

Abstrakt

S rozvojem molekulárně-biologických metod se pozornost soustřeďuje na možnosti detekce minimální reziduální nemoci (minimal residual disease, MRD) u solidních nádorů. V naší práci se soustředíme na důkaz přítomnosti MRD u neuroblastomů. Neuroblastom je nádor periferního sympatického nervového systému, který zahrnuje až desetinu všech dětských solidních nádorů. Otázkou zůstává, zda přítomnost MRD v kostní dřeni bude možné využít jako nezávislý prognostický znak. S tím je spojena i další otázka, jakou techniku je k jejímu prokázání nejvhodnější použít, případně jaký znak vyšetřovat.

K detekci MRD u neuroblastomů je možné využít několik metodických přístupů, které se odlišují nejen nákladností a pracností, ale zejména senzitivitou a specificitou. Detekují se nádorové buňky v periferní krvi nebo v kostní dřeni. Kostní dřeň je velmi častým místem metastatického postižení u neuroblastomu. Při vstupním vyšetření kostní dřene pomocí standardního cytomorfoloického vyšetření je pozitivita zachycena u více než 85 % případů neuroblastomů vysokého rizika. Koncentrace nádorových buněk je však často v kostní dřeni nebo periferní krvi v hodnotách (především v průběhu terapie nebo po jejím ukončení), které jsou hluboko pod detekčním limitem standardních vyšetřovacích metod: cytomorfoloické vyšetření, zobrazovací metody (MRI, CT, UZ), izotopové metody (MIBG). V naší práci byly proto použity citlivější metody: reverzně transkriptázová polymerázová reakce v reálném čase (QRT-PCR), průtoková cytometrie a imunocytochemická metoda. Tyto metody jsme následně porovnali s cytomorfoloickým vyšetřením, které je schopné prokázat 1 nádorovou buňku mezi 200 buňkami kostní dřene.

Naše studium je zaměřeno jako retrospektivně prospektivní, ve kterém byly vyšetřeny vzorky od pacientů s neuroblastomem. Do studie bylo zařazeno 46 pacientů, od kterých jsme získali 132 vzorků kostní dřene. Porovnali jsme výsledky z jednotlivých vyšetření mezi sebou a u QRT-PCR i korelace sledovaných genů mezi sebou. V našem případě jsme dokazovali expresi mRNA tří genů *TH*, *PHOX2B*, *DCX*, které jsou stabilně exprimovány u neuroblastomů, ale nejsou exprimovány buňkami kostní dřene. Podobnou senzitivitu, jako při RT-PCR, je možné dosáhnout pomocí imunocytochemie. V našem případě dokazujeme antigen GD2, který je přítomen na povrchu neuroblastomových buněk, nikoliv však buněk kostní dřene. Senzitivita vyšetření pomocí průtokového cytometru je závislá na zvoleném postupu a počtu vyšetřovaných znaků v kombinaci. Stanovili jsme kombinaci $CD45^- / CD81^+ / CD56^+$. Při tomto postupu jsme schopni dosáhnout senzitivity

1 nádorové buňky mezi 100-1000 buňkami kostní dřeně. Senzitivita a specificita těchto vyšetření byla ověřena už v in vitro modelech.

Tato vyšetření jsme porovnali s cytomorfologickým vyšetřením. V naší studii jsme prokázali, že QRT-PCR a imunocytochemie jsou citlivějšími technikami při detekci MRD, než průtok cytometrie a cytomorfologické vyšetření. Výsledky vyšetření by mohly pomoci při stanovení vhodné metody a vyšetřovaného znaku MRD u neuroblastomů. Na základě námi zjištěných výsledků jsme se pokusili stanovit diagnostické schéma pro diagnostiku MRD u neuroblastomu.

Klíčová slova: neuroblastom, QRT-PCR, průtoková cytometrie, imunocytochemie, morfologie, kostní dřeň, periferní krev