

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni

Autoreferát dizertační práce

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

MUDr. Ing. Tomáš Votava

Plzeň

2011

Dizertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního studia na Dětské klinice fakultní nemocnice Plzeň a Univerzitě Karlově v Praze, Lékařské fakultě v Plzni

Uchazeč: **MUDr. Ing. Tomáš Votava**
Dětská klinika FN Plzeň a LF UK v Plzni
Alej svobody 80
Plzeň

Školitel: **prof. MUDr. Ondřej Topolčan, DrSc.**
Laboratoř imunoanalýzy FN Plzeň a LF UK v Plzni
E.Beneše 13
Plzeň

Oponenti: **RNDr. Kristián Šafarčík Ph.D.**
FN Ostrava-Poruba
Klinika nukleární medicíny
17. listopadu 1790, Ostrava-Poruba

MUDr. Luboslav Sanislo
Onkologický ústav sv. Alžběty
Heydukova 10, Bratislava, Slovensko

Doc. MUDr. Marie Ludvíková Ph.D.
Procháskův pavilon
Ústav biologie, LF UK v Plzni
Karlovarská 48, Plzeň

Autoreferát byl rozeslán dne:.....

Obhajoba disertační práce se koná dne.....v..... hodin před komisí pro obhajobu disertačních prací v oboru Pediatrie, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze. Knihovna dětské kliniky FN Plzeň, Alej Svobody 80. S disertační prací je možné se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty, Oddělení pro vědu a výzkum, Husova ulice 3, Plzeň.

Obsah

1	ÚVOD	4
2	PROBLEMATIKA THYMIDIN KINÁZY	4
2.1	Thymidin kináza - popis a biochemické principy	
2.2	Monitorace thymidin kinázy u hematologických malignit	
2.3	Thymidin kináza u lymfadenopatie	
3	CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	10
4	METODIKA	10
4.1	Soubory pacientů a použité klinické hodnocení	
4.1.1	Kontrolní skupiny pacientů	
4.1.2	Soubor pacientů s leukémií	
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	
5	VÝSLEDKY	14
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 - prognostický význam	
5.2.3	Hladiny sledovaných markerů v průběhu follow up	
5.3	Soubor pacientů s lymfomy	
5.3.1	Hladiny sledovaných markerů při diagnóze lymfom - diferenciálně diagnostický význam	
6	DISKUSE	20
7	ZÁVĚR	25
8	ZÁVĚR PRO PRAXI	26
9	POUŽITÁ LITERATURA	28
10	PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ AUTORA	33
11	SUMMARY	35

1 Úvod

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 Problematika thymidin kinázy

2.1 Thymidin kináza – popis a biochemické principy

Zařazení thymidinu do DNA struktury bylo popsáno již v 50-tých letech minulého století (4). Později bylo prokázáno, že tento proces je umožněn mimo jiné fosforylací thymidinu a jako klíčový enzym této reakce byla popsána thymidin kináza (TK) (5). Bylo prokázáno, že vyšší organismy mají v buňkách přítomny dvě izoformy tohoto enzymu, TK1 a TK2 (6). Historicky byla nejprve extrahována TK1 z fetální tkáně a později TK2 z adultní tkáně, proto dřívější terminologie používala názvy fetální a adultní TK (7). 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 (8). Dalším výzkumem byla prokázána souvislost mezi enzymatickou aktivitou TK a růstem a regenerací jaterní tkáně na

krysím modelu (9). V lidských buňkách je gen pro TK1 lokalizován na chromosomu 17 a gen pro TK2 na chromosomu 16 (10).

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 proliferaujících 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 (11). Zpětná regulace enzymatické aktivity TK1 je zajištěna inhibiční funkcí thymidin trifosfátu (TTP), což je produkt předchozí reakce fosforylace thymidinu (12). Pomocí tohoto mechanismu je dosaženo rovnováhy v množství TTP potřebné k syntéze nukleové kyseliny a nedochází tak k přesycení systému TTP. 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-fluoro 2'-dideoxythiminu a 3'-azido-2',3'-dideoxythyminu (AZT, azidothymidin) (13-15). 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 (16). Je zřejmá jistá substrátová specifita TK2 v porovnání s TK1, například thymidinová analoga jako AZT jsou TK2 fosforylována výrazně méně než TK1 (13,14).

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 (17).

Vybrané příklady chorob, kde byla monitorována TK1

Zvýšená sérová hladina TK1 byla detekována u řady solidních nádorů a byla prokázána její korelace s progresí onemocnění. Výsledky u kontrolních zdravých jedinců a pacientů se zánětlivými chorobami, benigním nádorem prsu a střeva jsou shrnuty v tabulce 1. 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 (18-21).

Tabulka 1: Hladiny TK1 (IU/l) u chorob různé etiologie a u zdravých dospělých jedinců (18-21)

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

2.2 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 (22). Jedním takovým parametrem je hladina TK1, která přímo koreluje s proliferací aktivitou nádoru (23). 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 (24). 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 (25-27). 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 (28). Další studie dokazují, že sérová hladina TK1 je nezávislým markerem, který predikuje délku trvání CLL do progresu (29). 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 (30). 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. (29).

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 (31). 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 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 (32). 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 (33). 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 (34)

2.3 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 (35).

3 Cíle 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 onemocněním 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 2. 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.

Tbalka 2: Souhrnná tabulka všech dětí s leukémií zařazených do studie

Diagnosa	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%

4.1.3 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-Hodgkinův 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 Hodgkinových 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 adsorbicí 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.

5 Výsledky

5.1 Kontrolní skupina dětí s benigním onemocněním

V tabulce 3 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 3: 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 4: 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 3 a 4 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 (36,37). 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 5: Základní deskriptivní statistika diagnostických hodnot sledovaných markerů

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

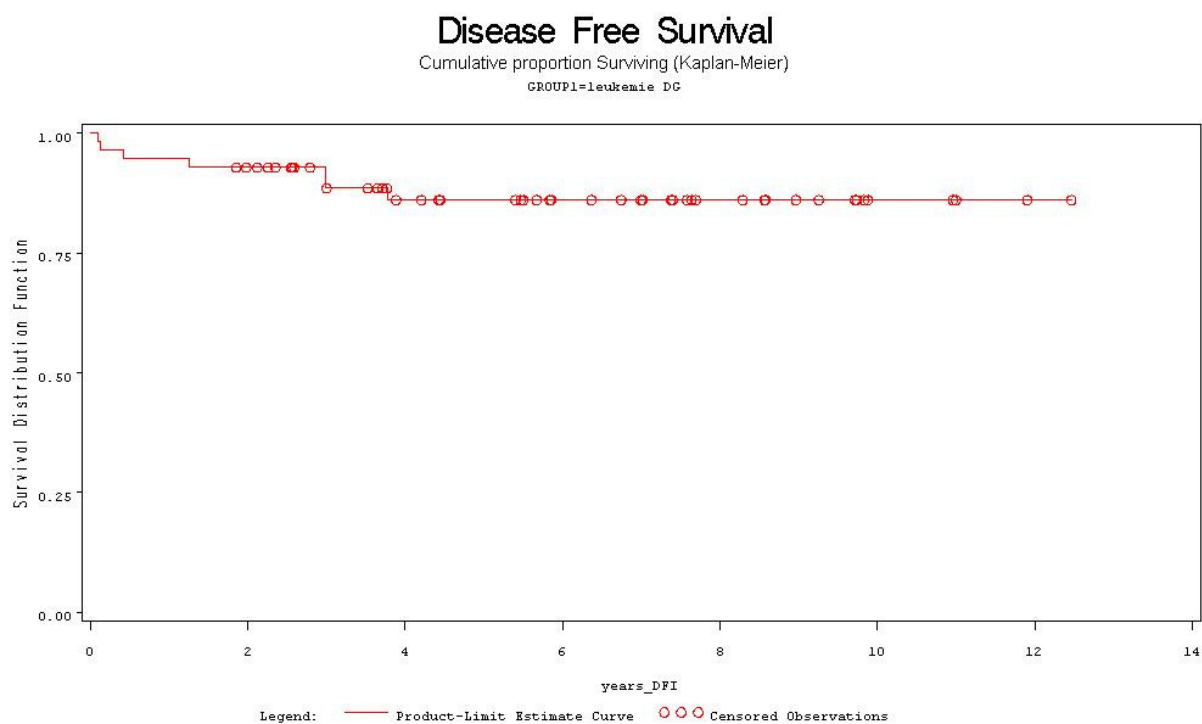
Z tabulky 5 vyplývá, že rozptyl výsledků je poměrně značný, ale medián hodnot parametrů při diagnóze (hlavně u TK1) je 40x zvýšen oproti normě. Výsledky byly dále analyzovány s cílem zjistit, zda pomocí hladiny jednotlivých markerů lze odlišit skupinu s leukémiemi od pacientů s neonkologickými onemocněními.

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 neonkologickým onemocněním.

5.2.2 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.

Graf 1: 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.

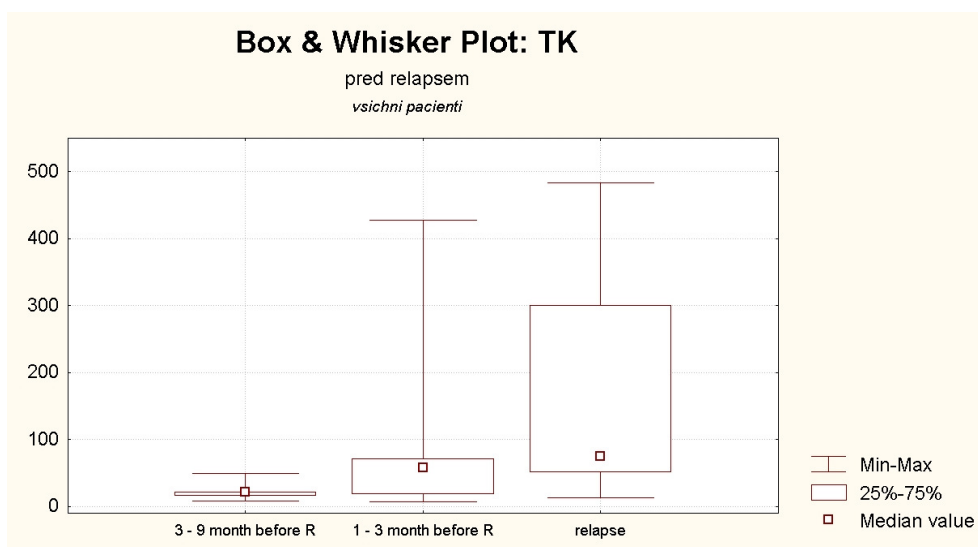
5.2.3 Hladiny sledovaných markerů v průběhu follow up

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. U parametru TK1 bylo $p < 0,02535$ a u β 2MG bylo $p < 0,04551$.

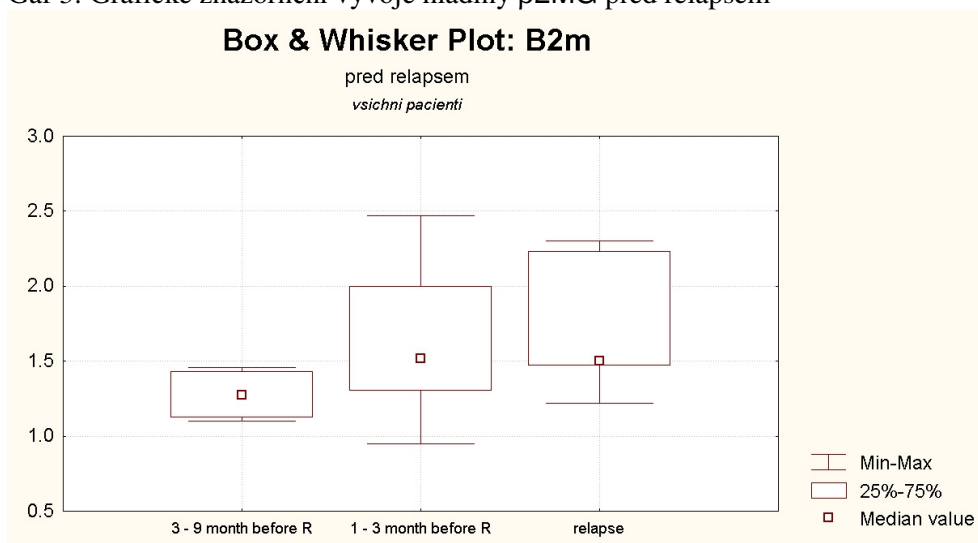
Tabulka 6: Statistická deskripce skupiny s relapsy – TK1

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

Gaf 2: Grafické znázornění vývoje hladiny TK1 před relapsem

Tabulka 7: 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

Gaf 3: 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.

5.3 Soubor pacientů s lymfomy

5.3.1 Hladiny sledovaných markerů při diagnóze lymfom – diferenciálně diagnostický význam

Tabulka 8: 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 8 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 ($p < 0,08$) narozdíl od β 2MG, kde tento rozdíl signifikantní byl ($p < 0,0019$). Ostatní hodnocené

parametry, t.j. prognostický význam obou markerů a význam při sledování po léčbě nebyly vzhledem k malému počtu událostí signifikantní.

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 (38). Zastoupení jednotlivých pohlaví – u leukémii 62% chlapci, 38% děvčata, u lymfomů 53% chlapci a 47% děvčata odpovídá literatuře.

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

Přínos námi sledovaných markerů (TK1, β 2MG), k rychlejšímu stanovení diagnosy 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 diagnose 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 diagnosu. Někdy se u dětí setkáváme s tzv. doutnající formou leukémie, kdy hodnoty v hematologických parametrech mohou vykazovat pouze minimální změny a stanovení správné diagnosy 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 diagnosy. V takovýchto případech další nehematologický marker může urychlit rozhodnutí o provedení vyšetření kostní dřeně a tím přispět k dřívějšímu stanovení diagnosy.

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 diagnose statisticky signifikantní (38).

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%, 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 (26) 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 (22,23). 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.

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 prvé 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 časou primární diagnostiku leukémií a monitoraci remisního období a časou 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 diagnose 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 (39), 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 diagnose signifikantně zvýšen (24). V porovnání s jeho výsledky, považujeme naši práci za klinicky využitelnější, neboť naše kontrolní skupina pro hodnocení lymfomů nebyli zdraví jedinci, ale děti s lymfadenitidou což je v klinické praxi běžnější při diferenciálně diagnostickém zvažování diagnosy lymfomu.

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 % specifitě, 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.

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 ukat/l, ztrácí vyšetření TK1 a β 2MG smysl vzhledem k vysoké pravděpodobnosti falešně pozitivního výsledku. V případě negativní virologie a normálních jaterních testů je diagnosa 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 diagnosy 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 diagnos je nejpravděpodobnějším nádorem uzlin lymfom. Z toho vyplývá, že v průběhu standardního diferencielně 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 diagnosu (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/Inflamation>
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. Simmons NS, Dounce AL. An improved preparation of sodium desoxyribonucleate. *J Am Chem Soc* 1952;74:1724-6
5. 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.
6. Okuda H, Arima T, Hashimoto T, Fujii S. [Multiple forms of deoxythymidine kinase in various tissues](#) *Cancer Res.* 1972 Apr;32(4):791-4.
7. 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
8. Ohrvik A, Lindh M, Einarsson R, et al. Sensitive nonradiometric method for determining thymidine kinase 1 activity. *Clin Chem* 2004;50(9):1597-1606

- 9 Hopkins HA, Campbell HA, Barbiolly 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
- 10 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-celi hybrid/thymine kinase gene/gene mapping). *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:8563-7
- 11 C, 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.
- 12 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.
- 13 Munch-Petersen B. Differences in the kinetic properties of thymidine kinase isoenzymes in unstimulated and phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *Mol Cell Biochem* 1991;94:173-85
- 14 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
- 15 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. *Proct Natl Acad Sci USA* 1986;83(21):8333-7

- 16 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
- 17 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
- 18 Topolcan O, Holubec L Jr. The role of thymidine kinase in cancer diseases. *Expert Opin Med Diagn* 2008;2(2):129-141
- 19 Topolcan O, Holubec L, Kausitz J, et al. Thymidine kinase monitoring importance in the routine clinical practice. *Anticancer Res* 2004;24(5D)3655-6
- 20 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
- 21 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
- 22 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
- 23 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
- 24 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

- 25 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
- 26 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
- 27 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
- 28 Kallander CF, Simonsson B, Hagberg H, Gronowitz JS. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1984;54(11):2450-5
- 29 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
- 30 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
- 31 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
- 32 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

- 33 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
- 34 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
- 35 Van Waarde A, Elsinga PH. Proliferation Markers for the Differential Diagnosis of Tumor and Inflammation. *Curr Pharm Des* 2008;14(31):3326-3339
- 36 Lipska L, Visokai V, Levy M, et al. Tumor markers in patients with relapse of colorectal carcinoma. *Anticancer Res* 2007;27(4A):1901-5
- 37 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
- 38 Thomas WM, Robertson JF, McKenna PG, et al. Serum thymidine kinase in colorectal neoplasia. *Eur J Surg Oncol* 1995;21(6):632-4
- 39 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

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, Petrtýlová 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

11 Summary

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 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.