého množství nádorových buněk, které jsou ještě pod detekčními možnostmi konvenčních monitorovacích metod (patologické změny v krevním obraze, cytologie, FACS, MRD) a navíc ještě v období klinicky zcela němém (u FACS a MRD se jedná o hypotézu, neboť tato vyšetření se v rámci follow up standardně neprovádějí). Při floridním relapsu pak dojde k vzestupu všech sledovaných parametrů. Domníváme se, že naše pozorování podporuje význam použití biochemického markeru jako je TK1 i v éře molekulárně genetického sledování MRD u ALL. Největší význam spatřujeme v monitoraci po dokončení vlastní cytostatické léčby. Tento význam podporuje i výrazně nižší cena a menší pracnost provedení TK1 testu ve srovnání s molekulárně genetickými metodami, které se zatím rutinně v pediatrii používají pouze při follow up po transplantaci kmenových buněk nikoli po konvenční léčbě leukémie. V literatuře nejsou dosud publikována data porovnávající u leukémií monitoraci nádorových markerů s minimální residuální nemocí sledované molekulárně genetickými metodami.

Z předchozí diskuse vyplývá, že systematická monitorace hladiny TK1 po dokončení léčby za účelem včasné diagnostiky relapsu leukémie je její hlavní indikací. Z našich zkušeností je ale zřejmé, že je nutno dodržovat určitá pravidla, bez kterých monitorace nemá smysl. V první řadě

musíme brát v úvahu falešnou pozitivitu při podávání některých typů cytostatik (např. methotrexát). Dalším faktorem ztěžujícím interpretaci výsledku je přítomnost infekce (hlavně virové), která výrazně zvyšuje hladinu TK1 a v neposlední řadě hepatopatie (u naší skupiny pacientů pocytostatická), která také zvyšuje hladinu TK1. Kromě možné falešné positivity je třeba brát v úvahu také věk pacienta, protože fyziologický růst organismu může také zvyšovat hladinu TK1, a proto je více než absolutní hodnota markeru podstatná jeho dynamika. Význam sledování dynamiky vývoje hladiny TK1 oproti izolovanému hodnocení absolutní hodnoty TK1 (v IU/l) je třeba zdůraznit i s ohledem na skutečnost, že doposud nebyly stanoveny normální hodnoty hladiny TK1 pro různé věkové kategorie. Pro optimální monitoraci je tedy vhodné sledovat TK1 v intervalu 3 měsíce, zároveň provádět klinické vyšetření pacienta a provádět mimo jiné i monitoraci jaterních funkcí a virologické vyšetření. Hladinu TK1 je pak vhodné porovnávat s „individuální remisní“ hladinou TK1, která může být pro každého dětského pacienta v průběhu follow up jiná. Interpretace výsledku při dodržení výše uvedených pravidel má pak velký význam pro včasnou diagnostiku relapsu.

Další sledovaný marker β 2MG se při monitoraci leukémií neosvědčil a to jak při diagnóze, kde měl nízkou senzitivitu, tak v rámci sledování pacienta po léčbě, kde se jeho interpretační síla pohybuje na hranici statistické významnosti. S ohledem na tyto výsledky a na to, že naše práce byla primárně zaměřena na hodnocení významu TK1 se v diskuzi o β 2MG podrobněji nezmiňuji.

Přes všechna interpretační úskalí je význam stanovení TK1 velký, neboť je třeba si uvědomit, že doposud neexistoval žádný spolehlivý nádorový marker, který by dosahoval dostačujících specifit a senzitivit pro aktivní časnou primární diagnostiku leukémií a monitoraci remisního období a časnou diagnostiku relapsu.

U lymfomů je situace s ohledem na kohortu našich pacientů jiná. Vzhledem k tomu že po dobu sledování zatím žádný pacient z naší skupiny neprodělal recidivu onemocnění a nezemřel, nelze provést hodnocení markerů s ohledem na jejich prognostickou sílu a nelze se k nim vyjádřit ani jako k potenciálním prediktorům recidivy při sledování po léčbě. Co je však zásadní, z

klinického pohledu může být β 2MG použit při diferenciální diagnostice u uzlinových syndromů, neboť jeho zvýšení u lymfomů v porovnání s benigní lymfadenitidou je signifikantní. U TK1 je zřejmé, že u lymfomů při diagnóze je sice také její hladina zvýšena ve srovnání s lymfadenitidou, ale lze hovořit pouze o trendu nikoliv o statisticky průkazném zvýšení. O významu β 2MG u lymfomů, jakožto o nádorovém markeru, je v dospělé populaci řada prací (95), ale o jeho významu u dětské populace jsou zmínky pouze sporadické. Například se o něm zmiňuje Bien ve své práci z roku 2004, kdy prokázal, že ve srovnání se zdravou dětskou populací je β 2MG u lymfomů při diagnóze signifikantně zvýšen (73). V porovnání s jeho výsledky, považujeme naši práci za klinicky využitelnější, neboť naše kontrolní skupina pro tento soubor nebyli zdraví jedinci, ale děti s lymfadenitidou což je v klinické praxi běžnější při diferenciálně diagnostickém zvažování diagnózy lymfomu.

Kasuistická sdělení z naší praxe

Kasuistika 1

5 letý chlapec byl přijat na naše oddělení poté co utrpěl lehký úraz pádem ze zídky. V krevním obraze byla mírná trombocytopenie a normocytární anémie, klinický nález byl v normě. S ohledem na nejasnou etiologii bicytopenie jsme provedli aspiraci kostní dřeně a byl proveden náběr TK1. V kostní dřeni byl morfologickým vyšetřením prokázán normální nález, TK1 byla ale více než 800 IU/l. Chlapec byl dále sledován a za 6 týdnů došlo k progresi bicytopenie, provedli jsme nový aspirát kostní dřeně, kde bylo prokázáno 32% lymfoblastů a byla stanovena diagnóza ALL. Chlapec je nyní v léčbě, dospěl již do první kompletní remise onemocnění.

Kasuistika 2

6 letý chlapec s diagnózou ALL na probíhající udržovací chemoterapii se dostavil 16 měsíců od stanovení diagnózy k pravidelné kontrole. Pozn. před zahájením udržovací chemoterapie byla potvrzena remise onemocnění aspirátem kostní dřeně. Klinicky byl při kontrole chlapec zcela bez obtíží, v krevním obraze leukopenie odpovídající udržovací chemoterapii, hladina TK1 byla však

vyšší než 800 IU/L. Chlapec byl proto za 3 týdny pozván k provedení aspirace kostní dřeně (mimo standardní monitorovací plán) a byl potvrzen relaps ALL s 90% infiltrací kostní dřeně, v té době se již objevily blasty o v periferní krvi.

7 Závěr

Leukémie

Na naší skupině 58 pacientů s leukémiemi se nám podařilo jednoznačně prokázat, že vyšetřením TK1 po vyloučení virové infekce lze v rámci diferenciálně diagnostické rozvahy s poměrně velkou jistotou ($p < 0,0001$) rozlišit pacienty s leukémií oproti pacientům s jinými onemocněními, které mohou mít podobné klinické příznaky jako leukémie (v našem případě to byly lymfadenitida, autoimunitní onemocnění, bakteriální infekce a aplasie kostní dřeně). Senzitivita TK1 je 85,2 při 96 % specificitě, senzitivita β 2MG je nevyhovující.

Neprokázali jsme prognostický význam sledovaných markerů TK1 a β 2MG u pacientů s leukémiemi., respektive vzhledem k malému počtu pacientů v námi sledované skupině nelze pro malý počet událostí (relaps, úmrtí) tyto markery z prognostického hlediska hodnotit.

TK je v období po skončení terapie (při kompletní remisi onemocnění) vhodným markerem pro monitoraci a pro časný zachyt relapsu onemocnění a to v období 3 - 9 měsíců před jeho klinickou manifestací ($p < 0,02535$). β 2MG je ze stejného pohledu pro monitoraci méně vhodný ($p < 0,04551$). β 2MG je vhodným doplňkovým markerem k TK1.

S ohledem na současný trend snahy o monitoraci MRD u leukémií molekulárně genetickými metodami by se mohlo zdát, že monitorace proliferačního markeru thymidinkinázy je již věc přežitá. Je ale třeba si uvědomit, že monitorace MRD molekulárně genetickými metodami se provádí zatím pouze na začátku léčby s ohledem na stratifikaci pacientů do jednotlivých rizikových skupin, ale nikoli jako standardní sceeningová metoda v rámci follow up k časnému odhalení relapsu. Souvisí to především s časovou a ekonomickou náročností molekulárně genetické metodiky. Proto při běžném rutinním sledování má dle našeho názoru své nezastupitelné místo i sledování proliferačního markeru TK1 a ev. doplňkového nádorového markeru β 2MG.

Lymfomy

β 2MG ve skupině nemocných s lymfomy umožní diferenciální diagnostiku proti lymfadenitidě statistická významnost rozdílu je ($p < 0,0019$). U lymfomu na rozdíl od β 2MG se TK1 v diferenciální diagnostice neuplatňuje. β 2MG se uplatní jako doplňková metoda při rozhodování, zda provést histologické vyšetření uzliny nebo ne u pacienta s lymfadenopatií po vyloučení infekční etiologie lymfadenopatie. Na druhou stranu nepovažujeme za racionální provádět histologické vyšetření uzliny pouze na základě zvýšení β 2MG bez přítomnosti podezření na nádorovou etiologii z klinického vyšetření, zobrazovacích metod (USG, CT) nebo anamnestických údajů (B-symptomy, alkoholová bolest, pruritus apod).

Obdobně jako u leukémií, ani u pacientů s lymfomy se nám nepodařilo prokázat prognostický význam TK1 a β 2MG.

8 Závěr pro praxi

Leukémie – diagnostický algoritmus

Při podezření na leukémii (klinickém nebo laboratorním) – je vhodné mimo jiné provést screeningové virologické vyšetření (EBV, CMV, Parvovirus B19, HHV6, Adenovirus), jaterní testy a vyšetření TK1 a β 2MG. V případě průkazu aktivní virové infekce nebo elevace jaterních transamináz nad 5 μ kat/l, ztrácí vyšetření TK1 a β 2MG smysl vzhledem k vysoké pravděpodobnosti falešně pozitivního výsledku. V případě negativní virologie a normálních jaterních testů je diagnóza leukémie pravděpodobná při hladině TK1 nad 200 IU/l, a to se senzitivitou 81% a specificitou 96%. Při hodnotách nad uvedené cut off a negativní virologii u dítěte bez hepatopatie je vhodné ihned provést cytologické vyšetření kostní dřeně k definitivnímu potvrzení diagnózy leukémie.

Leukémie – algoritmus při sledování pacienta po dokončené léčbě

Po dokončení cytostatické léčby leukémie - follow up kontroly každé 3 měsíce s pravidelnou kontrolou klinického stavu, základní laboratoře a TK1 a β 2MG. S ohledem na možný relaps je třeba hladiny TK1 a β 2MG u každého pacienta vyhodnocovat individuálně. Po určení individuálních remisních hodnot obou markerů TK1 a β 2MG (nejčastěji se ustálí po půl roce od ukončení udržovací léčby leukémie, kdy odezní vliv cytostatik a upraví se toxická hepatopatie), je každý vzestup o více než 50% (je-li pacient bez virového infektu a bez hepatopatie) podezřelý z počínajícího relapsu onemocnění a pacient by měl být (i v případě dobrého klinického stavu a normálních parametrů krevního obrazu) pozván na kontrolu v kratším intervalu – nejlépe do 1 měsíce. Při přetrvávání nebo progresi elevace nádorových markerů při kontrolním vyšetření by mělo být neprodleně provedeno vyšetření kostní dřeně k ověření nebo vyloučení relapsu akutní leukémie.

Lymfomy

Při vyšetření pacienta s lymfadenopatií je třeba kromě jiného vyloučit i možnost nádorového onemocnění. V dětském věku z onkologických diagnóz je nejpravděpodobnějším nádorem uzlin lymfom. Z toho vyplývá, že v průběhu standardního diferenciatně diagnostického vyšetření pacienta včetně klinického vyšetření, zhodnocení anamnézy, základního grafického vyšetření (USG) a sérologického vyšetření, je vhodným vyšetřením i stanovení β 2MG a TK1, a pokud z výše uvedeného algoritmu není možné stanovit diagnózu (např. virový infek, antropozoonoza apod.) a hladina β 2MG je nad 1,55 mg/l, je diagnóza lymfomu pravděpodobná. Při nejasné diagnóze a vyšší hladině β 2MG nad uvedené cutt off je vhodné provést histologické vyšetření uzliny, které jako jediné může určit konečnou diagnózu. TK1 se u lymfomů pro podobný účel jako β 2MG neosvědčila.

9 Použitá literatura

- 1 <http://en.wikipedia.org/wiki/Inflammation>
- 2 Nekulová M, Šimíčková M, Valík D. Nádorové markery a epigenetické faktory. *Klin.Biochem.Metab.* 2006;14(35):152-156
- 3 Ahmed SF, Farqueuharson C. The effect of GH and IGF1 on linear growth and skeletal development and their modulation by SOCS proteins. *Journal of Endocrinology* (2010) 206, 249-259
- 4 Gurney J, Severson RK, Davis S, et al. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1 year age- specific rates by histologic type. *Cancer* 1995;75(8):2186-95
- 5 Spector LG, Xie Z, Robison LL, et al. Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from children's oncology group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(3):651-5
- 6 Pui CH, Raimondi SC, Murphy SB, et al. An analysis of leukemic cell chromosomal features in infants. *Blood* 1987;69(5):1289-93
- 7 Fong CT, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and the mechanism of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1987;28(1):55-76
- 8 Linet M. *The Leukemias: Epidemiological Aspects* (New York: Oxford University Press, 1985)
- 9 Greaves M. In utero origins of childhood leukemia. *Early Hum Dev* 2005;81(1):123-9
- 10 Zuna J, Prouzova Z, Kalina T, Lizcova L, Zemanova Z, Muzikova K, Rahmatova S, Meijerink JP, Trka J. Backtracking of ALL to cord blood. *Leuk Res.* 2009;33(8):e107-8

- 11 Zuna J, Ford AM, Peham M, Palet N, Saha V, Eckert C, Kochling J, Panzer-Grumayer R, Trka J, Greaves M. TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5355-60
- 12 Mayer J, Starý J a kolektiv. *Leukemie* (Grada Publishing, 2002): strana 27
- 13 Koutecký J, Kabíčková E, Starý J. *Dětská onkologie pro praxi* (Triton, 2002): strana 116
- 14 Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology* (5th edition Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2006), str. 696
- 15 Pizzo PA, Poplack DG. *Principles and Practice of Pediatric Oncology* (5th edition Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2006), strana 724
- 16 Link MP, Donalson SS. The lymphomas and lymphadenopathy – Nathan DG, Orkin SH. Nathan and Oski's *Hematology of infancy and childhood*. (5th edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, 1998): strana 1349-1352
- 17 Zuelzer WW, Kaplan J. The child with lymphadenopathy. *Semin Hematol* 1975;12(3):323-334
- 18 Bubanska E. Diferenciálna diagnostika lymfadenopatií u detí. *Pediatr Prax* 2008;3:157-160
- 19 Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;93(5):1732-7
- 20 Groschel B, Miller V, Doerr HW, Cinatl J Jr. Activity of Cellular Thymidine Kinase 1 in PBMC of HIV-1-Infected Patients: Novel Therapy Marker. *Infection* 2000;28(4):209-213
- 21 Simmons NS, Dounce AL. An improved preparation of sodium desoxyribonucleate. *J Am Chem Soc* 1952;74:1724-6

- 22 Lavie A, Konrad M. Structural requirements for efficient phosphorylation of nucleotide analogs by human thymidylat kinase. [Mini Rev Med Chem](#). 2004 May;4(4):351-9.
- 23 Okuda H, Arima T, Hashimoto T, Fujii S. [Multiple forms of deoxythymidine kinase in various tissues](#) *Cancer Res*. 1972 Apr;32(4):791-4.
- 24 Taylor AT, Stafford A, Jones OW. Properties of thymidine kinase partially purified from human fetal and adult tissue. *J Biol Chem* 1971;247(6):1930-5
- 25 Ohrvik A, Lindh M, Einarsson R, et al. Sensitive nonradiometric method for determining thymidine kinase 1 activity. *Clin Chem* 2004;50(9):1597-1606
- 26 Hopkins HA, Campbell HA, Barbiolloy B, Van Potter R. Thymidine kinase and deoxyribonucleic acid in growing and regenerating livers from rats on controlled feeding schedules. *Biochem J* 1973;136(4):955-66
- 27 Harlow LS, Berenstein D, Munch-Petersen S, Munch-Petersen B (2006). "Effect of C-terminal of human cytosolic thymidine kinase (TK1) on in vitro stability and enzymatic properties". *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 25 (9-11): 1185–8.
- 28 Welin M, Kosinska U, Mikkelsen NE, et al (December 2004). "Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (52): 17970–5.
- 29 Sherley JL, Kelly TJ. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* 1988;263(17):8350-8
- 30 Sherley JL, Kelly TJ. Human cytosolic thymidine kinase. Purification and physical characterization of enzyme from HeLa cells. *J Biol Chem* 1988;263(1):375-82
- 31 Munch-Petersen B. Differences in the kinetic properties of thymidine kinase izoenzymes in unstimulated and phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Mol Cell Biochem* 1991;94:173-85

- 32 Eriksson S, Kierdaszuk B, Munch-Petersen B, et al. Comparison of the substrate specificities of human thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase toward antiviral and cytostatic nucleoside analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176(2):586-92
- 33 Furman PA, Fyfe JA, St Clair MH, et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(21):8333-7
- 34 Wang L, Eriksson S. Cloning and characterization of full-length mouse thymidine kinase 2: the N-terminal sequence directs import of the precursor protein into mitochondria. *Biochem J* 2000;351 (Pt2):469-76
- 35 Maschke J, Menne S, Jacob JR, Kreuzfelder E, Tennant BC, Roggendorf M, Grosse-Wilde H. Thymidine utilization abnormality in proliferating lymphocytes and hepatocytes of the woodchuck. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;78(3-4):279-96
- 36 Xu W, Gorman PA, Rider SH, et al. Construction of a genetic map of human chromosome 17 by use chromosome-mediated gene transfer (in situ hybridization/acute promyelocytic leukemia/somatic-cell hybrid/thymine kinase gene/gene mapping). *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8563-7
- 37 Lieberman HB, Lin PF, Yeh DB, Ruddle FH. Transcriptional and posttranscriptional mechanism regulate murine thymidine kinase gene expression in serum stimulated cells. *Mol Cell Biol* 1988;8:5280-91
- 38 Coppock DL, Pardee AB. Control of thymidine kinase mRNA during the cell cycle. *Mol Cell Biol* 1987;7(8):2925-32
- 39 Lee LS, Cheng YC. Human deoxythymidine kinase I. Purification and general properties of the cytoplasmic and mitochondrial isoenzymes derived from blast cells of acute myelocytic leukemia. *J Biol Chem* 1976;251(9):2600-4

- 40 Kim YK, Lee AS. Identification of 70-base pair cell cycle regulatory unit within the promoter of the human thymidine kinase gene and its interaction with cellular factors. *Mol Cell Biol* 1991;11:2296-302
- 41 Ito M, Conrad SE. Independent regulation of thymidine kinase mRNA and enzyme levels of serum-stimulated cells. *J Biol Chem* 1990;265(12):6954-60
- 42 Gross MK, Merrill GF. Thymidine kinase synthesis is repressed in nonreplicating muscle cells by a translation mechanism that does not affect the polysomal distribution of thymidine kinase mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(13):4987-91
- 43 Kristensen T, Jensen HK, Munch-Petersen B. Overexpression of human thymidine kinase mRNA without corresponding enzymatic activity in patients with chronic lymphatic leukemia. *Leuk Res* 1994;18:861-6
- 44 Kauffman MG, Kelly TJ. Cell cycle regulation of thymidine kinase: residues near the carboxyl terminus are essential for the specific degradation of the enzyme at mitosis. *Mol Cell Biol* 1991;11(5):2538-46
- 45 Kauffman MG, Rose PA, Kelly TJ. Mutations in the thymidine kinase gene that allow expression of the enzyme in quiescent (G0) cells. *Oncogene* 1991;6(8):1427-35
- 46 Chang ZF, Huang DY. The regulation of thymidine kinase in HL-60 human promyeloleukemia cells. *J Biol Chem* 1993;268(2):1266-71
- 47 Lejcko J, Jungerova J, Topolcan O, Koza V. Thymidine kinase at malignant lymphogranuloma and non-Hodgkin Lymphoma. *Prakt Lek* 1992;72(5):171-3
- 48 Fenske J, Tuttle A, Olson G et al. Development of an automated, non-radiometric assay for thymidine kinase on the LIAISON analyzer-technical and clinical evaluation. *Tumor Biol* 2007;28(1):56

- 49 Shaw T, Silie RH, MacPhee DG. The role of blood platelets in nucleoside metabolism: assay, cellular location and significance of thymidine phosphorylase in human blood. *Mutant Res* 1988;200:99-116
- 50 El Kouni MH, El Kouni MM, Naguib FN. Differences in activities and substrate specificity of human and murine pyrimidine phosphorylases: implications for chemotherapy with 5-fluoropyrimidines. *Cancer Res* 1993;53(16):3687-93
- 51 Gronowitz JS. Ultra sensitive colorometric thymidine kinase activity analyses using template dependent product immobilisation by reverse transcriptase complemented by yeast kinase. *Tumor Biol* 2007;28(1):55
- 52 Topolcan O, Holubec L Jr. The role of thymidine kinase in cancer diseases. *Expert Opin Med Diagn* 2008;2(2):129-141
- 53 Pikner R, Ludvikova M, Ryska A, et al. TPS, thymidine kinase, VEGF and endostatin in cytosol of thyroid tissue samples. *Anticancer Res* 2005;25(3A):1517-21
- 54 Romain S, Christensen IJ, Chinot O, et al. Prognostic value of cytosolic thymidine kinase activity as a marker of proliferation in breast cancer. *Int J Cancer* 1995;61(1):7-12
- 55 Munch-Petersen B, Tyrsted G, Cloos L. Reversible ATP dependent transition between two forms of human cytosolic thymidine kinase with different enzymatic properties. *Biol Chem* 1993;268(21):15621-5
- 56 Topolcan O, Holubec L, Kausitz J, et al. Thymidine kinase monitoring importance in the routine clinical practice. *Anticancer Res* 2004;24(5D):3655-6
- 57 Topolcan O, Holubec L Jr, Svobodova S, et al. The diagnostic and prognostic significance of thymidinkinase in tumor diseases. *Tumor Biol* 2007;28(Suppl 1):57

- 58 Topolcan O, Holubec L Jr, Svobodova S, et al. The diagnostic and prognostic significance of thymidinkinase in tumor diseases. *J Clin Ligand Assay* 2007;29(4):190-3
- 59 He Q, Fornander T, Johansson H, et al. Thymidine kinase 1 in serum predicts increased risk of distant or loco-regional recurrence following surgery in patients with early breast cancer. *Anticancer Res* 2006;26(6C):4753-9
- 60 O'Neill KL, Hoper M, Odling-Smee GW. Can thymidine kinase levels in breast tumours predict disease recurrence? *J Natl Cancer Inst* 1992;84(23):1825-8
- 61 Syratos F, Martin PM, Hacene K, et al. Multiparametric prognostic evaluation of biological factors in primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992;84(16):1266-72
- 62 Romain S, Martin PM, Klijn JG, et al. DNA-synthesis enzyme activity: a biological tool useful for predicting anti-metabolic drug sensitivity in breast cancer? *Int J Cancer* 1997;74(2):156-61
- 63 Broet P, Romain S, Daver A, et al. Thymidine kinase as a proliferative marker: clinical relevance in 1,692 primary breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2001;19(11):2778-87
- 64 Svobodova S, Topolcan O, Holubec L, et al. Prognostic importance of thymidine kinase in colorectal and breast cancer. *Anticancer Res* 2007;27(4A):1907-9
- 65 Kausitz J. Radioimmunoanalysis in Oncology. University press in Pilsen: KBC;1991
- 66 Chang AE, Skibber JM. *Oncology. An Evidence-Based Approach*. New York: Springer, USA; 2006
- 67 Holubec L Jr, Topolcan O, Pikner R, et al. The significance of CEA, CA19-9 and CA72-4 in the detection of colorectal carcinoma recurrence. *Anticancer Res* 2000;20(6D):5237-44
- 68 Lipska L, Visokai V, Levy M, et al. Tumor markers in patients with relapse of colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2007;27(4A):1901-5

- 69 Liska V, Holubec L Jr, Treska V, et al. Dynamic of serum levels of tumour markers and prognosis of recurrence and survival after liver surgery for colorectal liver metastases. *Anticancer Res* 2007;27(4C):2861-4
- 70 Thomas WM, Robertson JF, McKenna PG, et al. Serum thymidine kinase in colorectal neoplasia. *Eur J Surg Oncol* 1995;21(6):632-4
- 71 Cheson B. Chronic Lymphocytic Leukemia: Staging and prognostic factor. In: *Chronic Lymphocytic Leukemia. Scientific Advances and Clinical Developments*. Cheson B, editor. New York Marcel Dekker; 1993
- 72 Kallander CF, Simonsson B, Gronowitz JS, Nilsson K. Serum deoxythymidine kinase correlates with peripheral lymphocyte thymidine uptake in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1987;38(4):331-7
- 73 Hengstschlager M, Knofler M, Mullner EW, et al. Different regulation of thymidine kinase during the cell cycle of normal versus DNA tumor virus-transformed cells. *J Biol Chem* 1994;269 (19):13836-42
- 74 Hallek M, Emmerich B, Strohmeyer S, et al. Activity of serum thymidine kinase in non-Hodgkin lymphoma: relationship to other prognostic factors. *Klin Wochenschr* 1988;66(16):718-23
- 75 Gronowitz JS, Hagberg H, Kallander CF, Simonsson B. The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 1983;47(4):487-95
- 76 Suki S, Swan F Jr, Tucker S, et al. Risk classification for large cell lymphoma using lactate dehydrogenase, beta-2 microglobulin, and thymidine kinase. *Leuk Lymphoma* 1995;18(1-2):87-92

- 77 Kallander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1984;54(11):2450-5
- 78 Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996;22(5-6):439-47
- 79 Di Raimondo F, Giustolisi R, Lerner S, et al. Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine. *Ann Oncol* 2001;12(5):621-5
- 80 Kok M, Bonfer JM, Korse CM, et al. Serum soluble CD27, but not thymidine kinase, is an independent prognostic factor for outcome in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Tumour Biol* 2003;24(1):53-60
- 81 Poley S, Steiber P, Nussler V, et al. Serum thymidine kinase in non-Hodgkin lymphomas with special regard to multiple myeloma. *Anticancer Res* 1997;17(4B):3025-9
- 82 Fujiwara H, Arima N, Ohtsubo H, et al. Clinical significance of serum neuron-specific enolase in patients with adult T-cell leukemia. *Am J Hematol* 2002;71(2):80-4
- 83 Sadamori N, Ichiba M, Mine M, Hakariya S, Hayashibara T, Itoyama T, Nakamura H, Tomonaga M, Hayashi K. Clinical significance of serum thymidine kinase in adult T-cell leukaemia and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1995;90(1):100-5
- 84 O'Neil KL, Zhang F, Li H, Fuja DG, Murray BK. Thymidine kinase 1 a prognostic and diagnostic indicator in ALL and AML patients. *Leukemia* 2007;21(3):560-3
- 85 Musto P, Bodenizza C, Falcone A, et al. Prognostic relevance of serum thymidine kinase in primary myelodysplastic syndromes: relationship to development of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 1995;90(1):125-30

- 86 Borovansky J, Stribrna J, Elleder M, Netikova I. Thymidine kinase in malignant melanoma. *Melanoma Res* 1994;4(5):275-9
- 87 Foekens JA, Romain S, Look MP, et al. Thymidine kinase and thymidylate synthase in advanced breast cancer: response to tamoxifen and chemotherapy. *Cancer Res* 2001;61(4):1421-5
- 88 Topolcan O, Holubec L Jr, Finek J, et al. Changes of thymidine kinase (TK) during adjuvant and palliative chemotherapy. *Anticancer Res* 2005;25(3A):1831-3
- 89 Van Waarde A, Elsinga PH. Proliferation Markers for the Differential Diagnosis of Tumor and Inflammation. *Curr Pharm Des* 2008;14(31):3326-3339
- 90 Gronowitz JS, Larsson A, Kallander CF, Claesson K, Sjoberg O, Lernestedt JO, Frodin L, Trufveson G. Serum thymidine kinase in transplant patients: its relation to cytomegalovirus activity, renal transplant rejection and its use for monitoring of antiviral therapy. *Ann Clin Res* 1986;18(2):71-5
- 91 Larson A, Frodin L, Trufveson G, Larsson E, Kallander CF, Gronowitz JS. Deoxythymidine kinase, a possible marker for monitoring activity of cytomegalovirus infection after renal transplantation. *Scand J Urol Nephrol* 1986;20(1):75-6
- 92 Sadamori N. Clinical and biological significance of serum tumor markers in adult T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 1996;22(5-6):415-9
- 93 Sadamori N, Mine M, Hakariya S, Ichiba M, Kawachi T, Itoyama T, Nakamura H, Tomonaga M, Hayashi K. Clinical significance of beta 2-microglobulin in serum of adult T cell leukemia. *Leukemia*. 1995;9(4):594-7
- 94 Bien E, Balcerska A, Ciesielski D. Does beta-2 microglobulin measurement play role in diagnostics of childhood malignancies? *Wiad Lek* 2004;57(1-2):8-11

- 95 Vassilakopoulos TP, Nadali G, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Kontopidou FN, Karkantaris C, Kokoris SI, Kyrtsolis MC, Tsaftaridis P, Pizzolo G, Pangalis GA. The prognostic significance of beta(2)-microglobulin in patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2002;87 (7): 701-708

10 Přehled publikovaných prací autora

Články v impaktovaných časopisech

Votava T, Topolcan O, Holubec L Jr, Cerna Z, Sasek L, Finek J, Kormunda S. Changes of Serum Thymidine Kinase in Children with Acute Leukemia. *Anticancer Research* 2007;27 (4A):1925-8 IF 1,414 viz příloha 1

Cmejlova J, Cerna Z, **Votava T**, Pospisilova D, Cmejla R. Identification of a new in-frame deletion of six amino acids in ribosomal protein S19 in a patient with Diamond-Blackfan anemia. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36(3):337-41 IF 2,678

Abstrakt v impaktovaném časopise

Votava T, Topolcan O, Holubec L Jr, Cerna Z, Sasek L, Kormunda S. Thymidine kinase enzymatic activity – good marker for the early recognition of the relapse of acute leukemia in children. *Tumor Biology* 2007;28 (suppl 1):56 IF 2,481

Přednášky na mezinárodních konferencích

Votava T, Topolcan O, Cerna Z, Holubec L Jr, Sasek L. Changes of serum Thymidine kinase in children with acute leukemia. 6th international conference CECHTUMA 2006, May 30-June 1, Prague

Votava T, Topolcan O, Holubec L Jr, Cerna Z, Sasek L, Kormunda S. Thymidine kinase enzymatic activity – good marker for the early recognition of the relapse of acute leukemia in children. The 35th Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM 2007, September 15-19, Prague

Přednášky a postery na národních konferencích

Černá Z, Petříková V, Sýkora J, **Votava T**. Vyšetření cirkulujících transferinových receptorů (TfR) u dětí s diagnózou sideropenické anémie v ambulantní praxi. XIII. Pracovní konference českých a slovenských dětských hematologů, 3.-5. října 2003, Lednice - přednáška

Votava T, Černá Z, Topolčan O, Holubec L, Šašek L. Monitorace nádorových markerů u dětí s akutními leukémiemi. 15. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, 4.-6. listopadu 2005, České Budějovice – poster

Pospíšilová D, Mihál V, Petrtylová K, Keslová P, Hak J, Blatný J, Kohlerová S, Černá Z, **Votava T**, Čmejlová J, Čmejla R, Priwitzzerová M, Divoký V, Starý J. Esenciální trombocytémie u dětí v České republice. 15. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, 4.-6. listopadu 2005, České Budějovice – přednáška

Ptoszková H, Suková M, Novák Z, Jabali Y, **Votava T**. Databáze chronických těžkých neutropenií (SCN) u dětí. 15. konference dětských hematologů a onkologů ČR a SR, 4.-6. listopadu 2005, České Budějovice - přednáška

Votava T, Doležalová L, Černá Z, Geierová V, Karas M. Vzácná příčina trombocytopenie v dětském věku. XX. Konference dětských hematologů a onkologů České a Slovenské republiky, 8.-10. října 2010, Praha - poster

Přednášky a postery na lokálních konferencích a pracovních setkáních za poslední rok

Votava T, Černá Z, Doležalová L. Evansův syndrom. XXII. Plzeňské pediatrické dny, 19.-20. března 2010, Plzeň – přednáška

Civáňová M, Nekl R, **Votava T**. AIHA – naše zkušenosti. XXII. Plzeňské pediatrické dny, 19.-20. března 2010, Plzeň – přednáška

Cvalínová D, Doležalová L, Černá Z, **Votava T**, Jehlička P, Lád V. Novinky v léčbě hemangiomů – naše první zkušenosti. XXII.Plzeňské pediatrické dny, 19.-20.března 2010, Plzeň – přednáška

Votava T, Černá Z, Doležalová L, Starý J, Kobr J a Pracovní skupina dětské hematologie. Současná léčba akutní lymfoblastické leukémie (ALL) u dětí v České republice a novinky v souvislosti se zahájením nového protokolu AIEOP-BFM 2009. Večer Dětské kliniky – přednáškový večer JEP, 8.září 2010, Plzeň – přednáška

ANTICANCER RESEARCH 27: 1925-1928 (2007)

Changes of Serum Thymidine Kinase in Children with Acute Leukemia

TOMAS VOTAVA¹, ONDREJ TOPOLCAN², LUBOS HOLUBEC Jr.³, ZDENKA CERNA¹,
LUMIR SASEK¹, JINDRICH FINEK³ and STANISLAV KORMUNDA²

¹Department of Pediatrics, ²Central Laboratory of Radioisotopes,

³Second Clinic of Internal Medicine and Department of Oncology and Radiotherapy,
Charles University, Faculty of Medicine and Faculty Hospital, Pilsen, Czech Republic

Abstract. Background: Thymidine kinase (TK) is involved in nucleic acid synthesis and is therefore considered to be an important proliferation tumor marker. Our main goal was to determine the significance of elevated TK levels as a relapse marker during follow-up with child patients suffering from acute leukemia. Patients and Methods: TK serum levels in 38 children with acute leukemia (34 lymphoblastic, 4 myeloblastic) were determined using radio-receptor analysis (RRA, Immunotech, Prague, USA). All patients included in this study had had TK examined before the start of the treatment and at least twice during the follow-up. Results: Our results showed that TK serum levels at the time of diagnosis were extremely high (78-5826 U/l, median value 403 U/l, normal <8 U/l), while in remission TK serum levels were much lower (5-80 U/l, median value 31 U/l). During relapse of acute leukemia (5 cases), TK levels increased considerably to measurements between 120-800 U/l (median value 324 U/l). The study showed that the elevation of TK serum levels during follow-up was a helpful marker for the recognition of an early stage of relapse and in some cases occurred as early as one month before the appearance of clinical signs. Sensitivity in this case was 87% and thus TK serum levels seem to be a very good parameter during follow-up because of acceptable sensitivity, low cost (4 \$/sample) and the elimination of a requirement for screening of bone marrow samples. Conclusion: While TK serum levels were helpful in predicting relapse during follow-up, it is necessary to note that they did not correlate with prognosis in our group of patients during the time of the initial diagnosis of acute leukemia.

Correspondence to: Lubos Holubec, Ph.D., Department of Oncology and Radiotherapy, Charles University, Faculty of Medicine, Pilsen, Czech Republic. Tel: +420 377153131, Fax: +420 377153222, e-mail: holubec@fnplzen.cz

Key Words: Thymidine kinase, childhood leukemia, tumour markers.

Thymidine kinase (TK) is an enzyme contributing to the synthesis of deoxyribonucleic acid (DNA) by incorporating thymine (1-4). While there have been a number of publications in the last 50 years examining changes in the level of TK during tumor therapy (5-9), the goal of our research is to determine the importance of TK for leukemia diagnosis, treatment monitoring and follow-up with child patients. The basis of our hypothesis is the observation that the level of TK correlates with proliferating cell activity and thus during leukemia, when there is a generalized proliferation of cells, we should observe a significant increase of the levels of TK (10).

Patients and Methods

Our patient sample consisted of 38 children with acute leukemia (34 with acute lymphoblastic leukemia and 4 with acute myeloid leukemia) who were treated at the Department of Pediatric Hemato-oncology at the University Hospital of the Charles University in Pilsen between January 1995 and May 2005. The study sample consisted of 38 patients – 28 boys and 10 girls. The average age of our patients was 6.5 years and the range was from 1 to 15 years of age. The average observation time was 46.7 months (ranging from 3 to 95 months). TK levels were tested using radio-receptor analysis (Immunotech, Prague, Czech Republic). This radioenzymatic assay has been optimised for TK1 estimation (also known as fetal TK, dTK-F, or cytosol-TK) (3, 4). The thymidine kinase assay is based on enzymatic phosphorylation of 5-[125I]-deoxyuridine, catalysed by thymidine kinase contained in the sample. 5-[125I]-Deoxyuridine is transformed to 5-iododeoxyuridine monophosphate (125Id-UMP). 125Id-UMP is then separated from the reaction mixture by adsorption on ion exchange resin. The sorbent is rinsed and the radioactivity is then determined in a gamma counter. The TK enzymatic activity in the samples is obtained by interpolation from the standard curve and is directly proportional to the radioactivity. Patients were included in the study, if they had had their TK levels tested before the beginning of the treatment, and if during the follow-up there were at least two TK measurements available from the previous 12 months.

Statistical analysis of the data was performed by the S.A.S program, version 8.02 and the Statistica program 98 Edition. Descriptive statistics (median, 25%-75% percentile, minimum,

Table I. Basic characteristics of the study group.

Number of children	38	
Gender	♂ 28	♀ 10
Type of leukemia	34 x ALL	4 x AML
Length of observation	46.7 months	
Number of relapses in group	5 (all in bone marrow)	
	4 x first relapse	1 x second relapse

maximum) were calculated for the whole group of patients, as well as for individual subgroups. Profiles of specificities and corresponding sensitivities for individual referential groups are illustrated with receiver operating characteristics (ROC) curves in accordance with EGTM recommendations (21). The comparison of variables in given groups and subgroups, considering the distribution of the variables, was performed by non-parametric tests (Kruskal-Wallis test or two-sample Wilcoxon test). The relations between the parameters were computed using Spearman's correlation coefficient.

The measured TK levels were compared with other parameters that are usually tested in patients with hemoblastosis and are considered to be markers of cell proliferation (lactate dehydrogenase, erythrocyte sedimentation, β -2 microglobulin, ferritin) (5). The TK levels were compared with the clinical status of the patients and the afore-mentioned parameters. Children who underwent the complete therapy during the observed time, and who had no other somatic problems after finishing the treatment, were included in the study for follow-up.

Results

The basic characteristics of the patients who participated in this study are shown in Table I, followed by figures containing the summaries of the measurements. The levels of TK before the start of the treatment, during remission, and during relapse are shown in Figure 1. The diagnosis values are extremely high (normal is up to 8 U/l), remission values are much lower, and there is a significant increase ($p < 0.001$) in the TK levels about 1 month before relapse that almost reaches the values measured during the diagnosis and before the beginning of the treatment. Figure 2 shows the same for the levels of β -2 microglobulin. Note that during relapse, there is also a significant increase ($p < 0.041$) of the levels of β -2 microglobulin compared to remission status. The levels of ferritin during diagnosis, remission and relapse are shown in Figure 3. Note that there is no significant change of levels of ferritin during relapse compared to remission status. The erythrocyte sedimentation rates at diagnosis, during remission and during relapse are shown in Figure 4. There is a statistically

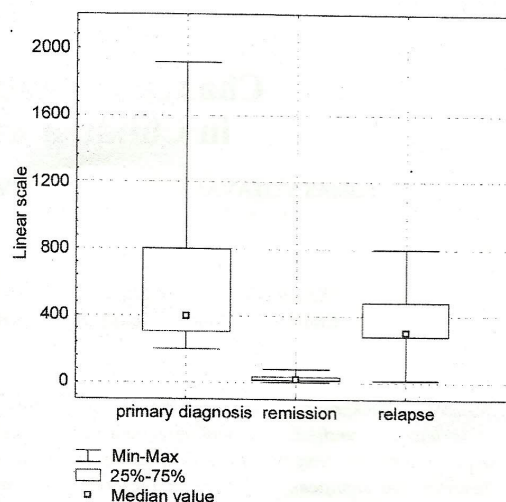


Figure 1. Box and whisker plots of levels of thymidine kinase at diagnosis, during remission and during acute leukemia relapse.

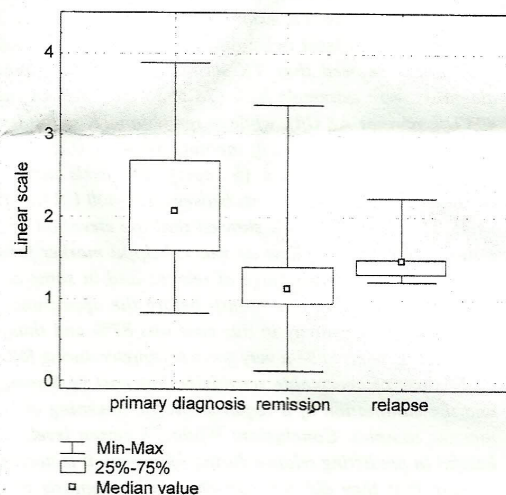


Figure 2. Box and whisker plots of levels of β -2 microglobulin at diagnosis, during remission, and during relapse.

significant increase ($p < 0.001$) in the erythrocyte sedimentation rate during relapse compared to remission status. A comparison of ROC characteristics for investigated parameters is shown in Figure 5. The best profile was achieved using TK.

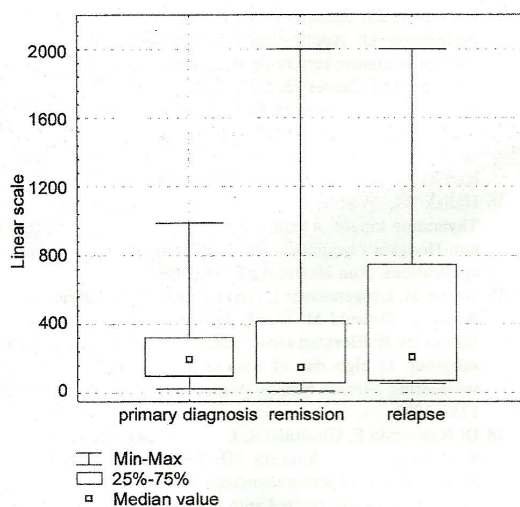


Figure 3. Box and whisker plots of levels of ferritin at diagnosis, during remission and relapse.

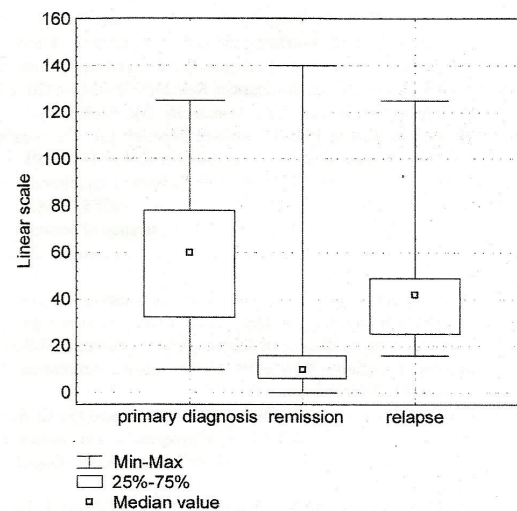


Figure 4. Box and whisker plots of erythrocyte sedimentation rate (ESR) at diagnosis, during remission and during relapse.

Discussion

Based on our results and the published literature, we conclude that TK is a very good parameter for monitoring the progress of basic hemato-oncological disease after the end of the intensive part of the therapy (11-17). Out of all of the parameters that we investigated (TK, lactate dehydrogenase, erythrocyte sedimentation, β -2 microglobulin, ferritin), TK seems to be the most suitable for long-term monitoring and follow-up. However, we were not able to demonstrate the prognostic capabilities of TK levels or other parameters determined at diagnosis with clinical continuation of the disease (18, 19). A group of our patients who experienced a relapse did not show significant differences in the levels of the monitored parameters (at the time of diagnosis) as compared to patients without a relapse. We conclude from our results that despite the fact that the level of TK reflects the activity of the leukemic process, entry levels of TK are not suitable for stratification of child patients with acute leukemia into risk categories (20). Because there is very little published literature dealing with tumor markers for acute hemoblastosis in children and because of the promising results of our studies, we plan to continue our research with a primary focus on TK and possibly other proliferative molecules.

Acknowledgements

This study was sponsored by the Research project MSM 0021620819, Charles University and Teaching Hospital Pilsen, Czech Republic.

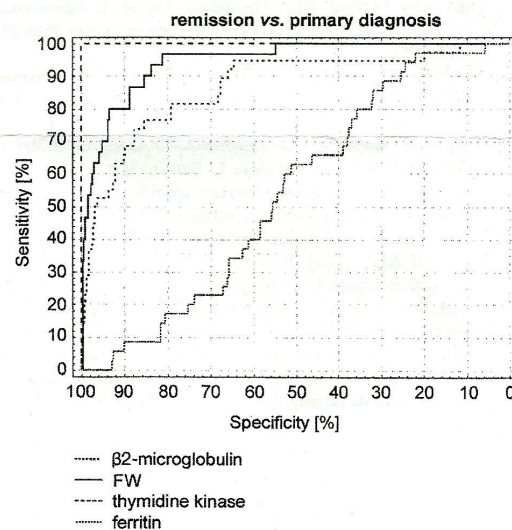


Figure 5. Comparison of ROC characteristics for investigated parameters.

References

- 1 Kralovszky J, Kovacs I, Orosz Z, Katona C, Toth K, Rahoty P, Czeglédi F, Kovacs T, Budai B, Hullán L and Jeney A: Prognostic significance of the thymidylate biosynthetic enzymes in human colorectal tumors. *Oncology* 62(2): 167-174, 2002.

- 2 Wu J, Mao Y, He L, Wang N, Wu C, He Q and Skog S: A new cell proliferating marker: cytosolic thymidine kinase as compared to proliferating cell nuclear antigen in patients with colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 20(6C): 4815-4820, 2000.
- 3 Hannigan BM, Barnet YA, Armstrong DB, McKelvey-Martin VJ and McKenna PG: Thymidine kinases: the enzymes and their clinical usefulness. *Cancer Biother* 8: 189-197, 1993.
- 4 Sherley JL and Kelly TJ: Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *J Biol Chem* 263: 8350-8358, 1988.
- 5 Sadamori N: Clinical and biological significance of serum tumor markers in adult T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 22(5-6): 415-419, 1996.
- 6 He Q, Fornander T, Johansson H, Johansson U, Hu GZ, Rutqvist LE and Skog S: Thymidine kinase 1 in serum predicts increased risk of distant or loco-regional recurrence following surgery in patients with early breast cancer. *Anticancer Res* 26(6C): 4753-4760, 2006.
- 7 Li HX, Zhang S, Lei DS, Wang XQ, Skog S and He Q: Serum thymidine kinase 1 (S-TK1) is a prognostic and monitoring factor in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 13: 145-149, 2005.
- 8 Zhang J, Jia Q, Zou S, Zhang P, Zhang X, Skog S, Luo P, Zhang W and He Q: Thymidine kinase 1: a proliferation marker for determining prognosis and monitoring the surgical outcome of primary bladder carcinoma patients. *Oncol Rep* 15(2): 455-461, 2006.
- 9 Zhang F, Pendleton AR, Robinson JG, Monson KO, Murray BK and O'Neill KL: Thymidine kinase 1 immunoassay: potential marker for breast cancer. *Cancer Detect Prev* 25(1): 8-15, 2001.
- 10 O'Neill KL, Buckwalter MR and Murray BK: Thymidine kinase: diagnostic and prognostic potential. *Expert Rev Mol Dian* 1(4): 428-433, 2001.
- 11 Musto P, Bodenizza C, Falcone A, D'Arena G, Scalzulli P, Perla G, Modoni S, Parlato L, Balvani MR and Carotenuto M: Prognostic relevance of serum thymidine kinase in primary myelodysplastic syndromes: relationship to development of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 90(1): 125-130, 1995.
- 12 O'Neill KL, Zhang F, Li H, Fuja DG and Murray BK: Thymidine kinase 1 - a prognostic and diagnostic indicator in ALL and AML patients. *Leukemia* 21(3): 560-563, 2007.
- 13 He Q, Zhang P, Zou L, Li H, Wang X, Zhou S, Fornander T and Skog S: Concentration of thymidine kinase 1 in serum (S-TK1) is more sensitive proliferation marker in human solid tumors than its activity. *Oncol Rep* 14(4): 1013-1019, 2005.
- 14 Gronowitz JS, Kallander FR, Diderholm H, Hagberg H and Pettersson U: Application of an *in vivo* assay for serum thymidine kinase: results on viral disease and malignancies in humans. *Int J Cancer* 15: 5-12, 1984.
- 15 Gronowitz JS, Hagberg H, Kallander FR and Simonsson B: The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 47: 487-495, 1983.
- 16 Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S and Emmerich B: Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and broad range of potential clinical applications. *Ann Hematol* 65: 1-5, 1995.
- 17 Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, Knauf W, Dietzfelbinger H, Adorf D, Ostwald M, Busch R, Kuhn-Hallek I, Thiel E and Emmerich B: Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, non-smoldering chronic lymphoblastic leukemia. *Blood* 93: 1732-1737, 1999.
- 18 Di Raimondo F, Giustolisi R, Lerner S, Cacciola E, O'Brien S, Kantarjian H and Keating MJ: Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine. *Ann Oncol* 12(5): 621-625, 2001.
- 19 Poley S, Stieber P, Nussler V, Pahl H and Fateh-Moghadam A: Serum thymidine kinase in non-Hodgkin's lymphomas with special regard to multiple myeloma. *Anticancer Res* 17(4B): 3025-3029, 1997.
- 20 Kok M, Bonfrer JM, Korse CM, de Jong D and Kersten MJ: Serum soluble CD27, but not thymidine kinase, is an independent prognostic factor for outcome in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Tumor Biol* 24(1): 53-60, 2003.
- 21 European Group on Tumor Markers: Consensus Recommendations. *Anticancer Res* 19: 2785-2820, 1999.

Received December 13, 2006

Accepted March 29, 2007

Revised April 2, 2007