

**III. DNY DIAGNOSTICKÉ,
PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ
ONKOLOGIE**

ABSTRAKTA

28. - 30. listopadu 2007

SATELITNÍ WORKSHOPY

26. - 27. listopadu 2007

1. Datová analýza v oblasti nádorové genomiky
2. Laserové mikrodisekce, mikroizolace
a amplifikace RNA

OLOMOUC

ISBN 978-80-244-1824-7

Vážené kolegyně, kolegové, milí přátelé!

Dovolte, abych Vás jménem organizátorů konference, jménem Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti ČLS JEP i jménem svým co nejsrdečněji přivítal na třetím ročníku Dnů diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie v Olomouci.

Naše konference se pomalu ale jistě našla své místo v řadě vzdělávacích akcí pořádaných v České republice i v zahraničí. Svědčí o tom zvyšující se počet přihlášených účastníků, který v letošním roce přesáhne 215 lidí. Pokusili jsme se pro Vás připravit atraktivní program, jehož sestavení bylo letos s ohledem na velký počet změn a zahraničních účastníků mimořádně náročné. Všem Vám proto děkuji za vstřícnost, pomoc a trpělivost, kterou jste vůči organizátorům projevíli. Věřím, že každý z vás v letošním programu najde něco zajímavého a podnětného.

Na konferenci budou opět vyhlášeny Ceny za nejlepší prezentovanou přednášku a poster, které jsou tradičně spojeny s finanční odměnou. Tuto cenu vyhlašuje naše Nadace "Rakovina věc veřejná", o jejichž rozsáhlých aktivitách v našem regionu se můžete dočíst na www.vecverejna.cz.

Očekáváme Vaše zkušenosti a náměty, které přispějí k dalšímu zlepšení naší společné práce a těším se na setkání s Vámi na Dnech diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie v Olomouci.

Se srdečným pozdravem

Doc. MUDr. Marián Hajdúch, PhD.

koordinátor konference

*předseda Sekce diagnostické a prediktivní onkologie
České onkologické společnosti ČLS JEP*

IV. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

26. – 28. 11. 2008

REGIONÁLNÍ CENTRUM OLOMOUC

PROGRAM / OBSAH

Středa 28. 11. 2007

14.00-14.10

Zahájení konference

14.10-15.50

Předsedající: Říhová B., Král V., Strnad M.

1. Nová protinádorová léčiva a léčebné postupy.8

1. Král V., Králová J., Záruba K., Řezanka P., Kejík Z., Kaplanek R., Martásek P.: Supramolecular Approach to TTD: Application of Novel Porphyrin Derivatives for Drug Transport and Combined Therapy. (Praha) (30 minut)
2. Říhová B., Strohalm J., Šírová M., Štrych T., Mrkvan T., Šubr V., Plocová D., Kovář M., Kovář L., Ulbrich K.: Mechanismy působení směrovaných polymerních poléčiv. (Praha) (30 minut)
3. Strnad M., Kryštof V., Havlíček L.: Perspektivy inhibice buněčného cyklu syntetickými inhibitory cyklin-dependentních kináz. (Olomouc) (30 minut)

Diskuse (10 minut)

15.50-16.10

Přestávka

16.10-17.10

Předsedající: Šírová M., Džubák P.

2. Molekulární podstata účinku a toxicity polymerních protinádorových léčiv.10

1. Šírová M., Rossmann P., Strohalm P., Šubr V., Plocová D., Ulbrich K., Říhová B.: Polymerní cytostatika na bázi HPMA podporují imunitní reakci proti nádoru. (Praha) (10 minut)
2. Hovorka O., Strohalm J., Šubr V., Ulbrich K., Říhová B.: Mechanismus cytotoxicity polymerních konjugátů na bázi HPMA je ovlivněn jejich internalizační drahou a intracelulárním osudem. (Praha) (10 minut)
3. Džubák P., Kratochvílová R., Lipert J., Janošťáková A., Perlík V., Hajdúch M.: Účinek volného, liposomálního a polymerního doxorubicinu na chemosenzitivní a chemorezistentní nádorové buňky. (Olomouc, Praha) (10 minut)
4. Vydra D., Vostálová J., Doležal D., Džubák P., Hostašková P., Ulrichová J., Hajdúch M.: Protinádorová účinnost a kardiotoxicita volného, liposomálního a polymerního doxorubicinu. (Olomouc) (10 minut)

Diskuse (20 minut)

17.10-17.30

Přestávka

17.30-18.30

Předsedající: Hajdúch M., Kolářová H.

3. Mechanismy účinku protinádorových léčiv a léčebných postupů.12

1. Štukavec J., Horák L., Ducháč V., Poučková P.: Experimentální fotodynamická terapie kolorektálního karcinomu. (Praha) (10 minut)
2. Čejková S., Trbušek M., Ročňová L., Potěšil D., Šmardová D., Kuglík P., Doubek M., Brychtová Y., Mayer J.: Terapeutické monoklonální protilátky senzitivizují in vitro některé B-CLL vzorky s aberacemi genu TP53 k fludarabinu a chlorambucilu. (Brno) (10 minut)
3. Džubák P., Vydra D., Doležal K., Hauserová E., Tarkowski P., Václavíková K., Strnad M., Hajdúch M.: Antiproliferační aktivity 6-benzyladenosidů a jejich prodrugs. (Olomouc) (10 minut)
4. Buršíková E., Matoušková E., Prchalová M., Kleibl Z.: Účinky cytostatik na primární mamární buňky s hereditární mutací genu BRCA1/2. (Praha) (10 minut)

Diskuse (20 minut)

Večer - volný program

Čtvrtek 29.11.2007

8.30-10.00

Předsedající: Hofmanová J., Trojanec R.

4. Patofyziologie nádorových onemocnění.14

1. Hofmanová J., Vaculová A., Hýžďalová M., Koubková Z., Kočí L., Stixová L., Netíková J., Kozubík A.: Apoptóza versus diferenciacie u normálních a transformovaných epiteliálních buněk tlustého střeva po působení butyrátu a vysoce nenasycených mastných kyselin (Brno) (20 minut)
 2. Potešil J., Džubák P., Kratochvílová R., Janošťáková A., Kopřiva F., Zápalka M., Karásková E., Vospělová J., Hajdúch M.: Proteiny lékové rezistence a jejich význam u nenádorových onemocnění. (Olomouc) (15 minut)
 3. Slabý O., Hrstka R., Svoboda M., Krekáč D., Ovesná J., Vyzula R.: Význam mikroRNA-21 v patogenezi kolorektálního karcinomu. (Brno) (15 minut)
 4. Procházka P., Hraběta J., Vícha A., Eckschlager T.: Amplifikace a exprese onkogenu MYCN v chemorezistentních neuroblastomových liniích. (Praha) (10 minut)
 5. Procházková J., Souček K., Stixová L., Kozubík A.: Role MAP kináz a kaspáz v monocytární diferenciaci buněk HL-60. (Brno) (10 minut)
- Diskuse (20 minut)

10.00-10.15

Přestávka

10.15-12.00

Předsedající: Plank L., Hajdúch M.

5. Prognostické a prediktivní faktory I.17

1. Scorilas A.: Kallikreins as Novel Molecular Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Hormone - Related Cancers. (Řecko, Atény) (20 minut)
 2. Plank L., Szépe P., Lasabová Z., Minárik G., Kajo K., Burjanivová T.: Morfologické, imunofenotypové a mutačné analýzy c-KIT-u a PDGFR v rámci centralizované biopické diagnostiky gastrointestinálních stromálních tumorů v SR (Martin, Bratislava) (20 minut)
 3. Neuwirt H.: SOCS-3 is upregulated by androgens in prostate cancer cells and exerts inhibitory effects on AR-mediated proliferation. (Innsbruck, Rakousko) (20 minut)
 4. Weber-Hall S.: Role of fluorescent in situ hybridization (FISH) technique in solid tumor diagnosis (Londýn) (30 minut)
- Diskuse (15 minut)

12.00-13.30

Přestávka na oběd

13.30-15.00

Předsedající: Melichar B., Pešek M.

6. Prognostické a prediktivní faktory II.19

1. Melichar B., Hornychová H., Tomšová M., Melicharova K., Ryška A.: Imunitní odpověď jako prognostický a prediktivní faktor u nádorových onemocnění. (Hradec Králové) (15 minut)
 2. Smilek P., Dušek L., Veselý K., Rottenberg J., Kostřica R., Neuwirthová J.: Prognostické parametry karcinomů hlavy a krku. (Brno) (15 minut)
 3. Pešek M., Benešová L., Belšánová B., Brůha F., Mukenšnabl P., Jančaříková D., Krejčí J., Minárik M.: Mutace EGFR jsou prediktorem účinnosti tyrozinkinázových inhibitorů, na rozdíl od mutací k-ras onkogenu u adenokarcinomu plic (Praha, Plzeň) (15 minut)
 4. Hrstka R., Knoflíčková D., Holčáková J., Nenutil R., Vojtěšek B.: Prognostická relevance proteinů AGR2 a AGR3 při léčbě karcinomu prsu (Brno) (10 minut)
 5. Stejskalová E., Malíš J., Pospíšilová H., Kodet R., Jarošová M.: Přínos cytogenetického a arrayCGH vyšetření dětských nádorů ledvin a jater. (Olomouc, Praha) (10 minut)
 6. Vobořil R., Weberová-Vobořilová J., Rychterová V., Horák L., Fanta J.: Nové potencionální markery chování nádorových buněk. (Praha) (10 minut)
- Diskuse (15 minut)

15.00-15.15

Přestávka

15.15-17.00

Předsedající: Hajdúch M., Džubák P.

7. Nádorová genomika a proteomika*22

1. Kovářová H., Gadher S., Džubák P., Hajdúch M.: Klasifikace mechanismu účinku a rezistence inhibitorů CDK pomocí proteomických technologií. (Liběchov, Zurich, Olomouc) (20 minut)
2. Macht M., Deininger S.-O., Boháč M., Schuerenberg M., Luebbert Ch., Fuetterer F., Ebert M., Roeken Ch.: Current Status and Future Applications of MALDI Imaging. (Mnichov, Berlín, Brno) (20 minut)
3. Korba T.: Aplikace výzkumu proteinových biomarkerů v onkologii centrálního nervového systému a plicních nádorů s využitím hmotnostní spektrometrie. (Praha) (20 minut)
4. Halbhuber Z., Krivjanská M.: Expresní čipy, Array CGH, CHIP-chip a vliv kvality vzorku. (Praha) (10 minut)
5. Nedvěd J., Thérová M., Havlíček V., Hajdúch M.: Hmotnostní spektrometrie: nástroj časné diagnostiky Pseudallescheria boydii. (Praha, Olomouc) (10 minut)
6. Garajová I., Svoboda M., Slabý O., Krejčí E., Kocáková I., Bednaríková M., Šefr R., Růžickova J., Hoch J., Vyzula R.: DNA microarray analysis of locally advanced rectal adenocarcinomas: prediction of sensitivity to neoadjuvant chemoradiotherapy. (Brno, Praha) (10 minut)

Diskuse (15 minut)

*Tato sekce je organizována v rámci projektu Centra nádorové proteomiky LC07017.

17.00-17.15**Přestávka****17.15-18.55**

Předsedající: Ehrmann J., Drábek J.

8. Prognostické a prediktivní faktory III.25

1. Hajdúch M.: Prediktivní faktory odpovědi nádoru a toxicity okolních tkání na ionizační záření. (Olomouc) (20 minut)
2. Slabý O., Garajová I., Svoboda M., Fabian P., Berkovcová J., Srovnal J., Šmerdová T., Sobková K., Mikulénka P., Vyzula R.: Moderní molekulárně-biologické přístupy ke stanovení prognózy u pacientů s kolorektálním karcinomem (Brno, Olomouc) (10 minut)
3. Adámková-Krákorová D., Brančíková D., Bednařík O., Veselý K.: Konvenční osteosarkom dospělého věku - prediktivní faktory v klinické praxi. (Brno) (10 minut)
4. R. Solná, J. Veselovská, M. Jarošová, Š. Rožmanová, M. Holzerová, E. Faber, K. Indrák, V. Divoký: Léčba dasatinibem u nemocných s CML rezistentních na imatinib: test sensitivity leukemických buněk pacientů na inhibitory kináz in vitro a in vivo. (Olomouc) (10 minut)
5. Hlobilková A., Ehrmann J., Knížetová P. and Kolář Z.: Analysis of VEGF, Flt-1, Flk-1, and nestin in relation to astrocytoma pathogenesis. (Olomouc) (10 minut)
6. Škarda J., Israeli S., Gilberg-Rashi H., Fridman E., Ofek-Moravsky E., Kopolovic J., Kolek V., Klein J., Kolář Z.: Analýza možných prediktorů mozkových metastáz u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic pomocí tkáňových a cDNA mikroterejí. (Olomouc, Tel Aviv-Israel) (10 minut)
7. Brychtová S., Bezděková M., Tichý M. jr., Hirňák J., Beneš P., Brychta T.: Imunohistochemická detekce SDF1 v maligních i benigních kožních melanocytárních lézích. (Olomouc) (10 minut)

Diskuse (20 minut)

20.00 – 24.00 - Společenský večer v Grand restaurantu RCO**Pátek 30.11.2007****8.30-10.05**

Předsedající: Haškovec C., Mihál V.

9. Patogeneze a prediktivní faktory hematologických malignit.28

1. Haškovec C., Polák J., Moravcová J., Singlová Z., Klamová Z., Schwarz J.: Uplatnění genomiky (molekulární genetiky) v onkohematologii (Praha) (20 minut)
2. Klabusay M., Heidekerová M., Trbušek M., Hrabčáková V., Kuhrová V., Brychtová Y., Mayer J.: Stanovení exprese ZAP-70 metodou kvantitativní cytometrie, korelace s mutačním stavem IgVH a exprese CD38 u pacientů s diagnózou (Brno) (15 minut)

3. Mihál V., Radová L., Novák Z., Pospíšilová D., Hajdúch M.: Zkřížená rezistence na glukokortikoidy u akutní lymfoblastické leukémie dětí. (Olomouc) (15 minut)
 4. Burjanivová T., Marcinek J., Lasabová Z., Szépe P., Balcárek T., Vaňochová A., Plank, L.: Analýza mutácie JAK2 V617F a morfológie kostnej drene v trepanobiopických vzorkách morfológicky a klinicky verifikovanej Pravej polycytémie. (Martin) (10 minut)
 5. Malčíková J., Šmardová J., Čejková S., Kuglík P., Brychtová Y., Doubek M., Dvořáková D., Mayer J., Pospíšilová Š., Trbušek M.: Prognostický význam mutačního stavu genu TP53 u pacientů s B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií – význam monitorování obou alel. (Brno) (10 minut)
 6. Kotašková J., Francová H., Kuhrová V., Doubek M., Brychtová Y., Dvořáková D., Mayer J., Pospíšilová Š.: Sledování exprese vybraných genů u pacientů s B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií – záchyt změny leukemického klonu vlivem terapie (Brno) (10 minut)
- Diskuse (15 minut)

10.05-10.25

Přestávka

10.25-11.45

Předsedající: Bártek J., Hajdúch M.

10. Karcinogeneze, a toxikologie protinádorových léčiv.31

1. Bártek J.: Molecular basis of DNA damage signaling and its defects in human breast cancer. (Kodaň, Olomouc) (30 minut)
 2. Halašová E., Matáková T., Mušák L., Valachová J., Poláková V., Slýšková J., Poliaček I., Šváchová M., Bukovská E.: Chromosomal aberration in relation to hOGG1 gene polymorphism in chromium exposed individuals. (Bratislava, Praha, Martin, Ružomberok) (10 minut)
 3. Sedláčková L., Nguyen Thi Thu H., Špaček M., Kozák T., Holler E., Bremm H., Hromadníková I.: Analýza membránové a relativní genové exprese proteinu tepelného šoku Hsp70 u akutní leukémie. (Praha, Regensburg, Německo) (10 minut)
 4. Stejskal J., Dvořáková D., Ulrych V., Kolářová I., Vaňásek J., Kheck M.: Využití TGF- β 1 k predikci akutní plicní toxicity při chemoradioterapii NSCLC. (Pardubice, Jihlava) (10 minut)
- Diskuse (20 minut)

11.45-13.15

Přestávka na oběd

13.15-14.15

Předsedající: Havlík R., Holubec L.

11. Pokroky v klinické diagnostice zhoubných nádorů.34

1. Havlík R., Kysučan J., Buriánková E., Loveček M., Klos D., Neoral Č.: Přínos PET-CT v předoperačním stagingu karcinomu pankreatu. (Olomouc) (10 minut)
 2. Holubec L., Topolčan O., Mrázková P., Pražáková M., Záhlava J., Fínek J.: Význam nádorových markerů a zobrazovacích metod pro časný záchyt relapsu u nemocných s gynekologickými malignitami (Plzeň) (10 minut)
 3. Kalita O., Vaverka M., Hrabálek L., Machač J., Houdek M., Švebišová H., Ehrmann J., Trojanec R., Hajdúch M.: Primitivních neuroektodermálních nádorů (PNET) dospělých pacientů. (Olomouc) (10 minut)
 4. Macháček J., Hajdúch M.: Současné příčiny a pozadí neúspěchů diagnostiky a léčby zhoubných nádorů. (Olomouc) (10 minut)
 5. Trojanec R., Hajdúch M., Kolář Z., Braunerová Z., Berkovcová J., Dziechciarková M., Krejčí IV., Mlčochová S.: Pětileté zkušenosti s vyšetřováním statusu genu Her-2/neu (c-erbB-2) u karcinomu prsu v Referenční laboratoři v České republice. (Olomouc) (10 minut)
- Diskuse (10 minut)

14.15-15.30

Předsedající: Minárik M., Berkovcová J.

12. Molekulární metody v diagnostice zhoubných nádorů37

1. Augustiňáková A., Krsková L., Kalinová M., Hliská I., Břízová H., Kodet R.: Optimalizace amplifikace a prvotní výsledky mutační analýzy exonů genů receptorových tyrosinkináz c-kit a pdgfra u pacientů s gastrointestinálním stromálním tumorem. (Praha) (10 minut)
 2. Minárik M., Sekerka P., Pešek M., Benešová L.: Možnosti využití populační genomické databáze v onkologické diagnostice a léčbě. (Praha, Plzeň) (10 minut)
 3. Drábek J., Trojanec R., Ehrmann J., Kalita O., Hajdúch M.: Detekce metylace MGMT genu jako prediktivní faktor léčby gliomů alkylačními činidly. (Olomouc) (10 minut)
 4. Krsková L., Augustiňáková A., Hliská A., Kalinová M., Drahokoupilová E., Sumerauer D., Múdry P., Kodet R.: Sledování minimální diseminované nemoci u pacientů s rhabdomyosarkomy s použitím kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase. (Praha, Brno) (10 minut)
 5. Staňková M., Berkovcová J., Srovnal J., Drábek J., Hahnová A., Bílková R., Růžková V., Kolek V., Hajdúch M.: Možnosti detekce mutací v onkogenu k-ras. (Olomouc) (10 minut)
 6. Srovnal J., Berkovcová J., Kesselová M., Wiecek S., Staňková M., Bílková R., Růžková V., Hajdúch M.: Detekce mutací genu k-ras metodou High Resolution Melting Curve Analysis: Vzájemné srovnání metod a přístrojů na souboru 153 pacientů. (Olomouc) (10 minut)
- Diskuse (15 minut)

15.30-15.45**Ukončení konference, odevzdání cen za vítěznou přednášku a poster****Postery.40**

1. **D. Brancikova, D. Adámková-Krákorová, O. Bednarik, Z. Mechl:** Predictor of responsibility of the treatment of bone metastases MBC: Monitoring levels of osteomarkers (Brno)
2. **Břízová H., Mrhalová M., Neradová M., Kodet R.:** Robotická bezkontaktní laserová mikrodisekce- nová dimenze molekulární analýzy. (Praha)
3. **Dziechciarková M., Trojanec R., Kolář Z., Bouchalová K., Braunerová B., Hajdúch M.:** Rozšíření možnosti detekce Her-2/neu, využitím širšího spektra cytogenetických sond a monoklonálních protilátek. (Olomouc)
4. **Fabrik I., Adam V., Křížková S., Binková H., Horáková Z., Kukačka J., Průša R., Eckschlager T., Kizek R.:** Sledování změny hladiny metalothioneinu u pacientů s terapií platinovými léčivy. (Brno, Praha)
5. **Fabrik I., Křížková S., Adam V., Strnáděl J., Horák V., PKukačka J., Eckschlager T., PPrůša R., Kizek R.:** Analýza metalothioneinu u maligního melanomu. (Brno, Praha)
6. **Fabrik I., Húska D., Adam V., Binková H., Horáková Z., Kukačka J., Eckschlager T., Kizek R.:** Sledování koncentrace metalothioneinu v plné krvi pacientů s nádorovým onemocněním. (Brno, Praha)
7. **Garajova I., Fabian P., Nenutil R., Svoboda M., Slaby O., Vyzula R.:** Tumor-infiltrating cytotoxic T-cells predict outcome in colorectal carcinoma, clinical stadium II. (Brno)
8. **Pavla Hublarova, Dana Knoflickova, Zina Hanzelkova, Yuriy Baturko, Rudolf Nenutil and Borivoj Vojtěšek:** Development of cell arrays - cell line screening on immunocytochemistry base assessed by new software COLGRAPH (Brno)
9. **Kesselová M., Srovnal J., Kořínková G., Vysloužil K., Duda M., Skalický P., Cwierka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M.:** CEA vs. EGFR1 vs. CK 20 - který marker je nejvhodnější pro detekci minimální reziduální choroby u pacientů s kolorektálním karcinomem? (Olomouc)
10. **Kovář L., Etrych T., Šubr V., Strohalm J., Sklenář J., Chytil P., Ulbrich K., Říhová B.:** Volný a N-(2-HYDROXYPROPYL)METHACRYLAMID (HPMA) vázaný doxorubicin: změny glykosylace povrchové membrány buněk EL-4. (Praha)
11. **Kozubík K., Tichý B., Janíková A., Dvořáková D., Mayer J., Pospíšilová Š.:** Analýza genové exprese u folikulárního lymfomu pomocí oligonukleotidových microarrays (Brno)
12. **Křížková S., Fabrik I., Shestivska V., Húska D., Adam V., Hubálek J., Šílený J., Trnková L., Kizek R.:** Využití magnetizovatelných částic v kombinaci s elektrochemickou detekcí. (Brno)
13. **Křížková S., Fabrik I., Adam V., Nákielová J., Hodek P., Stiborová M., Kizek R.:** Imunochemická detekce metalothioneinu za použití myších a slepičích protilátek. (Praha, Brno)
14. **Matáková T., Halašová E., Sivoňová M., Mušák L., Dzian A., Hatok J., Dobrota D.:** Vztah mezi chromozómovými aberacemi a polymorfismy genů GSTs u pracovníků s dlouhodobou expozicí chromom. (Martin)
15. **Sivoňová M., Matáková T., Dobrota D., Hatok J., Franecková M., Kirschnerova R., Kliment J. ml., Tomaškin R. and Kliment J.:** Role of androgen metabolism gene PSA and xenobiotic metabolising enzymes GSTs in prostate cancer risk. (Martin, Slovakia)

16. **Slováčková J., Grochová D., Šmardová J.:** Funkční analýza teplotně závislých mutantů p53 v kvasinkových a lidských buňkách. (Brno)
17. **J. Smejkalová, P. Vidláková, J. Mužíková, A. Stejskalová, L. Kovářová, L. Hanák, M. Penka, R. Hájek, J. Michálek:** Výsledky stabilitní studie pilotních šarží léčivého přípravku Tumor infiltrující lymfocyty. (Brno)
18. **J. Šmardová, D. Grochová, P. Fabian, M. Moulis, J. Šmarda, B. Ravčuková, I. Falková, J. Vaňková, I. Vášová:** Detekce neobvyklé mutace nádorového supresoru p53 u Burkittova lymfomu: duplikace 30 pb. (Brno)
19. **Uvírová M., Kuglík P., Žežulková D., Mouková L., Dvořáčková J.:** Význam molekulárně cygenetického vyšetřování karcinomu děložního čípku. (Ostrava)
20. **D. Větvíčka, O. Hovorka, K. Ulbrich, B. Říhová:** Příprava GFP-EL4 nádorového modelu pro analýzu interakcí nádoru s imunitním systémem. (Praha)
21. **P. Vidláková, E. Matějková, D. Kyjovská, L. Lauerová, L. Hanák, I. Burešová, M. Penka, J. Michálek:** Využití selektivní deplece aloreaktivních T-lymfocytů při alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. (Brno)
22. **R. Vrzal, M. Daujat-Chavanieu, J.-M. Pascussi, J. Ulrichová, P. Maurel, Z. Dvořák:** CLINICALLY USED ANTI-TUBULINE DRUGS RESTRICT AHR-CYP1A2 SIGNALLING PATHWAY VIA C-JUN-N-TERMINAL KINASE: A STUDY IN PRIMARY CULTURES OF HUMAN HEPATOCYTES. (Olomouc, Montpellier, Francie)
23. **M. Avgeris, E. G. Fragoulis, K. Stravodimos, A. Scorilas:** STUDY OF L-DOPA DECARBOXYLASE (*DDC*) IN PROSTATE TISSUES AND CANCER CELL LINES.

Pořadatelé si vyhrazují právo na změny v uvedeném programu, které budou průběžně zveřejňovány na www.solen.cz.

1. NOVÁ PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA A LÉČEBNÉ POSTUPY

Předsedající: Říhová B., Král V., Strnad M.

Středa 28. 11. 2007 - 14.10-15.50

SUPRAMOLECULAR APPROACH TO TDD: APPLICATION OF NOVEL PORPHYRIN DERIVATIVES FOR DRUG TRANSPORT AND COMBINED THERAPY.

¹V. Král, ³J. Králová, ²K. Záruba, ²P. Řezanka, ²Z. Kejík, ¹R. Kaplanek and P. ⁴Martásek

¹Zentiva a.s., Prague, U Kabelovny 130, 102 37 Praha 10, Czech Republic

²Institute of Chemical Technology, Department Analytical Chemistry, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic (email: vladimir.kral@vscht.cz)

³Institute of Molecular Genetics, AS CR, Flemingovo nám.2, Prague 6, Czech Republic

⁴1th Medical school, Charles University Prague, CZ

The uptake of exogenous molecules such as drugs into cells can arise from a variety of mechanisms that can be broadly classified as active and passive transport. Active uptake requires that target molecules be recognized by specific intermolecular interactions, selected, and shuttled across the cell membrane by receptors. Thus, molecules may be targeted toward these receptors by appending appropriate substrate moieties. Conversely, passive uptake involves diffusion at some point in the process and arises from nonspecific cell-molecule interactions. Because of the lipid membrane core, the more lipophilic a molecule, the easier the barrier to traversing through the cell membrane, whereas amphipathic molecules will nominally bind at the interface or polar region and have greater barriers to crossing the membrane. Here we describe application of porphyrin-cyclodextrin conjugates for targeted drug delivery of cytostatic drugs in combination with photodynamic therapy. Porphyrin chemistry has undergone a renaissance over the past ten years due to potential applications of these compounds in areas including photodynamic therapy, solar energy conversion and catalysis. Porphyrin, a representative of conjugated tetrapyrrolic macrocycles, has been a potent candidate for diverse applications in the areas of biology, medicine, material science and catalysis. Novel fluorinated porphyrins with oligoethyleneglycol, oligopeptide, distamycin analogues, mono-, disaccharide, and β -cyclodextrin substitution showed significant photosensitizing potential in vitro and in vivo and displayed an increased selectivity for malignant tissue. The objective of this study was to explore their capacity to induce apoptosis. To study the mechanism of their action, we have investigated uptake, intracellular localization, cell phototoxicity and morphological and biochemical changes following photodynamic treatment in human leukemic cell line HL60 and also other tumor cells. Some of our novel PS exhibited a very effective induction of apoptosis as demonstrated by condensation of chromatin, DNA fragmentation, cytochrome c release, a loss of membrane phospholipids asymmetry (as evidenced by the externalization of phosphatidylserine), and

an increase in caspase-3 protease activity. Moreover, polymethine and other polycationic porphyrin derivatives exhibit not only very specific tumor localization, but also into-cell antisense oligonucleotide transport properties as was demonstrated on the primary leukemic cells.

MECHANISMY PŮSOBNÍ SMĚROVANÝCH POLYMERNÍCH PROLÉČIV.

¹B.Říhová, ²J.Strohalm, ¹M.Šírová, ²T.Etrych, ¹T.Mrkvan, ²V.Šubr, ²D.Plocová, ¹M.Kovář, ¹L.Kovář, ²K.Ulbrich

¹Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., 142 20 Praha 4;

²Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v.v.i., 162 06 Praha 6

Makromolekulární proléčiva mohou být k cílové nádorové tkáni směřována buď aktivně nebo pasivně. Aktivní směřování umožňuje přítomnost ligandy, která na nádorové tkáni rozeznává specifický receptor. Pasivní směřování je důsledkem t.zv. EPR efektu (Enhanced Permeation and Retention efekt). Diskontinuální endotel a omezená lymfatická drenáž expanzivně rostoucího nádoru způsobuje, že se v solidní nádorové tkáni pasivně akumulují a lokálně působí látky s vyšší molekulovou hmotností. Nanoterapeutika na bázi HPMA [N-(2-hydroxypropyl) methakrylamid] se vyznačují tím, že mají nejenom vysokou protinádorovou aktivitu ale zejména tím, že během terapie je současně navozena systémová protinádorová rezistence. Jejimi nositeli jsou zejména CD8 T lymfocyty. Průnik do cílových buněk a způsob jejich smrti (apoptóza, nekróza) je zásadním způsobem ovlivněn složením polymerního proléčiva a orientací jeho cytostatické složky.

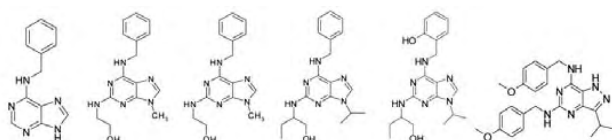
PERSPEKTIVY INHIBICE BUNĚČNÉHO CYKLU SYNTETICKÝMI INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINÁZ.

Strnad M., Kryštof V., Havlíček L.

Laborator růstových regulátorů, Ústav experimentální botaniky AVČR & Univerzita Palackého, 783 71 Olomouc

Náš výzkum soustřeďující se na poznání molekulárních mechanismů účinku cytokininů v regulaci buněčného dělení prokázal, že přirozené rostlinné hormony cytokiny jsou obecně nespecifickými inhibitory živočišných cyklin-dependentních kinas, klíčových enzymů každé eukaryotické buňky, ve které regulují aktivitu řady proteinů buněčného cyklu. Za velmi závažné lze považovat skutečnost, že v řadě lidských nádorů jsou cykliny a cyklin-dependentní kinasy abnormálně regulovány. Pro první specifický inhibitor p34^{cdc2} odvozený od N⁶-benzylaminopurinu (BAP) byl navržen název olomoucín (OC). OC zadržuje buňky na hranicích G1/S a G2/M, což je v souladu s hypotézou o převládajícím vlivu OC na CDK1 a CDK2. Inhibiční aktivita OC byla dále zvýšena modifikacemi na C2, C6 a N9 purinu, tzn., pozicích, které kontrolují vazbu k CDK1/2. Tento přístup vedl následně k vývoji nového, vysoce

účinného inhibitoru CDK roskovitinu (ROSC, 6-(benzylamino)-2(R)/1-hydroxymethyl)propyl/amino-9-isopropylpurin, který vykazuje zvýšenou inhibiční aktivitu pro CDK1, vyšší selektivitu pro určité CDK, zvýšenou antimitotickou aktivitu v G1/S a G2/M přechodu buněčného cyklu a mnohem silnější protinádorové účinky. Objev olomoucínu stál na počátku vývoje nové generace protinádorových látek založených na specifické inhibici proteinkinas homologních s CDK1/2 (obr.1). Následný vývoj vedl k vývoji dalších, mnohem účinnějších a specifitějších inhibitorů CDK 1/2, jakými jsou např. roskovitin, bohemín a purvalanol A. Roskovitin končí 2B. fázi klinického zkoušení a testuje se v několika evropských zemích a v USA v multicentrické studii. Seliciclib byl zkoušen na nádorech prsu a plicních nádorech v kombinaci se standardní chemoterapií. V průběhu zkoušení byly prováděny následující experimenty: (1) testování použití Seliciclibu v kombinaci se dvěma cytostatiky (gemcitabinem a *cis*-platinou) na malobuněčný karcinom plic; (2) testy použití Seliciclibu u rozvinutých nádorů prsu v kombinaci se dvěma dalšími léčivy (kapecitabinem a orálně podávaným „prodrug“ 5-fluorouracilem).



Obr. 1. Chemické struktury 6-benzylaminopurinu (BAP), olomoucínu, bohemínu, roskovitinu, olomoucínu II a E.2.G.G. (z leva do prava).

Vedle inhibice CDK1/2 jsme se soustředili i na vývoj inhibitorů CDK7/9, které reprezentuje olomoucín II a dále na vývoj protinádorových chemoterapeutik kombinujících inhibici CDK s antimikrotubulární aktivitou – E.2.G.G. (obr.1). Tyto látky mají mnohem zajímavější protinádorový potenciál.

Práce je podporována granty: MSM 6198959216 a GAČR 301/05/0418.

2. MOLEKULÁRNÍ PODSTATA ÚČINKU A TOXICITY POLYMERNÍCH PROTINÁ-DOROVÝCH LÉČIV

Předsedající: Šírová M., Džubák P.

Středa 28. 11. 2007 - 16.10-17.10

POLYMERNÍ CYTOSTATIKA NA BÁZI HPMA PODPORUJÍ IMUNITNÍ REAKCI PROTI NÁDORU.

¹M. Šírová, ¹P. Rossmann, ²J. Strohalm, ²V. Šubr, ²D. Plocová, ²K. Ulbrich, ¹B. Říhová

¹Mikrobiologický ústav AVČR, v.v.i., Praha

²Ústav makromolekulární chemie AVČR, v.v.i., Praha;

Bylo opakovaně dokázáno, že vazba nízkomolekulárního cytostatika na syntetický polymerní nosič, jako je N-[2-(hydroxypropyl)metakrylamid] (HPMA), mění farmakokinetiku léčiva: prodlužuje se jeho biologický poločas a dostupnost, významně se omezuje nežádoucí systémová toxicita. Protinádorový účinek léčiva přitom zůstává zachován, a dokonce může být zesilován tzv. EPR (Enhanced and Permeability Retention) efektem. Konjugáty doxorubicinu na bázi HPMA vykazují protinádorovou aktivitu v řadě experimentálních modelů. Konjugát obsahující doxorubicin a lidský intravenosní imunoglobulin (Intraglobin nebo Endobulin) může úplně vyléčit již rozvinuté syngenní myší nádory (T-buněčný lymfom EL-4) a je vysoce aktivní i v dalších modelech. Více než polovina jedinců vyléčených po s.c. transplantaci lymfomu EL-4 zůstává dlouhodobě rezistentní vůči témuž nádoru. Rozhodujícím mechanismem resistance je specifická cytotoxická reakce CD8+ buněk, která se rozvíjí již během léčby v závislosti na způsobu podání léčiva a dávce. Vyléčení lze dosáhnout pouze u imunokompetentních jedinců. Podání konjugátu nepoškozuje imunitní reakci organismu proti nádoru. Vedle přímého protinádorového působení má konjugát velmi pravděpodobně také imunomodulační efekt. Zcela v souladu s experimentálními daty jsou i výsledky pilotní klinické studie, do níž byly zahrnuty převážně pacientky s generalizovaným karcinomem prsu.

MECHANISMUS CYTOTOXICITY POLYMERNÍCH KONJUGÁTŮ NA BÁZI HPMA JE OVLIVNĚN JEJICH INTERNALIZAČNÍ DRAHOU A INTRACELULÁRNÍM OSUDEM.

¹O. Hovorka, ²J. Strohalm, ²V. Šubr, ²K. Ulbrich, ¹B. Říhová

¹Institute of Microbiology, ASCR, Vídeňská 1083, Prague 4, 142 20, Czech Republic

²Institute of Macromolecular Chemistry, ASCR, Heyrovsky sq. 2, Prague 6, 162 06, Czech Rep.

Polymerní konjugáty na bázi N-(2-hydroxypropyl) methacrylamidu nesoucí cytostatikum doxorubicin představují novou generaci protinádorových léčiv. Přestože některé konjugáty již vstoupily do fáze klinických testů, přesný mechanismus jejich účinku je stále nejasný. Dva základní typy konjugátů se odlišují způsobem vazby doxorubicinu k polymerní kostře: a) konjugáty nesoucí doxorubicin navázaný

proteolyticky štěpitelnou vazbou, b) konjugáty nesoucí doxorubicin navázaný hydrolyticky štěpitelnou vazbou. Štěpitelnost polymerních konjugátů nesoucích doxorubicin navázaný proteolyticky štěpitelnou vazbou, byla dříve považována za podmínku jejich účinnosti. Dnes víme, že jejich účinek není vázán na štěpitelnost a ani vstup konjugátů do buněk není vázán na aktivní transportní mechanismy jak bylo předpokládáno. Tato léčiva pronikají do buněk velmi rychle (v řádu sekund) a akumulují se ve všech membránových strukturách a způsobují tak poškození membránové integrity. Naproti tomu hydrolyticky štěpitelné konjugáty jsou internalizovány aktivními mechanismy, štěpeny kyselým pH v endozómech a uvolněný doxorubicin proniká do jádra, kde interkaluje do jaderné DNA.

Práce na tomto projektu je podporována grantem GAAV A400200702.

ÚČINEK VOLNÉHO, LIPOSOMÁLNÍHO A POLYMERNÍHO DOXORUBICINU NA CHEMOSENZITIVNÍ A CHEMOREZISTENTNÍ NÁDOROVÉ BUŇKY.

¹Džubák P., ¹Kratochvílová R., ¹Lipert J., ¹Janošáková A., ²Perlík V., ¹Hajdúch M.

¹Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc,

²Zentiva a.s., Praha.

Doxorubicin je významnou součástí řady léčebných protokolů v protinádorové terapii. Nicméně, jeho použití je často spojeno s výskytem nežádoucích účinků (hepatotoxicita, nefrotoxicita), přičemž mezi nejzávažnější a často vedoucí k trvalému poškození se řadí kardiotoxicita. Dalším z parametrů vedoucích k nižší léčebné odpovědi je eliminace doxorubicinu transportními proteiny asociovanými s lékovou rezistencí. Z tohoto důvodu probíhá vývoj analogů a lékových forem doxorubicinu, které mají toxicitu nižší, se současně výhodnějšími parametry farmakokinetiky, přičemž na jejich transportu by se proteiny lékové resistance (MDR) nepodílely. Na našem pracovišti byl proto v těchto souvislostech testován volný, liposomální a s polymerním N-(2-hydroxypropyl) methacrylamidem konjugovaný doxorubicin (HPMA-Doxo). Testování extracelulárního transportu MDR proteiny bylo provedeno v in vitro modelu na linii K562 a její na paclitaxel rezistentní variantě K562-Tax exprimující funkční P-glykoprotein (P-gp) a linii A549 a její vincristin rezistentní variantě A549-Vcr exprimující MRP1-protein. Pro hodnocení transportních mechanismů pro testovaná léčiva byly použity inhibitory P-gp/MRP1 a to cyklosporin-A/probenecid. Ukázalo se, že v případě liposomálního a polymerního doxorubicinu dochází k nižšímu a pozdějšímu nárůstu intracelulární koncentrace léčiva ve srovnání s volným doxorubicinem,



přičemž pouze cyklosporin-A má vliv na akumulaci liposomálního a polymerního doxorubicinu a to až v intervalech od 5 hod. po aplikaci. Neprokázal se vliv MRP1 proteinu na transport polymerního nebo liposomálního doxorubicinu, ve srovnání s volným doxorubicinem, což indikuje možnost použití těchto léčiv v případech nádorů vykazujících rezistenci vůči antracyklinům založenou na expresi MRP1.

Práce je podporována granty: MSM 6198959216 a společností Zentiva, a.s.

PROTINÁDOROVÁ ÚČINNOST A KARDIOTOXICITA VOLNÉHO, LIPOSOMÁLNÍHO A POLYMERNÍHO DOXORUBICINU.

¹Vydra D., ²Vostálová J., ¹Doležal D., ¹Džubák P., ¹Hostašková P., ²Ulrichová J., ³Perlík V., ¹Hajdúch M.

¹Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc,

²Ústav lékařské chemie a biochemie, LF UP, Olomouc,

³Zentiva, a.s., Praha.

Antracykliny patří mezi frekventně užívaná cytostatika v léčbě nádoru prsu, ovaria, prostaty a sarkomů. Mimo jejich hlavní účinky založené na interkalaci do DNA nádorových buněk mají tato léčiva schopnost indukovat tvorbu kyslíkových radikálů. Tato vlastnost, zodpovědná za poškození intracelulárních struktur buněk, se výrazně podílí na vzniku kardiotoxických, hepatotoxických a myelotoxických nežádoucích účinků při léčbě těmito preparáty. Mezi nejčastěji užívaná léčiva se řadí např. doxorubicin, epirubicin a dále jejich liposomální formy Daumoxom, Caelix charakterizované pomalejším uvolňováním léčiva a menší toxicitou při podání. V rámci spolupráce se společností Zentiva, a.s. a MBÚ AVČR byly v naší laboratoři provedeny experimenty ke srovnání toxicity a účinnosti volného doxorubicinu, jeho liposomální formy a nově syntetizovaného polymerního léčiva N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidem konjugovaného doxorubicinu (HPMA-Doxo). Pro experiment in-vivo za podmínek konvenčního chovu byla zvolena myš í imbre d ní linie C57Bl6. Typ zvířat byl vybrán vzhledem k toleranci použité syngenní transplantované nádorové linie, myš í T-lymfoblastické leukémie EL-4. Základem studie bylo stanovení toxicity testovaného léčiva, výstupem byla hodnota maximální tolerované dávky léčiva, od které byly odvozeny dávky pro další testování a dávkovací schémata. Testované polymerní léčivo mělo srovnatelný terapeutický efekt v porovnání s již zavedenými léčivy a významně nižší projevy toxicity v testech in-vivo. Toto bylo následně potvrzeno in vitro toxikologickými testy na izolovaných potkaních kardiomyocytech, kde vykazoval polymerní doxorubicin nejnižší stupeň toxicity. Výhledově bude polymerní derivát doxorubicinu testován na širším spektru nádorových linií, kdy bude podán v koncentraci na hranici maximální tolerované dávky, přičemž předpokládáme, že v těchto dávkách se výrazněji projeví i jeho protinádorová účinnost.

Práce je podporována grantem MSM 6198959216 a společností Zentiva, a.s.

3. MECHANISMY ÚČINKU PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV A LÉČEBNÝCH POSTUPŮ

Předsedající: Hajdúch M., Kolářová H.

Středa 28. 11. 2007 - 17.30-18.30

EXPERIMENTÁLNÍ FOTODYNAMICKÁ TERAPIE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU.

¹J. Štukavec, ¹L. Horák, ¹V. Ducháč, ²P. Poučková

¹Chirurgická klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady, Praha

²Ústav biofyziky a informatiky, 1. LF UK, Praha

Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější malignity české populace. Riziko onemocnění kolorektálním karcinomem nyní dosahuje u české populace 5,9 %. Stále početná je i skupina pacientů s pokročilým nádorem, kdy je indikována pouze terapie paliativní. Cílem výzkumu je zlepšení skriningu a navrzení nových způsobů léčby, které dosahují lepších výsledků než stávající postupy. Cílem naší práce je nabídnout nemocným další možnost léčby tohoto závažného onemocnění. Fotodynamická terapie (PDT) je v dnešní době již standardně používanou léčebnou metodou rozličných benigních i maligních chorob. PDT je založena na kombinaci fotosenzitizéru, který se selektivně vychytává v nádoru, a následném ozáření světlem o dané vlnové délce. Světelné zdroje jsou nejčastěji lasery s vlnovou délkou mezi 600 až 900 nm. Delší vlnové délky pronikají hlouběji do tkáně, ale maximální penetrace, které je možné dosáhnout, je přibližně 8 mm. Vlastní experiment byl proveden na atymických myších. První skupina myší byla léčena disulfonovaným hydroxyhlinitým ftalocyaninem, druhá skupina fotofrinem a další dvě skupiny byly kontrolní. Jedná dávka ftalocyaninu vedla k nekróze nádoru v 87% případů. Léčba fotofrinem vedla k nekróze u 62% myší. Mezi hlavní výhody PDT patří: nízká invazivita výkonu bez nutnosti anestézie, minimální pooperační bolestivost, minimální krevní ztráty. Další rozvoj PDT v klinické praxi závisí na průkazu, že účinnost této terapie, případně i v kombinaci s klasickými postupy, je vyšší než u dosud standardně používaných metod.

TERAPEUTICKÉ MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY SENZITIVIZUJÍ IN VITRO NĚKTERÉ B-CLL VZORKY S ABERACEMI GENU TP53 K FLUDARABINU A CHLORAMBUCILU.

S. Čejková, M. Trbušek, L. Ročňová, D. Potěšil, J. Šmardová, P. Kuglík, M. Doubek, Y. Brychtová, J. Mayer

Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika FN Brno, Černopolní 9, 62500 Brno

Je dobře známo, že aberace nádorového supresoru TP53 predisponují pacienty s B-buněčnou chronickou lymfocytární leukémií k silné rezistenci na fludarabin a chlorambucil. Monoklonální protilátka rituximab (anti-CD20) je u tohoto onemocnění používána především v kombinovaných léčebných režimech, často právě s fludarabinem. Existuje však velmi málo in vitro dat, ukazujících efekt této léčby na B-CLL buňky s aberantním TP53 nebo ATM (kináza regulující pro

tein p53). Totéž platí pro potencionální kombinaci rituximabu s chlorambucilem a alemtuzumabu (Mab anti-CD52) s fludarabinem. V našem souboru jsme detekovali delece TP53 a ATM pomocí I-FISH a mutace TP53 funkční analýzou FASAY s následnou sekvenací. Pro sledování efektu léčiv byl použit test buněčné viability (WST-1 assay). Použili jsme in vitro systém bez aktivního séra a tudíž byl pominut vliv komplementu (CDC). Po ošetření buněk rituximabem či alemtuzumabem (10 µg/ml, 72h) g/ml; CLB: mbyla aplikována chemoterapeutika ve čtyřech koncentracích (F: 25-0,4 M). Vliv monoklonálních protilátek byl stanoven pomocí multivariačním 50-6,25 analýzy „two-way ANOVA“. Nejvíce pacientů (n=54) bylo testováno pro kombinaci rituximab/fludarabin, která je reálně používaná při léčbě B-CLL pacientů. Vzorky s abnormálním TP53 byly na samotný fludarabin většinou resistantní (14/19; 71%) a žádný nebyl citlivý. Vzorky s deleceí ATM byly mnohem citlivější a v podstatě se nelišily od kontrolních (wt) vzorků. Při srovnání viability vzorků ošetřených fludarabinem a vzorků ošetřených kombinací rituximab/fludarabin vztažených k plně neošetřené kontrole byl pozorován pozitivní senzitivizační efekt rituximabu (P<0,01) u jedné třetiny vzorků s abnormalitami TP53 a deleceí ATM a u dvou třetin wt-vzorků. Velmi podobné výsledky jsme pozorovali i pro další dvě kombinace (rituximab/chlorambucil a alemtuzumab/fludarabin) testovaných ve zhruba třetinovém rozsahu. Naše výsledky potvrzují, že protein p53 rozhodujícím způsobem determinuje senzitivitu B-CLL buněk k fludarabinu a chlorambucilu. Některé vzorky s aberacemi TP53 je však možné senzitivizovat monoklonálními protilátkami rituximab a alemtuzumab.

Podporováno grantem IGA MZ ČR č. 8445-3/2005. E-mail: scejkova@fnbrno.cz.

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF 6-BENZYLADENOSINES AND THEIR PRO-DRUG FORMS.

¹Džubák P., ¹Vydra D., ²Doležal K., ²Hauserová E., ³Tarkowski P., ³Václavíková K., ²Strnad M., ¹Hajdúch M.

¹Laboratory of Experimental Medicine, Dpt. of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, ²Laboratory of Growth Regulators, Palacky University and Institute of Experimental Botany ASCR, Olomouc, Czech Republic, ³Department of Biochemistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

The cytokinins are one of the major groups of phytohormones, which control key processes during plant growth and development. They were first identified as a factor that promotes cell division in the presence of auxin and sustained growth in cultured plant cells. Systematic screening and testing on various cancer cell lines of the in vitro cytotoxicity of 6-benzyladenosine, substituted differently on the benzyl ring

have been done. The most promising compound of this study, 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purine riboside, has been tested for its antitumour activity against cancer cell lines derived from various tumors. The IC₅₀ data obtained from a calcein AM viability/cytotoxicity or MTT assay showed the interesting cytotoxic properties of this substance in contrast to other very similar derivatives which displayed much lower activity in this assay. Therefore, these results support the potential use of this compound in cancer, especially in the treatment of leukaemias. The 6-benzylaminopurine riboside, 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purine riboside, and both pro-drug forms reduced the frequency of S-phase cells of the cancer cell line CEM in antiproliferation assays. Further observed cellular effects included inhibition of DNA and RNA synthesis. The leading compound 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purine riboside as well as its mono-acetylated PD01 and tetra-acetylated PD02 pro-drug forms, respectively, were tested for its bioavailability after the oral administration to eight week old female Balb/c mice. We have confirmed that -(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purine riboside is not bioavailable, but a acetylated pro-drugs exhibited high bioavailability, the plasmatic concentrations of free 6-(2-hydroxy-3-methoxybenzylamino)purine reached therapeutic ranges (9.3 ?M/5.7 ?M), 2 or 4 hours following the pro-drug administration. Anticancer activity of pro-drugs was also analyzed in vivo using P388D1 and K562 leukemia models. Supported by grants awarded by the Czech Ministry of Education (MSM 6198959216 and LC07017).

rezistenci vykazovaly na přítomnost 5-fluorouracilu, naopak, nejcitlivější byly na přítomnost doxorubicinu. U tohoto cytostatika jsme však zaznamenali dva vzorky primárních buněk, jeden od nosičky mutace BRCA1 a druhý BRCA2, které vykazovaly výraznou rezistenci k doxorubicinu (tolerance dávky 40 ppc). U ostatních testovaných preparátů (gemcitabin, topotecan, vinorelbin, cisplatina, karboplatina) se citlivost v obou testovaných souborech od sebe nelišila. Práce na tomto projektu je podporována grantem IGA MZ ČR NR 8345-4

ÚČINKY CYTOSTATIK NA PRIMÁRNÍ MAMÁRNÍ BUŇKY S HEREDITÁRNÍ MUTACÍ GENU BRCA1/2.

^{1,2}Buršíková E, ^{1,2}Matoušková E, ^{1,2}Prchalová M, ¹Kleibl Z.

¹Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK v Praze

²Ústav molekulární genetiky AV ČR

Zárodečné mutace v genech BRCA1 a BRCA2 jsou hlavními predispozičními faktory pro vznik hereditárního karcinomu prsu a/nebo ovaria. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu u nosiček těchto mutací dosahuje 80%. Klinické studie ukazují, že u pacientek s mutacemi v genu BRCA1 je dosahováno mírně horších léčebných odpovědí v terapii karcinomu prsu ve srovnání s pacientkami s mutacemi v genu BRCA2 a pacientkami se sporadickými tumory. Cílem práce byla charakterizace biologické odpovědi primárních mamárních kultivovaných buněk získaných z mamoplastik od nosiček hereditárních mutací v genu BRCA1/2 a zdravých žen na paletu antineoplastických chemoterapeutik s různým mechanismem účinku (gemcitabin, doxorubicin, topotecan, vinorelbin, cisplatina, karboplatina, 5-fluorouracil). Celkem bylo hodnoceno 11 vzorků nosiček mutací v genu BRCA1/2 a 12 vzorků od zdravých žen. Po odběru zdravé mamární tkáně byly vzorky enzymaticky dezintegrovány pomocí 0.1% kolagenázy A a následně suspenze mamárních buněk byla kultivována v modifikovaném HMEM médiu za použití feeder-layer techniky. Na subkonfluentní buňky ve 4. pasáži byla aplikována studovaná cytostatika v různých koncentracích překrývající jejich celé terapeutické rozmezí v násobcích „plasma peak concentration (ppc)“. Růst buněk byl hodnocen pomocí MTT a NTCA testů po 72 hodinách. Z výsledků vyplývá, že primární mamární buňky s/bez přítomnosti mutace v genu BRCA1/2 se chovají podobným způsobem. Nejvyšší

4. PATOFYZIOLOGIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.

Předsedající: Hofmanová J., Trojanec R.

Čtvrtek 29.11.2007 - 8.30-10.00

APOPTÓZA VERSUS DIFERENCIACE U NORMÁLNÍCH A TRANSFORMOVANÝCH EPITELIÁLNÍCH BUNĚK TLUSTÉHO STŘEVA PO PŮSOBNÍ BUTYRÁTU A VYSOCE NENASYCENÝCH MASTNÝCH KYSELIN.

Hofmanová J., Vaculová A., Hýžďalová M., Koubková Z., Kočí L., Stixová L., Netíková J., Kozubík A.

Oddělení cytogenetiky, Biofyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Brno

V epitelu tlustého střeva je dynamická rovnováha mezi proliferací, diferenciací a apoptózou regulována endogenními faktory (cytokiny, hormony), ale je rovněž významně ovlivňována vnějšími faktory jako jsou lipidové složky diety. Zejména mastné kyseliny s krátkým řetězcem jako je butyrát vznikající bakteriální fermentací vlákniny a esenciální vysoce nenasycené mastné kyseliny (VNMK) mohou mít vliv na chování střevních buněk. Lze rovněž předpokládat i jejich úlohu při rozvoji zánětlivých a nádorových onemocnění střeva. V naší studii jsme navíc vycházeli z předpokladu vzájemné interakce těchto látek. Srovnávali jsme odpověď lidských linií epitelálních buněk odvozených z normální tkáně (FHC), adenomů (AA/C1, RG/C2) a adenokarcinomů tlustého střeva různého stupně transformace (HT-29, HCT-116) na kombinované působení butyrátu sodného (NaBt) a VNMK (omega-6 kyselina arachidonová -AA, a omega-3 kyselina dokosahexaenová -DHA). V průběhu kultivace (24-72 h) jsme detekovali změny v parametrech odrážejících proliferaci (počty buněk, buněčný cyklus), diferenciaci (aktivita alkalické fosfatázy - ALP, exprese karcinoembryonálního antigenu - CEA) a buněčnou smrt (viabilita, apoptóza - morfologie jader, štěpení PARP). Jednotlivé linie odpovídaly na zkoumané látky (použité jednotlivě nebo v kombinaci) rozdílně v závislosti na stupni transformace. Zatímco NaBt indukoval diferenciaci u linií FHC, AA/C1 a HT-29, vyvolával pouze apoptózu u linií RG/C2 a HCT-116. Ve srovnání se samotným NaBt či VNMK, kombinace těchto látek zvyšovala apoptózu pouze u buněk FHC a snižovala diferenciaci u všech diferencujících linií. Modulace diferenciaci vs. apoptóza byly doprovázeny změnami struktury lipidů v membráně, akumulací lipidů v cytoplasmě, produkcí reaktivních kyslíkových metabolitů a modulací transmembránového mitochondriálního potenciálu (detekováno fluorescenčními próbami průtokovou cytometrií). Zároveň byly pozorovány změny v aktivitě kaspázy-3 a -9 (fluorimetrie) a v expresi regulačního proteinu Mcl-1 (western blotting). U všech parametrů byly pozorovány výraznější účinky u DHA. Lze uzavřít, že interakce NaBt s VNMK může vyvolávat významné změny buněčných lipidů, ovlivňovat mitochondrie a oxidativní metabolismus a modulovat kinetiku střevních buněk v závislosti na stupni jejich transformace.

Práce je podporována granty GA ČR 524/07/1178, IGA AV ČR 1QS500040507 a KJB500040508, AVOZ 50040507.

PROTEINY LÉKOVÉ REZISTENCE A JEJICH VÝZNAM U NENÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.

¹Potešil J., ²Džubák P., ²Kratochvílová R., ²Janošáková A., ¹Kopřiva F., ¹Zápalka M., ¹Karásková E., ¹Vospělá J., ²Hajdúch M.

¹Dětská klinika, LF UP a FN Olomouc.

²Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc.

Léčba dětí s autoimunitními chorobami, nespecifickými střevními záněty a astma bronchiale je v současnosti založena na použití řady léčiv, mezi kterými významnou roli hrají kortikoidy. Glukokortikoidy jsou účinné inhibitory T buněčné aktivity a prozánětlivých cytokinů a jsou vysoce účinnou terapií aktivních zánětlivých střevních onemocnění. Na druhou stranu je selhání glukokortikoidní terapie častou indikací k chirurgickému řešení u pacientů se zánětlivým střevním onemocněním (ulcerózní kolitida, Crohnova choroba). Ačkoliv molekulární základ glukokortikoidní rezistence je studován u řady zánětlivých onemocnění, v případě nespecifických střevních zánětů a astma bronchiale je stále špatně prozkoumán. Zdá se, že fenomen glukokortikoidní rezistence je omezen na T-lymfocyty a pravděpodobně i na další cílové zánětlivé lymfocyty. Jsou popsány některé základní mechanismy rezistence mezi které patří a) porušená signalizace glukokortikoidní dráhy, b) konstitutivní aktivace prozánětlivých mediátorů a c) snížení intracelulární koncentrace glukokortikoidů v důsledku exprese proteinů mnohočetné lékové rezistence (MDR). V této souvislosti je P-glykoprotein (P-gp), ATP dependentní transmembránová pumpa řadící se do skupiny ABC transportních proteinů, jedním z mechanismů jak buňky snižují intracelulární koncentraci cytotoxických látek, léčiv, či jejich metabolitů. Jak již bylo popsáno, tímto mechanismem je ovlivněna i absorpce i některých dalších léčiv z tenkého i tlustého střeva a jejich účinnost. V současnosti jsou známy i jiné proteiny podílející se na MDR. Mezi nejpodstatnější patří další proteiny řadící se do skupiny ABC transportních proteinů jako jsou MRP 1-7 (multidrug resistance protein), BCRP a jiné jako je ribonukleoproteinová částice (vault) LRP (Lung resistance protein - poprvé popsán u ca. plic). Abychom pochopili mechanismy rozvoje rezistence a byli schopni predikovat odpověď na terapii kortikoidy nebo látky potencující jejich účinek, případně další léčiva ovlivněná MDR, byl vytvořen model na nádorových buněčných liniích o známé expresi proteinů a enzymů podílejících se různými mechanismy na MDR. Nyní se zavedené metodiky aplikují ve studiu exprese proteinů lékové rezistence na lymfocytech periferní krve vyzolovaných z krve pacientů sledovaných pro nespecifické střevní záněty (NSZ) a astma bronchiale. Kromě exprese je také plánováno hodnocení popsaných funkčních mutací těchto transportních proteinů a jejich význam na rozvoj onemocnění.

Pro porozumění dědičnosti jsou do studie zahrnuti také rodinní příslušníci pacientů. V současnosti probíhá sběr materiálu, izolace DNA a hodnocení exprese P-glykoproteinu na lymfocytech periferní krve. Doposud bylo vyšetřeno cca 400 pacientů u kterých pozorujeme řadu zajímavých fenotypů, které budou prezentovány.

Práce je podporována grantem Ministerstva zdravotnictví IGA NR8954-3 a MŠMT 6198959216.

VÝZNAM MIKRORNA-21 V PATOGENEZI KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU.

^{1,4}Slabý O., ¹Hrstka R., ³Dubská L., ^{2,4}Svoboda M., ¹Krekáč D., ¹Kvardová V., ⁵Ovesná J., ^{2,4}Vyzula R.

¹Masarykův onkologický ústav, Oddělení klinické a experimentální patologie, Brno,

²Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno,

³Masarykův onkologický ústav, Oddělení laboratorní medicíny, Brno,

⁴Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno,

⁵Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha - Ruzyně

MikroRNA (miRNA) tvoří velkou skupinu krátkých nekódujících RNA post-transkripčně regulujících genovou expresi. Schopnost miRNA inhibovat translaci onkogenů a nádorových supresorů dává předpoklad jejich zapojení do procesů kancerogeneze. V této studii jsme metodou Real-Time PCR sledovali vztah vybraných miRNA ke klinicko-patologickým charakteristikám kolorektálního karcinomu (KRK) na souboru 29 pacientů. Nejvyšší hladiny v nádorové tkáni oproti normálnímu střevnímu epitelu vykazovala miR-21 ($p < 0,0001$), kterou jsme pozitivně asociovali také s postižením lymfatických uzlin a rozvojem vzdálených metastáz ($p = 0,009$). K objasnění funkce miR-21 v patogenezi KRK jsme provedli *in vitro* studii na buňkách kolorektálního karcinomu DLD1. Za tímto účelem jsme do buněk transientně transfekovali 2'-O-methylované oligonukleotidy, anti-miRNA-21, což vedlo k reprodukovatelnému poklesu hladin miR-21 na 12%-15% oproti expresi v kontrolních buňkách, do kterých byl transfekován 2' OME-EGFP. Pro normalizaci dat byla použita malá jaderná RNA U6B (RNU6B), jejíž exprese nebyla transfekcí ani v jednom případě ovlivněna. Vliv transfekce anti-miRNA-21 na proliferaci DLD1 buněk a jejich citlivost k panelu cytostatik (5-fluorouracil, irinotekan, oxaliplatin, cisplatin, doxorubicin) byl testován pomocí MTT testu. Průběh buněčného cyklu byl analyzován průtokovou cytometrií. Tato studie je příspěvkem ke studiu funkcí miRNA v regulaci apoptózy, buněčné proliferace a diferenciaci během nádorového procesu. Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9076 – 4 a výzkumným záměrem MZ0MOU2005.

AMPLIFIKACE A EXPRESE ONKOGENU MYCN V CHEMOREZISTENTNÍCH NEUROBLASTOMOVÝCH LINIÍCH.

Procházka P., Hraběta J., Vícha A., Eckschlagler T.

Klinika dětské hematologie a onkologie UK, 2. LF a FN Motol, V Úvalu 84, Praha

Úvod: Amplifikace onkogenu MYCN je nejdůležitějším prognostickým znakem u neuroblastomu. Neuroblastom

vysokého rizika (HR NBL) je charakteristický agresivním růstem a velmi nepříznivou prognózou bez ohledu na klinické stádium. Hlavní příčinou selhání chemoterapie je vznik chemorezistence na použité cytostatikum. Proto jsme se zaměřili na rezistenci buněk HR NBL k běžně používaným cytostatikům: doxorubicinu, vinkristinu a cisplatině (CDDP) a látky vykazující protinádorové účinky: BS-RNáze.

Cíle práce: Komparativní genomovou hybridizací (CGH) vyšetřit HR NBL buněčnou linií UKF-NB-4 a od ní odvozené linie chemorezistentní k výše uvedeným látkám. Zaměřit se na oblast 2p24 s lokalizací genu MYCN a zjištěné změny potvrdit fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH). Metodou RT PCR v reálném čase zjistit expresi mRNA MYCN v senzitivní a chemorezistentních liniích. Zkusit kultivovat chemorezistentní linie bez cytostatika a sledovat změny exprese mRNA MYCN v jednotlivých fázích kultivace. Pokusit se přispět k poznatkům o vzniku chemorezistence.

Výsledky: V oblasti 2p24 jsme metodou CGH prokázali snížení počtu amplifikovaných kopií MYCN u všech chemorezistentních linií oproti linií senzitivní. Tento pravděpodobný úbytek kopií genu MYCN jsme ověřili metodou FISH, kterou stanovujeme přesný počet kopií v každé buňce. To je zajímavé, protože v průběhu léčby se nepopisují významné změny počtu kopií, ale v našem experimentu u chemorezistentních linií se počet kopií snížil. Metodou RT PCR v reálném čase jsme zjišťovali expresi mRNA MYCN. Parentální linie má ve srovnání se vzorkem leukocytů periferní krve zdravého dobrovolníka expresi o více než 2 řády vyšší. Všechny chemorezistentní linie exprimovaly mRNA MYCN o jeden řád více než senzitivní linie. Kultivace UKF-NB-4 CDDP bez CDDP ovlivňuje expresi mRNA MYCN. Expres se postupně snižuje na úroveň exprese senzitivní linie i když si rezistenci k CDDP zachovává. **Závěry:** Interpretace poklesu počtu kopií genu MYCN a vzestupu jeho exprese zatím zůstává nejasný. Snížení počtu kopií MYCN se může přímo podílet na vzniku chemorezistence. Druhým možným vysvětlením je selekce buněk s nižším počtem kopií MYCN podmíněno zvýšenou citlivostí buněk s vysokou amplifikací MYCN k použitému cytostatiku. Vyšší exprese mRNA MYCN u chemorezistentních linií souvisí s větší malignitou chemorezistentních nádorů popsanou v literatuře. Postupné snižování exprese mRNA MYCN v chemorezistentní linii při kultivaci bez cytostatika naznačuje bezprostřední vliv cytostatika na chování buněk. Potvrzení významu exprese MYCN je obtížné, protože existují literární údaje o tom, že exprese genu MYCN ovlivňuje apoptózu buněk jinak u neuroblastomu s amplifikací a jinak bez této amplifikace. Práce vznikla za finanční podpory grantu GAUK 200 079 a MŠMT VZ č. 0021620813.

ROLE MAP KINÁZ A KASPÁZ V MONOCYTÁRNÍ DIFERENCIACI BUNĚK HL-60.

^{1,2}Procházková J., ¹Souček K., ¹Stixová L., ^{1,2}Kozubík A.

¹Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, Brno, ²Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Kotlářská 2, Brno

Zástava hematopoetické diferenciaci buněk akutní promyelocytární leukémie (např. HL-60) může být překonána účinkem diferenciací látek jako je kyselina retinová nebo



ABSTRACTA

vitamín D3. Takováto léčba však často bývá doprovázena selekcí rezistentních klonů buněk. Studium signálních drah vedoucích k diferenciaci proto stále zůstává aktuální problematikou zvláště pro hledání cílů léčiv nové generace. V naší předchozí studii jsme prokázali, že spolupůsobení cytokinu TNF-alfa a inhibitorů 5-lipoxygenázy MK-886 na buňky HL-60 vedlo k indukci jak procesu monocytární diferenciace, tak apoptózy. Tato práce byla zaměřena na studium role kináz aktivovaných mitogeny (MAPK) a na zapojení kaspáz do obou procesů. K aktivaci tří hlavních MAPK kináz (p38, ERK, JNK) došlo již 15 minut po přidání MK-886 a TNF-alfa, proto jsme jejich roli studovali pomocí inhibitorů jejich aktivity (SB202190, SP600125, U0126 (resp.)). Inhibice pro-apoptotických MAPK (p38, JNK) vedla k potlačení účinku MK-886+TNF-alfa, kdežto inhibice dráhy podporující přežití (ERK) způsobila zvýšení exprese CD11b, CD14 a produkci ROS, což jsou znaky monocytárních buněk. Uvedená kombinace látek vede také k aktivaci kaspáz. Inhibice kaspáz pomocí zVAD-fmk zcela potlačila monocytární diferenciaci. Z těchto výsledků plyne významnost pro-apoptotických drah nejen pro indukci apoptózy, ale i monocytární diferenciace.

This project was supported by grants No. 524/06/P345 and 524/05/0595 of GAČR and AVOZ No. 50040507.

5. PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY I

Předsedající: Plank L., Hajdúch M.

Čtvrtek 29.11.2007 - 10.15-12.00

KALLIKREINS AS NOVEL MOLECULAR BIOMARKERS FOR DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF HORMONE - RELATED CANCERS.

Dr.Scórilas A.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Athens. 157 01, Panepistimiopolis, Athens, Greece.

Summary: The human tissue kallikreins (KLKs, hKs) represent the largest contiguous cluster of serine protease genes in the human genome. Tissue kallikreins are encoded by 15 structurally similar, steroid hormone-regulated genes that colocalize to chromosome 19q13.4. They are widely expressed in diverse tissues and implicated in a range of normal physiologic functions from the regulation of blood pressure and electrolyte balance to tissue remodeling, prohormone processing, neural plasticity, and skin desquamation. Kallikrein function is regulated at various levels, including transcription, translation and post-translation level. It is widely known that kallikreins are implicated in various neoplastic conditions and it has been shown that they can serve as new biomarkers for diagnosis, prognosis, and monitoring of cancer.

Human Kallikrein-3 (KLK3, hK3) is the already known PSA, which has been approved as the most useful and acceptable biomarker in prostate cancer. As a consequence, many kallikreins, in addition to hK3/PSA, have been identified as promising diagnostic and/or prognostic biomarkers for several cancer types, including ovarian, breast, and prostate. As far as prostate cancer is concerned, KLK4, KLK11, KLK14, and KLK15 genes are highly expressed. Several other kallikreins are differentially expressed at both the mRNA and protein levels in various endocrine-related malignancies, and they have prognostic value. Recent data also suggest that KLKs may be causally involved in carcinogenesis, particularly in tumor metastasis and invasion, and, thus, may represent attractive drug targets to consider for therapeutic intervention. Our data suggest that the expression analysis of the KLKs gene isoforms could also constitute novel molecular biomarkers for diagnosis, prognosis and prediction of therapy response in hormone – related cancers.

Acknowledgements: Work was supported by a Greek-Czech joint research and technology grant (EPAN.M.4.3.6.1) co-funded by the European Regional Development Fund (70%) and National Resources (30%) - Ministry of Development - General Secretariat for Research & Technology of Greece and by the Biopaths Co.

MORFOLOGICKÉ, IMUNOFENOTYPOVÉ A MUTAČNÉ ANALÝZY C-KIT-U A PDGFRA CENTRALIZOVANEJ BIOPTICKEJ DIAGNOSTIKY GASTROINTESTINÁLNYCH STROMÁLNYCH TUMOROV V SR.

¹Plank L., ¹Szépe P., ²Lasabová Z., ³Minárik G., ¹Kajo K., ¹T. Burjanivová

¹Ústav patologickej anatómie JLF UK a MFN v Martine,

²Ústav molekulovej biológie JLF UK v Martine a

³Geneton s.r.o v Bratislave

Úvod: Vzhľadom k zriedkavosti gastrointestinálnych tumorov (ďalej GIST) vznikol v SR projekt centralizovanej bioplickej diagnostiky GIST-ov, ktorý zahŕňa aj mutačné analýzy c-KITu a PDGFRA. Cieľom práce je prezentácia prvých výsledkov projektu.

Materiál a metodika: Všetky prípady bioplicky diagnostikovaných alebo suspektných GIST-ov sú v martinskom centre projektu (po formolovej fixácii a zaliatí do parafínu) analyzované panelom histologických a imunohistochemických vyšetrení (detekcia CD117, CD34, svalovo-špecifických antigénov, S-100 proteínu), vrátane stanovenia mitotickej aktivity a proliferatívneho Ki-67 indexu. Z parafínových rezov je izolovaná DNA, následne vyšetrená PCR reakciami s použitím špecifických primerov pre exóny 9, 11, 13 a 17 c-KITu, ako aj pre exóny 12, 14 a 18 PDGFRA. Získané produkty sú po purifikácii podrobené sekvenáčnej analýze.

Výsledky: Analýza prvej série 82 prípadov projektu vykazuje: a.) prevahu vretenobunkového typu GIST-u (63.4%), zatiaľ čo zmiešaný (27.7%) a epitelooidný typ sú zriedkavejšie (8.9%), b.) prevahu prípadov s vysokým rizikom (49.1%) a približne rovnaký podiel prípadov so stredným (22.3%) a nízkym alebo veľmi nízkym rizikom (24.1%) malígneho správania, c.) nádory vykazujú častejšie infiltratívne a menej často prinajmenej sčasti opúzdrené rastové črty (42%, resp. 35% všetkých), d.) expresia CD117+ sa vyskytuje v 98.2% and CD34+ v 83.9% všetkých GIST-ov (s rozdielnou intenzitou exprese) a koexpresia svalových markerov je prítomná takmer v 1/5 prípadov (najčastejšie v menej ako 50% buniek nádoru). Mutačné analýzy doteraz vyšetrených 47 prípadov vykazujú nasledovné výsledky: a.) najčastejšie mutácie v exóne 11 c-KITu (n=27) sú častejšie delečného a menej často inzerčného typu alebo missense-typu, b.) zriedkavejšie mutácie v exóne 9 (n=3) c-KITu a v exóne 12 boli zistené relatívne časté (n=1) PDGFRA, c.) v exónoch 12 a 18 PDGFRA polymorfizmy (n=15, resp. n=5), a to sčasti v asociácii s inými genetickými poruchami.

Záver: referovaný národný program prináša prvé výsledky štandardizovanej diagnostiky „second-look“ typu a poskytuje aj možnosť získať také prognostické a prediktívne údaje, ktoré môžu byť zásadne dôležité pre terapeutické rozhodovanie a osud pacienta.

Práca na tomto projekte je podporená grantom fy. Novartis

SOCS-3 IS UPREGULATED BY ANDROGENS IN PROSTATE CANCER CELLS AND EXERTS INHIBITORY EFFECTS ON AR-MEDIATED PROLIFERATION.

H. Neuwirt

Department of Urology, Innsbruck Medical University, Anichstrasse 35, A-6020 Innsbruck, Austria

We have previously shown that suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) antagonizes regulation of cellular events by cAMP and is expressed in human prostate cancer. The purpose of this study was to elucidate whether SOCS-3 expression is regulated by androgenic hormones in prostate cancer cell lines.

To investigate possible effects of androgens on SOCS-3 protein expression, PC3-AR and the androgen-dependent LAPC-4 cells were treated with different concentrations of R1881. Our Western blot analyses show an increase in expression of the SOCS-3 protein after androgen treatment in both cell lines, which can be blocked by the anti-androgen bicalutamide. To further characterize effects of R1881 on SOCS-3 gene, qRT-PCR and promoter-reporter assay were performed. Surprisingly, we find no influence of androgen on SOCS-3 mRNA levels or promoter activity, thus suggesting a post-transcriptional effect of androgens. Hence, we blocked translation or transcription by using cycloheximide and actinomycin D, respectively. Concordant with our previous findings we show a significant increase of SOCS-3 protein level after androgen treatment in cells in which transcription was blocked, but not in those with impaired translation. In order to understand implications of SOCS-3 regulation by androgen, we used the SOCS-3 negative LNCaP-ATCC and stably transfected them with a tetracycline-responsive SOCS-3 Tet-On plasmid. We report that androgenic proliferative effects on cell proliferation and PSA secretion are significantly diminished following upregulation of SOCS-3 protein.

In conclusion, androgens upregulate SOCS-3 protein via post-transcriptional effects and SOCS-3 itself inhibits androgen-stimulated proliferation, possibly by influencing cell cycle regulation.

This abstract was sponsored by the Austrian Research Fund (FWF), grant number: 18193

MOLECULAR GENOMIC CHANGES IN CARCINOMA AND THEIR CLINICAL APPLICATION IN DIAGNOSTIC PATHOLOGY - FOCUS ON DEVELOPMENT OF FISH PROBES FOR BREAST AND MELANOMA.

Weber-Hall S.

Abbott Diagnostics, London, United Kingdom

As our understanding of genomic DNA changes underlying carcinoma development progresses, we are able to start to use these changes as useful markers of disease stage, prognosis and response to targeted therapies. Fluorescent In-Situ Hybridisation (FISH) technology makes use of these genomic abnormalities and is routinely used in constitutional and

haematological diagnostics, and is becoming increasingly used in solid tumour diagnostics. The technology lends itself to applications in Pathology as it works efficiently on Formalin fixed paraffin embedded tissue and is the only technology allowing detection of multiple genomic abnormalities within the tissue context of the tumour. This talk will focus on the use, and future prospects for multitarget FISH technology in therapy selection for breast cancer, and discuss the future use of FISH technology in other carcinomas for example Melanoma, Bladder cancer and Barrett's Esophageal Cancer.

6. PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY II

Předsedající: Melichar B., Pešek M.

Čtvrtek 29.11.2007 - 13.30-15.00

IMUNITNÍ ODPOVĚĎ JAKO PROGNOSTICKÝ A PREDIKTIVNÍ FAKTOR U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ.

Melichar B., Hornychová H., Tomšová M., Melicharova K., Rýška A.

Klinika onkologie a radioterapie, Fingerlandův ústav patologie a Klinika gerontologická a metabolická Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové

V posledním desetiletí došlo k významnému pokroku v poznání vlastností nádorových buněk podmiňujících průběh onemocnění (prognostické faktory) i odpověď na léčbu (prediktivní faktory). Naproti tomu poměrně malá pozornost byla věnována studiu prediktivního a prognostického významu odpovědi organismu. Nicméně řada dat ukazuje, že imunitní odpověď organismu je v řadě případů prognostickým a prediktivním ukazatelem srovnatelného významu s fenotypem nádorových buněk. Naše předchozí studie prokázaly, že neopterin, ukazatel systémové imunitní aktivity, je prognostickým faktorem u nemocných s metastatickým kolorektálním karcinomem, karcinomem ledviny, karcinomy horního zažívacího traktu i karcinomem ovaria. Vyšší hladina neopterinu u nemocných s karcinomem ovaria korelovala s poruchou propustnosti střevní sliznice a byla spojena s vyšším rizikem toxicity. V retrospektivní analýze u nemocných s karcinomem ovaria byl rovněž prokázán význam přítomnosti tumor infiltrujících lymfocytů. Přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů byla rovněž prediktivním faktorem patologické kompletní odpovědi po neoadjuvantní chemoterapii. Tyto výsledky ukazují na významnou roli imunitní odpovědi na nádorové onemocnění. Parametry imunitní odpovědi by měly být sledovány v prospektivních studiích, zejména se zřetelem na stále se rozšiřující roli biologické léčby.

Podpořeno granty IGA MZ NR9096-4 a NR8392

PROGNOSTICKÉ PARAMETRY KARCINOMŮ HLAVY A KRKU.

¹Smilek P., ²Dušek L., ³Veselý K., ¹Rottenberg J., ¹Kostřica R., ¹Neuwirthová J.

¹Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, FN u sv. Anny v Brně,

²Centrum biostatistiky a analýz, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně

³I. Patologicko-anatomický ústav FN u sv. Anny v Brně

Účelem studie bylo objasnit prognostický význam flow cytometrické analýzy DNA, mitotického a apoptotického indexu, Ki-67, EGF-R, c-erb-B2, matrix metalloproteinasis-9 (MMP 9), p53, bcl-2 a CD 34 u karcinomů hlavy a krku. Byla provedena analýza souboru 217 nemocných. Vedle rutinních vyšetření byla provedena i výše uvedená stanovení biomarkerů a byl zkoumán vztah mezi těmito parametry nádoru a celkovým přežitím (OS) a dobou od ukončení léčby až po relaps nebo progresi onemocnění (EFS). Samotný

histopatologický grading nepřispěl významně k predikci EFS a OS. TNM stadium, ploedita a míra realizované proliferace ovlivnila OS i EFS. Pozitivita bcl-2 a MMP-9 měla vztah k celkovému přežití, pozitivita EGFR, c-erbB-2, CD34, p53 neovlivnila přežití.

MUTACE EGFR JSOU PREDIKTOREM ÚČINNOSTI TYROZINKINÁZOVÝCH INHIBITORŮ, NA ROZDÍL OD MUTACÍ K-RAS ONKOGENU U ADENOKARCINOMU PLIC.

Pešek M., Benešová L., Belšánová B., Brůha F., Mukenšnabl P., Jančaříková D., Krejčí J., Minárik M.

Klinika nemocí plicních a tuberkulózy FN Plzeň, Laboratoř molekulární genetiky Genomac Praha, Šiklův patologicko-anatomický ústav FN Plzeň

Mutace genu pro EGFR a k-ras se pokládají za významné prognostické i prediktivní faktory pro výsledek biologicky cílené terapie inhibitory tyrozinkinázy (gefitinib, erlotinib). Autoři referují o výsledcích genetických vyšetření 223 nemocných léčených gefitinibem v rámci programu časného přístupu v letech 2002 – 2005 a 59 nemocných léčených erlotinibem v letech 2005 – 2007. Mutace byly vyšetřovány ze vzorků nádorové tkáně s využitím laserové mikrodisekce, analýza mutací EGFR a k-ras byla prováděna kombinací fragmentační analýzy a DNA sekvenování a separací heteroduplexů v teplotních gradientech.

Výsledky: Frekvence somatických mutací v našem souboru: Celkem bylo vyšetřeno 223 pacientů, DNA se nepodařilo izolovat ze dvou cytologických a z 20 histologických preparátů.

EGFR exon 19 delecí	23/190	12,1%
EGFR exon 21 substitucí	7/173	4,0%
K-ras exon 1 substitucí	27/207	13,0%

Identifikace EGFR a k-ras mutací v našem souboru:

EGFR exon 19 delece	EGFR exon 21	K-ras exon 1 mutace
del 745-750insK del 747-751insS del 746-751insA del 747-752 del 752-759 Total 23x	L858R 7x	GGT>TGT (Cys) 18x GGT>GGT (Val) 6x GGT>GAT (Asp) 2x GGT>GCT (Ala) 1x

EGFR mutace znamená významnou výhodu u plicních adenokarcinomů

AdenoCa vs. ostatní typy

Čas do progresu		Průměrný čas přežití	
Mutované* adenokarcinom (n=18)	Mutované* ostatní typy (n=11)	Mutované* adenokarcinom (n=18)	Mutované* ostatní typy (n=11)
412 dní	117 dní	534 dní	207 dní
p = 0,00045		p = 0,00473	

K-ras mutace neznamenají špatnou prognózu biologické léčby K-ras pozitivní vs. K-ras negativní

Čas dogrese		Průměrný čas přežití	
K-ras pozitivní (n = 21)	K-ras negativní (n = 29)	K-ras pozitivní (n = 21)	K-ras negativní (n = 29)
61 dní	63 dní	156 dní	194 dní
p = 0,460		p = 0,792	

EGFR mutace znamená významnou výhodu u plicních adenokarcinomů

Mutovaný vs. nemutovaný

Čas dogrese		Průměrný čas přežití	
Mutovaný* adenokarcinom (n=18)	Nemutovaný* adenokarcinom (n=12)	Mutovaný* adenokarcinom (n=18)	Nemutovaný* adenokarcinom (n=12)
429 dní	85 dní	534 dní	244 dní
p = 0,00013		p = 0,00028	

Nemocní léčení erlotinibem v letech 2005 – 2007: n = 77, muži 52, ženy 25, prům. věk 61,5 let, rozmezí 41 – 81 let. Epidermoidní Ca 39, adenokarcinomy 32, anaplastické a n.s. NSCLC 6.

Geneticky vyšetřeno: 59 nemocných, z toho epidermoidní 30, adenokarcinomy 26, anaplastické a n.s. NSCLC 3. Mutace EGFR nalezeny u 5 pac., 3 muži a 2 ženy, všichni adenokarcinomy. Mutace k-ras nalezeny u 6 nemocných – 5 mužů a 1 žena, adenokarcinomy 3, epidermoidní Ca 3.

Nemocní s TTP $\geq$ 3 měsíce

Epidermoidní Ca	7	
Adenokarcinomy	10	
Anaplast. a n.s. NSCLC	1	
Z geneticky vyšetřených	5/18	27,8%
Nemocní bez mutací	10/48	20,8%
EGFR mutace	4/5	80%
K-ras mutace	1/6	16,7%

EGFR mutace nevyšetřeny u TTP $\geq$ 3 měsíce u 2 pac. s adenokarcinomy.

Závěr: Na základě našich výsledků předkládám algoritmus, který by měl pomoci vyhodnotit prognózu nemocných podle jejich EGFR statusu, pohlaví a typu nádoru. Podle našich závěrů doporučujeme vyšetřovat EGFR mutace u pacientů s adenokarcinomy, kde je zvažována léčba inhibitory tyrozinkinázy. Pacienti s k-ras mutacemi sice mohou z této léčby rovněž profitovat, při progresi je však vhodné zvážit chemoterapii II. nebo i III. linie.

Podporováno IGA MZ NR 9087-3

PROGNOSTICKÁ RELEVANCE PROTEINŮ AGR2 A AGR3 PŘI LÉČBĚ KARCINOMU PRSU.

R. Hrstka, D. Knoflíčková, J. Holčáková, R. Nenutil a B. Vojtěšek

Masarykův onkologický ústav, Oddělení onkologické a experimentální patologie, Žlutý kopec 7, Brno

Karcinom prsu je nejčastější nádorové onemocnění žen ve většině vyspělých zemí světa a podobně je tomu i v naší populaci. Přibližně u dvou třetin pacientek je prokázána přítomnost funkčních estrogenních receptorů (ER) a právě u těchto případů je vhodné indikovat anti-hormonální léčbu, která představuje jednu z nejstarších forem molekulární terapie. V přímé souvislosti s expresí ER byly recentně detekovány proteiny AGR2 a AGR3. Jedná se o lidské homology proteinu XAG-2, nacházejícího se ve vysokých hladinách v pohlavních žlázách u *Xenopus laevis*. Při bližším zkoumání bylo

prokázáno, že se jedná o významný proliferativní faktor se schopností indukovat tvorbu metastáz. Vzhledem k úzké asociaci proteinů AGR 2 a AGR3 s expresí ER, je možné předpokládat jejich zapojení do procesů spojených s některými nežádoucími účinky při podávání tamoxifenu (TAM), kdy může docházet k tvorbě karcinomu endometria, případně i vzniku rezistence vedoucí k relapsu onemocnění. Naše výsledky jasně ukazují, že exprese AGR2 i AGR3 úzce souvisí s méně diferencovanými, ER pozitivními karcinomy prsu. Na základě in vitro studií jsme prokázali, že působením tamoxifenu dochází v buňce k nárůstu hladin obou proteinů. Retrospektivní studie u pacientek léčených TAM pak skutečně potvrdila signifikantní rozdíl v hladinách AGR2 i AGR3 ve vzorcích nádorové tkáně před a po podání TAM.

Tato práce byla podporována IGA MZ ČR NR/8338-3/2005 a MZ0MOU2005.

PŘÍNOS CYTOGENETICKÉHO A ARRAYCGH VYŠETŘENÍ DĚTSKÝCH NÁDORŮ LEDVIN A JATER.

¹Stejskalová E., ¹Mališ J., ²Pospíšilová H., ³Kodet R., ²Jarošová M.

¹Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2.LF a FN Motol

²Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

³Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2.LF a FN Motol

Nefroblastom (Wilmsův tumor) je neobvyklejším dětským nádorem ledvin. Patří do skupiny nádorů s obecně dobrou prognózou, přesto přibližně 15% pacientů relabuje a další odpověď na léčbu bývá výrazně zhoršená, s 50% nadějí na přežití, navzdor moderním léčebným možnostem. Histologicky nepříznivý anaplastický typ představuje asi 5% relabujících pacientů, určitou výzvou je rozpoznat pacienty s příznivou histologií, u nichž je zvýšená pravděpodobnost progresu a nepříznivého vývoje onemocnění. Mezi slibné indikátory patří delece 1p a 11q, delece 16q13-qter a nebalancovaná translokace der(16)t(1;16), trizomie či polyzomie 1q (důsledek nebalancované translokace nebo izochromozom 1q), monozomie 22, komplexní karyotyp. V našem příspěvku budeme demonstrovat vlastní soubor pacientů s převážně unilaterálním Wilmsovým tumorem. Většina pacientů nebyla před operací léčena, takže chromozomální změny nejsou zkráceny chemoterapií. Abnormální klonální chromozomální aberace jsme pozorovali téměř u všech pacientů, zejména deleci 1p, izochromozom 1q, monozomii 22, ve shodě s literárními nálezy. Primární maligní nádory jater jsou u dětí velmi vzácné, představují pouze 0.5-2% všech dětských nádorů. Léčebné výsledky se v posledních dvaceti letech dramaticky zlepšily. Rozhodující léčebnou modalitou je chirurgická léčba. Významnou roli hraje adjuvantní a neoadjuvantní chemoterapie. Přesto přibližně čtvrtina pacientů umírá. Málo je známo o skutečné frekvenci a klinickém významu genetických změn. Dosud bylo publikováno pouze okolo 100 případů s klonálními chromozomálními změnami. Za významné v etiologii se považují +1 nebo +1q, +2 nebo +2q, +8 nebo +8q,+20. Zatím byla popsána jediná nenáhodná translokace der(4)t(1;4)(q12;q34). V našem sdělení budeme demonstrovat vlastní soubor deseti hepatoblastomů s výše uvedenými klonálními změnami. Použití metody arrayCGH s microarray K3 (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands) dovolilo odhalit změny, které nebyly pozorovány

v klasickém cytogenetickém vyšetření. Praktickým výstupem naší studie je korelace prokázaných změn s histopatologickým nálezem, klinickými údaji a odpovědí na léčbu.

Práce je podporována grantem IGA MZ č.NR/9050-3

NOVÉ POTENCIONÁLNÍ MARKERY CHOVÁNÍ NÁDOROVÝCH BUNĚK.

¹Vobořil R, ²Weberová-Vobořilová J, ³Rychterová V, ¹Horák L, ¹Fanta J

¹Chirurgická klinika, 3. LF UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

²Oddělení buněčné a molekulární biologie, Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie, 3. LF UK, Praha

³Ústav patologie, 3. LF UK a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha

Zlepšující se výsledky v léčbě onkologických pacientů jsou podmíněny mj. i pokroky na poli buněčné a molekulární biologie. Zkoumání v této oblasti se kromě jiného zaměřuje na objasnění mechanismů odpovědných za vznik rezistence nádorových buněk k protinádorové léčbě. Potlačení vzniku této rezistence by mohlo přispět k dalšímu zlepšení efektivity terapie onkologicky nemocných. Rovněž tak nalezení vhodných markerů v nádorové tkáni by mohlo být důležitým ukazatelem dalšího chování nádorových buněk. V našem sdělení chceme prezentovat naše výsledky dosažené v experimentální a klinické části studie zaměřené právě na chování nádorových buněk, na možné mechanismy vedoucí k rezistenci těchto buněk na protinádorovou léčbu a na hledání vhodných markerů charakterizujících chování nádoru.

7. NÁDOROVÁ GENOMIKA A PROTEOMIKA

Předsedající: Hajdúch M., Džubák P.

Čtvrtek 29.11.2007 - 15.15-17.00

CLASSIFICATION OF MECHANISMS OF ACTION AND RESISTENCE OF SYNTHETIC CDK INHIBITORS USING PROTEOMIC TECHNOLOGIES.

¹Kovářová H., ²Gadher S., ³Džubák P., ³Hajdúch M.

¹Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czech Republic,

²Beckman Coulter, Zurich, Switzerland,

³Laboratory of Experimental Medicine, Dpt. of Pediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic.

The purpose of this study was to apply a recently introduced proteomic based approach to identify candidate biomarkers of the response to anticancer activity of cyclin-dependent kinase inhibitor, bohemine. Mapping of the total protein expression of CEM lymphoblastic leukemia cells following bohemine treatment was performed by 2-D liquid phase separation. Proteins were fractionated by isoelectric points in pH gradient in the first dimension and each of these pI protein fractions was further separated by hydrophobicity using non-porous silica reverse phase chromatography in the second dimension. 2-D protein expression maps of control untreated and bohemine treated cells were generated and inter-sample comparison was performed. Most of the differentially expressed proteins were present at a decreased level after bohemine treatment while there were four proteins, which were up regulated. These proteins representing candidate biomarkers of cancer cell response to the treatment were selected for identification by mass spectrometry. Our results demonstrating down regulation of three histone variants, different in their pI and hydrophobicity, in response to bohemine indicated that anti-mitotic and anti-cancer activities of this compound may be associated with epigenetic regulation at the level of chromatin structure. Furthermore, crk-like adaptor scaffolding protein represents a new important protein family affected by bohemine. This strategy is valuable for comprehensive proteomic analysis of cellular protein targets and pathways that are relevant to anticancer activity of cyclin-dependent kinase inhibition.

The work on this project was supported by Czech Ministry of School and Education (LC07017 and MSM6198959216)

CURRENT STATUS AND FUTURE APPLICATIONS OF MALDI IMAGING.

M. Macht³, S.-O. Deininger³, M. Bohac⁴, M. Schuerenberg³, C. Luebbert³, A. Fuetterer³, M. Ebert², C. Roeken¹

¹Department of Medicine II, Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Germany

²Institute of Pathology, Charité University Hospital, Berlin, Germany

³Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany

⁴Scientific Instruments Brno, s.r.o., Brno, Czech republic

MALDI imaging is a technique with increasing importance for marker discovery and in clinical research. The sample preparation, especially the application of matrix onto the sample is of utmost importance on the quality of the results. The main parameters in judging the results are the achievable spatial resolution and the spectra quality-unfortunately these parameters seem to be negatively correlated. Here, various preparation methods, such as pneumatic spray, robotic and manual spotting were evaluated. The images are usually analysed visualizing the spatial resolution of selected peaks on an image. The data however contain more complex information, such as overall changes in the proteomic pattern. Here we discuss how such information can be tapped.

The data quality is directly correlated with the time of solvent exposure and the amount of matrix. To achieve good quality of spectra at maximal spatial resolution it proved necessary to optimize preparation parameters such as the number of repeated matrix applications, solvent composition and matrix concentration.

When tissues were compared that contained only homogeneous tumor or non-tumor regions the simple presence or absence of a peak was not sufficient to classify the tissue because of the lack of an "internal control". Therefore the data evaluation of the several thousands of spectra was performed by chemometric, multivariate statistical models to distinguish between various tissue areas and to locate specific outlier compounds.

It was not only possible to distinguish tumor from non-tumor areas, but also between tumors of different types. Moreover, specific known biomarkers could be allocated which may determine the further patient therapy.

Human tissue sections of different types of cancer were prepared on a microtome, transferred onto electrically conductive glass slides were used for the experiments. Images were acquired with a MALDI-TOF/TOF instrument equipped with a 200 Hz laser with changeable focus size (~120 µm to 10 µm). Data evaluation was done using dedicated software packages.

APLIKACE VÝZKUMU PROTEINOVÝCH BIOMARKERŮ V ONKOLOGII CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU A PLICNÍCH NÁDORŮ S VYUŽITÍM HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.

T. Korba

Applied Biosystems, Praha

Proteomické postupy ve výzkumu nádorových biomarkerů získávají stále větší důležitost. Přednáška přináší příklady objevování proteinových biomarkerů nádorů centrálního nervového systému pomocí multiplexní relativní kvantifikace s činidly iTRAQ a analýzou LC/MALDI na přístroji 4800 MALDI/TOF/TOF. Relativní a absolutní kvantifikace proteinových

biomarkerů v plazmě využívá postupu MIDAS na hybridním analyzátoru trojitý kvadrupol / lineární iontová past 4000 QTRAP. Cílem je verifikovat markery, validovat je a případně využít v klinické praxi. Prezentovány jsou výsledky sledování metastáz plicních nádorů.

EXPRESNÍ ČIPY, ARRAY CGH, CHIP-CHIP A VLIV KVALITY VZORKU.

Z. Halbhuber, M. Krivjanská

Central European Biosystémy s.r.o., Nad Safinou 365/II, Vestec u Prahy

V posledním desetiletí je zřejmé, že pokrok v technologii DNA čipů je obrovský. Rozlišení v kterém jsou nanášeny jednotlivé sondy na čip se stále zvyšuje a roste i počet organismů pro které jsou k dispozici čipy pokrývající celý jejich genom. Díky stále se rozšiřujícímu spektru výrobců čipů, tak dnes můžeme, například u expresních čipů pokrývajících celý lidský genom, volit mezi platformami firem Affymetrix, Illumina, Agilent, Operon, PhalanxBiotech, Medianta, Nimblegen. Tak, jak se zdokonalují čipy, se stabilizují i postupy značení, hybridizace a promývání. Klíčovým ukazatelem určujícím úspěšnost experimentu je tedy dostatek kvalitního vzorku. V naší krátké prezentaci ukážeme vliv kvality vzorku na data získaná z expresního čipu PhalanxBiotech. Sledovali jsme vliv integrity vyjádřené jako RIN na exprese housekeeping genů - Lysosomal-associated membrane protein 1, Calnexin, Ubiquitin specific protease 11, Damage-specific DNA binding protein 1, Ubiquitin-activating enzyme 28, Tripartite motif-containing 28, Actin Binding LIM protein 1.

Jako ukázkou high-density arrayů bychom rádi prezentovali i data z array CGH a CHIP-chip experimentů zaměřených na promotorovou oblast lidského genomu.

Práce na tomto sdělení je podporována grantem MSM NPV II.

ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE U FOLIKULÁRNÍHO LYMFOMU POMOCÍ OLIGONUKLEOTIDOVÝCH MICROARRAYS.

Kozubík K.¹, Tichý B.¹, Janíková A.², Dvořáková D.¹, Mayer J.^{1,2}, Pospíšilová Š.¹

¹Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHO FN Brno

²Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Brno

Folikulární lymfom (FL) se řadí mezi B-lymfoproliferace a je v Evropě i v USA druhým nejčastějším typem maligních lymfomů. Vyznačuje se relativně dlouhým mediánem přežití, indolentním průběhem s pomalou progresí a opakovanými relapsy. FL je senzitivní na terapii, avšak diseminovaná stadia jsou dosud považována za nevy léčitelné onemocnění. FL může v průběhu nemoci spontánně regredovat, ale také transformovat do histologicky agresivnější formy, nejčastěji difúzního velkobuněčného lymfomu, který má velmi špatnou prognózu. Diagnóza FL se stanovuje histologicky z odebrané lymfatické uzliny nebo infiltrátu. Prognóza pacientů s FL je

značně heterogenní, i když většina pacientů přežívá 6 až 10 let, zhruba 20% nemocných umírá do 2 let od stanovení diagnózy. Současnými histopatologickými a klinickými metodami nelze u konkrétního pacienta průběh choroby předpovědět. Moderní metody molekulární biologie nabízí potenciální řešení. Pomocí microarrays (např. oligonukleotidových expresních microarrays) cílených na konkrétní onemocnění lze upřesnit nejen diagnózu, ale i prognózu onemocnění. Pro náš experiment jsme použili vlastní specializovaný design DNA čipů pro odlišení folikulárního lymfomu od jiných maligních lymfomů a pro jeho subklasifikaci. Na základě recentních publikací jsme vybrali přibližně 3 500 genů, které mají rozdílnou expresi v rámci subtypů lymfomů. K vyšetření jsme použili platformu microarrays od firmy Agilent obsahující 14 tisíc oligonukleotidů o délce 60 bází. Analýzou genové exprese jsme detekovali rozdíly mezi jednotlivými subtypy lymfomů. Výsledky ukazují na velký potenciál této metody při stanovení diagnózy a upřesnění prognózy folikulárního lymfomu. Práce na tomto projektu je podporována grantem IGA MZ ČR 8448-3/2005, výzkumným záměrem MŠMT ČR MSM0021622430 a NF Elpida Nucleus

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE: NÁSTROJ ČASNÉ DIAGNOSTIKY PSEUDALLESCHERIA BOYDII.

J. Nedvěd^{1,2}, M. Thérová³, V. Havlíček¹, M. Hajdúch³

¹Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i.

²Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

³Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, 2. Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Pseudallescheria boydii je běžná vláknitá houba ohrožující zejména imunosuprimované pacienty. Až 70% případů je letálních zejména proto, že se onemocnění na první pohled jeví jako aspergilóza. *P. boydii* je však rezistentní k terapii Amfotericinem B. Proto je potřeba nalézt způsob včasné diagnostiky, který by umožnil efektivní terapii. V roce 2006 naše laboratoř prezentovala zachycení produkce jedinečného cyklického peptidu lasovité struktury. Tato molekula je produkována kmenem CCF 3082, který byl původně izolován z nosní dutiny psa s chronickým onemocněním horních cest dýchacích. Cyklický peptid o molekulové hmotnosti 739 g/mol byl původně považován za možný diagnostický marker infekce *P. boydii*. Následná analýza sbírkových kmenů *P. boydii* a jejího anamorfu *Scenedosporium apiospermum* nepotvrdila specifitu peptidu pro celý rod. In vitro kultivace nicméně naznačují produkci odvozených případně dalších jedinečných molekul. Pro vybraných 15 kmenů byly zaznamenány profily malých molekul, které byly zachyceny extrakcí media po in vitro kultivaci pomocí kapalinové chromatografie - hmotnostní spektrometrie. Velké množství dat bylo zpracováno metodou analýzy hlavních komponent (PCA). Tato studie naznačila několik kandidátních signálů, které byly přítomny u všech kmenů a tudíž by mohlo jít o potenciální biomarkery. Pro analýzu klinických izolátů byl navržen nový iontový zdroj - desorpční elektrosprej (DESI) a byl implementován na iontový

cyklotronový hmotnostní spektrometr s Fourierovou transformací (FT-ICR, Bruker APEX Q, 9,4T). Tento systém umožňuje přímou analýzu solidních vzorků bez nutnosti složitějšího zpracování. Zároveň je vyvíjena technika zobrazovací hmotnostní spektrometrie s využitím MALDI (Matrix assisted laser desorption/ionisation). Data získaná po kultivaci in vitro budou porovnána s daty pořízenými pomocí DESI a MALDI imagingu klinických vzorků.

DNA MICROARRAY ANALYSIS OF LOCALLY ADVANCED RECTAL ADENOCARCINOMAS: PREDICTION OF SENSITIVITY TO NEOADJUVANT CHEMORADIOOTHERAPY.

Garajova I., Svoboda M., Slaby O., Krejci E., Kocaková I., Bednariková M., Seř R., Ruzickova J., Hoch J., and Vyzula R.
Dpt. of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno;
Dpt. of Pathology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno;
Dpt. Of Surgical Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno;
Dpt. of Radiation Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno;
Masaryk University, Medical School, Brno;
Dpt. of Surgery, 2nd Medical School, Charles University in Prague, all in Czech Republic.

PURPOSE: Rectal cancer prognosis is favorable for surgically cured patients. To allow radical surgery removal of locally advanced rectal adenocarcinomas (LARA), neoadjuvant chemoradiotherapy is performed to reduce of tumor volume. This practice also increase a feasibility of sphincter-sparing surgery. Unfortunately, not all patients, who underwent neoadjuvant chemoradiotherapy gain its benefits. Molecular characterization of sensitive or resistant patients should assist to oncologists in treatment decision by selecting those patients who will respond to neoadjuvant chemoradiotherapy, and who not. Patients who do not respond can be spared from toxicity, time, and expense associated with the treatment. The aim of our study was to identify differences in gene expression profiles of LARA treated with neoadjuvant chemoradiotherapy.

METHODS: Eleven patients (pts) with LARA treated with neoadjuvant chemoradiotherapy based on fluoropyrimidines (fluorouracil or capecitabine) were included in our pilot study. Response to the therapy was determined on both level, 1. clinically (TNM) by trans-rectal ultrasonography and CT or MRI before and after therapy, and 2. histopathologically by TRG-scoring system (tumor regression grade from 1 to 5) according to Mandard (Cancer 1994). Analyzed patients were divided into two groups: 1. Responders "R" (TRG1-2 and clinical downstaging), and 2. Non-Responders "NR" (TRG4-5, no/minimal downstaging). Tumor biopsies were obtained before initiation the therapy and stored in RNAlater. RNA was extracted from each specimen and relative gene expression levels of 440 genes known to be involved in cancer biology were obtained by low-density oligonucleotide microarrays.

RESULTS: Gene expression data analysis based on SAM (Significance Analysis of Microarrays) and t-test methods identified 7 genes (anti-apoptotic lipocalin 2, oncogene JUNB, cell cycle regulator RB1, p53-binding protein MDM4, calnexin, peroxisome proliferator-activated receptor delta PPARD, mu-

cin-like adhesion molecule CD24) with significantly upregulated expression in primary tumors of "NR". In subsequent cluster analysis this group of genes was able to discriminate "R" and "NR".

CONCLUSION: Our preliminary data suggest that low-density oligonucleotide microarray technology should contribute to a better understanding of rectal cancer resistance at molecular level and facilitate prediction of tumor response to neoadjuvant chemoradiotherapy.

Supported by IGA MZ CR NR/9076–4.

8. Prognostické a prediktivní faktory III.

Předsedající: Ehrmann J., Drábek J.

Čtvrtek 29.11.2007 - 17.15-18.55

PREDIKTIVNÍ FAKTORY ODPOVĚDI NÁDORU A TOXICITY OKOLNÍCH TKÁNÍ NA IONIZAČNÍ ZÁŘENÍ.

Hajdúch M.

Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice a Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Ionizační záření se využívá v léčbě lidských maligních onemocnění od počátku 20. století. Do dnešní doby se většina inovací v oblasti radioterapie zaměřila na optimalizaci dávkového schématu, způsobu doručení terapeutické dávky do nádoru a technologickému zlepšení fyzikální podstaty ozařovacího plánu. Naproti tomu zůstala řada poznatků o molekulární podstatě DNA poškození a jeho opravách doposud nevyužita v klinické praxi. V přednášce bude diskutována podstata DNA poškození, způsoby jeho opravy, perspektivy ve využití těchto poznatků pro vývoj nových modulatorů a cílů kombinované chemo-radiační léčby. Zvláštní pozornost bude věnována syndromům DNA instability, které jsou predispoziční ke vzniku nádorů. Intenzivní protinádorová léčba takto postižených pacientů založená na postupech indukujících DNA poškození může vést k závažné toxicitě s letálními následky. Včasné rozpoznání těchto syndromů v klinické praxi pak umožňuje redukcí protinádorové léčby s odpovídající redukcí toxicity a nezmenšeným protinádorovým účinkem. Cílem našeho společného snažení by měla být vyšší integrace nejnovějších poznatků z oblasti molekulární podstaty DNA poškození do klinické praxe.

Podpořeno projekty: NR/9076, LC07017 a MSM6198959216.

MODERNÍ MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ PŘÍSTUPY KE STANOVENÍ PROGNÓZY U PACIENTŮ S KOLOREKTÁLNÍM KARCINOMEM.

^{1,4}Slabý O., ^{2,4}Garajová I., ^{2,4}Svoboda M., ¹Fabian P., ³Berkovcová J., ³Srovnal J., ¹Šmerdová T., ⁴Sobková K., ⁴Mikulenka P., ^{2,4}Vyzula R.

¹Masarykův onkologický ústav, Oddělení klinické a experimentální patologie, Brno,

²Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno,

³Fakultní nemocnice Olomouc, Dětská klinika, Laboratoř experimentální medicíny, Olomouc,

⁴Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Kolorektální karcinomy (KRK) patří v České republice k nejčastějším nádorovým onemocněním. V léčbě tohoto onemocnění i přes vzrůstající náklady není dosahováno uspokojivých výsledků. Jedním z důvodů je skutečnost, že pacienti v klinickém stádiu II (pT3-pT4, pN0) a III (pT2-pT4, pN+) po absolvování chirurgického zákroku není možné s dostatečnou senzitivitou rozdělit na skupinu s vysokým a nízkým rizikem relapsu onemocnění a následně pro ně vytvořit individuální léčebný plán. Přibližně 20-30% pacientů v klinickém stádiu II umírá do pěti let na progresi onemocnění, protože nebyli na základě současně používaných diagnostických kritérií vyhodnoceni jako riziková z hlediska progresu onemocnění a

nedostali potřebnou adjuvantní chemoterapii. U pacientů v klinickém stádiu III (k progresi dochází přibližně u 50%) je situace opačná. Naprostá většina pacientů po chirurgickém zákroku absolvuje adjuvantní chemoterapii, přestože celkové přežití významně zlepšuje pouze u 10-20% těchto pacientů a ostatní prochází zatěžující chemoterapeutickou léčbou bez zřetelného benefitu. Tyto skutečnosti mají samozřejmě význam také z hlediska farmakoekonomiky. Je tedy zřejmé, že současná kritéria pro stanovení prognózy u pacientů v klinickém stádiu II a III nemá z hlediska predikce relapsu a celkového přežití dostatečnou informativní hodnotu. Racionální přístup k indikaci adjuvantní léčby nabízí molekulární charakterizace vysoce rizikové podskupiny napříč pacienty v obou klinických stádiích pomocí technologie DNA čipů. Tento přístup je založen na předpokladu, že pozdější vysoce invazivní a metastatický fenotyp kolorektálních karcinomů je detekovatelný již v primárních karcinomech pacientů s lokoregionálním postižením tj. v klinickém stádiu II a III. Detekce tohoto specifického molekulárního profilu by v budoucnu mohla sloužit k individualizaci terapie u pacientů s kolorektálním karcinodem. Srovnatelnost a reprodukovatelnost DNA čipových studií je naneštěstí ovlivněna jejich technologickou rozmanitostí (především u prací staršího data) a výsledky, kterých bylo pomocí nich dosaženo nelze v současnosti považovat za konkluzivní. Cílem naší přednášky je seznámit posluchače se současnými možnostmi molekulární biologie v prognostice kolorektálního karcinomu, shrnout výsledky nejvýznamnějších DNA čipových studií z této oblasti a představit výsledky studie, která byla vypracována na Masarykově onkologickém ústavu v Brně ve spolupráci s Laboratoří experimentální medicíny v Olomouci.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9076 – 4, výzkumným záměrem MZ0MOU2005 a MSM 6198959216.

KONVENČNÍ OSTEOSARKOM DOSPĚLÉHO VĚKU - PREDIKTIVNÍ FAKTORY V KLINICKÉ PRAXI.

D. Adámková Krákorová, D. Brancíková, O. Bednařík, K. Veselý

Oddělení klinické a radiační onkologie, KOC I. patologicko-anatomický ústav Fakultní nemocnice U sv. Anny v Brně, Pekařská 53

Úvod: Osteosarkom je maligní sarkom charakterizovaný přímou tvorbou kosti nebo osteoidní tkáně nádorovými buňkami. Nádor je vysoce maligní, šíří se lokálně dřeňovou dutinou, dochází k invazi do okolních měkkých tkání a k časnému hematogennímu rozsevu především do plic, kostí. Patří mezi relativně vzácná onemocnění, představuje méně než 1 % ze všech zhoubných nádorů s incidencí 1-3 pacienti ročně na 1 milión obyvatel. Křivka jeho výskytu má bimodální charakter, první vrchol je ve 2. a 3. dekádě života, druhý vrchol po 6. dekádě. Léčba osteosarkomů by měla být vedena v centrech, která se touto problematikou zabývají a je v zásadě multimodální. Je kladen důraz na maximálně agresivní

předoperační chemoterapii s následným chirurgickým řešením, histopatologickým hodnocením odpovědi nádoru případně metastáz na předoperační chemoterapii, dle které následuje volba typu pooperačního zajištění chemoterapií. Histopatologická odpověď nádoru na předoperační chemoterapii je faktorem důležitým pro přežití, výskyt systémových metastáz i lokoregionálních recidiv. Kontraverze: Dříve umíralo do 2 let od stanovení diagnózy téměř 100 % nemocných, v 70. letech 20. století se uvádělo 5-ti leté přežití mezi 20-30 %, zavedením agresivní chemoterapie u primárně lokalizovaných osteosarkomů, sestávající z kombinací HD MTX, DDP, ADM, IFO, udávají dnes specializovaná centra dlouhodobé přežití až 80 %. U primárně metastatických osteosarkomů nepřevyšuje 5-ti leté přežití i po agresivní terapii včetně resekce MTS 50-ti %. Proto pokračuje hledání nových účinných látek a léčebných postupů, zkouší se i eskalace dávek užívaných cytostatik, což zvyšuje riziko jejich toxických účinků. Metastatické postižení v době stanovení diagnózy, tumor velkého objemu, vyšší věk, zvýšené hladiny LDH a ALP před započetím léčby, postižení axiálního skeletu, mužské pohlaví, histologický podtyp osteosarkomu a histopatologická odpověď nižší než 90% nektrózy po neoadjuvantní chemoterapii je spojována s horším přežitím. Dosud nejsou známy validní markery či metody, které by byly schopny v době stanovení diagnózy predikovat, který pacient bude na léčbu odpovídat dobře a který hůře. Jejich nalezení by mohlo pomoci upřesnit tailoring léčby jednotlivých pacientů a mít tím přímý dopad v klinické praxi. Soubor pacientů a metody: Součástí sdělení budou výsledky souboru pacientů léčených na Oddělení klinické a radiční onkologie FN u sv. Anny v Brně (2003-2006), u kterých jsme se zaměřili na stanovení overexprese HER-2/neu a mutace TP 53 genu v době stanovení diagnózy a jejich korelaci s histopatologickou odezvou na předoperační chemoterapii. Závěr: Ani HER2/neu overexprese ani mutace TP 53 genu neměly zásadní význam pro biologii high grade osteosarkomu u pacientů v našem souboru. Naše závěry jsou v souladu s daty publikovanými v poslední době. Zásadním prediktivním faktorem v klinické praxi tedy zatím zůstává pouze histopatologické hodnocení odpovědi nádoru na předoperační chemoterapii, tedy určení procenta nektrózy.

LÉČBA DASATINIBEM U NEMOCNÝCH S CML REZISTENTNÍCH NA IMATINIB: TEST SENSITIVITY LEUKEMICKÝCH BUNĚK PACIENTŮ NA INHIBITORY KINÁZ IN VITRO A IN VIVO.

¹R. Solná, ¹J. Veselovská, ²M. Jarošová, ²Š. Rožmanová,

²M. Holzerová, ²E. Faber, K. ²Indrák, ¹V. Divoký

¹Ústav biologie, LF UP Olomouc;

²Hemato-onkologická klinika, FN a LF UP Olomouc

Chronická myeloidní leukémie (CML) je charakterizována přítomností abnormálního fúzního genu BCR-ABL, který kóduje konstitutivně aktivní Bcr-Abl tyrozinkinázu. Deregulovaná aktivita této tyrozinkinázy je nezbytná a dostačující pro nádorovou transformaci buňky, je tedy ideálním cílem farmakoterapie. Specifické inhibitory kináz patří mezi velmi účinná a moderní léčiva s nízkou toxicitou u CML.

V naší laboratoři se zabýváme studiem mechanismů rezistence nemocných s CML na léčbu těmito inhibitory registrovanými v ČR tj. imatinibem (specifický a selektivní inhibitor Bcr-Abl kinázy) a dasatinibem (duální inhibitor, který

kromě Bcr-Abl kinázy inhibuje také Src kinázy). Zvýšená aktivace (fosforylace) Src kináz je asociovaná s progresí onemocnění, s blastickými krizemi a s rezistencí na léčbu. Testujeme citlivost leukemických buněk na tyto inhibitory u klinicky rezistentních nemocných. Leukocyty nemocného inkubujeme s inhibitory kináz in vitro. Účinnost inhibitorů posuzujeme podle inhibice fosforylace (aktivace) molekuly Crkl (specifický substrát Bcr-Abl kinázy) a inhibice fosforylace Src kináz. Metoda využívá western blotting s imunodetekcí. Na souboru několika kasuistik představíme výsledky testů inhibice fosforylace a jejich korelace s klinickým průběhem onemocnění. In vitro test sensitivity leukemických buněk na inhibitory kináz (resp. test inhibice fosforylace Crkl, Src kináz) je funkčním testem na buněčné úrovni. Lze jej využít vedle standardního cytogenetického vyšetření a mutační analýzy Abl kinázové domény k rozlišení mechanismů rezistence u nemocných s CML a přispět tak významnou měrou k rozhodování o léčbě.

Podpořeno projekty MSM 6198959205 a MSM 6198959216.

ANALYSIS OF VEGF, FLT-1, FLK-1, AND NESTIN IN RELATION TO ASTROCYTOMA PATHOGENESIS.

Hlobilkova A., Ehrmann J., Knizetova P. and Kolar Z.

Laboratory of Molecular Pathology and Department of Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Hnevotinska 3, Olomouc, CZ-775 15, Czech Republic, hlob@tunw.upol.cz

Because of important role of angiogenesis in astrocytoma pathogenesis and progression, our immunohistochemical study assessed vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors (Flk-1, and Flt-1) expression in these tumours. Nestin is an intermediate filament protein expressed in neural stem cells, taking part in central nervous system (CNS) and CNS-derived tumours development. We investigated significance of VEGF, its receptors, and nestin expression in endothelial cells and in tumour astrocytes in correlation with tumour grade. The CD34 was used as a marker of endothelial cells in newly formed blood vessels. We used paraffin embedded astroglial tumour samples from 69 patients, which were divided into low grade astrocytomas (grade I-II) 32 samples and high grade astrocytomas (grade III-IV) 37 samples. Mouse monoclonal antibodies against VEGF, Flk-1, nestin, CD34 and rabbit polyclonal serum against Flt-1 were used, followed by standard indirect immunohistochemical method with Envision plus kit. A microwave generator was used for antigen retrieval. Both receptors, Flt-1 and Flk-1, were expressed in cytoplasm of tumour astrocytes and any significant differences were found between low and high grade groups. Expression of VEGF in cytoplasm was increased in high grade group with level of significance 0.026. Nestin expression was found in cytoplasm of tumour astrocytes as well as endothelial cells. The level of its expression in both, tumour and endothelial cells, increased in high grade group with level of significance 0.007 and 0.003. Higher expression of VEGF, observed in high grade astrocytomas, might subsequently activate both PI3 K/PKB/Akt and MAPK pathways and participate on aggressiveness of tumours. Results concerning nestin detection indicated its possible role in tumour vascular development. Based on expression of nestin in tumour astro

cytes we can deduce that nestin could also play a role in regulation of astrocytic proliferation.

This work was supported by grant IGA MZ CR NR/7828-3, IGA MZ CR NR/8370-3 and MSM 6198959216.

ANALÝZA MOŽNÝCH PREDIKTORŮ MOZKOVÝCH METASTÁZ U PACIENTŮ S NEMALOBUNĚČNÝM KARCINOMEM PLIC POMOCÍ TKÁŇOVÝCH A CDNA MIKROEREJÍ.

J. Škarda¹, S. Israeli⁵, H. Gilberg-Rashi⁵, E. Fridman⁴, E. Ofek-Moravsky⁴, J. Kopolovic⁴, V. Koleč³, J. Klein², Z. Kolář¹

¹Ústav patologie a laboratoř molekulární patologie LF a FN Olomouc,

²1. Chirurgická klinika LF a FN Olomouc,

³Klinika tuberkulózy a respiračních nemocí LF a FN Olomouc,

⁴Department of Pathology, The Chaim Sheba Medical Center and Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel-Aviv, Israel,

⁵Sheba Cancer Research center, Tel Hashomer, Israel

Cílem naší práce bylo analyzovat geny kódující transmembránové sekretorické proteiny, které jsou selektivně up-regulovány u mozkových metastáz nemalobuněčných plicních karcinomů. Uvedené geny byly detegovány pomocí cDNA mikroerejí z nádorových buněk selektovaných pomocí laserové mikrodisekce. K verifikaci biologické a prediktivní role proteinů, které jsou kódovány uvedenými geny byla použita imunohistochemická analýza vzorků primárních plicních i karcinomů a jejich mozkových metastáz na standardních parafinových řezech a pomocí tkáňových mikroerejí. Bylo zjištěno, že geny kódující metaloproteázy jsou signifikantně up-regulovány v mozkových metastázách a v primárních plicních nádorech u pacientů s mozkovými metastázami. Prognostický význam některých nových metaloproteáz byl ověřen na souborech pacientů s nemalobuněčným karcinodem plic.

IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE SDF-1 V MALIGNÍCH I BENIGNÍCH KOŽNÍCH MELANOCYTÁRNÍCH LÉZÍCH.

¹Brychtová S., ¹Bezděková M., ²Tichý M. jr., ³Hirňák J., ⁴Beneš P., ⁵Brychta T.

¹Laboratoř molekulární patologie, Ústav patologie, LF UP a FN Olomouc,

²Klinika chorob kožních a pohlavních LF UP a FN Olomouc,

³Klinika plastické chirurgie LF UP a FN Olomouc,

⁴Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc,

⁵Interní a diabetologická ambulance, SPEA s.r.o, Olomouc

Chemokin CXCL12, známý také jako SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), je protein, který reguluje chemotaxi lymfocytů, monocytů a dendritických buněk. SDF je různou měrou exprimován ve stromálních buňkách (zejména fibroblastech a endoteliích) i nádorových tkáních, kde může přispívat k progresi tumorů ovlivněním buněčné proliferace, migrace a regulací imunitní odpovědi na nádorové antigeny. V poslední době se zdůrazňuje jeho role jako modulátoru nádorové angiogeneze, kde se předpokládá jeho synergický

efekt na VEGF zprostředkovanou expanzi vaskulárních endoteliálních buněk a naopak inhibiční efekt na apoptózu. Expres chemokinu se však u různých typů maligních nádorů významně liší, zvýšené hladiny byly detekovány například u plicních, kolorektálních a ovariálních karcinomů, zatímco nízká exprese je popisována u spinocelulárních karcinomů dutiny ústní. Cílem naší studie bylo hodnocení exprese SDF-1 u primárních kožních melanomů ve srovnání s kontrolní skupinou benigních pigmentových névů a její porovnání s expresí vaskulárních růstových faktorů (VEGF, VEGF-C). Pomocí nepřímé imunohistochemie na parafinových řezech jsme vyšetřili soubor 22 maligních melanomů a 22 pigmentových névů s použitím primárních protilátek anti-SDF-1 (RD Systems, klon 79018, ředění 1:100), anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, klon C-1, ředění 1:50) a anti-VEGF-C (Santa Cruz Biotechnology, klon N-19, ředění 1:50). Prokázali jsme významně nižší expresi SDF-1 v maligních buňkách ve srovnání s benigními melanocyty. Protein byl rovněž detekován ve stromálních fibroblastech a endoteliích, bez signifikantních rozdílů mezi benigními a maligními lézemi. Nebyla prokázána souvislost mezi SDF-1 a expresí VEGF nebo VEGF-C. Závěr: Na základě získaných výsledků předpokládáme, že pozorovaná nižší exprese proteinu u maligních melanoblastů by mohla souviset s nedostatečnou imunitní reakcí proti nádoru. Dále se ukazuje, že nádorová angiogeneze je na expresi tohoto proteinu pravděpodobně nezávislá. Práce na tomto projektu je podporována grantem MSM6198959216.

9. PATOGENEZE A PREDIKTIVNÍ FAKTORY HEMATOLOGICKÝCH MALIGNIT.

Předsedající: Haškovec C., Mihál V.

Pátek 30.11.2007 - 8.30-10.05

UPLATNĚNÍ GENOMIKY (MOLEKULÁRNÍ GENETIKY) V ONKOHEMATOLOGII.

C. Haškovec, J. Polák, J. Moravcová, Z. Siegllová, H. Klamová, J. Schwarz

Ústav hematologie a krevní transfuze, U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2. haskovec@uhkt.cz

Onkohematologie je výborným příkladem uplatnění genomiky (molekulární genetiky) v onkologii. Poskytuje nám nejen informace pro pochopení vzniku těchto nemocí, ale dává i účinné nástroje pro stanovení diagnózy, prognózy a monitorování rezidální nemoci u leukemických a některých dalších pacientů. Umožňuje i cílenou léčbu, např. BCR/ABL - pozitivních pacientů inhibitory tyrozinových kináz, nebo promyelocytárních pacientů retinovou kyselinou. Přítomnost některých genů, nebo jejich mutací, pomáhá k zařazování pacientů do rizikových skupin a určuje tak terapii "šitou na míru" dané rizikové skupině. Molekulární markery, ať už specifické, nebo nespecifické, jsou užívány pro monitorování reziduální choroby. Molekulární identifikace nárůstu leukemického klonu - molekulární relaps - dává informaci pro znovuzahájení léčby pacienta v době, kdy se nachází ještě v hematologické remisi a umožňuje tak předcházet hematologickému a klinickému relapsu. Toto je několik příkladů uplatnění genomiky v léčbě onkohematologických pacientů. Podpořeno VZ 00023736.

STANOVENÍ EXPRESE ZAP-70 METODOU KVANTITATIVNÍ CYTOMETRIE, KORELACE S MUTAČNÍM STAVEM IGVH A EXPRESÍ CD38 U PACIENTŮ S DIAGNÓZOU B-CLL.

¹Klabusay M., ¹Heidekerová M., ²Trbušek M., ¹Hrabčáková V., ²Kuhrová V., ¹Brychtová Y., ²Mayer J.

¹Laboratoř flow cytometrie a celulární terapie, IHOK, FN Brno,

²Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK, FN Brno

Chronická lymfatická leukémie (B-CLL) je nejčastějším typem leukémie dospělých. Klinický průběh tohoto onemocnění je různý a prognóza kolísá od dlouhodobého přežívání nemocných bez nutnosti protinádorové terapie k časně a rychlé progresi choroby. V současnosti jsou hledány nové prognostické znaky, které by přispěly k lepšímu zhodnocení rizika progresu nemoci u jednotlivých pacientů a reflektovaly biologický původ patologických lymfocytů. Přesná prognostická stratifikace pacientů je nezbytná ke stanovení správné taktiky a intenzity léčby. Přesnější stratifikaci umožňují moderní markery, např. stanovení mutačního stavu pro variabilní části těžkých řetězců imunoglobulinů (IgVH), exprese proteinu ZAP-70 a CD38. Analýza ZAP-70 a CD38 se provádí flow cytometricky, běžně používané metodiky jsou však zatíženy řadou technických problémů. V naší laboratoři jsme u 250

pacientů hodnotili expresi ZAP-70 a CD38 nově vypracovanou metodou kvantitativní cytometrie a korelovali nálezy tohoto vyšetření s dalšími prognostickými znaky (mutační status lokusu IgVH, exprese CD38). Použití kvantitativní cytometrie umožní odstranit dosavadní technické nedostatky ve stanovení ZAP-70 a metodu standardizovat.

Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR9023-3.

ZKŘÍŽENÁ REZISTENCE NA GLUKOKORTIKOIDY U AKUTNÍ LYMFOLASTICKÉ LEUKÉMIE DĚTÍ.

Mihál V., Radová L., Novák Z., Pospíšilová D., Hajdúch M.

Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci; Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci

Ve všech stávajících léčebných protokolech pro léčbu dětské ALL jsou kortikosteroidy nezastupitelnou součástí čtyřtýdenní indukční léčby. V BFM protokolech již více než 20 let využíváme jednoduché kritérium odpovědi pacientů na prednison (PGR vs PPR) osmý den léčby, které využíváme při stratifikaci pacientů do rizikových skupin. Pro přesnější rozdělení pacientů dle rizika recidivy jsou postupně zaváděny další časové etapy hodnocení časně odpovědi na léčbu. Kortikoidy jsou jedním z nejdůležitějších léků léčebného arzenálu pro dětskou ALL. Lýza (apoptóza) leukemických buněk je iniciována vazbou steroidů na skupinu steroidních receptorů. Steroidy s charakterem glukokortikoidů mají vyšší protinádorovou aktivitu než steroidy s mineralokortikoidní aktivitou. Mezi ně zahrnujeme zejména prednison (nebo prednisolone) a dexametason a méně často metylprednisolon a cortivazol. V in vivo a in vitro testech byla nedávno potvrzena relativně vysoká zkřížená rezistence na kortikoidy. Vyšší dávka kortikoidů jako jedna z cest jak tuto rezistenci překonat je diskutována do dnešních dnů.

Autoři předkládají literární rešerši výše uvedené problematiky a komentují některé neobvyklé léčebné přístupy se zajímavým terapeutickým dopadem. Na souboru 125 dětí s diagnózou ALL dokumentují významnou (32 %) in vitro zkříženou rezistenci na kortikoidy (prednison vs dexametason) prokázanou MTT testem. Autoři diskutují možné léčebné zohlednění fenoménu zkřížené rezistence na kortikoidy při přípravě nových léčebných protokolů a o využití nových genomických a proteomických technologií v diagnostice steroid rezistentních leukémií.

Podpořeno projekty: LC07017 a MSM6198959216

ANALÝZA MUTACE JAK2 V617F A MORFOLÓIE KOSTNEJ DRENE V TREPANOBIOTICKÝCH VZORKÁCH MORFOLOGICKY A KLINICKY VERIFIKOVANEJ PRAVEJ POLYCYTÉMIE.

¹T. Burjanivová, ¹J. Marcinek, ²Z. Lasabová, ¹P. Szépe,

¹T. Balhárek, ²A. Vaňochová, ¹L. Plank

¹Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum biopcticej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a MFN v Martine,
²Ústav molekulovej biológie JLF UK v Martine

Polycythemia vera (PV) patrí do skupiny Ph1 negatívnych myeloproliferatívnych ochorení (MPO), pri ktorých pozorujeme častý, avšak nešpecifický výskyt mutácie JAK2 V617F. Aj preto biopctické vyšetrenie kostnej drene (KD) stále v diferenciálnej diagnostike Ph1- MPO zohráva dôležitú úlohu. V najnovšie pripravovanej WHO klasifikácii je prítomnosť mutácie V617F považovaná za tzv. „veľké“ a typický morfológický obraz PV za tzv. „malé“ kritérium ochorenia. Na našom pracovisku sme za 3 roky vyšetřovali biopsie KD 68 pacientov, v ktorých morfológický obraz zodpovedal, alebo čiastočne pripúšťal dg. PV. Dotazníkovou formou sme požiadali príslušné klinické pracoviská o ich záverečnú diagnózu, ktorú sme obdržali v 43 prípadoch, pričom 33x bola potvrdená nami stanovená dg. PV a 10x boli klinicky stanovené iné typy MPO. Mutáciu V617F sme vyšetřovali v DNA izolovanej z parafrínových blokov KD metódou alelovo-špecifickej hot start multiplex PCR u všetkých 68 pacientov. V pozitívnych prípadoch sme pokračovali v reštrikčnej analýze s enzýmom BsaXI, čo umožnilo nielen potvrdiť prítomnosť mutácie, ale aj identifikovať jej homozygótnu, resp. heterozygótnu formu. V prípadoch negatívnych na výskyt mutácie V617F sa v súčasnosti pokúšame detekovať prítomnosť mutácie v exóne 12 pomocou alelovo-špecifickej PCR. Okrem mutačných analýz sme v skupine klinicky verifikovanej PV (n=33) analyzovali histomorfologický obraz pomocou štandardného panelu histologických a histochemických farbení KD. Mutácia JAK2(V617F) bola zistená prítomná u 60 pacientov (88%), z toho 33x (45%) v heterozygótnej a 27x v homozygótnej forme. 6 prípadov bolo negatívnych a v 2 prípadoch kvalita DNA neumožnila posúdiť prítomnosť mutácie. V skupine aj klinicky potvrdenej PV sme identifikovali 13x heterozygótnu, 17x homozygótnu formu mutácie a 2x negativitu, pričom v 23 prípadoch morfológický obraz plne zodpovedal diagnostickým kritériám PV. Tak v tejto skupine, ako aj v ostatných prípadoch sme často pozorovali prítomnosť atypických a pre PV netypických morfológických znakov (fibróza KD, tesné zhluky, dysplázie či atypická morfológia megakaryocytov), avšak tieto sa vyskytovali prevažne vo vyšetřeniach realizovaných po dlhodobom sledovaní či terapii ochorenia. Napriek značnej degradácii DNA izolovanej z parafrínových rezov sme schopní úspešne detekovať mutáciu JAK2, a to vrátane rozlišovania homozygótnej a heterozygótnej formy mutácie, čo umožňuje jednak analýzu archívneho materiálu, ako aj využitie v rutinej diagnostike MPO. Možno konštatovať, že biopctické vyšetřenie KD má stále dôležité miesto tak pri potvrdení diagnózy PV, ako aj pri diferenciálnej diagnostike, pričom pre adekvátnu interpretáciu morfológie KD je nevyhnutná dostatočná znalosť relevantných klinických údajov. Podporené grantom UK 84/2007 a ESF – Inkubátor doktorandov na JLF UK.

PROGNOSTICKÝ VÝZNAM MUTAČNÍHO STAVU GENU TP53 U PACIENTŮ S B-BUNĚČNOU CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIÍ – VÝZNAM MONITOROVÁNÍ OBOU ALEL.

Malčíková J.^{1,2}, Šmardová J.³, Čejková S.^{1,2}, Kuglík P.⁴, Brychtová Y.², Doubek M.², Dvořáková D.^{1,2}, Mayer J.², Pospíšilová Š.^{1,2}, Trbušek M.^{1,2}

¹Centrum molekulární biologie a genové terapie,

²Interní hematologická klinika

³Ústav patologie

⁴Oddělení lékařské genetiky Fakultní Nemocnice Brno, Černopolní 9

B-buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL) je maligní onemocnění s heterogenním klinickým průběhem postihující starší populaci. Mezi významné prognostické markery patří prítomnost aberací v genu TP53, vyskytující se u 10-15 % pacientů. Nádorový supresor p53 je klíčovým regulátorem buněčného cyklu a apoptózy. Prítomnost aberací genu TP53 vede u B-CLL pacientů k agresivnějšímu průběhu onemocnění a k rezistenci na terapii. Gen TP53 bývá ve většině případů inaktivován delecí jedné a mutací druhé alely, ovšem vyskytují se též samostatné delecce či mutace bez poškození druhé alely. Rozdíl v prognóze pacientů nesoucích inaktivaci obou alel a pacientů s poškozením jedné alely není dosud objasněn. Cílem naší studie bylo stanovení prítomnosti jednotlivých aberací (delece, mutace, kombinace obou) v genu pro p53 u pacientů s B-CLL a sledování jejich vlivu na průběh onemocnění a potřebu léčby. Delece v lokusu TP53 (17p13.1) byly detekovány interfázni FISH a mutace v genu byly vyhledávány pomocí kvasinkové funkční analýzy FASAY s následnou sekvenací templátů z kvasinkových kolonií nesoucích mutovaný TP53 gen. Z 360 vyšetřovaných B-CLL pacientů byly u 12% nalezeny patologické změny v genu TP53. Většina pacientů s TP53 aberacemi (58%) měla kompletní inaktivaci obou alel (kombinace delece/mutace), ovšem poměrně velká skupina pacientů nesla samostatné delece (16%) nebo mutace 26%. Pacienti s inaktivací obou alel vykazovali nejhorší prognózu: 96% vyžadovalo chemoterapii, třetina z nich zemřela do dvou let od diagnózy a v této skupině pacientů bylo také nejkratší celkové přežití. Oproti tomu u pacientů s abnormalitami jedné alely byla nutnost léčby výrazně nižší (65%), žádný z nich do dvou let od diagnózy nezemřel a jejich celkové přežití se statisticky nelišilo (p = 0,21) od pacientů bez TP53 abnormalit. Analýza statusu obou alel genu TP53 je u pacientů s B-CLL přínosná, neboť korelace mezi výskytem delecí a mutací v genu TP53 není absolutní, značná část pacientů nese inaktivaci jen jedné alely (samostatné delece nebo mutace) a tito pacienti mají lepší prognózu než pacienti s inaktivací obou alel.

Tato práce je podporována granty IGA MZ ČR NR8445-3/2005, NR8448-3/2005, NR9293-3, NR9305-3 a MŠMT ČR MSM0021622430

SLEDOVÁNÍ EXPRESE VYBRANÝCH GENŮ U PACIENTŮ S B-BUNĚČNOU CHRONICKOU LYMFOCYTÁRNÍ LEUKÉMIÍ – ZÁCHYT ZMĚNY LEUKEMICKÉHO KLONU VLIVEM TERAPIE.

Kotašková J.¹, Francová H.¹, Kuhrová V.¹, Doubek M.², Brychtová Y.², Dvořáková D.¹, Mayer J.^{1,2}, Pospíšilová Š.¹

¹Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK FN Brno

²Interní hematologická klinika FN Brno



B-buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL) je lymfoproliferativní onemocnění charakterizované monoklonální expanzí zralých B-lymfocytů. Stanovení mutačního statusu genu pro variabilní oblast těžkého řetězce imunoglobulinu (IgVH) umožňuje identifikovat leukemický klon B-buněk a současně stratifikuje pacienty do dvou prognosticky odlišných skupin. Pacienti s nemutovaným genem pro IgVH (nukleotidová homologie se zárodečnou linií větší než 98%) mají kratší dobu přežití (8 vs 25 let). Mutační status IgVH u B-CLL buněk zůstává neměnný během celého onemocnění a jeho vyšetření není nutné opakovat. Detekce přítomnosti pacient-specifického klonu se navíc s úspěchem využívá při sledování zbytkové choroby. Na základě výsledků vlastních DNA čipových analýz B-CLL buněk byl vytipován set genů, jejichž rozdílná míra exprese koreluje s mutačním statusem genu pro IgVH. Exprese vybraných genů (LAG3, LPL, ZAP70, CLLU1 a ADAM29) byla sledována u souboru 120 pacientů. Diskrepantní případy byly následně podrobeny detailnější analýze. V jednom z případů byl B-CLL klon opakovaně charakterizován jako IgVH mutovaný, zatímco exprese námi vybraných markerů odpovídala nemutovanému IgVH. Následná fragmentační analýza potvrdila minoritní přítomnost dalšího B-CLL klonu s nemutovaným genem pro IgVH. Klasický způsob stanovení mutačního statusu IgVH pomocí PCR nebyl v tomto případě dostatečně citlivý. Fragmentační analýza dále ukázala, že vlivem terapie u pacienta došlo k potlačení původně dominantního klonu s mutovaným IgVH a k postupné progresi klonu s nemutovaným IgVH. Sledování zbytkové choroby cílené na původní klon přestává být v tomto případě relevantní. Monitorování exprese vybraného setu genů může doplnit sledování pacientů po terapii, zaznamenat eventuální změny v mutačním statusu IgVH a případně indikovat opakovanou detailní charakterizaci dominantního B-CLL klonu.

Tento projekt je podporován grantem IGA MZ ČR NR8443-3/2005, výzkumným záměrem MŠ MT ČR MSM0021622430 a NF Elpida Nukleus.

10. KARCINOGENEZE A TOXIKOLOGIE PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV.

Předsedající: Bártek J., Hajdúch M.

Pátek 30.11.2007 - 10.25-11.45

MOLECULAR BASIS OF DNA DAMAGE SIGNALING AND ITS DEFECTS IN HUMAN BREAST CANCER.

Bártek J.

Kodaň, Olomouc

CHROMOSOMAL ABERATION IN RELATION TO *hOGG1* GENE POLYMORPHISM IN CHROMIUM EX- POSED INDIVIDUALS.

E. Halašová¹, T. Matáková², L. Mušák^{1,3}, J. Valachová³, V. Poláková⁴, J. Slýšková⁴, I. Poliaček⁷, M. Šváchová⁸, E. Bukovská¹

¹Ústav lékařské biologie, Univerzita Komenského v Bratislavě, Jesseniova lékařská fakulta v Martine, Malá hora 4, 037 54 Martin

²Ústav lékařské biochemie, Univerzita Komenského v Bratislavě, Jesseniova lékařská fakulta v Martine

³Klinika pracovního lékařstva toxikologie Univerzita Komenského v Bratislavě, Jesseniova lékařská fakulta v Martine

⁴Ústav experimentální medicíny AV, Praha

⁵II. Chirurgická klinika, Martinská fakultní nemocnice, Kollárova 2, Martin

⁶Ústřední vojenská nemocnice, Ružomberok,

⁷Ústav lékařské biofyziky, Univerzita Komenského v Bratislavě, Jesseniova lékařská fakulta v Martine

⁸Laboratoř molekulární patologie, Univerzita Palackého, Olomouc

The aim of this study was to conduct a bio monitoring study in welders by employing chromosomal aberration in peripheral blood lymphocytes as a marker of genotoxic effect in relation to genetic polymorphisms of repair gene *hOGG1* as a biomarker of individual susceptibility to procarcinogens.

We found higher frequency of chromosomal aberrations in exposed group 1.96% than in control group 1.55%. The difference was not significant. In chromatide type aberrations, there was a significant difference ($P=0.050$) between exposed smokers (1.21%) and non-smokers (0.63%).

Significantly higher chromosome type aberrations (CSA) were detected in individuals with homozygous variant and heterozygous polymorphisms (1.27%) as compared to those with wild-type genotype (0.85%) in *hOGG1* gene.

We did not find any correlation between chromium level in the blood and chromosomal aberrations.

Key words: chromium, chromosomal aberration, gene polymorphism, *hOGG1*.

ANALÝZA MEMBRÁNOVÉ A RELATIVNÍ GENOVÉ EXPRESSE PROTEINU TEPELNÉHO ŠOKU HSP70 U AKUTNÍ LEUKÉMIE.

¹Sedláčková L., ¹Nguyen Thi Thu H., ²Špaček M., ²Kozák T., ³Holler E., ³Bremm H., ¹Hromadníková I.

¹Oddělení molekulární biologie a patologie buňky, 3. LF UK a FNKV, Praha,

²Oddělení klinické hematologie, FNKV a 3. LF UK, Praha,

³Abteilung Hämatologie/Intern. Onkologie, Klinikum der Universität Regensburg, Germany

Proteiny tepelného šoku (heat shock proteins, Hsp) jsou vysoce konzervativní molekuly, které jsou přítomné v cytoplasmě buněk v nízkých koncentracích za fyziologických podmínek. Mezi jejich hlavní funkce patří stabilizace proteinů a jejich ochrana před agregací a transport proteinů mezi intracelulárními kompartmenty. Byla také popsána jejich role ve zpracování peptidů a jejich prezentaci na pozadí MHC systému. Expresse konstitučních forem Hsp proteinů se zvyšuje v odpovědi na různé patologické podněty. Zároveň je indukována exprese inducibilních forem proteinů tepelného šoku. Byla zjištěna nádorově specifická exprese inducibilní formy proteinu Hsp70 na buněčné membráně solidních nádorů (kolorektální, plicní, neuronový a pankreatický karcinom, jaterní metastázy a metastázy melanomu) a leukemických blastů u pacientů s akutní myeloidní leukémií. Další studie odhalily, že membránově vázaný protein Hsp70 představuje nádorově specifickou rozpoznávací strukturu pro aktivní receptory NK buněk včetně receptoru CD94. Bylo zjištěno, že stimulace NK buněk TKD peptidem (peptid odvozený od Hsp70) společně s cytokinem IL-2 zvyšuje expresi CD94 na NK buňkách a zvyšuje tak jejich schopnost zabíjet cílové nádorové buňky s pozitivní membránovou Hsp70 expresí. Tato data signalizují potenciální využití imunoterapie NK buňkami v kombinaci se standardní chemo/radioterapií k doléčení minimální reziduální nemoci. Předmětem našeho studia je screening membránové a relativní genové exprese Hsp70 proteinu u pacientů s čerstvým záchytem nebo relapsem akutní leukémie pomocí průtokové cytometrie a RT-PCR v reálném čase. Počet blastů pozitivních na membránově vázaný protein Hsp70 je určován pomocí specifické monoklonální protilátky detekující membránově vázaný protein Hsp70 s využitím vícebarevné FACS analýzy a specifických leukemických markerů.

Práce na tomto projektu je podporována granty TRANSNET (MRTN-CT-2004-512253) a STEM DIAGNOSTICS (LSHB-CT-2007-037703).

**VYUŽITÍ TGF- β 1 K PREDIKCI AKUTNÍ PLICNÍ TOXICITY PŘI CHEMORADIOTERAPII NSCLC.****¹Stejskal J., ¹Dvořáková D., ¹Ulrych V., ¹Kolářová I., ¹Vaňásek J., ²Kheck M.**¹Oddělení klinické a radiační onkologie Nemocnice Pardubice,²Patologicko-anatomické oddělení Nemocnice Jihlava

Využití TGF- β 1 k predikci akutní plicní toxicity při chemoradioterapii NSCLC 1Stejskal J., 1Dvořáková D., 1Ulrych V., 1Kolářová I., 1Vaňásek J., 2Kheck M. 1 Oddělení klinické a radiační onkologie Nemocnice Pardubice, 2 Patologicko-anatomické oddělení Nemocnice Jihlava Léčba lokálně pokročilých stádií nemalobuněčných plicních karcinomů (NSCLC) dlouhodobě nepřináší uspokojivé výsledky. Kombinace léčebných modalit, především radioterapie (RT) a chemoterapie (CHT), s využitím eskalace dávky záření vede k jejich relativnímu zlepšení. Současně však dochází ke zvýšení projevů akutní toxicity léčby, zejména radiační pneumonitidy (RP). Experimentálně je možno k predikci RP využít monitorování plasmatických hladin transformačního růstového faktoru beta 1 (TGF- β 1). V naší práci jsme léčili 2 skupiny pacientů (A a B) s NSCLC stádia IIIA a IIIB neoadjuvantní chemoterapií (4 cykly CHT) a následně konkomitantní chemoradioterapií (2 cykly CHT) s eskalací dávky záření (64 – 69,8 Gy). Ve skupině A byla navíc během RT cíleně prováděna radioprotekce amifostinem (Ethyl 500mg i.v.). Hodnocení RP bylo prováděno systémem Common Toxicity Criteria, verze 2.0. Krev na detekci plasmatických hladin TGF- β 1 byla odebírána před chemoterapií, před radioterapií, 4. týden při radioterapii, na konci radioterapie a vyšetřena metodou ELISA. Histopatologické vyšetření plicní tkáně bylo provedeno po patologicko-anatomické pitvě pacientů. U všech pacientů jsme zaznamenali různý stupeň rozvoje akutní toxicity léčby. Amifostin vedl ke snížení incidence RP vyššího stupně, když ve skupině A (s amifostinem) bylo postiženo o polovinu méně pacientů než ve skupině B (bez radioprotekce). Ve skupině A pacientů (s amifostinem) byly zjištěny minimální histopatologické změny plicní tkáně oproti výrazným morfologickým změnám ve skupině B. Rozdíly v šířkách alveolokapilárních sept mezi oběma skupinami byly statisticky významné ($p=0,0001$). Elevace hladin TGF- β 1 4. týden při chemoradio-terapii u pacientů skupiny B (bez radioprotekce) souvisela s výskytem RP vyššího stupně. Poukázali jsme na využití TGF- β 1 jako endogenního prediktoru pro odhad rozvoje RP zejména při chemoradioterapii s eskalací dávky záření.



11. POKROKY V KLINICKÉ DIAGNOSTICE ZHOUBNÝCH NÁDORŮ.

Předsedající: Havlík R., Holubec L.

Pátek 30.11.2007 - 13.15-14.15

PŘÍNOS PET-CT V PŘEDOPERAČNÍM STAGINGU KARCINOMU PANKREATU.

Havlík R., Kysučan J., Buriánková E., Loveček M., Klos D., Neoral Č.

I. chirurgická klinika a klinika nukleární medicíny LF a FN v Olomouci

Současný standard diagnostického postupu u rakoviny slinivky zahrnuje spirální CT břicha, RTG hrudníku, endosonografii k posouzení vztahu k cévním strukturám a k získání histologické diagnózy. Bez ohledu na extenzivní předoperační staging, četnost předoperačně nezjištěných metastáz detekovaných při operaci (laparoskopie, laparotomie) se pohybuje kolem 30%. Pozitronová emisní tomografie (PET) - PET scan – detekuje metabolický signál aktivně rostoucích nádorových buněk v těle. Využívá 18F-fluorodeoxyglukozu (FDG) a je neinvazivní metodikou, která umožňuje zobrazit v jednom sezení celé tělo. U nemocných s tumory slinivky vykazuje PET vysokou senzitivitu u jaterních metastáz a může pomoci odlišit benigní a maligní léze. Nicméně přesné anatomické a topografické zobrazení u PET nálezů není možné. K překonání tohoto omezení možností PET vyšetření byla vyvinuta metodika simultánního CT skenování. PET/CT skenování umožňuje získat CT anatomickou a PET funkční informaci ve stejnou dobu. V období leden-říjen 2007 jsme vyšetřili 30 nemocných s diagnózou karcinomu hlavy pankreatu předoperačně včetně PET-CT. Předoperační PET-CT nálezy byly porovnány s operačními nálezy. Shoda s předoperačním PET/CT byla u 17 (57%) pacientů. Rozdílný peroperační nález byl u 13 pacientů. Pokud se jedná o neshodu, byla zde ve dvou případech falešná pozitivita, ve 3 případech nebyly detekovány drobné jaterní metastázy a v 9 případech nekorelovalo postižení lokálních lymfatických uzlin. Závěr – autoři referují zkušenosti s PET/CT u prvních 30 pacientů s nálezem karcinomu slinivky. U 43% vyšetřených byla prokázána určitá neshoda předoperačního PET/CT s operačním nálezem. Jako pozitivum metody lze ovšem označit detekci vzdálených metastáz, které nebyly detekovatelné jinými metodami a které nebyly v našem souboru v žádném případě falešně pozitivní. Metoda si vyžaduje další objektivnější evaluace.

VÝZNAM NÁDOROVÝCH MARKERŮ A ZOBRAZOVACÍCH METOD PRO ČASNÝ ZÁCHYT RELAPSU U NEMOCNÝCH S GYNEKOLOGICKÝMI MALIGNITAMI.

Holubec L., Topolčan O., Mrázková P., Pražáková M., Záhlava J., Fínek J.

Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Plzni

Cíl studie: Cílem studie bylo srovnání diagnostické přesnosti zobrazovacích metod (USG, TSV USG, CT, PET/CT) a rutinních nádorových markerů pro časný záchyt relapsu gynekologických malignit v průběhu dispenzární péče po primární terapii. **Metodika:** Po skončení primární terapie bylo v průběhu dvou let na RTO FN Plzeň sledováno celkem 56 nemocných s gynekologickými malignitami: 36 nemocných s epitelovými nádory ovaria a 20 nemocných s nádory děložního těla či cervixu. U těchto pacientek byly pravidelně stanovovány rutinní nádorové markery a prováděna kontrolní vyšetření pomocí zobrazovacích metod (USG, TSV USG, CT, PET/CT). Byly vyhodnoceny senzitivity (SN) a specifity (SP) rutinních nádorových markerů a zobrazovacích metod pro časný záchyt relapsu.

Výsledky: Pro gynekologické malignity jako celek je ze zobrazovacích metod nejprínosnější stanovení PET/CT (SN 93%, SP 93%), nejméně přínosné USG vyšetření (SN 40%, SP 33%). Nejlepším nádorovým markerem bylo stanovení CA 125 (SN 78%, SP 80%). Pro skupinu nemocných s epitelovými nádory ovarii, bylo dosaženo stejných výsledků: ze zobrazovacích metod má největší přínos PET/CT vyšetření (SN 90%, SP 100%), nejméně přínosné je USG vyšetření (SN 39%, SP 33%). Nejlepším nádorovým markerem bylo opět stanovení CA 125 (SN 81%, SP 88%). Při vzájemném srovnání nádorových markerů při fixní 95% SP bylo u gynekologických malignit jako celku nejvyšších senzitivit dosaženo u CA 125 (SN 84%) a thymidinkinázy (SN 75%). Pro ovariální karcinom bylo dosaženo stejných výsledků: CA 125 (SN 88%), thymidinikináza (SN 72%). Thymidinikináza má rovněž prognostický význam, což bude demonstrováno formou několika kazuistik.

Závěr: Pro časný záchyt relapsu u gynekologických malignit a to zvláště epitelových nádorů ovarii se jako optimální jeví provedení PET/CT vyšetření v kombinaci se stanovováním nádorových markerů CA 125 a thymidinkinázy. Práce na tomto projektu je podporována výzkumným záměrem MSM 0021620819, Náhrada a podpora některých životně důležitých orgánů, LF UK v Plzni.

Práce na tomto projektu je podporována výzkumným záměrem MSM 0021620819, Náhrada a podpora některých životně důležitých orgánů, LF UK v Plzni.

PRIMITIVNÍCH NEUROEKTODERMÁLNÍ NÁDORY (PNET) DOSPĚLÝCH PACIENTŮ.

Kalita O.¹, Vaverka M.¹, Hrabálek L.¹, Machač J.¹, Houdek M.¹, Švebišová H.², Ehrmann J.³, Trojanec R.⁴, Hajduch M.⁴.

¹Neurochirurgická klinika FN a LF UP Olomouc

²Onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

³Odd. patologie, Centrum molekulární biologie a medicíny FN a LF UP Olomouc

⁴Laboratoř experimentální medicíny FN Olomouc

Primitivní neuroektodermální nádory tvoří podstatnou část dětských mozkových neoplazií. Ve vyšším věku se tyto nádory vyskytují raritně. Na malém vzorku pacientu se autoři snaží ukázat diagnostické možnosti, limity chirurgického řešení a onkologickou terapii PNET nádorů této věkové skupiny. Mimo již standardních zobrazovacích metod MRI a CT, lze využít PET/CT k zjištění vzdálených, extrakraniálních a extraspinálních metastáz. Role neurochirurga kolísá od požadavku na radikální resekce po prostou biopsii. Kromě klasického histologického a imunohistochemického vyšetření provádíme cytogenetické vyšetření, které ukazuje významnou prediktivní hodnotu. Pro dětské pacienty bylo vypracováno několik režimů chemoterapie, popř. radioterapie (použití radioterapie u dětí má svá omezení). U dospělých je radioterapie plně využitelná. Naopak s ohledem na menší odolnost dospělých vůči „high dose“ chemoterapii, nutná modifikace protokolů chemoterapie. Postup je také modifikován výsledky histologického (imunohistochemického) a cytogenetického vyšetření. Jednotný protokol léčby této diagnózy u dospělých nemocných však stále nebyl ustaven. K řešení je nutný individuální přístup při spolupráci neurochirurga, neuroradiologa, neuropatologa a neuroonkologa.

SOUČASNÉ PŘÍČINY A POZADÍ NEÚSPĚCHŮ DIAGNOSTIKY A LÉČBY ZHOUBNÝCH NÁDORŮ.

J.Macháček, M.Hajdúch

Onkologické centrum FN a LF UP Olomouc

I když v medicíně obecně platí, že léčba nemoci v samém počátku je úspěšnější než v její pokročilosti, pak zejména v klinické onkologii, a to celosvětově, je tato podmínka absolutně zásadní. Časná diagnostika je předpokladem léčebného úspěchu, pokročilá, diseminovaná onemocnění až na málo výjimek nejsme dosud schopni vyléčit. Zásadním předpokladem úspěšné léčby zhoubného nádoru (ZN) je záchyt onemocnění v časném stádiu. K tomu jsou při nejmenším zapotřebí následující předpoklady: Pozitivní přístup pacientky k diagnostickému procesu a terapii na podkladě dostatečné informovanosti, uvědomělosti a kázně, náležitá úroveň a organizace zdravotnické péče, patřičné medicínské znalosti, erudice a zejména pak vlastní vnitřní přesvědčení zdravotnického personálu, zejména lékařů, o reálných možnostech vyléčitelnosti ZN. V neposlední řadě je to příznivá biologická struktura nádoru-jeho genetické pozadí.

Zatímco první tři body – předpoklady – jsou více méně v naší moci, i když jejich zvládnutí má stále daleko k dokonalosti, obrovské, většinou dosud neřešitelné problémy nám stále dělá čtvrtý předpoklad – genetické pozadí nádoru. Právě toto je trvale příčinou řady překvapení a léčebných neúspěchů. Jsme tak bohužel často svědky situací, když původně časně onemocnění v kratší nebo i výrazně delší době se projeví opětovně nejen lokální recidivou, ale dokonce i vzdálenými metastázami. Náznorným příkladem je karcinom prsu, kde 5leté přežití bez známek nemoci ještě zdaleka neznamena vyléčení a i po 10 letech se ne zrovna vzácně a většinou překvapivě setkáme s náhle propuklou metastatickou-diseminovanou chorobou. Tato skutečnost je všeobecně známá, ale dosud ne zcela jednoznačně vysvětlena a už vůbec ne vyřešena. Jako příklad si dovoříme předvést několik kasuistik z poslední doby.

Z nich zejména pozoruhodná je nemocná s recidivou a diseminací po více jak 17 letech. Další 4 případy jsou zajímavé regionální metastázou v stejnostranné podpažní jamce- axile, u jedné z nich spolu s diseminací plicní a později jaterním a peritoneálním rozsevem (až za 10let po plicním nálezu úspěšně léčeném), posléze (za 1 rok) s fatálním vyústěním (jaterní selhání).

Zásadní otázkou tedy zůstává, proč u některých nemocných diagnostikovaných jako časná stadia, tumor recidivuje po tak relativně dlouhé době 10 a více letech, jak toto riziko předvídat, rozpoznat a hlavně jak recidivě zabránit nebo ji ex post efektivně zlikvidovat. Jsou to tedy otázky možností prognózování, predikce a terapeutické šíře. Mnohé prediktivní ukazatele jsou dnes již dávno známé. Patří sem histologický grading G, hodnocení lokální přítomnosti či absence invazivity do cév a lymfatických uzlin, hormonální estrogen a progesteron receptory. Z novějších prediktorů indikujících zejména bioterapii lze zmínit Her2neu, EGFR a dále testy zaměřené na zjišťování minimální residuální choroby –MRD, resistenci na cytostatika (p53-pumpa), a zejména pak šetření genetického pozadí nádorů pomocí Micro array analýzy-DNA čipy - a cytogenetické márkry.

Přes velké rozdíly mezi různými druhy nádorů je zde jedna důležitá společná vlastnost-schopnost, a to i uvnitř histologicky identického novotvaru, nekonečně se množit a tvořit nové sekundární dceřinné nádory. Tato základní typická vlastnost spočívá podle posledních výzkumů v tumorozních kmenových buňkách, které je možno označit téměř jako nesmrtelné. Novější představa o složení nádorové tkáně spočívá v rozlišení do nejméně dvou buněčných skupin. Za prvé jsou to běžné, základní, typické nádorové buňky svižně se množící, ale snadno zranitelné, neschopné dlouhodobého přežívání. Druhou skupinu představují tak zvané kmenové buňky - stem cells - , dělící se pomalu, které jsou však velmi vytrvalé, odolávají záření, chemoterapii, hypoxii i dalším nepříznivým toxickým vlivům. Jejich vlastní ochranné mechanismy jim umožňují velmi dlouho existovat. Právě jejich predikce, detekce a následná totální likvidace může přinést zásadní změny v dlouhodobých a trvalých léčebných úspěších.

Poslední dobu se vytváří přesvědčení, že u nádorů schopných diseminace jsou dosavadní možnosti lokální léčby, chemoterapie, hormonální léčby prakticky vyčerpány. Jisté naděje se stále vkládají do stále nových objevů v rámci biologické terapie. Diagnostická stránka onkologie však stále dominuje při prognóze konečného výsledku, rozsahu nemoci a při prediktivitě intensity i šíři terapie. Stále větší důraz při tomto rozhodování bude nutno klást na hledání a rozšiřování metod a postupů ke stanovení biologické povahy nádoru- na jeho genetické pozadí.

PĚTILETÉ ZKUŠENOSTI S VYŠETŘOVÁNÍM STATUSU GENU HER-2/NEU (C-ERBB-2) U KARCINOMU PRSU V REFERENČNÍ LABORATOŘI V ČESKÉ REPUBLICE.

R. Trojanec, M. Hajdúch, Z. Kolář, B. Braunerová, J. Berkovcová, M. Dziechciarková, V. Krejčí, S. Mlčochová
Laborař experimentální medicíny (LEM), Dětská klinika FN a LF UP v Olomouci, Puškinova 6, 775 20 Olomouc
Laborař molekulární patologie při Ústavu patologie, LF UP v Olomouci, Hněvotínská 3, 775 15 Olomouc

Amplifikace a/nebo nadměrná exprese Her-2/neu indikuje u karcinomu prsu nepříznivou prognózu. U těchto pacientek prokazuje účinnost geneticky cílená). Výsledky mezinárodních studií i české léčba trastuzumabem (Herceptin Referenční laboratoře (RL) ukazují, že část výsledků z lokálních laboratoří (LL) je falešně pozitivních či negativních. Z tohoto důvodu byla po vzoru jiných zemí a z podpory zdravotních pojišťoven a firmy Roche založena v ČR 1.7.2002 Referenční laboratoř pro stanovení statusu Her-2/neu status. RL je společným pracovištěm Laboratoře experimentální medicíny (LEM), Dětská klinika FN a LF UP v Olomouci a Laboratoře molekulární patologie při Ústavu patologie, LF UP v Olomouci. Metody: Pacientky s metastatickým karcinomem prsu a pozitivní imunohistochemií (IHC 2+ a 3+) jsou zasílány z LL k referenčnímu vyšetření. V RL jsou pacientky potvrzovány imunohistochemicky (HercepTest) a pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH; PathVysion). Pacientky s polyzomií chromozómu 17 jsou potvrzovány sondami na 17p a vzorky u kterých FISH nelze z technických důvodů provést jsou analyzovány na počet kopií Her-2/neu genu technikou kvantitativní real-time PCR. Výsledky: Za pětiletou existenci RL bylo vyšetřeno přes 2300 patientských vzorků. Byla detekována neshoda mezi RL a LLs větší než 1 resp. 2 IHC stupně u 41% resp. 21% případů. Pouze u 81% původně IHC 3+ pozitivních (LL) pacientů byla potvrzena pozitivita Her-2/neu tj. indikace pro terapii trastuzumabem. Shoda mezi IHC a FISH v RL byla 98% pro IHC 3+ pozitivní případy a 95% pro IHC 0+ (FISH negativní výsledek byl považován poměr gen/chromozómu < 2,00). Přínos RL byl rovněž potvrzen na souboru žen s metastatickým karcinomem prsu. Pacientky vyšetřené v RL vykazovaly delší dobu přežití na léčbě trastuzumabem. Míra přežití u pacientek vyšetřených v RL byla signifikantně vyšší, zejména během prvního 1,5 roku terapie. Dalšími úkoly, kterými se RL v průběhu své existence zabývá je poskytování metodologie, referenčních materiálů a konzultantského servisu pro patologii, cytogenetiku i onkologii s cílem standardizovat diagnostiku a podporovat racionalizaci onkologické léčby. Tato práce je podporována zdravotními pojišťovnami ČR, firmou Roche s.r.o. a grantovými projekty MSM6198959216 a MPO 1H-PK/45. Zvláštní poděkování patří všem spolupracujícím klinickým i laboratorním pracovištím a našim pacientům.

12. MOLEKULÁRNÍ METODY V DIAGNOSTICE ZHOUBNÝCH NÁDORŮ.

Předsedající: Minárik M., Berkovcová J.

Pátek 30.11.2007 - 14.15-15.30

OPTIMALIZACE AMPLIFIKACE A PRVOTNÍ VÝSLEDKY MUTAČNÍ ANALÝZY EXONŮ GENŮ RECEPTOROVÝCH TYROSINKINÁZ C-KIT A PDGFRÁ U PACIENTŮ S GASTROINTESTINÁLNÍM STROMÁLNÍM TUMOREM.

Augustiňáková A., Krsková L., Kalinová M., Hilská I., Břízová H., Kodet R.

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

Gastrointestinální stromální tumory (GISTy) patří mezi nejčastější mesenchymální nádory gastrointestinálního traktu. Morfologicky, imunofenotypově i geneticky jsou GISTy definovanou skupinou nádorů, odlišnou od jiných nádorů měkkých tkání lokalizovaných v gastrointestinálním traktu. U většiny GISTů je charakteristická exprese receptorového proteinu KIT (CD 117). Konstitutivní mutace genů c-kit a pdgfra (platelet derived growth factor receptor alpha) hrají významnou roli v patogenezi vzniku GISTů. Jedná se o mutace typu substituce jednonukleotidových bází, složitější delece, delece-inzerce, inzerce nebo duplikace. Výsledkem mutací je na ligandu nezávislá aktivace receptorových tyrosinkináz KIT nebo PDGFRa, s následným spuštěním signálních drah, vedoucích v konečném důsledku k expresi molekul zapojených do kontroly buněčné proliferace, diferenciaci, prodlouženího přežívání nebo inhibice programované smrti buňky. Mutace v těchto genech se nevyskytují se společně, jsou navzájem exkluzivní. Význam analýzy mutací v genech c-kit a pdgfra spočívá nejen v poznání mechanismu vzniku nemoci a v komplexní diagnostice GISTů ale rovněž má klinicko-terapeutický dopad, vzhledem k prediktivní hodnotě chování nádoru s definovaným typem mutací na terapii Imatinib mesylátem. Imatinib mesylát je účinným inhibitorem aktivovaných receptorových tyrosinkináz KIT a PDGFRa u pacientů s neoperabilním, metastazujícím nebo recidivujícím GISTem. Nádory s mutacemi v regulačních oblastech genů c-kit a pdgfra (u genu c-kit jde o exony 11 a 9, u genu pdgfra o exon 12) se považují za tumory senzitivní na terapii, zatímco nádory s mutacemi v tyrosinkinázových doménách (exony 13 a 17 u c-kitu a exony 14 a 18 u genu pdgfra) za primárně rezistentní na léčbu. Zdrojem materiálu pro studii mutační analýzy genů c-kit a pdgfra byly vzorky tkání od pacientů s morfologicky a imunohistochemicky verifikovanou diagnózou gastrointestinálního stromálního tumoru. Jednalo se jednak o vzorky zmražených čerstvých tkání a jednak, ve většině případů, o vzorky tkání fixovaných ve formolu a zalitých do parafínu. Pro metody molekulární biologie, stejně jako pro mutační analýzu je důležitá kvalita vzorku. U DNA izolované ze vzorků získaných z parafinových bločků se setkáváme se sníženou kvalitou. Důvodem je degradace nukleových kyselin způsobena procesy souvisejícími se zpracováním vstupního materiálu (použit

fixační činidlo, procesy odvodnění, zalévání do parafínu). S použitím dvou amplifikačních master mixů, HotStarTaq® Master Mix Kitu (Qiagen, Hilden, Germany) a termostabilní AmpliTaq® Gold polymerázy (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), byla optimalizována amplifikace exonů 9, 11, 13 a 17 genu c-kit a exonů 12, 14 a 18 genu pdgfra. DNA izolovaná ze zmraženého materiálu byla velmi dobré kvality, zatímco DNA získaná izolací z parafinových bločků byla dobré a slabší kvality. Ze získaných DNA jsme amplifikovali výše uvedené exony. Výrazné rozdíly v citlivosti a specifčnosti detekovaných produktů nebyly zjištěny. Oba amplifikační systémy byly stejně vhodné i pro amplifikaci exonů o nižší kvalitě izolované DNA. Detekce mutací byly v naší laboratoři provedeny pomocí asymetrické sekvenční PCR (polymerázové řetězové reakce) s následnou analýzou pořadí nukleotidů pomocí kapilární elektroforézy na genetickém analyzátoru ABI PRISM 310. Nejčastěji jsme detekovali mutace v exonu 11 genu c-kit, ve shodě s publikovanými údaji o největším výskytu mutací právě v této oblasti. Zjistili jsme delece, delece-inzerce a substituce nukleotidových bází. V jednom případě jsme detekovali jednonukleotidovou substituci adeninu (A) za guanin (G) v kodonu 496 exonu 9 c-kitu, čehož následkem byla změna kyseliny asparagové za asparagin. Zjištěné mutace byly u každého pacienta verifikovány opětovným provedením analýzy a porovnáním sekvence vzorku pacienta s referenční sekvencí genů c-kit a pdgfra získanou z databáze <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> a sekvencí vyšetřenou ze vzorku od zdravého člověka.

Tento projekt byl podporován výzkumným záměrem FNM MZO 00064203.

MOŽNOSTI VYUŽITÍ POPULAČNÍ GENOMICKÉ DATABÁZE V ONKOLOGICKÉ DIAGNOSTICE A LÉČBĚ.

¹Minárik M., ¹Sekerka P., ²Pešek M., ¹Benešová L.

¹Laboratoř molekulární genetiky a onkologie, Genomac International, s.r.o., Praha

²Plicní klinika LF a FN Plzeň, Plzeň

Současný rozvoj metodiky a instrumentální techniky přispěl k urychlenému zavádění genomických analýz do klinické a experimentální onkologie. Tyto postupy jsou uplatňovány především v diagnostice hereditárních nádorových syndromů, kde se jedná o vyšetřování zárodečných mutací (BRCA1-2, p53, APC, MMR geny, apod.). Kromě toho se dále uvažuje o testování obecně zvýšené genetické predispozice, především v souvislosti se sledováním incidence nádorů a výskytu jednonukleotidových polymorfismů (tzv. single-nucleotide polymorphisms, SNP). Tyto drobné genetické variace (a jejich kombinace) mohou mít také významný přínos pro racionální selekci onkologické terapie. Na základě farmakogenomických studií je lze využít pro odhad léčebné odpovědi a toxicity.

Podobně se SNP markery uplatňují při farmakogenetickém testování zaměřeném na odhad individuální kinetiky metabolismu pro zamezení předávkování léků. Hledání nových markerů (zárodečných mutací a SNP polymorfismů) bývá často založeno na asociačních studiích, kde je porovnáván výskyt daného genotypu mezi skupinami pacientů a kontrol. Pro plnou charakterizaci nově identifikovaných markerů je kromě uvedeného srovnání často třeba určit výskyt dané variace v obecné populaci. Stejně tak je důležité validovat markery, které byly vysledovány na jiných populacích. V naší laboratoři se podařilo vytvořit unikátní referenční databázi obsahující stovky až tisíce DNA vzorků od dobrovolných poskytovatelů. V příspěvku budou představeny možnosti využití této databáze pro výše uvedené vědecké účely, včetně diskuse o souvisejících experimentálních, zákonných i etických aspektech.

DETEKCE METYLACE MGMT JAKO PREDIKTIVNÍ FAKTOR LÉČBY GLIOMŮ ALKYLACÍMI ČINIDLY.

¹Drábek J., ¹Trojanec R., ²Ehrmann J., ³Kalita O., ¹Hajdúch M.

¹LEM při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc

²Ústav patologie LF UP a FN Olomouc

³Neurochirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

Metylce DNA je globálním, epigenetickým mechanismem řízení genové exprese. V nádorových buňkách dochází ke třem změnám metylace: hypometylce (na globální úrovni genomu), hypermetylce (u promotorových CpG ostrůvků tumor-supresorových genů) a ztráta imprintingu. Metylaci DNA lze vedle intragenové mutace a ztráty heterozygoty považovat za třetí cestu inaktivace tumor-supresorových genů v genezi nádorového onemocnění. O-6-methylguanine-DNA methyltransferáza (MGMT) je reparační enzym, zodpovědný za odstranění metylačních aduktů guaninu. Hypermetylce CpG ostrůvku MGMT vede ke snížení exprese MGMT, a tím jednak k akumulaci mutací G na A, jednak ke zvýšení citlivosti nádoru k alkylujícím látkám. Je prokázáno, že hypermetylce CpG ostrůvku MGMT je asociována s lepším přežitím pacientů s gliomem, léčených alkylujícími látkami. V tomto sdělení prezentujeme pilotní výsledky vyšetření úrovně metylace CpG ostrůvku MGMT u pacientů s gliomem. Detekce metylace byla provedena chemickou změnou, následovanou PCR: působením bisulfitu se nemetylovaný cytozin deaminuje na uracil, zatímco metylovaný cytozin je chráněn, což umožňuje použít metylačně-specifickou kvantitativní PCR s exonukleázovou TaqMan sondou. Práce na tomto projektu je podporována grantem MSM6198959216.

SLEDOVÁNÍ MINIMÁLNÍ DISEMINOVANÉ NEMOCI U PACIENTŮ S RABDOMYOSARKOMY S POUŽITÍM KVANTITATIVNÍ POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE V REÁLNÉM ČASE.

¹Krsková L., ¹Augustiňáková A., ¹Hilská A., ¹Kalinová M.,

²Drahokoupilová E., ²Sumerauer D., ³Múdry P., ¹Kodet R.

¹Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

²Klinika dětské hematologie a onkologie, FN Motol, Praha

³Klinika dětské onkologie, FN Brno

Úvod Rabdomyosarkomy (RMS) jsou nejčastějšími nádory měkkých tkání dětského věku. RMS se vyskytují ve dvou základních variantách: alveolární (aRMS) a embryonální (eRMS). Expres myogenního regulačního genu myoD1 bývá udávána jako jeden z hlavních molekulárních rysů RMS. Většina aRMS je charakterizovaná chromozomální translokací t(2;13)(q35;q14) s fúzním genem PAX3-FKHR popř. variantní translokací t(1;13)(q36;p14) s fúzním genem PAX7-FKHR. Metastatické postižení u pacientů s RMS je negativním prognostickým faktorem. Častá lokalizace metastatického postižení u RMS – obzvláště u pacientů s aRMS – je kostní dřeň. Velmi důležitým faktorem léčby RMS zůstává otázka, zda nárůst infiltrace kostní dřeně (KD) nádorovými buňkami předchází relapsu a zdá má prediktivní hodnotu pro terapii pacientů s RMS. Z tohoto důvodu jsme zavedli kvantitativní stanovení genu PAX3-7/FKHR a myoD1 pomocí reverzní transkriptázové RQ-PCR v reálném čase (RQ-RT-PCR). Tato metoda umožňuje sledovat aktivitu a dynamiku onemocnění. Cíle Cílem naší studie bylo ověřit specifitu exprese genu myoD1 na molekulární úrovni pro diagnózu RMS a jeho aplikovatelnost pro sledování minimální diseminované nemoci (MDN) u pacientů s RMS. Dále jsme se zaměřili na sledování MDN u fúzně pozitivních aRMS pomocí RQ-RT-PCR sledováním exprese fúzních genů v korelaci s expresí genu myoD1. Metody Pomocí nested RT-PCR a RQ-RT-PCR bylo vyšetřeno 76 pacientů s RMS (48 aRMS a 28 eRMS). Dále bylo vyšetřeno 6 vzorků svalové tkáně, 18 vzorků non-RMS mesenchymálních nádorů, 19 vzorků NHL, 10 vzorků KD od dárců kostní dřeně a 6 vzorků KD od pacientů s hematologickými malignitami. Pomocí RQ-RT-PCR a nested RT-PCR jsme vyšetřili: 84 vzorků KD od 30 fúzně pozitivních aRMS, 31 vzorků KD od 18 fúzně negativních aRMS a 33 vzorků KD od 28 pacientů s eRMS. Shrnutí Analýzou hladiny mRNA pro myoD1 jsme zjistili expresi myoD1u všech RMS (aRMS medián myoD1 mRNA 1.5×10^5 a eRMS medián 1.13×10^5). Dále jsme detekovali expresi myoD1 u 17/18 non-RMS mesenchymálních nádorů (medián myoD1 mRNA 1.56×10^2), ve všech 6 vzorcích svalové tkáně (1.64×10^5) a to v obdobných hladinách jako u vzorků RMS. Slabá exprese myoD1 byla detekována u skupiny pacientů s NHL. Fúzní transkript PAX3/7-FKHR je zcela specifický a sensitivní marker pro Dg aRMS. Výsledky nested RT-PCR a RQ-RT-PCR velmi dobře korelují ($p < 0.0001$). Z naší studie vyplývá, že gen myoD1 není specifický molekulární marker pro diagnózu RMS, ani není vhodný ke sledování okrajů excize. Jeho detekce se dá s jistým omezením využít ke sledování dynamiky MDN. Detekce fúzních genů vyvolaných translokací představují vhodný marker pro sledování MDN u pacientů s fúzně pozitivním aRMS. Naše výsledky detekce fúzních transkriptů a myoD1 v kostní dřeni pacientů s RMS naznačují, že pacienti s pozitivními nálezy mají vysoké riziko progresu onemocnění. Tento projekt byl podporován grantem GAČR304/07/0532, výzkumným záměrem MSM 0021620813 a FNM MZO 00064203.

MOŽNOSTI DETEKCE MUTACÍ V ONKOGENU K-RAS.

^{1,2}Staňková M., ¹Berkovcová J., ¹Srovnal J., ¹Drábek J., ²Hahnová A., ¹Bílková R., ¹Růžková V., ³Kolek V., ¹Hajdúch M.

¹Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc,

²Institute of Applied Biotechnologies a.s.,

³Klinika plicních nemocí a tuberkulózy LF UP a FN Olomouc

Onkogen k-ras patří mezi důležité nádorové markery. K-ras kóduje protein s GTPázovou aktivitou o velikosti 21 kDa. Jeho fyziologickou funkcí, jako důležité součásti signálních buněčných kaskád, je zprostředkovat přenos podnětů z aktivovaných membránových receptorů do buněčného jádra a stimulovat tak buněčnou proliferaci a diferenciaci. V procesu karcinogeneze velmi často dochází k poškození k-ras genu bodovými mutacemi, které vedou ke konstitutivní aktivaci K-ras proteinu. Ve většině případů jsou přítomny tyto mutace v prvním exonu genu (převážně v kodonu 12 a 13) a vedou k záměně glycinu za aminokyselinu s jinými vlastnostmi, nejčastěji za kyselinu asparagovou s kyselým charakterem. Mutace v onkogenu k-ras jsou běžné v nádorech slinivky břišní, tlustého střeva, v adenokarcinomu plic a dalších. Výskyt mutace indikuje horší prognózu onemocnění často spojenou s chemorezistencí nádorových buněk. Rovněž přítomnost mutace v k-ras genu je negativním prediktivním znakem pro použití cílené terapie pomocí inhibitorů EGFR1. Naší snahou je optimalizovat co nejsenzitivnější metodu detekce mutace genu k-ras, kterou bude moci využít pro běžné testování velkých souborů pacientů. Pro zatím jsme se zaměřili na specifické vyšetření kodonu 12, ve kterém zaznamenáváme téměř 90% všech mutací. Naše analýzy byly provedeny na souboru 63 vzorků DNA karcinomu plic. Zavedli jsme 3 různé metody detekce, které jsme porovnávali jak z hlediska detekčního limitu tak finanční a časové náročnosti. První metoda - alelicko specifické PCR využívá specifické vazby primeru na jednotlivé typy sekvence. Její optimalizace je velmi obtížná a objevuje se u ní vyšší pravděpodobnost falešně pozitivních výsledků. Další analýza pomocí High Resolution Melting Curve (HRM) je založena na křivkách tání jednotlivých PCR produktů. Tato metoda je finančně a časově nenáročná. Její nevýhodou je nižší citlivost detekce oproti druhým sledovaným metodám. Posledním námi zaváděným vyšetřením je selektivní PCR (REMS-restriction endonuclease-mediated selective PCR). Při použití REMS PCR dochází ke štěpení zdravého typu sekvence, což umožňuje vyšší amplifikaci sekvencí obsahujících mutaci, které jsou následně detekovány. U této metody jsme dosáhli nejvyšší citlivosti. V celém souboru jsme provedli konfirmační vyšetření pomocí přímé sekvenace nebo pyrosekvenování. S rozvojem biologické terapie narůstá požadavek stanovení mutačního statusu genu k-ras jako prognostického a prediktivního markeru u řady nádorových onemocnění. Tento trend vyžaduje prescreening velkých souborů vzorků některou z robustních metod, na kterou bude navazovat následné přímé ověření mutace standardní metodou.

DETEKCE MUTACÍ GENU K-RAS METODOU HIGH RESOLUTION MELTING CURVE ANALYSIS: VZÁJEMNÉ SROVNÁNÍ METOD A PŘÍSTROJŮ NA SOUBORU 153 PACIENTŮ.

¹Srovnal J., ¹Berkovcová J., ¹Kesselová M., ¹Wiecek S.,

²Staňková M., ¹Bílková R., ¹Růžková V., ^{1,3}Hajdúch M.

¹Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc

²Institute of Applied Biotechnologies a.s., Praha

³Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

V současné době se již mnoha pacientům s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC), skvamocelulárním karcinomem hlavy a krku (HNSCC) a metastazujícím kolorektálním karcinomem (CrC) dostává možnosti být léčen moderní tzv. biologickou léčbou založenou na podání preparátů, které ať již extracelulárně nebo intracelulárně inhibují funkci Egfr1 (Erbix, Tarceva). Avšak léčebná odpověď typu kompletní či partiální remise je zaznamenána jen u relativně malého počtu pacientů (přibližně 10 %). Jednou z příčin rezistence na léčbu u přibližně 10 % pacientů je aktivující mutace kodonu 12 nebo 13 genu k-ras, který je členem MAPK signální dráhy a za fyziologických podmínek je aktivovaný receptorovými tyrosinkinázami, např. EGFR1. Tato aktivující mutace je tedy silným negativním prediktivním znakem při úvaze o léčbě inhibitory EGFR1. Cílem naší studie bylo zjistit možnosti detekce mutace genu K-ras u 153 pacientů metodou High Resolution Melting Curve Analysis (HRM) a výsledky porovnat s údaji získanými sekvenováním a pyrosekvenováním. Na statut genu k-ras jsme vyšetřili metodou HRM a paralelně odsekvenovali DNA získanou ze vzorků tumorů od 106 pacientů s NSCLC, 24 pacientů s kolorektálním karcinomem a 23 pacientek s HER2+ karcinomem prsu. Všechny 153 vzorků jsme vyšetřili na třech v současnosti komerčně dostupných přístrojích umožňujících HRM analýzu – LightScanner (Idaho Technologies), Rotor Gene 6000 (Corbett Research) a Light Cycler 480 (Roche), sekvenace byla provedena klasickou Sangerovou kapilární metodou na přístroji Beckmann Coulter CEQ 8800. Vybraný soubor 20 vzorků (10 pozitivních vs. 10 negativních) tumorů plic byl navíc vyšetřen metodou pyrosekvenování PyroMark (Biotage). Data získaná pyrosekvenováním umožňují stanovit procento mutované DNA genu k-ras ve vzorku. V pozitivních vzorcích se toto procento pohybovalo v rozmezí 7-60%. Klasickým sekvenováním byla odhalena sledovaná mutace k-ras pouze ve vzorcích s procentem mutované DNA nad 30%. Metodou HRM bylo však dosaženo stejné senzitivity jako při pyrosekvenování, kdy bylo dosaženo 7% podílu mutované DNA ve vzorku. Všechny při pyrosekvenování negativní (wild type) vzorky, byly negativní při sekvenování i HRM analýze. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v citlivosti všech tří použitých HRM analyzátorů. Ve vyšetřovaných souborech jsme sekvenováním odhalili mutaci kodonu 12 v 16 případech a kodonu 13 ve 3 případech, celkem tedy v 19 případech, což činí 12,4% pacientů. Metodou HRM jsme zjistili mutaci genu k-ras 23 u pacientů s NSCLC, 9 pacientů s kolorektálním karcinomem a 3 pacientek s HER2+ karcinomem, celkem tedy ve 35 případech, což činí 22,9% pacientů. Až na jeden vzorek bylo všech 19 sekvenace pozitivních vzorků zároveň pozitivních metodou HRM analýzy. Citlivost všech testovaných přístrojů je srovnatelná a dosahuje citlivosti pyrosekvenování, avšak za mnohonásobně nižší cenu. Využití metody HRM vidíme v prescreeningu vzorků před následnou sekvenací, která je nyní považována za „zlatý standard“ v určování mutačního statusu genů. Aktivující mutace genu k-ras způsobuje neúčinnost inhibitorů Egfr1 v léčbě maligních onemocnění, proto by měl být před podáním těchto léčiv vyšetřeno mutační statut genu k-ras v buňkách tumoru. Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216, IGA MZCR NR/7804-5 a MPO 1H-PK/45.

POSTERY

PREDICTOR OF RESPONSIBILITY OF THE TREATMENT OF BONE METASTASES MBC: MONITORING LEVELS OF OSTEOMARKERS.

D. Brancikova, D. Adámková-Krákorová, O. Bednarik, Z. Mechl, M. Nekulova

St. Anna's University Hospital Brno, Department of Radiation Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institut, Department Of Biochemistry

The treatment of the bone metastases have two aim with the same relevance's :stabilisation of malignant disease and prevention of the skeletal related events . Bisphosphonates are useful in inhibition of the osteoclastic antineoplastic activity and the response of levels of osteomarkers during the treatment with bisphosphonates is very quickly. Aim of our study is the monitoration levels of osteomarkers and their correlation with the clinical symptom's of the malignant disease and later theirs correlation with prediction of the treatment responses and with prognosis of the disease. *Material and methods:* Patients with the first detection of the bone dissemination of the malignant disease. *Stratification:* stratum A: asymptomatic patients Stratum B: symptomatic {pain, fracture...} *Osteomarkers:* CTX - C telopeptid, kolagen I, marker of the bone resorbtion ICTP - MMP telopeptid, marker of the bone resorbtion P1NP- protokolagen 1 N terminal propeptid, marker of the bone modulation. The sampling of osteomarkers started before therapy, next 14 days post the first application and next post 28 days and every month during 6 months. *Laboratory:* standard haematology and biochemistry including calcium levels in plasma, Denzitometry before starting and next post six month. Anamnesis, clinical examination, scintigraphy ,X rays or CT scan. *Therapy:* Antineoplastic: tailoring with type of the malignant disease. Radiotherapy in the cases of the limited osteolytic localities. *Bisphosphonates:* all patients {20} *Results:* First levels of osteomarkers : all three markers elevated 4pts, ICTP+P1NP only.....8 pts , ICTP only 2pts, P1NP only elevate: 4pts,normal values of all osteomarkers: 2 pts. Decrease values post therapy 3 months going : 16 patients, Increase 1 patients stable values 3 patients. Progression of disease 1 patient post 6 months correlate with elevation of P1NP (first value was normal). *Conclusion:* The study is continued, but the prevent results are favourable. Analysis our 20 patients demonstrate the positive correlation between the regression of the clinical signs of the disease and the decrease levels of the osteomarkers.

ROBOTICKÁ BEZKONTAKTNÍ LASEROVÁ MIKRODISEKCE- NOVÁ DIMENZE MOLEKULÁRNÍ ANALÝZY.

Břízová H., Mrhalová M., Neradová M., Kodet R.

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha

Důležitou a nezastupitelnou úlohu v diagnostické, prediktivní a experimentální onkologii hraje molekulární analýza. Molekulární vyšetření je často ztíženo přítomností směsné populace ve vyšetřovaném materiálu. V důsledku vysoké citlivosti molekulárních technik i malé množství nežádoucích buněk negativně ovlivní interpretaci výsledků a může maskovat detekci biologicky relevantních abnormalit. Pochopení buněčných procesů na molekulární úrovni závisí na identifikaci, izolaci a charakterizaci specifických buněk. První krok je splněn využitím řady mikroskopických postupů, charakterizace zase prostřednictvím širokého spektra dostupných molekulárních vyšetření. Isolace identifikovaných buněk donedávna představovala hlavní komplikaci, kterou však lze v poslední době překonat pomocí laserové mikrodisekce. Laserová mikrodisekce umožňuje pod mikroskopickou kontrolou získat z tkáňového řezu morfologicky dobře definovanou buněčnou populaci a tím spojuje výhody tradičního morfologického pozorování s možnostmi molekulární analýzy přesně definovaných buněk. PALM Robot MicroBeam systém je specifický jedinečnou bezkontaktní laserovou mikrodisekcí, které je docíleno katapultací mikrodisekované plochy laserovým pulsem (laser pressure catapulting). Robotika systému spolu s bezkontaktním získáním cílového materiálu představuje robustní přístup izolace specifických buněk (jediné buňky) s minimálním rizikem křížové kontaminace. Kritickým bodem celé technologie jsou náročné techniky extrakce nukleových kyselin (NK). NK jsou citlivé k řadě faktorů působících v různých krocích procesu (fixace tkáně, řez na sklíčko, HE nebo imunohistochemické barvení, uskladnění preparátu, samotná mikrodisekce, izolační postupy). Je třeba upravit podmínky přípravy řezů i barvení, navíc je nutné využít vysoce účinné postupy pro získání dostatečného množství kvalitních NK i z minimálního množství materiálu, který je po laserové mikrodisekci zdrojem pro následná molekulární vyšetření. Výsledkem úpravy a náročné optimalizace standardních laboratorních postupů je získání spolehlivých a reprodukovatelných výsledků i z limitovaného množství buněk, a tedy zvýšení specifity molekulárního testování. Práce se věnuje zavedení zcela nové bezkontaktní technologie laserové mikrodisekce s využitím robotického systému PALM Microbeam. Byla optimalizována řada laboratorních postupů od samotné přípravy řezu, přes disekci s katapultací až po izolaci NK včetně účinné reverzní transkripce a následných expresních analýz na kvalitativní i kvantitativní úrovni. Výsledkem je získání kvalitní intaktní NK s dostatečnou koncentrací pro následné molekulární analýzy. Optimalizace technologie umožňuje v dalších krocích provádět buněčné specifické molekulární studie a významně tak přispět ke zpřesnění diagnostiky nebo k pochopení rozvoje maligních onemocnění i určení potencionálních terapeutických cílů. Projekt je podpořen IG FNM 9756, VZ MZO ČR 00064203/6704 a MŠMT ČR 0021620813.

ROZŠÍŘENÍ MOŽNOSTI DETEKCE HER-2/NEU, VYUŽITÍM ŠIRŠÍHO SPEKTRA CYTOGENETICKÝCH SOND A MONOKLONÁLNÍCH PROTILÁTEK.

^{1,3}Dziechciarková M., ^{1,3}Trojanec R., ^{2,3}Kolář Z., ^{2,3}Bouchalová K., ^{1,3}Braunerová B., ^{1,3}Hajdůch M.

¹Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice,

²Laboratoř molekulární patologie při Ústavu patologie

³Referenční laboratoř pro c-erbB-2, LF UP v Olomouci.

Karcinom prsu je hlavní příčinou úmrtí žen na nádorová onemocnění. Přibližně ve 30 % nádorů dochází k amplifikaci a/nebo nadměrné expresi Her-2/neu (c-erbB-2). Dle současných znalostí je amplifikace a overexprese genu Her-2/neu indikátorem špatné prognózy u pacientek s karcinomem prsu. Pro tyto pacientky je určena selektivní, geneticky směřovaná léčba monoklonální humanizovanou protilátkou, trastuzumabem (Herceptin). V současnosti se pro vyšetření Her-2/neu používá nejčastěji imunohistochemická (IHC) metoda a IHC pozitivní případy jsou ověřovány fluorescenční in situ hybridizací (FISH). Aby léčba Herceptinem byla pro pacientku přínosná, je třeba provést kvalitní vyšetření. Pro srovnání, jak se liší výsledky stanovení, při použití různých agens jsme provedli vyšetření vzorků pomocí několika typů polyklonálních protilátek vyvinutých firmou Exbio, ve spolupráci s naším pracovištěm a výsledky porovnali s výsledky imunohistochemie s protilátkami běžně používanými v diagnostice Her-2/neu (HercepTest; DakoCytomation). Stejným způsobem jsem postupovali při ověření sondy, připravené značením plasmidu vs. komerční sondy (PathVysion Vysis). Tři nově vyvinuté polyklonální protilátky firmy Exbio vykazují stejné interpretační výsledky jako imunohistochemický detekční systém HercepTestu od DakoCytomation. U souboru 524 pacientů, vyšetřených plasmidovou i komerční sondou, byla nalezena vysoká shoda při stanovení amplifikace genu Her-2/neu (rozdíl v 2,6% vzorků; $p < 10^{-5}$). Takto připravenou a ověřenou sondu lze tedy použít při stanovení statusu genu Her-2/neu. Na základě porovnání různých sond a protilátek vyplývá, že lze použít pro vyšetření Her-2/neu rozdílné detekční systémy, ale je nutné verifikovat jejich spolehlivost s komerčně dodávanými ověřenými systémy.

SLEDOVÁNÍ ZMĚNY HLADINY METALOTHIONEINU U PACIENTŮ S TERAPIÍ PLATINOVÝMI LÉČIVY.

^{1,2}Fabrik I., ^{1,2}Adam V., ¹Křížková S., ³Binková H., ³Horáková Z., ⁴Kukačka J., ⁴Průša R., ⁵Eckschlager T., ¹Kizek R.

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

²Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

³Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 656 91 Brno

⁴Ústav klinické biochemie a patobiochemie, a

⁵Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Cisplatina je stále nejčastěji používaným cytotoxickým prostředkem při léčbě různých druhů nádorových onemocnění. V osmdesátých letech minulého století byla vyvinuta platinová léčiva „druhé generace“, jejichž zástupcem

je karboplatina [cis-diamino(1,1-cyklobutan-dikarboxyláto) platnatý komplex]), jako méně toxická alternativa k cisplatině vykazující méně vedlejších efektů. Zatímco oxaliplatina [oxaláto-1,2-diaminocyklohexan platnatý komplex] byla navržena v letech devadesátých jako další, již „třetí generace“ platinových léčiv. Její hlavní předností je schopnost překonání resistance nádorových buněk vůči

ANALÝZA METALOTHIONEINU U MALIGNÍHO MELANOMU.

^{1,2}Fabrik I., ¹Křížková S., ^{1,2}Adam V., ³Strnádel J., ³Horák V., ⁴Kukačka J., ⁵Eckschlager T., ⁴Průša R., ¹Kizek R.

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

²Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

³Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Liběchov 277 21

⁴Ústav klinické biochemie a patobiochemie,

⁵Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Pacientů s maligním melanomem v posledním desetiletí výrazně narůstá a pro klinické aplikace jsou hledány nové markery usnadňující diagnostiku a léčbu. Bylo publikováno několik prací, kde byla sledována asociace mezi hladinou MT a průběhem tohoto zhoubného onemocnění. Nejnovější studie na 1 270 pacientech ukázala progresi onemocnění v případě vysoké hladiny zjištěného MT. Vlastní biologický efekt MT u melanomu není zcela jasný a pravděpodobně může být také zapojen do melanogeneze a kontroly kyslíkových radikálů v melanocytech. Maligní melanom je etiologicky heterogenní chorobou a je považován za multifaktoriálně determinovaný. Familiární výskyt maligního melanomu byl pravděpodobně popsán již v roce 1820 a je pozorován asi u 10 % případů osob mladšího věku, v jejichž rodinách nejsou pozorovány jiné malignity. Navíc se zjistilo, že u familiárního výskytu je pozorováno lepší přežití než u nefamiliárního. U dědičných forem byly dosud identifikovány 4 odpovědné geny pro 4 typy melanomů – pro kožní maligní melanom 1 (CMM1) na chromosomu 1p36, cutaneous malignant melanoma 2 (CMM2) gen CDKN2A na chromosomu 9p21, kožní maligní melanom 3 (CMM3) gen CDK4 na 12q14 a CMM4 na chromosomu 1p22. Navíc je melanom pozorován u řady syndromů spojených s chromosomální nestabilitou. U linie lidského kožního maligního melanomu byly porovnávány buněčné linie primárního melanomu a také buněčné linie metastazovaného melanomu. Pomocí elektrochemické analýzy bylo detekováno množství metalothioneinu u jednotlivých buněčných liniích. Stanovené množství se u jednotlivých linií lišilo koncentrací, která byla v rozmezí od 6 – 11 $\mu\text{mol/l}$. Při stanovování množství metalothioneinu v živočišných tkáních byly využity kožní melanomy a metastázy z tkání. Jako vzorky se odebíraly jednak přímo metastázy z tkáně, tak i tkáň okolní a srovnávalo se množství metalothioneinu. Bylo zjištěno, že hladina metalothioneinu v melanomu se pohybovala mezi 400 – 500 $\mu\text{g/g}$. Při porovnávání hladiny metalothioneinu v metastázách a jejich příslušných tkáních, bylo zjištěno, že hladina v metastázách je až 12 $\times$ nižší než hladina v příslušné tkáni. Práce byla

podporována grantovými výzkumnými projekty Běh Terryho Foxe 2007 a GA AV IAA401990701. KUKACKA, J., et al.: Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with trauma brain injury. *Neuroendocrinol. Lett.*, 27, 2006 (Suppl 2), s. 116-120.

SLEDOVÁNÍ KONCENTRACE METALOTHIONEINU V PLNÉ KRVÍ PACIENTŮ S NÁDOROVÝM ONEMOCNĚNÍM.

^{1,2}Fabřík I., ¹Húska D., ^{1,2}Adam V., ³Binková H., ³Horáková Z., ⁴Kukačka J., ⁵Eckschlager T., ¹Kizek R.

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

²Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

³Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 656 91 Brno ⁴Ústav klinické biochemie a patobiochemie

⁵Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Nádorová onemocnění jsou ve vyspělých zemích nejčastější příčinou úmrtí. O mechanismu jejich vzniku není stále dostatek relevantních informací a terapeutické možnosti jsou omezené. Stále tedy platí, že prevence a včasná diagnóza hrají prvořadou úlohu při boji s tímto závažným onemocněním. Každý den přináší odborné časopisy nové studie, které se zabírají analýzou různých biologicky významných molekul a jejich souvislostí s nádorovým onemocněním. Jak lze předpokládat, některé by mohly sloužit jako biomarkery nádorového onemocnění. Většina takových potencionálních markerů je stále sledována pouze na úrovni základního experimentálního výzkumu a praktické využití je často komplikované. V naší práci jsme se zaměřili na protein metallothionein, který by mohl splňovat kritéria obecného nádorového markeru, mezi které patří snadná detekce, souvislost hladiny markeru a vývoji onemocnění, specifický. Je to malý metaloprotein sloužící hlavně k transportu iontů kovů, především zinku. Kovy komplexuje pomocí thiolových (-SH) skupin, kterými je jeho struktura charakteristická (téměř 30 % jeho hmotnosti tvoří cystein). Jeho schopnost vázat a transportovat esenciální těžké kovy z něj činí velmi důležitou součást buněčného aparátu ovlivňující jeho metabolickou aktivitu. Je dobře známo, že metabolismus nádorových buněk je velmi aktivní a proto lze předpokládat, že i syntéza metallothioneinu bude zvýšená. Experimentálně bylo zjištěno, že je zastoupen v tělních tekutinách, což ulehčuje jeho detekci. Jako vzorky jsme využili plnou krev pacientů primárně diagnostikovaných pro zhoubný nádor v oblasti hlavy a krku. Námi zvolený způsob detekce - elektrochemický (diferenční pulzní voltametrie - Brdiczkova reakce) - má několik výhod. Je velmi citlivý, relativně levný a také automatizovatelný. V této práci jsme optimalizovali metodu automatického dávkování vzorku, což výrazně sníží nároky na obsluhu analyzátoru. Měření probíhala na přístroji 747 VA Stand a 746 VA Trace Analyzer (Metrohm, Švýcarsko). Automatické dávkování bylo zajištěno díky 695 Autosampler (Metrohm, Švýcarsko). Hodnoty koncentrací metallothioneinu byly dle očekávání

zvýšené ve srovnání s kontrolní skupinou. Průměrná koncentrace se pohybovala kolem 2 µM přičemž tato hodnota je asi čtyřikrát větší, než u kontrolních vzorků. Práce byla podporována grantovými výzkumnými projekty Běh Terryho Foxe 2007 a GA AV IAA401990701. FABRIK, I., et al.: Určení hladiny termostabilních thiolů u pacientů se zhoubným nádorem. *Klinická onkologie*, č. 6 v tisku, 2007.

TUMOR-INFILTRATING CYTOTOXIC T-CELLS PREDICT OUTCOME IN COLORECTAL CARCINOMA, CLINICAL STADIUM II.

Garajova I., Fabian P., Nenutil R., Svoboda M., Slaby O., Vyzula R.

Dpt. of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno; Dpt. of Pathology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno; Masaryk University, Medical School, Brno

PURPOSE: Simple methods to identify colorectal cancer (CRC) patients in clinical stadium II (T3-4N0M0, Dukes' B) at high risk of recurrence are needed. Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) are a possible prognostic factor, cytotoxic TILs (CD8+ cells) are generally considered as prognostically favorable, whereas a subgroup of TILs, regulatory T-cells (T-reg, CD4+ CD25+ FOXP3+) are not. We have evaluated the effect of the presence of intraepithelial CD8+ cells on overall survival in patients with CRC in clinical stadium II. **METHODS:** Formalin-fixed, paraffin embedded tumor samples from 13 patients with CRC in clinical stadium II were evaluated by immunohistochemistry using commercially available anti-CD8 mouse monoclonal antibody. Intraepithelial CD8+ cells were enumerated in one high power magnification field in the area with the highest CD8+ cell infiltration. Its prognostic effect was evaluated using Kaplan-Mayer method. Moreover, pre-operative, total white cells and individual counts of eosinophiles, neutrophils, lymphocytes were evaluated from peripheral blood as well. **RESULTS:** We divided the patients into two groups according to the number of intraepithelial CD8+ T-cells, as quantified in the most abundant areas, so called "hot spots". First group with 0 to 2 CD8+ cells and the second group with more than 2 CD8+ cells. The median observation period was 50 months. The number of intraepithelial CD8+ T-cells correlated with patients' longer overall survival (poor prognosis for the patients in the first group with less CD8+ cells). **CONCLUSION:** We conclude that infiltration of CD8+ cells might be an important prognostic factor in CRC in clinical stage II. Knowledge of local immune responses is important for the development of therapeutic strategies. To support our pilot study there are further experiments undergoing in our laboratory. **ACKNOWLEDGMENTS:** This project is supported by IGA MZ CR NR/9076-4.

DEVELOPMENT OF CELL ARRAYS - CELL LINE SCREENING ON IMMUNOCYTOCHEMISTRY BASE ASSESSED BY NEW SOFTWARE COLGRAPH.

P. Hublarova, D. Knoflickova, Z. Hanzelkova, Y. Baturko, R. Nenutil and B. Vojtesek

Department of Clinical and Experimental Pathology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Zluty kopec 7, Brno, 65653

Cell arrays are new approach to the standardization of immunohistochemical methods (IHC). They are suitable for i) evaluation of IHC, ii) characterization of antibody, iii) proteomic research and iv) are ideal tool for extensive studies carried on cell lines. Great advantages of this method are low material usage, huge volume of highly reproducible data assessed by computer analysis with defined colour intensity levels and possibility of comparing 23 different specimens of cell lines in one experiment. Primarily, cell suspensions are fixed in formalin, embedded in agarose and than in paraffin to form blocks. Subsequently, cylinders (1 mm in diameter) are punctuated from the each block, and placed in distinct positions in cell array. Complete array is than sliced by microtom and thawed to SuperFrost+ glass. The purpose of our cell array development was to overcome the problems of classical immunocytochemistry on formalin-fixed paraffin-embedded material and to improve the testing of newly developed antibodies. By this methodical approach, we analysed the expression of p53 and MDM2 proteins with antibody DO-1 and 2A9, respectively, in breast cancer cell lines using newly designed software for automatic assessing IHC - ColorGraphicAnalysis (COLGRAPH). We quantified p53 expression and determined p53 status in cancer cell lines on the basis of comparing histoscores of proteins p53 and MDM2. We successfully pointed up a distribution of wild type and mutant p53 cell lines according to homogeneity of p53 expression and positivity of p53 IHC reaction. We developed a new methodological approach to IHC that is full of flexibility. The cell array can be designed according to acquired attributes like cell origin, protein expression, studied treatment etc. In the combination with new software ColorGraphicAnalysis (COLGRAPH), above meant method gives us a powerful tool for sample screening in extensive studies. On the basis of our promising results, this method is going to have rich possibilities of application in research and diagnostics fields in future.

This work was supported by grants IGA MZ CR NR /8338-3/ 2005, MSM LC06035 and MZO 00209805.

CEA VS. EGFR1 VS. CK 20 - KTERÝ MARKER JE NEJVHODNĚJŠÍ PRO DETEKCI MINIMÁLNÍ REZIDUÁLNÍ CHOROBY U PACIENTŮ S KOLOREKTÁLNÍM KARCINOMEM?

¹Kesselová M., ¹Srovnal J., ¹Kořínková G., ²Vysloužil K., ²Duda M., ²Skalický P., ³Cwierka K., ³Švébišová H., ³Gajová B., ^{1,3}Hajdúch M.

¹Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, Puškinova 6, 775 20 Olomouc

²I. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc, I.P.Pavlova 6, 775 20 Olomouc

³Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc, I.P.Pavlova 6, 775 20 Olomouc

Pro detekci minimální reziduální choroby (MRD) u solidních nádorů metodou real-time RT-PCR je velmi důležité nalézt dostatečně senzitivní a zároveň specifický marker cirkulujících nádorových buněk. Velmi často platí pravidlo, že čím specifitější marker máme, tím menší senzitivitu nám poskytuje, a naopak. Pro zvýšení senzitivity se proto používá kombinace různých markerů nádorových buněk. Cílem naší studie bylo porovnat vhodnost karcinoembryonálního antigenu (CEA), receptoru pro epidermální růstový faktor 1 (EGFR1) a

cytokeratinu 20 (CK20) jako markerů MRD na prospektivním souboru pacientů s kolorektálním karcinomem a nálezy korelovat s klinicko-patologickými charakteristikami. Metodou real-time RT-PCR jsme stanovili absolutní expresi genů CEA, EGFR1 a CK 20 v tkáni a v předoperačních vzorcích periferní krve a kostní dřeně získaných od 256 pacientů operovaných ve FN Olomouc pro kolorektální karcinom (ve stadiu Duke's A 52 pacientů, Duke's B 80, Duke's C 57 a Duke's D 67 pacientů). Provedli jsme statistické zhodnocení výsledků s klinicko-patologickými údaji. Z předběžných výsledků se zdá, že CEA je obecně vhodnějším markerem než EGFR1. Rozdíly zjištěné v jednotlivých statistických analýzách, kde jsme porovnávali vztah mezi expresí EGFR a CEA s klinickopatologickými charakteristikami nemoci, se však nezdají být příliš výrazné. Průměrná exprese sledovaných markerů v periferní krvi zdravých jedinců byla 88 kopií CEA/mg RNA, 49 kopií EGFR1/mg RNA a 5140 kopií CK20/mg RNA, v kostní dřeni zdravých jedinců činila tato průměrná exprese 138 kopií CEA/mg RNA, 12400 kopií EGFR1/mg RNA a 0 kopií CK20/mg RNA. Vysoké exprese EGFR1 v kostní dřeni a CK20 v periferní krvi značně omezují jejich použití jako markerů nádorových buněk v uvedených kompartmentech na rozdíl od CEA. Při korelační analýze exprese EGFR vs. CEA v krvi a kostní dřeni pacientů jsme žádnou souvislost nenalezli. Prokázali jsme dostatečnou senzitivitu a specifitu kombinace markerů CEA, EGFR a CK20 pro detekci MRD u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216, IGA MZCR NR/7804-5 a MPO 1H-PK/45.

VOLNÝ A N-(2-HYDROXYPROPYL) METHACRYLAMID (HPMA) VÁZANÝ DOXORUBICIN: ZMĚNY GLYKOSYLACE POVRCHOVÉ MEMBRÁNY BUNĚK EL-4.

¹Kovář L., ²Etrych T., ²Šubr V., ²Strohalm J., ¹Sklenář J., ²Chytil P., ²Ulbrich K., ¹Říhová B.1

¹Mikrobiologický ústav AVČR v.v.i.,

²Ústav Makromolekulární chemie AVČR, v.v.i. Praha, Česká Republika

Kopolymery N-(2-hydroxypropyl)methacrylamidu (HPMA) byly vyrobeny jako polymerní nosiče léčiv. Konjugáty obsahující aminolytický vázaný doxorubicin (PK1), na rozdíl od konjugátů s hydrolytický vázaným doxorubicin (HYD) a volného léčiva (Dox), se akumulují v intracelulárních membránách včetně Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula, které jsou zodpovědné za glykosylaci proteinů v buňce. Naše pokusy ukázaly, že PK1, na rozdíl od HYD a Dox, zvyšují glykosylaci povrchu buněk a také mění složená povrchových oligosacharidů. Zvýšená exprese molekuly CD43 po inkubaci buněk s PK1, která je silně glykosylována by mohla vysvětlit tuto změnu glykosylace. V našem systému jsme dále prokázali, že buňky po inkubaci s PK1 jsou méně adhezivní, což odpovídá jedné z funkcí molekuly CD43. Vliv molekuly CD43 na povrchu buněk inkubovaných s PK1 na zprostředkování buněčné smrti je cílem našich dalších pokusů. Práce na tomto projektu je podporována grantem MEYES CR 1M0505.

ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE U FOLIKULÁRNÍHO LYMFOMU POMOCÍ OLIGONUKLEOTIDOVÝCH MICROARRAYS.

¹Kozubík K., ¹Tichý B. 1, ²Janíková A., ¹Dvořáková D., ^{1,2}Mayer J., ¹Pospíšilová Š.

¹Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK FN Brno

²Interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice Brno

Folikulární lymfom (FL) se řadí mezi B-lymfoproliferace a je v Evropě i v USA druhým nejčastějším typem maligních lymfomů. Vyznačuje se relativně dlouhým mediánem přežití, indolentním průběhem s pomalou progresí a opakovanými relapsy. FL je senzitivní na terapii, avšak diseminovaná stadia jsou dosud považována za nevyléčitelné onemocnění. FL může v průběhu nemoci spontánně regredovat, ale také transformovat do histologicky agresivnější formy, nejčastěji difúzního velkobuněčného lymfomu, který má velmi špatnou prognózu. Diagnóza FL se stanovuje histologicky z odebrané lymfatické uzliny nebo infiltrátu. Prognóza pacientů s FL je značně heterogenní, i když většina pacientů přežívá 6 až 10 let, zhruba 20% nemocných umírá do 2 let od stanovení diagnózy. Současnými histopatologickými a klinickými metodami nelze u konkrétního pacienta průběh choroby předpovědět. Moderní metody molekulární biologie nabízí potenciální řešení. Pomocí microarrays (např. oligonukleotidových expresních microarrays) cílených na konkrétní onemocnění lze upřesnit nejen diagnózu, ale i prognózu onemocnění. Pro náš experiment jsme použili vlastní specializovaný design DNA čipů pro odlišení folikulárního lymfomu od jiných maligních lymfomů a pro jeho subklasifikaci. Na základě recentních publikací jsme vybrali přibližně 3 500 genů, které mají rozdílnou expresi v rámci subtypů lymfomů. K vyšetření jsme použili platformu microarrays od firmy Agilent obsahující 14 tisíc oligonukleotidů o délce 60 bází. Analýzou genové exprese jsme detekovali rozdíly mezi jednotlivými subtypy lymfomů. Výsledky ukazují na velký potenciál této metody při stanovení diagnózy a upřesnění prognózy folikulárního lymfomu.

Práce na tomto projektu je podporována grantem IGA MZ ČR 8448-3/2005, výzkumným záměrem MŠMT ČR MSM0021622430 a NF Elpida Nucleus

VYUŽITÍ MAGNETIZOVATELNÝCH ČÁSTIC V KOMBINACI S ELEKTROCHEMICKOU DETEKCÍ.

¹Křížková S., ^{1,2}Fabřík I., ¹Shestivska V., ¹Húska D., ^{1,2}Adam V., ³Hubálek J., ³Šílený J., ²Trnková L., ¹Kizek R.

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

²Ústav biochemie, a 4Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

³Ústav mikroelektroniky, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně, Údolní 53, 602 00 Brno

Více jako 45 let je známo, že je možné nukleové kyseliny analyzovat pomocí elektrochemických metod. Význam této detekce stále narůstá především v souvislosti s výrazným rozvojem čipových technologií a stále hlubších znalostí v oblasti struktury genomu. Je známo, že DNA poskytuje na

rtuťové elektrodě redukční signál adeninu a cytosinu kolem potenciálu -1,4 V a oxidační signál redukčního produktu guaninu kolem potenciálu -0,2 V. Navíc od konce osmdesátých let minulého století byly pozorovány oxidační signály adeninu a guaninu na uhlíkové elektrodě. Proto byla velkým překvapením zpráva o možnosti rozlišit na uhlíkových elektrodách jednotlivé báze (adenin, cytozin, guanin i thymín). V naší práci jsme se zaměřili na charakterizaci DNA na uhlíkové pastové elektrodě. Zjistili jsme, že jsme schopni rozlišit všechny báze nukleové kyseliny s limitem stanovení kolem 3 µg/ml. Navrženou technikou byly sledovány interakce DNA s vybranými rostlinnými antioxidanty. Navíc byla celá technika stanovení DNA přesunuta do roviny mikrostanovení na miniaturizovaných tištěných elektrodách při amperometrickém způsobu rozlišení analytu. Všechny tyto nástroje bylo možné využít jako detekční krok v izolaci DNA na povrchu magnetizovatelných částic. Velmi vhodné jsou paramagnetické částice (DBT), které mají na svém povrchu ukotvený řetězec T(25). Molekuly mRNA (obsahují vždy sekvenci A25) interagují s řetězcem T(25) navázaným na DBT. Pro zvýšení reprodukovatelnosti zachycení nukleových kyselin na povrch magnetizovatelných částic byl navržen automatizovaný způsob využívající spojení vortexování a centrifugace v jednom přesně programovatelném cyklu. Výťažnost izolace DNA se pohybovala mezi 60-80%. Z izolovaných DNA o různé koncentraci byla získána lineární závislost s rovnicí regrese $y = 0.7,41x + 0,13$ s koeficientem spolehlivosti $R^2 = 0,9989$. Celý postup byl následně uplatněn pro analýze reálných vzorků tkání. Práce byla podporována grantovými výzkumnými projekty Běh Terryho Foxe 2007 a GA AV IAA401990701. KIZEK, R., et al.: Voltammetry of two single-stranded isomeric end-labeled -SH deoxyoligonucleotides on mercury electrodes. Talanta, 56, 2002 (5), s. 915-918. KIZEK, R., et al.: Determination of nanogram quantities of osmium-labeled single stranded DNA by differential pulse stripping voltammetry. Bioelectrochemistry, 55, 2002 (1-2), s. 119-121.

IMUNOCHEMICKÁ DETEKCE METALOTHIONEINU ZA POUŽITÍ MYŠÍCH A SLEPIČÍCH PROTILÁTEK.

¹Křížková S., ^{1,2}Fabřík I., ^{1,2}Adam V., ¹Nákielová J., ³Hodek P., ³Stiborová M., ¹Kizek R.

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno

²Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

³Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Albertov 2030, 128 40 Praha 2

Metalothionein je lokalizován v histologických řezech za použití komerčně připravované myší protilátky E9. Pro naše účely byla připravena protilátka z vajíček slepic imunizovaných metalothioneinem. Polyklonální protilátka byla purifikována afinitní chromatografií. Nespornou výhodou imunizace slepice je získání dostatečného množství protilátky (sběr několika vajíček) a zvíře nemusí být usmrceno. Nejdříve byly v našich testech ověřovány způsoby vazby metalothioneinu k mikrotitrační destičce. Na mikrotitrační destičky byl adsorbován metalothionein. Po důkladném omytí nenavázaného proteinu byla aplikována různá ředění jak slepičí primární (1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:700 a

1:1000), tak králiči sekundární protilátky (1:1000, 1:2000, 1:5000 a 1:10000). Byl sledován nárůst absorbance při 450 nm. Jako nejvhodnější kombinace bylo vybráno ředění primární protilátky 1:200 a u sekundární

VZŤAH MEDZI CHROMOZÓMOVÝMI ABERÁCIAMI A POLYMORFIZMAMI GÉNOV GSTS U PRACOVNÍKOV S DLHODOBOU EXPOZÍCIU CHRÓMOM.

¹Matáková T., ²Halašová E., ¹Sivoňová M., ²Mušák L., ³Dzian A., ¹Hatok J., ¹Dobrota D.

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK Martin,

²Ústav lekárskej biológie JLF UK Martin,

³I. chirurgická klinika MFN Martin

Biologické účinky chrómu sú závislé na jeho mocenstve, v ktorom sa do organizmu dostávajú. Kým Cr³⁺ je predovšetkým biogénny prvok potrebný k metabolizmu sacharidov, zlúčeniny Cr⁶⁺ sú priemyselnými karcinogénmi a látkami s alergizujúcim účinkom. Dlhodobá expozícia chrómom predstavuje vysoké riziko pre rozvoj zhubných nádorov, hlavne bronchogénneho karcinómu a karcinómu hrubého čreva. Pracovníci zväčša prevádzok sú dlhodobo exponovaní plynmi, ktoré obsahujú aj karcinogénny Cr⁶⁺. V našej práci sme hodnotili vzťah medzi výskytom aberantných buniek, so zreteľom na oba typy aberácií a to chromatidových (CHTA) a chromozómových (CHSA), hladinou chrómu v krvi a polymorfizmom génov metabolických enzýmov GSTM1, GSTT1 a GSTP1 v exponovanej a kontrolnej skupine. Exponovanú skupinu tvorilo 31 zväčšov s priemerným vekom 39,93±2,07 (SEM) a dobou expozície 9,33±1,66 rokov, 20 z nich boli fajčiari. Kontrolnú skupinu tvorilo 31 osôb, ktorí neboli exponovaní známym mutagénom, s priemerným vekom 37,72±2,71, pričom 11 z nich boli fajčiari. V exponovanej skupine sme nenašli štatisticky významne vyšší výskyt v celkovom počte aberantných buniek (AB.B.) 1,93±0,17% (SE) v porovnaní s kontrolnou skupinou 1,54±0,12% (P>0,05). CHTA typ aberácií bol vyšší v kontrolnej skupine 1,03±0,10% v porovnaní s exponovanou skupinou 0,7±0,13%, rozdiel však nebol štatisticky významný. Geneticky závažnejší - CHSA typ bol štatisticky veľmi významne vyšší (P<0,005) v exponovanej skupine 1,22±0,20% v porovnaní s kontrolnou skupinou 0,54±0,12%. Pri hodnotení polymorfizmu GSTP1 bol nižší výskyt CHSA u divokého typu (1,4%±0,13) v porovnaní s variantnými a heterozygotnými jedincami (1,88±0,20), ktorý bol štatisticky významný (P<0,05). Pri GSTM1 a GSTT1 sme nezistili štatisticky významné rozdiely medzi rozličnými genotypmi. Pri porovnaní kombinácií genotypov sa najcitlivejšou ukázala kombinácia GSTM1 nulového genotypu s GSTT1 kladným genotypom, pri ktorom bol významne vyšší výskyt aberantných buniek (AB.B.) (2,1%±0,23) v porovnaní so všetkými ostatnými kombináciami.

Táto práca bola podporená grantami AV 4/0013/05 a MVTS Bil/ČR/SR/UK/06

ROLE OF ANDROGEN METABOLISM GENE PSA AND XENOBIOTIC METABOLISING ENZYMES GSTS IN PROSTATE CANCER RISK.

¹Sivoňová M., ¹Matáková T., ¹Dobrota D., ¹Hatok J., ¹Franecková M., ¹Kirschnerova R., ²Kliment J. ml., ²Tomaškin R. and ²Kliment J.

Department of Medical Biochemistry¹ and Urology², Jessenius Faculty of Medicine and Faculty Hospital, Martin, Slovakia,

Prostate-specific antigen (PSA) gene expression is regulated by androgen receptor (AR) through androgen response elements (AREs) in the promoter region of the PSA gene. A single nucleotide polymorphism with guanine (G) to adenine (A) substitution is identified at position -158 in the ARE of the PSA gene. Previous studies suggest that this polymorphism may be associated with higher PSA levels and increase prostate cancer risk. Detoxification enzymes glutathione-S-transferases (GSTs) may play a role in the formation of prostate cancer. GSTP1 has a polymorphic site at codon 105 (exon 5), where an adenosine-to-guanosine (A-G) transition causes an Ile-to-Val substitution (Ile105Val) and produces a variant enzyme with lower activity and less capability of effective detoxification. The absence of GSTM1 activity is caused by inheritance of two null alleles (alleles that have a deletion of the GSTM1 gene) similarly; individuals with no GSTT1 activity also have inherited null alleles of the GSTT1 gene, which lead to absence of activity of these enzymes. We have investigated the potential functional significance of these polymorphisms and its association with prostate cancer susceptibility in 145 men diagnosed with prostate cancer and 219 healthy control men. PSA and GSTs polymorphisms were determined by polymerase chain reaction-based methods using DNA from peripheral blood samples. We did not find a significant association between PSA polymorphism at position -158 and prostate cancer risk. The OR, calculated relative to subjects with the A/A genotype, was for the A/G genotype 0.95 (95% CL 0.56–1.6, and for the G/G genotype 0.62 (95% CL 0.34–1.12), respectively. We observed non-significant association in null alleles of the GSTM1 (OR = 0.92; 95% CI = 0.59–1.42 and GSTT1 (OR = 0.62, 95% CI = 0.35–1.08) with risk of bladder cancer. Prostate cancer risk was moderately increased with the GSTP1 (Val/Val) genotype (OR = 1.46; 95% CI 1.46–4.55). Our findings suggest that GSTP1 (Val/Val) genotype may affect the risk of prostate cancer and tumor aggressiveness. Further, GSTM1 null, GSTT1 null genotypes did not appear to influence the susceptibility to prostate cancer.

This work was supported by grants UK/264/2006, MVTS Bil/ČR/SR/UK/06 and AV 4/0013/05.

FUNKČNÍ ANALÝZA TEPLITNĚ ZÁVISLÝCH MUTANTŮ P53 V KVASINKOVÝCH A LIDSKÝCH BUŇKÁCH.

^{1,2}Slovácková Jana, ^{1,2}Grochová Diana, ¹Šmardová Jana

¹Laboratoř molekulární patologie ÚPA FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno

²Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Nádorový supresor p53 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který pod vlivem buněčného stresu transaktivuje své cílové geny a podílí se tak na kontrole buněčného cyklu, regulaci apoptózy a oprav DNA. V současné době je popsáno více než 1500 různých mutací genu p53. Nejčastěji to jsou mutace bodové, které mění sekvenčně specifickou vazbu p53 na DNA v promotorech cílových genů a mají za následek ztrátu jeho transaktivací aktivity. Mutace v genu p53 lze úspěšně

detekovat funkční analýzou separovaných alel v kvasinkách („functional analysis of separated alleles in yeast“ – FASAY). Tato metoda využívá schopnosti lidského proteinu p53 fungovat v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* jako transkripční faktor a následně transkripce cílového genu ADE2. Bílé kvasinkové kolonie na selekčním médiu jsou tvořeny kvasinkami, které exprimují standardní p53, a červené kolonie kvasinkami, které exprimují nefunkční p53. Velkou výhodou metody FASAY je, že umožňuje odlišit i částečně inaktivující mutace, které si v permisivních podmínkách alespoň částečně zachovávají transaktivační aktivitu a tvoří růžové kvasinkové kolonie. S využitím metody FASAY jsme z různých lidských nádorů získali 23 teplotně závislých (td) mutací p53. V kvasinkovém expresním systému jsme studovali jejich funkční vlastnosti vzhledem ke třem různým responsivním elementům (RE) odvozeným z promotorových oblastí cílových genů p53 (p21, bax, RGC) v teplotách 25, 30 a 35°C. Všechny td mutanty p53 jsme také exprimovali v lidských nádorových buňkách H1299 odvozených od plicního karcinomu. Opět jsme provedli analýzu jejich transaktivačních schopností vzhledem k vybraným RE (p21, bax, RGC) v teplotách 32 a 37°C. Ze srovnání obou analýz vyplynulo, že td mutanti p53 se chovají velmi podobně jak v kvasinkovém tak i lidském expresním systému. Shodně vykazují teplotní závislost a diskriminativní charakter (tzn. k různým RE se vážou s různou mírou afinity). Analýza transaktivačních schopností td mutantů p53 v lidských buňkách založená na měření luciferázové aktivity představuje citlivější přístup pro určení míry transaktivace. Umožňuje například odhalit td mutanty s vyšší transaktivační schopností než jakou má standardní p53. FASAY, založená na odcitnění fenotypu kvasinkových kolonií, toto neumožňuje. Na druhou stranu FASAY spolehlivě odhalí teplotní závislost těch mutantů, u nichž se aktivita p53 obnovuje až v nižší teplotách, než při jakých jsou úspěšně kultivovány lidské buňky. Oba přístupy mají své nesporné výhody. Metoda FASAY však zůstává vhodnější pro rutinní analýzu stavu p53 z klinického materiálu. Je rychlejší, levnější, přiměřeně časově náročná a jak jsme ukázali, je v detekci mutací p53 spolehlivá. Tato práce byla podpořena grantem MSM 0021622415.

VÝSLEDKY STABILITNÍ STUDIE PILOTNÍCH ŠARŽÍ LÉČIVÉHO PŘÍPRAVKU TUMOR INFILTRUJÍCÍ LYMFOCYTY.

^{1,2}J. Smejkalová, ^{1,2,3}P. Vidláková, ^{1,2}J. Mužíková, ^{1,2}A. Stejskalová, ^{1,2}L. Kovářová, ²L. Hanák, ¹M. Penka, ^{1,2}R. Hájek, ^{1,2}J. Michálek

¹Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno

²Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, ILBIT pavilon A

³Lékařská fakulta Masarykovy univerzity

Úvod. Imunoterapie je v dnešní době nová a netoxická léčba pro nádorová onemocnění s cílem vyvolat specifickou imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Tumor infiltrující lymfocyty (TIL) jsou buňky imunitního systému hostitele přítomné v nádorové tkáni. U pacientů s metastazujícím melanomem mají tyto buňky prokazatelný protinádorový efekt dokumentovaný jak v preklinických tak klinických studiích. TIL mohou být získány přímo z nádorové tkáně, expandovány in vitro a poté využity jako buněčná imunoterapie. Mechanismus účinku je

biologický a spočívá ve zničení nádorových buněk buňkami TIL. Cíl. Cílem bylo ověření stability pilotních léčivých přípravků vyrobených od 6 pacientů s metastazujícím melanomem. Bylo sledováno zachování parametrů bezpečnosti a jakosti léčivého přípravku. Pacienti/metody. Do pilotní studie byli zařazováni nově diagnostikovaní pacienti s metastazujícím melanomem s lokoregionálním onemocněním (stadium III) nebo pacienti s generalizovaným onemocněním (stadium IV). Přípravky pro stabilitní studii byly rozmrazeny a testovány v rozmezí 1-15 týdnů po zamražení. Druhé rozmražení bylo provedeno po 19 měsících od zamražení. Z parametrů bezpečnosti a jakosti byla sledována sterilita léčivého přípravku, absolutní počet buněk, vitalita a flowcytometrické zastoupení znaků CD3+. Jeden léčivý přípravek byl po druhém rozmražení (po 19 měsících skladování) kultivován 14 dní. Mimo výše zmíněné parametry byla sledována i hladina endotoxinu, přítomnost virů (HCV, HBV, Mycoplasma sp., parvoviry, mykobakterie, HIV), nepřítomnost chromosomálních aberací a flowcytometrické zastoupení znaků CD4+, CD8+. Výsledky. První tři léčivé přípravky byly rozmrazeny pouze jednou a to v rozmezí 4 až 8 týdnů. Sledované hodnoty nebyly zásadně změněny v porovnání při zamražení a rozmražení. Absolutní počet buněk zůstal: 99% z počtu 27,0x10⁹; 97% z počtu 56,0x10⁹; 97% z počtu 3,4x10⁹. Vitalita: 80% - 79%; 75,4% - 73,9%; 80% - 77,0%. Flowcytometrické zastoupení CD3+: 97,6% - 98,2%; 97,3% - 96,5%; 95,4% - 97,2%. Další tři léčivé přípravky byly poprvé rozmrazeny v rozmezí 1-15 týdnů od zamražení, druhé rozmražení bylo provedeno po 19 měsících od zamražení přípravku. I v těchto případech nedošlo k zásadním změnám hodnocených parametrů. Absolutní počet buněk zůstal: 73% z počtu 45,0x10⁹; 74% z počtu 28,0x10⁹; 91% z počtu 22,0x10⁹. Vitalita: 100% - 95% - 95%; 100% - 80% - 92%; 100% - 91% - 90%. Flowcytometrické zastoupení CD3+: 95% - 99,9% - 96%; 95% - 92% - 90%; 97% - 95% - 93%. Závěr. Stabilitní studie byla provedena celkem u 6 přípravků na doporučení Státního ústavu kontroly léčiv (SÚKL). Bylo provedeno druhé rozmražení po 19 měsících. Ve všech stanovených parametrech (absolutní počet buněk, vitalita, flowcytometrické zastoupení CD3 znaků, sterilita) nedošlo k zásadním změnám, které by ovlivnily kvalitu přípravku i po 19-měsíčním skladování. Podporováno grantem IGA MR 8945-4.

DETEKCE NEOBVYKLÉ MUTACE NÁDOROVÉHO SUPRESORU P53 U BURKITTŮV LYMFOMU: DUPLIKACE 30 PB.

¹J. Šmarda, ¹D. Grochová, ²P. Fabian, ¹M. Moulis, ³J. Šmarda, ¹B. Ravčuková, ¹I. Falková, ¹J. Vaňková, ¹I. Vášová

¹ÚPA a

¹IHK FN Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno

²Oddělení patologie MOÚ, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno

³Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno

Burkittovy lymfomy (BL) patří k rychle rostoucím vysoce agresivním ne Hodgkinským lymfomům (NHL). Představují asi 1 až 2% lymfomů dospělé populace v západní Evropě a Spojených státech. Charakteristickým molekulárním markerem BL je vysoká exprese protoonkogenu c-myc, která je nejčastěji důsledkem translokace t(8;14)(q24;q32), méně často translokace t(2;8)(p12;q24) nebo t(8;22)(q24;q11). K dalším

genetickým změnám často detekovaným u BL patří aberace nádorového supresoru p53. Nádorový supresor p53 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který se váže na DNA a řídí expresi mnoha svých cílových genů jako odpověď na buněčný stres. Pro analýzu aberací p53 lze použít několik různých metod, například imunohistochemickou analýzu, imunobloting, sekvenování DNA, fluorescenční in situ hybridizaci a také funkční analýzu separovaných alel v kvasinkách (FASAY). Všechny tyto metody jsme použili u prezentovaného případu BL k podrobné analýze p53. Třípadesátiletý muž byl operován v dubnu 2006 s podezřením na difúzní velkobuněčný B-lymfom s rozsáhlým postižením břicha, žaludku, okolních uzlin a tkání, kostní dřeně a CNS. Diagnóza byla uzavřena jako Burkittův lymfom, klinické stadium IVB, s pozitivitou t(8;14) detekovanou fluorescenční in situ hybridizací. Intenzivní léčbou kombinovanou imunochemoterapií bylo dosaženo kompletní remise, která trvá dosud. V nádorové tkáni pacienta jsme imunohistochemickou analýzou s využitím monoklonální protilátky DO-7 detekovali vysokou hladinu proteinu p53 v buněčných jádrech. Pomocí imunoblotingu s využitím monoklonální protilátky DO-1 jsme potvrdili vysokou hladinu proteinu p53 a zjistili jsme, že molekulová hmotnost proteinu p53 tvořeného nádorovými buňkami je větší než molekulová hmotnost standardní varianty p53. Také molekulová hmotnost produktu PCR, kterou byla amplifikována cDNA p53 připravená z nádorové tkáně, byla vyšší než molekulová hmotnost amplifikátu standardní p53. Funkční analýza v kvasinkách jednoznačně prokázala expresi transaktivace nefunkční varianty p53, přičemž kvasinkové kolonie vykazovaly velmi neobvyklý fenotyp. Sekvenováním cDNA připravené z nádorové tkáně jsme v genu p53 detekovali duplikaci 30 pb vloženou do kodónu 87. Fluorescenční in situ hybridizace neprokázala delecii p53 specifického lokusu 17p13. Práce je podporována grantem NR/9305-3 IGA MZ ČR a MSM 0021622415

VÝZNAM MOLEKULÁRNĚ CYGENETICKÉHO VYŠETŘOVÁNÍ KARCINOMU DĚLOŽNÍHO ČÍPKU.

¹Uvířová M., ²Kuglík P., ³Žežulková D., ⁴Mouková L., ⁵Dvořáčková J.

¹CGB laboratoř a.s. Ostrava,

²OGMB ÚEB Přír.fak. MU Brno,

³OLF FN Brno,

⁴MOU Brno,

⁵Ústav patologie FN Ostrava

Zhoubné nádorové onemocnění, karcinom děložního čípku je celosvětově jednou z nejčastějších příčin úmrtí žen v důsledku nádorového onemocnění. Podle zdravotnické ročenky v posledních letech ročně lékaři v České republice diagnostikují přes 1000 nových případů a ročně na tuto diagnózu zemře přibližně 400 pacientek, přičemž rozdíl oproti západoevropským zemím je téměř dvojnásobný a nijak se nezmenšuje. Cervikální screening, který je založen na cytologii a v některých zemích také na HPV DNA testování, může být nástrojem pro stanovení nejen diagnózy, ale také rizika progresu onemocnění. Human Papilloma Virus (HPV) obecně je zodpovědný za transformaci epitelálních buněk, není však vysvětleno, proč některé těžké dysplazie (HSIL) progredují do karcinomu a jiné ne a proč z mnoha pozitivních lézí jich transformuje do karcinomu jen málo. Existuje hypotéza, že

pouze infekce HPV nestačí k maligní transformaci a nezbytné jsou také genetické změny, které se na této transformaci podílejí. Molekulárně cytogenetické studie s využitím techniky FISH či komparativní genomové hybridizace (CGH) dokazují, že více než 90% invazivních karcinomů čípku má zmožený lokus 3q11 (3q gain). Lokus 3q11 obsahuje gen pro RNA komponentu lidské telomerázy (hTERC). Zmnožení tohoto genu se podílí na progresi z premaligních lézí do invazivního karcinomu. Jedná se o tzv. "early event" maligní transformace, zatímco absence 3q gainu koreluje s regresí lézí. Ukazuje se, že 3q gain může být optimálním nezávislým prediktivním markerem pro karcinom děložního čípku. K průkazu amplifikace 3q11 oblasti se používá fluorescenční in situ hybridizace na cytologických preparátech s DNA sondou POND 3q26/3q11, výrobce Kretech Biotechnology. V naší práci jsme se pokusili zavést metodiku vyšetření amplifikace genu hTERC u pacientek s premaligními lézemi do laboratorní praxe. Předběžné výsledky získané v našich laboratořích korelují s literárními údaji.

PŘÍPRAVA GFP-EL4 NÁDOROVÉHO MODELU PRO ANALÝZU INTERAKCÍ NÁDORU S IMUNITNÍM SYSTÉMEM.

¹D. Větvíčka, ¹O. Hovorka, ²K. Ulbrich, ¹B. Říhová

¹Institute of Microbiology ASCR v.v.i., Videňská 1083, Prague 4, Czech Republic

²Institute of Macromolecular Chemistry ASCR v.v.i., Heyrovský sq. 2, Prague 6, Czech Republic

Polymerní konjugáty na bázi N-(2-hydroxypropyl) methakrylamidu (HPMA) nesoucí cytostatikum doxorubicin byly vyvinuty jako jeden ze systémů pro zlepšení terapeutického indexu a potlačení vedlejších účinků konvenčních cytostatik. Testuje se celá řada těchto konjugátů lišících se směrovací strukturou, sekvencí peptidových řetězců nesoucích cytostatikum a typem vazby léčiva. Snaha charakterizovat chování různých polymerních konjugátů přímo uvnitř nádoru a stanovit různé účinky těchto polymerních léčiv na buňky nádoru a na prozánětlivé imunokompetentní buňky je podmíněna přípravou stabilního transfekovaného nádorového modelu exprimujícího GFP, schopného růst v konvenčních myších. Podrobná analýza mikroprostředí nádoru během léčby nám pomůže navrhnout novou generaci polymerních konjugátů, které budou nejen účinnější, ale budou zároveň chránit a podporovat imunitní systém pacientů.

Práce na tomto projektu je podporována grantem GAAV A400200702.

VYUŽITÍ SELEKTIVNÍ DEPLECE ALOREAKTIVNÍCH T-LYMFOCYTŮ PŘI ALOGENNÍ TRANSPLANTACI HEMATOPOETICKÝCH KMENOVÝCH BUNĚK.

¹P. Vidláková, ¹E. Matějková, ¹D. Kyjovská, ³L. Lauerová, ³L. Hanák, ¹Burešová, ¹M. Penka, ^{1,2}J. Michálek

¹Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice Brno,

²I. dětská interní klinika, Fakultní nemocnice Brno

³Masarykův onkologický ústav, Brno

Hlavním cílem v oblasti transplantací kmenových buněk (HSCT) je prevence vzniku aloreaktivity, kterou způsobují dárcovské T lymfocyty (TL). Tyto buňky jsou příčinou vzniku akutní reakce štěpu proti hostiteli (GVHD). GVHD je hlavní příčinou potransplantační morbidita a mortality pacientů. Dalším úkolem je uchránit nebo ještě posílit reakci štěpu proti tumoru/leukémii (GVT/GVL). Selektivní deplece používající anti-CD25 imunotoxin (IT) umí eliminovat škodlivé aloreaktivní TL a zároveň těmto buňkám ponechá jejich protileukemickou/protinádorovou a antibakteriální reaktivitu. Základem experimentu je smíšená lymfocytární reakce (MLR). V primární MLR se používají ozářené neleukemické/nenádorové buňky pacienta jako antigenní stimulátor. Vzniklá populace aloreaktivních TL je selektivně depletována pomocí anti-CD25 imunotoxinu. Zbýlé TL nevykazují reaktivitu proti buňkám pacienta (příjemce štěpu) a jsou následně stimulovány leukemickými/nádorovými buňkami od stejného pacienta. Takto aktivované buňky jsou imunomagneticky separovány na základě produkce INF- α . Tímto způsobem bylo provedeno 17 MLR (10 s buňkami leukemickými a 7 s buňkami renálního karcinomu). V reakcích, ve kterých byly použity leukemické buňky, vedlo ošetření TL anti-CD25 imunotoxinem ke snížení aloreaktivity o 2log a zároveň byla ochráněna jejich GVL reaktivita a vysoká viabilita. U reakcí s buňkami renálního karcinomu se podařilo snížit jejich GVH reaktivitu pouze o 1log a ani GVT reaktivita nebyla zachována v dostatečné míře. Tato práce je podporována z grantu MŠMT, NPV 2B06058.

CLINICALLY USED ANTI-TUBULINE DRUGS RESTRICT AHR-CYP1A2 SIGNALLING PATHWAY VIA C-JUN-N-TERMINAL KINASE: A STUDY IN PRIMARY CULTURES OF HUMAN HEPATOCYTES.

¹R. Vrzal, ²M. Daujat-Chavanieu, ²J.-M. Pascussi, ¹J. Ulrichová, ²P. Maurel, ¹Z. Dvořák

¹Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Olomouc, Czech Republic

²INSERM, U632, Montpellier, F-34293 France; University Montpellier1, EA3768, Montpellier, F-34293 France

Perturbation of microtubular network has been shown to cause suppression of inducibility of major cytochromes P450 (CYP) through several nuclear receptors. Here we tested the effects of clinically used microtubules-interfering agents (MIAs), such as colchicine, vincristine, vinblastine and taxol on aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathway in primary cultures of human hepatocytes. We show that tested MIAs decreased induction of CYP1A2 mRNA by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and restrict TCDD-dependent nuclear translocation of AhR. On the other hand, these MIAs increased the content of AhR protein and AhR mRNA by transcriptional mechanism. We show that the MIAs activate c-jun-N-terminal kinase (JNK), partly p38 but not extracellular-regulated protein kinase (ERK). Consistently, sorbitol, a model activator of JNK, inhibited TCDD-mediated induction of CYP1A2 mRNA. We conclude that the effects of tested MIAs on AhR-CYP1A2 signaling pathway are dual, i.e. they inhibit transcriptional activity and nuclear translocation of AhR but in parallel increase AhR protein and mRNA level. Microtubules destabilizers have the same effects as stabilizer taxol. This implies that AhR func-

tions depend on microtubules dynamics but not integrity. Perturbation of AhR-CYP1A2 signaling by MIAs comprises AhR-JNK/p38 interactions. We also demonstrate that the effects of MIAs in human hepatocytes do not proceed via arresting cell cycle as confirmed by flow cytometry (FACS) analyses. This work was supported by the grant from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic MSM 6198959216 (to J.U.), by the grant from Grant Agency of the Czech Republic GACR 303/07/0128 (to Z.D.) and by EMBO Short Term Fellowship ASTF 275-2006 (to Z. D.).

STUDY OF L-DOPA DECARBOXYLASE (DDC) IN PROSTATE TISSUES AND CANCER CELL LINES.

¹M. Avgeris, ¹E. G. Fragoulis, ²K. Stravodimos, ¹A. Scorilas

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Athens, Athens, Greece;

²Academic Urological Clinic, "Laiko" Hospital, Faculty of Medicine, University of Athens, Athens, Greece.

Introduction: L-Dopa decarboxylase (DDC) is a pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme that catalyses the decarboxylation of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-Dopa) to dopamine (DA) and 5-hydroxytryptophan (5-HTP) to serotonin. Interestingly, it was found to be overexpressed at mRNA and protein level in small-cell carcinoma of the lung, neuroblastoma, protopathic cancer of ileus and gastric cancer peritoneal dissemination. Previously, DDC was identified as a novel androgen receptor (AR) co-activator protein that co-expressed with AR in a subset of neuroendocrine (NE) prostate cancer cells.

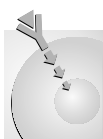
Purpose: The aim of this study was to investigate if DDC is expressed in prostate cancer cells and to evaluate its clinical potential in prostate cancer (CaP).

Materials & Methods: Total RNA was isolated from 120 tissue specimens from benign prostate hyperplasia (BPH) and CaP patients, as well as from LNCaP and PC3 prostate cancer cell lines. A highly sensitive quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) method for DDC mRNA quantification has been developed using the SYBR Green® chemistry. cDNA was prepared by reverse transcription using oligo-dT primers. Quantitative real time PCR was performed for DDC using gene-specific primers. Relative quantification analysis was made using the comparative C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) method and the LNCaP prostate cancer cell line as a calibrator. GAPDH was used as a house-keeping gene.

Results: DDC was found to be highly expressed in LNCaP prostate cancer cell line but not in PC3 cells. DDC was found to be over expressed, at the mRNA level, in the specimens from prostate cancer patients, in comparison to those from benign prostate hyperplasia patients ($p < 0.001$). Logistic regression and ROC curve analysis have demonstrated that the DDC expression have significant discriminatory value, suggesting that it could be an additional marker for CaP and BPH diaforodiagnosis in prostate cancer. DDC expression was also found to be related with tumor progression.

Conclusions: Our data reveal the potential of DDC expression, at the mRNA level, as a biomarker in diagnosis and prognosis of prostate cancer.

Acknowledgements: The project is co-funded by the European Social Fund and National Resources – (EPEAEK II) PYTHAGORAS II.



**LABORATOŘ
EXPERIMENTÁLNÍ
MEDICÍNY**

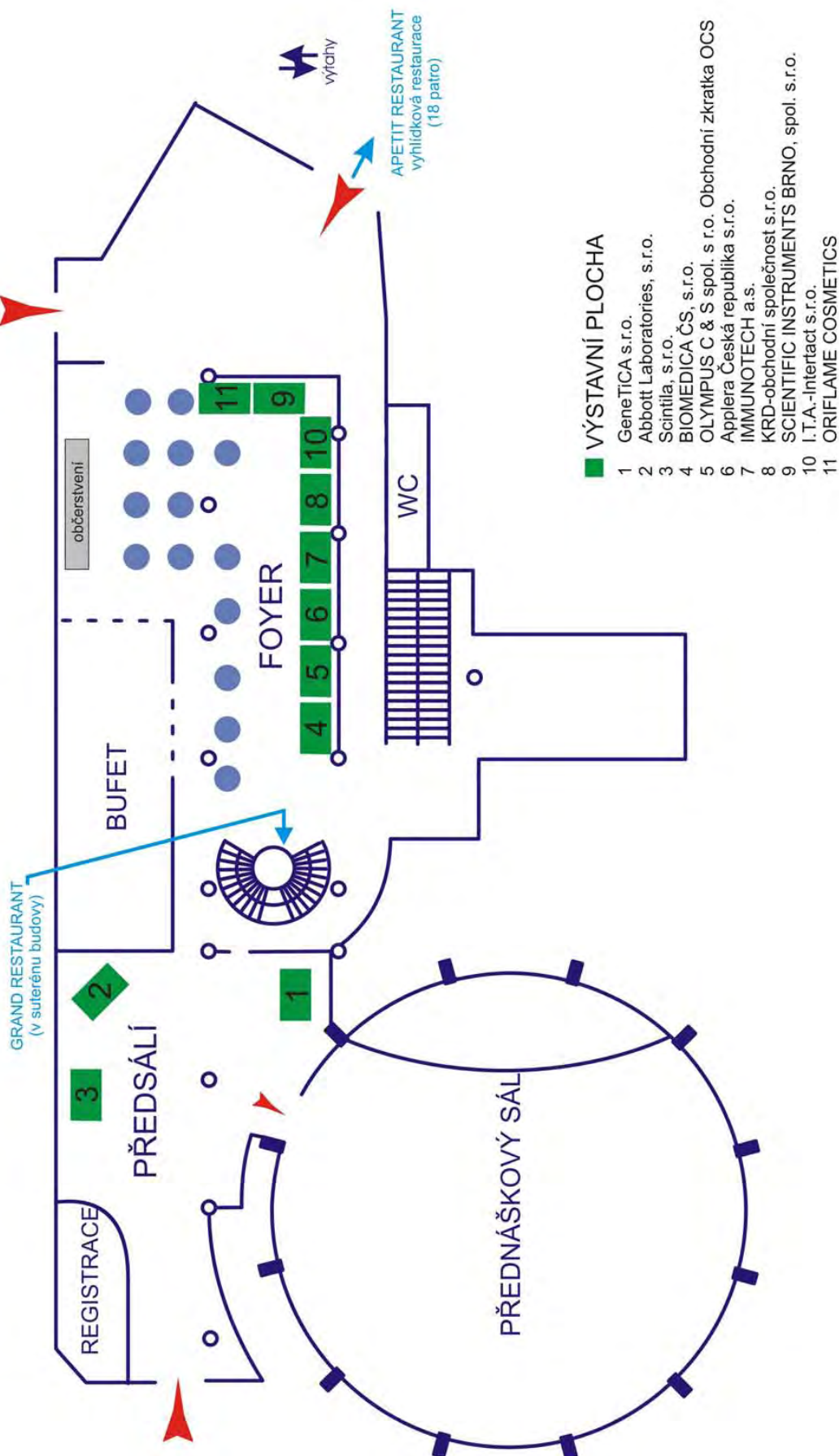
<http://lem.ocol.cz>

Rozmístění vystavovatelů na

III. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

28. - 30. 11. 2007, REGIONÁLNÍ CENTRUM OLOMOUC, Jeremenkova 40b

ORIENTAČNÍ PLÁNEK



III. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

28. – 30. 11. 2007

Abbott Laboratories, s.r.o.

Applera Česká republika s.r.o.

BIOMEDICA ČS, s.r.o.

GeneTiCA s.r.o.

IMMUNOTECH a.s.

I.T.A.- Intertact s.r.o.

KRD - obchodní společnost s.r.o.

OLYMPUS C & S spol. s r.o. Obchodní zkratka OCS

SCIENTIFIC INSTRUMENTS BRNO, spol. s.r.o.

Scintila, s.r.o.

MEDIÁLNÍ PARTNEŘI



Pořadatelé děkují výše uvedeným firmám za spoluúčast na zajištění kongresu.