

DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

ABSTRAKTA

9. – 10. prosince 2005

OLOMOUČ

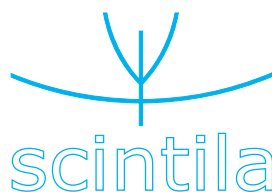
DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

OLOMOUC 9.–10. 12. 2005



GENERÁLNÍ PARTNER

PARTNEŘI



Rakovina věc veřejná

Pořadatelé děkují výše uvedeným firmám za spoluúčast na finančním zajištění kongresu.

SLOVO ÚVODEM

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 prvním ročníku Dnů diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie v Olomouci. Letošní první ročník jsme koncipovali jako dvoudenní konferenci. Byli jsme překvapeni mimořádným zájmem ze strany účastníků a z těchto důvodů jsme se rozhodli uspořádat program do dvou paralelních sekcí. Věřím, že každý z vás v připraveném programu něco zajímavého a podnětného.

Tématicky jsme se v letošním roce zaměřili na novinky v prediktivní onkologii, zejména na oblast léčiv směřovaných do rodiny EGFR/HER rodiny, dále na možnosti ultrastážování nádorových onemocnění, nové technologie v diagnostice a biologii nádorů, a v neposlední řadě na nová protinádorová léčiva. Na konferenci odezní i několik zajímavých a důležitých přednášek věnovaných problematice standardizace laboratorní diagnostiky a akreditace laboratoří. Můžete se těšit na nejnovější informace o dvou skupinách protinádorových léčiv vyvíjených v podmínkách České republiky – inhibitory cyklin-dependentních kináz a polymerních léčivech na bázi doxorubicinu, i na celou řadu dalších zajímavých sdělení a posterů.

Na závěr našeho odborného programu je připravený kurz „Principy klinických studií v onkologii pro nelékaře“. Cílem kurzu je přiblížit přehlednou formou principy klinického zkoušení v onkologii pro laboratorní pracovníky – nelékaře. Získané informace usnadní orientaci v odborné literatuře zabývající se problematikou diagnostiky, prognózování, predikce a léčby nádorových onemocnění.

Na konferenci Vás budeme také informovat o vyhlášení Cen za nejlepší práci v oblasti diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie spojené s finanční odměnou. Tuto cenu vyhlašuje Nadace „Rakovina věc veřejná“ a věříme, že cena bude udělována každoročně při příležitosti této konference.

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,
MUDr. Marián Hajdúch, PhD.

koordinátor konference
předseda Sekce diagnostické a prediktivní onkologie
České onkologické společnosti ČLS JEP

PROGRAM / OBSAH

PÁTEK 9. 12. 2005

10.00–12.05 hod. sál PEGASUS

Předsedající: HAJDÚCH, M.; KOLÁŘ, Z.; JANKŮ, F.

1. Predikce účinnosti léčiv směřovaných do EGFR/HER rodiny 8

- HAJDÚCH, M. Predikce účinnosti protinádorových léčiv směřovaných do genové rodiny HER. (17', 3' diskuze)
- BARTHOVÁ, M.; JANÁKOVÁ, L.; KAJO, K.; KVIATKOVSKÁ, Z.; PLANK, L. Celoštatny projekt detekciu stavu HER2 v novodiagnostikovaných případech karcinomu mliečnej žľazy v intervale 1. 1. 2003 – 30. 10. 2005. (10', 3' diskuze)
- TROJANEC, R.; HAJDÚCH, M.; PALÁCOVÁ, M.; VYZULA, R.; PETRÁKOVÁ, K.; BRAUNEROVÁ, B.; BOUCHALOVÁ, K.; KOLÁŘ, Z.; SEDLÁKOVÁ, E.; MLČOCHOVÁ, S. Status genu Her-2/neu (c-erbB-2) a zkušenosti s vyšetřováním v referenční laboratoři. (10', 3' diskuze)
- KAJO, K.; KVIATKOVSKÁ, Z.; PLANK, L.; MACHÁLEKOVÁ, K.; SZÉPE, P.; ŽUBOR, P.; JANÁKOVÁ, L.; BARTHOVÁ, M. Dá sa predpovedať stav HER2? (10', 3' diskuze)
- ŠIMIČKOVÁ, M.; PETRÁKOVÁ, K.; SVOBODA, M.; NEKULOVÁ, M.; PECEN, L.; FRGALA, T.; NENUTIL, R. Sérový Her-2/neu v průběhu terapie Herceptinem u nemocných s karcinomem prsu. (10', 3' diskuze)
- ŽUBOR, P.; DANKO, J.; VOJVODOVÁ, A.; KAJO, K.; SZUNYOGH, N.; KVIATKOVSKÁ, Z.; GALO, S.; MACHÁLEKOVÁ, K.; BIRINGER, K.; BARTHOVÁ, M.; DUSSAN, C. A.; PLANK, L. Examination of HER-2 SNP 655V gene polymorphism in risk assessment of breast cancer. (10', 3' diskuze)
- SKŘIČKOVÁ, J.; TOMÍŠKOVÁ, M.; SVOBODNÍK, A.; KAPLANOVÁ, J.; KADLEC, B.; BABIČKOVÁ, L.; PÁLKOVÁ, I.; NEBESKÝ, T.; STRATIL, D.; MINÁRIK, M. Existují prognostické a prediktivní markery pro podání gefitinibu (Iressa) v léčbě nemalobuněčného bronchogenního faktoru (NSCLC)? (10', 3' diskuze)
- BERKOVCOVÁ, J.; DZIECHCIARKOVÁ, M.; TROJANEC, R.; JANOŠŤÁKOVÁ, A.; WIECEK, S.; GRYGÁRKOVÁ, I.; KOLEK, V.; HAJDÚCH, M. Výsledky analýzy aberací Egrf1, Her2/neu a K-ras u pacientů s karcinomem plic na terapii gefitinibem v rámci programu časného přístupu. (10', 3' diskuze)
- CWIERTKA, K.; GRYGÁRKOVÁ, I.; BENEŠ, P.; KREJČÍ, E.; KOLEK, V. Cílená biologická léčba nádorů – rizika nových vedlejších nežádoucích účinků a jejich prediktivní význam. (10', 3' diskuze)

10.00–12.05 hod. sál PERSEUS

Předsedající: JAROŠOVÁ, M.; SVOBODA, M.; Ehrmann, J

2. Nové technologie v diagnostice, programování a predikci odpovědi nádorů na terapii 12

- DZIECHCIARKOVÁ, M.; HAJDÚCH, M.; TROJANEC, R.; BERKOVCOVÁ, J. Využití laserové mikrodisekce v diagnostice a prognózování nádorových onemocnění. (15', 3' diskuze)
- GALBAVÝ, Š.; KULIFFAY, P.; SANISLÓ, L.; KAUSITZ, J. Laserová skenovací cytometrie – použití v histopatologické diagnostice nádorů. (10', 3' diskuze)
- JAROŠOVÁ, M.; PLACHÝ, R.; POSPÍŠILOVÁ, H.; BUDINSKÁ, E.; HOLZEROVÁ, M.; PAPAŽÍK, T.; MIHÁL, V.; INDRÁK, K. Význam metody arrayCGH u hemato-onkologických nemocných. Přehled a vlastní výsledky. (15', 3' diskuze)
- SVOBODA, M.; GRELL, P.; PETRÁKOVÁ, K. Využití dna čipů (profilů genové exprese) pro molekulární diagnostiku a predikci u karcinomu prsu. (15', 3' diskuze)
- HAVLÍČEK, V. Proteomické technologie v biomedicině. (15', 3' diskuze)
- KARLÍKOVÁ, M.; TOPOLČAN, O.; VRZALOVÁ, J.; HOLUBEC, L. Princip multiplexové analýzy a její využití v onkologické praxi. (10', 3' diskuze)
- ROHOŇ, P.; ROŽMANOVÁ, Š.; HUBÁČEK, J.; SZOTKOWSKI, T.; PAPAŽÍK, T.; INDRÁK, K.; JAROŠOVÁ, M.; RUSIŇÁKOVÁ, Z. Aplikácia Q-RT-PCR pri stanovení hladiny fúzného génu AML1/ETO. (10', 3' diskuze)
- STAŇKOVÁ, M.; NÁDVORNÍK, R. Detekce mutací v onkogenu K-ras v pankreatické šťávě pomocí metody Real-Time PCR. (10', 3' diskuze)

13.30–15.35 hod. sál PEGASUS

Předsedající: MIHÁL, V.; NOVOTNÝ, J.; TROJANEC, R.

3. Prognostické a prediktivní faktory I. 15

- MIHÁL, V.; POSPÍŠILOVÁ, D.; JAROŠOVÁ, M.; HOLZEROVÁ, M.; JANOŠŤÁKOVÁ, A.; HAJDÚCH, M. Evoluce prognostických a prediktivních faktorů u dětské leukémie. (17', 3' diskuze)
- MINÁRIK, M.; BENEŠOVÁ-MINÁRIKOVÁ, L.; HRABÍKOVÁ, M.; BELŠANOVÁ, B.; BRŮHA, F.; TEŘL, M.; MUKENŠNÁBL, P.; PEŠEK, M. Experimentální aspekty vyšetřování molekulárních prediktorů nádorové léčby. (10', 3' diskuze)
- KRAMÁŘ, F.; ZEMANOVÁ, Z.; BABICKÁ, L.; RANSDORFOVÁ, Š.; ŠINDELÁŘOVÁ, L.; BŘEZINOVÁ, J.; MICHALOVÁ, K.; HRABAL, P.; KOZLER, P. Molekulární cytogenetická analýza buněk mozkových tumorů. (10', 3' diskuze)
- ŠKARDA, J.; HAJDÚCH, M.; BOUCHAL, J.; DŽUBÁK, P.; TICHÝ, T.; KLEIN, J.; KOLEK, V.; FRIDMAN, E.; KOLÁŘ, Z. Prognostický a prediktivní význam proteinů asociovaných s mnohočetnou lékovou rezistencí u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. (10', 3' diskuze)
- GRYGÁRKOVÁ, I.; KOLEK, V.; KLEIN, J.; NEORAL, Č.; HAJDÚCH, M. Má testování in vitro rezistence prognostický význam u operovaných pacientů s NSCLC st. IIIA? (10', 3' diskuze)
- HOLZEROVÁ, M.; FABER, E.; POSPÍŠILOVÁ, H.; STRAŠILOVÁ, J.; VOGLOVÁ, J.; DIVOKÝ, V.; NAUŠOVÁ, J.; INDRÁK, K.; JAROŠOVÁ, M. Přídáté chromosomové změny u pacientů s CML léčených preparátem Glivec. (10', 3' diskuze)
- HOUŠKOVÁ, L.; ZEMANOVÁ, Z.; BŘEZINOVÁ, J.; BABJUK, M.; PEŠL, M.; MICHALOVÁ, K. Neinvazivní diagnostika karcinomu močového měchýře metodou I-FISH. (10', 3' diskuze)
- DVOŘÁČKOVÁ, J.; UVÍROVÁ, M.; NEDBÁLEK, A. Naše první zkušenosti s molekulárně genetickým stanovením prognostických faktorů u karcinomu prostaty. (10', 3' diskuze)
- HOLUBEC, L.; TOPOLČAN, O.; TŘEŠKA, V.; FÍNEK, J.; PEŠTA, M. Význam stanovení biologické aktivity nádoru pro prognózu a volbu terapie. (10', 3' diskuze)

13.30–14.50 hod. sál PERSEUS

Předsedající: ŠMARDOVÁ, J.; EHRMAN, J.; ECKSCHLAGER, T

4. Biologie nádorů 18

1. GNOPOULOS, P. Cancer primary prevention. (17', 3' diskuze)
2. ŠMARDOVÁ, J.; SVITÁKOVÁ, M.; RAVČUKOVÁ, B.; GROCHOVÁ, D.; VAŇKOVÁ, J.; KROUPOVÁ. I. Funkční analýza separovaných alel v kvasinkách: spolehlivá metoda k určení statutu nádorového supresoru p53. (10', 3' diskuze)
3. VRZALÍKOVÁ, K.; MURRAY, P. G.; REYNOLDS, G. M.; EHRMANN, J. Polycombní geny BMI-1 a EZH2 u karcinomu cervixu. (10', 3' diskuze)
4. EHRMANN, J.; KOĐOUSEK, R.; SEDLÁKOVÁ, E.; NELSON, P. N.; DVOŘÁK, P.; VAVERKA, M. Primární lymfomy CNS a virové infekce EBV a HERV. (10', 3' diskuze)
5. SEDLÁKOVÁ, I.; VÁVROVÁ, J.; TOŠNER, J.; HANOUSEK, L. Lysofosfatidová kyselina u pacientek s ovariálním karcinomem. (10', 3' diskuze)
6. PLEVOVÁ, P.; BOUCHAL, J.; FIURÁŠKOVÁ, M.; PAPEŽOVÁ, M.; KŘEPELOVÁ, A.; ČUŘÍK, R.; FORETOVÁ, L.; NAVRÁTILOVÁ, M.; ZAPLETALOVÁ, J. Expres proteinů PML a TRF2 v nádorech kolorekta a prsu. (10', 3' diskuze)
7. KORABEČNÁ, M.; LUDVÍKOVÁ, M. Karcinogeneze z fetálních buněk na příkladu štítné žlázy. (10', 3' diskuze)

16.00–17.50 hod. sál PEGASUS

Předsedající: CWIERTKA, K.; KLEIBL, Z.; BERKOVCOVÁ, J.

5. Prognostické a prediktivní faktory II 20

1. MACHÁČEK, J.; HOUSERKOVÁ, D.; CWIERTKA, K. Pokroky a vývoj v diagnostice karcinomu prsu – redukce chyb a omylů. (17', 3' diskuze)
2. ADÁMKOVA-KRÁKOROVÁ, D.; BRANČIKOVÁ, D.; SPURNÝ, V.; VESELÝ, K.; HUŠEK, K. High grade osteosarkom dospělého věku, prognostické a prediktivní faktory. (10', 3' diskuze)
3. CWIERTKA, K.; LIPERT, J.; SROVNAL, J.; PILKA, R.; ŠVĚBIŠOVÁ, H.; KUDELA, M.; NOSKOVÁ, V.; DŽUBÁK, P.; TROJANEC R.; HAJDÚCH M. Ovariální karcinom – ideální model pro ověření možnosti predikce odpovědi na chemoterapii stanovením rezistence na cytostatika in vitro pomocí MTT testu? (10', 3' diskuze)
4. NOVOTNÝ, J.; TESAŘOVÁ, P.; PEŠTA, M.; HOLUBEC, L. Četnost Leydenské mutace, protrombinové mutace a mutace v MTHFR genu v populaci 470 pacientek s karcinomem prsu. (10', 3' diskuze)
5. NOVOTNÝ, J.; SÝKORA, V.; STRNAD, R.; PEŠTA, M.; TOMANCOVA, V.; ZIMOVJANOVA, M. Vliv 48 hodinové kontinuální infuze 5-fluorouracilu na expresi dihydropyrimidin-dehydrogenázy a thymidininfosforilázy. (10', 3' diskuze)
6. KLEIBL, Z.; KLEIBLOVÁ, P.; ŠEVČÍK, J.; NOVOTNÝ, J. Predikce toxicity způsobené fluoropyrimidiny na základě mutační analýzy kódující sekvence genu pro dihydropyrimidin-dehydrogenázu (DPD). (10', 3' diskuze)
7. DVOŘÁK, J.; RYŠKA, A.; TOMŠOVÁ, M.; VESELÝ, P.; JANSÁ, J.; ŠTUK, J.; MELICHAR, B.; ZOUL, Z.; JANDÍK, P.; PETERA, J. Korelace mezi expresí estrogenových a progesteronových receptorů, hladinou CEA a CA 15-3 před léčbou a tradičními klinicko-patologickými charakteristikami karcinomu prsu u žen starších 70 let. (10', 3' diskuze)
8. HAVRÁNEK, O.; KLEIBL, Z.; LUKEŠOVÁ, M.; NOVOTNÝ, J.; JANATOVÁ, M.; FORETOVÁ, L.; POHLREICH, P. Délka domény kódující polyglutaminovou oblast genu AIB1 jako prediktor vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací genu BRCA1. (10', 3' diskuze)

SOBOTA 10. 12. 2005

8.30–10.02 hod. sál PEGASUS

Předsedající: DVOŘÁČKOVÁ, J.; JANKŮ, F.; HAJDÚCH, M.

6. Nové možnosti stagingu a ultrastagingu nádorových onemocnění I 24

1. DVOŘÁČKOVÁ, J. Historie a současnost sentinelové uzliny. (17', 3' diskuze)
2. JANKŮ, F. Detekce minimální reziduální choroby v kostní dřeni – je čas na změnu klinické praxe? (17', 3' diskuze)
3. SKALICKÝ, P.; VYSLOUŽIL, K.; DUDA, M.; KLEMENTA, I.; STARÝ, L.; HAJDÚCH, M.; SROVNAL, J.; KOŘÍNKOVÁ, G. Chirurgické aspekty minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu. (10', 3' diskuze)
4. SROVNAL, J.; KOŘÍNKOVÁ, G.; VYSLOUŽIL, K.; DUDA, M.; SKALICKÝ, P.; CWIERTKA, K.; ŠVĚBIŠOVÁ, H.; GAJOVÁ, B.; HAJDÚCH, M. Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nemoci. (10', 3' diskuze)
5. BOLČÁK, K. Zkušenosti z provozu pracoviště pozitronové emisní tomografie Masarykova onkologického ústavu v Brně. (10', 3' diskuze)
6. JAKUBEC, P.; GRYGÁRKOVÁ, I.; JAKUBCOVÁ, T.; KOLEK, V.; BENÝŠEK, V. Význam pozitronové emisní tomografie u plicních malignit. (10', 3' diskuze)

8.30–10.00 hod. sál PERSEUS

Předsedající: CWIERTKA, K.; MIHÁL, V.; Novotný, J.

7. Varia a kazuistiky 27

1. SZÉPE, P.; KAJO, K.; SLÁVIK, P.; FELCANOVÁ, D.; PLANK, L. Riziko diagnostického omylu při zriedkavých nádorech matrice v kyretovanom biopstickom materiáli. (8', 3' diskuze)
2. VÍCHA, A.; SUMERAUER, D.; STEJSKALOVÁ, E.; JAROŠOVÁ, M.; HOLZEROVÁ, M.; PUCHMAJEROVÁ, A.; KŘEPELOVÁ, A.; KRUTÍLKOVÁ, V.; ECKSCHLAGER, T. Molekulárně cytogenetická charakterizace tří dětských feochromocytomů. (8', 3' diskuze)
3. MACHÁLEKOVÁ, K.; KAJO, K.; SZÉPE, P.; PLANK, L. Nezvyčajná asociácia nádorov typu GIST a NET u pacienta s neurofibromatózou- limity klinickej a patologickej diagnostiky. (8', 3' diskuze)
4. HORÁK, L.; KOHOUT, P.; KUBECOVÁ, M. Stanovení radiačního poškození tenkého střeva měřením střevní propustnosti. (8', 3' diskuze)
5. HOLUBEC, L.; FÍNEK, J.; SALVÉT, J.; TOPOLČAN, O. BNP (brain natriuretic peptide) – marker kardiálního selhávání u pacientů léčených radioterapií. (8', 3' diskuze)
6. HÜTTELOVÁ, R.; KLEIBL, Z. Využití technik asistované reprodukce v péči o onkologické pacienty. (8', 3' diskuze)
7. HORÁK, L.; LISÝ, P.; DUCHÁČ, V.; ŠTUKAVEC, J.; ŠVEC, A.; JIRÁSEK, T. Vím co léčíme ? Jak zlepšit detekci postižení uzlin u kolorektální rakoviny. (8', 3' diskuze)
8. DUCHÁČ, V.; HORÁK, L.; ZAVADIL, J.; LEŽAL, D.; ŠTUKAVEC, J. Autofluorescenční diagnostika kolorektálního karcinomu. (8', 3' diskuze)

10.30–12.05 hod. sál PEGASUS

Předsedající: DVOŘÁČKOVÁ, J.; PILKA, R.; SROVNAL, J.

8. Nové možnosti stagingu a ultrastagingu nádorových onemocnění II31

1. BOHANES, T.; KLEIN, J.; NEORAL, Č.; SZKORUPA, M.; KORANDA, P. Detekce sentinelové uzliny u plicního karcinomu pomocí patentní modři a její klinický význam. (10', 3' diskuze)
2. VRBA, R.; NEORAL, Č.; AUJESKÝ, R.; BOHANES, T.; KLEIN, J.; KRÁL, V.; KORANDA, P. Identifikace sentinelové uzliny a její význam u karcinomu jícnu a kardie. (10', 3' diskuze)
3. PILKA, R.; KUDELA, M.; DZVINČUK, P.; KORANDA, P. Detekce sentinelových lymfatických uzlin pomocí 99m Tc-nanokoloidu u Ca endometria. (10', 3' diskuze)
4. KOŘÍNKOVÁ, G.; SROVNAL, J.; HAJDÚCH, M.; ŠVACH, I.; ZLÁMALOVÁ, N.; ŠVÉBIŠOVÁ, H.; CWIERTKA, K.; MINAŘÍK, J. Detekce minimální reziduální choroby technikou PCR v reálném čase v sentinelových uzlinách u karcinomu prsu. (10', 3' diskuze)
5. JANKŮ, F.; SROVNAL, J.; KOŘÍNKOVÁ, G.; HAJDÚCH, M. Molekulární detekce okultních nádorových buněk v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu pomocí kvantitativní RT-PCR pro CEA. (10', 3' diskuze)
6. ROŽMANOVÁ, Š.; PLACHÝ, R.; FABER, E.; ROHOŇ, P.; NOVOSADOVÁ, A.; JAROŠOVÁ, M.; INDRÁK, K. Monitorování minimální reziduální nemoci u nemocných s CML pomocí real-time RT-PCR. (10', 3' diskuze)
7. HOSKOVEC, D.; ANTOŠ, F.; KUDRMANN, J.; BENKOVÁ, K.; VARGA, J. Cytologické a biochemické vyšetření laváže dutiny břišní u nádorů horní části GIT. (10', 3' diskuze)

10.30–12.15 hod. sál PERSEUS

Předsedající: HAJDÚCH, M.; PLANK, L.; SVOBODA, M.

9. Prognostické a prediktivní faktory III33

1. BRAUNEROVÁ, B.; TROJANEC, R.; HAJDÚCH, M.; BOUCHALOVÁ, K.; MLČOCHOVÁ, S.; MICKOVÁ, S. Úskalí a možnosti akreditačního procesu a význam akreditace z pohledu laboratoráře. (10', 3' diskuze)
2. VRANÁ, M.; BRDIČKA, R.; OTÁHALOVÁ, E. Validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu. (10', 3' diskuze)
3. PLANK, L.; VRANOVSKÝ, A.; BALVAN, B.; SZÉPE, P.; KVIATKOVSKÁ, Z. Rozdelenie prípadov difúzneho veľkobunkového B-lymfómu do prognosticky relevantných skupín s využitím internetového registra pacientov Lymfómovej skupiny Slovenska. (10', 3' diskuze)
4. STRAŠILOVÁ, J.; HOLZEROVÁ, M.; CHLUDOVÁ, K.; ŠČUDLA, V.; ZEMANOVÁ, M.; POSPÍŠILOVÁ, H.; LAKOMÁ, I.; PREKOPOVÁ, I.; HANZLÍKOVÁ, J.; KROPÁČKOVÁ, J.; INDRÁK, K.; JAROŠOVÁ, M. Studie chromosomových změn u nemocných s mnohočetným myelomem. (10', 3' diskuze)
5. CHUMCHALOVÁ, J.; KLIMEŠOVÁ, D.; KUHVROVÁ, V.; DVOŘÁKOVÁ, D.; BRYCHTOVÁ, Y.; FRANCOVÁ, H.; MAYER, J. Sledování defektů ve fosforylaci STAT1, STAT3 proteinů a jejich význam pro stanovení prognózy u CLL pacientů. (10', 3' diskuze)
6. KATRINCÁKOVÁ, B.; PACOVSKÁ, T.; RAIDA, L.; FABER, E.; VONDRÁKOVÁ, J.; VODIČKA, R.; VRBICKÁ, D.; VRTĚL, R.; JAROŠOVÁ, M.; INDRÁK, K. Využitie polymorfizmu DNA pri monitorovaní bunkového chimérizmu u pacientov po alogénnej transplantácii hematopoetických kmeňových buniek. (10', 3' diskuze)
7. HRABĚTA, J.; JELÍNEK, F.; ECKSCHLAGER, T. Korelace DNA ploidie s lokalizací a biologickou povahou spontánního melanomu u psů- možný model. (10', 3' diskuze)
8. BLAŠTÍK, O.; SVOBODA, M.; PRŮŠA, R.; KUKAČKA, J.; STIBOROVÁ, M.; ADAM, V.; PETRLOVÁ, J.; BEKLOVÁ, M.; ZEHNÁLEK, J.; KIZEK, R. Ověření senzitivity elektrochemického stanovení metalothioneinu jako potenciálního markeru nádorových onemocnění. (10', 3' diskuze)

13.30–16.00 hod. sál PEGASUS

Předsedající: STRNAD, M.; ECKSCHLAGER, T.; ŠIMÁNEK, V.; HAJDÚCH, M.

10. Nové možnosti protinádorové léčby.37

1. FILGUEIRA de AZEVEDO, W. Jr. Molecular modelling in the design of anticancer drugs. (17', 3' diskuze)
2. STRNAD, M. Roscovitin (Seliciclib). (17', 3' diskuze)
3. ŠIROVÁ, M.; MRKVAN, T.; HOVORKA, O.; ROSSMANN, P.; KOVÁŘ, M.; STROHALM, J.; ŠUBR, V.; ETRYCH, T.; PLOCOVÁ, D.; CHYTIL, P.; ROZPRIMOVA, L.; KUBÁČKOVÁ, K.; ULBRICH, K.; ŘÍHOVÁ, B. Léčba experimentálních nádorů cytostatiky vázanými na polymery na bázi HPMA vede ke vzniku dlouhodobé systémové resistance proti nádoru. (17', 3' diskuze)
4. ŠIMÁNEK, V. Fytochemikálie s chemoprotektivními a protinádorovými účinky. (17', 3' diskuze)
5. WĘSIERSKA-GĄDEK, J.; GUEORGUEVA, M.; HORKY, M.; RANFTLER, M. Roscovitin-induced P-Ser-46 wt p53 activates p53AIP1 protein resulting in apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. (10', 3' diskuze)
6. HORÁK, L.; ŠTUKAVEC, J.; POUČKOVÁ, P. Fotodynamická terapie v léčbě malignit GIT, experimentální PDT kolorektální rakoviny. (10', 3' diskuze)
7. FIGOVÁ, K.; HRABETA, J.; ČINÁTL, J.; ČINÁTL, J. JR.; MICHAELIS, M.; VONKA, V.; SOBOTKOVÁ, E.; ECKSCHLAGER, T. Účinek reoviru na nádorové buňky. (10', 3' diskuze)
8. DŽUBÁK, P.; HAJDÚCH, M.; VYDRA, D.; ANZENBACHER, P.; ŠAREK, J.; NOVÁK, P.; HAVLÍČEK, V. Protinádorové účinky derivátů kyseliny betulínové jsou způsobeny přímou interakcí s cytochromem c. (10', 3' diskuze)
9. BABULA, P.; MIKLOVÁ, R.; SLADKÝ, Z.; HAVEL, L.; ADAM, V.; KIZEK, R. Potencionální využití naftochinonů v medicíně. (10', 3' diskuze)

14.30–15.45 hod. sál PERSEUS

11. Kurz „Principy klinických studií v onkologii pro nelékaře“

Cílem kurzu je přiblížit přehlednou formou principy klinického zkoušení v onkologii pro laboratorní pracovníky- nelékaře. Získané informace usnadní orientaci v odborné literatuře zabývající se problematikou diagnostiky, prognózování, predikce a léčby nádorových onemocnění. Pro účast na kurzu je nutné se přihlásit na registraci!

CWIERTKA, K. Principy klinického zkoušení v onkologii. (30 minut)

DEMLOVÁ, R. Správná klinická praxe, management a legislativa klinického zkoušení v onkologii. (30 minut)

JANKŮ, F. Základy hodnocení klinické odpovědi nádorového onemocnění na terapii. (30 minut)

SVOBODNÍK, A. Biostatistické hodnocení v klinických studiích. (30 minut)

Postery.41

1. NEKULOVÁ, M.; ŠIMÍČKOVÁ, M.; PETRÁKOVÁ, K.; PECEN, L.; STANIČEK, J.; PILNÝ, R.; FRGALA, T.; VALÍK, D. Sérovy N-terminální propeptid kolagenu typu I (P1NP) a kostní metastázy karcinomu prsu.
2. MALÍKOVÁ, J.; NOWAKOVÁ, M.; HLOBILKOVÁ, A.; KOLÁŘ, Z. Vliv steroidních látek na viabilitu buněčných linií mnohočetného myelomu.

3. JANATOVÁ, M.; PROKOPCOVÁ, J.; POHLREICH, P. Studium úlohy genů BRCA1 a BRCA2 u sporadického karcinomu prsu.
4. PEŠTA, M.; HOLUBEC, L. jr.; TOPOLČAN, O.; RUPERT, K.; ČERNÁ, M.; LUBOŠ HOLUBEC, L. SEN.; TŘEŠKA, V.; FÍNEK, J.; ČERNÝ, R. Kvantitativní stanovení matrix metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2 a MMP-7) a jejich inhibitorů (TIMP-1 a TIMP-2) u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu.
5. BROŽOVÁ, M.; KLEIBL, Z.; ZADINOVÁ, M.; NETÍKOVÁ, I.; SCHOLZOVÁ, E.; MATOUŠKOVÁ, E. EM-G3 linie progenitorových buněk: Nový experimentální model studia vývoje lidského mamárního karcinomu.
6. FIURÁŠKOVÁ, M.; BRYCHTOVÁ, S.; TICHÝ, T. jr.; BENEŠ, P.; HIRŇÁK, J.; ZÁLEŠÁK, B. Vliv nádorového mikroprostředí na progresi maligního melanomu.
7. SMOLEJ, L.; ANDRÝS, C.; ŽÁK, P.; BELADA, D.; ŠIROKÝ, O.; KREJSEK, J.; MALÝ, J. Angiogenní cytokiny u chronické B-lymfocytární leukémie: souvislost s moderními prognostickými faktory.
8. HAVLÍČEK, M.; BARTL, J.; PETLÁKOVÁ, V. Quality Control Measurements of PET System Siemens Ecat Accel.
9. ENGLIŠ, M.; ZAMRAZIL, V.; JIRKOVSKÁ, A.; ZEMAN, J.; BĚLOHLÁVEK, O.; PRÁŠEK, J. Karcinoembryonální antigen (CEA) u medulárního karcinomu štítné žlázy (kazuistika).
10. NIŽNANSKÁ, V. PET/CT? Diskrepance nálezů.
11. HANUŠTIAK, P.; MIKELOVÁ, R.; KŘÍŽKOVÁ, S.; ADAM, V.; HODEK, P.; STIBOROVÁ, M.; BEKLOVÁ, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R. Studium flavonoidů pomocí elektrochemické detekce na uhlíkové pastové elektrodě.
12. HLÍDKOVÁ, E.; LIPERT, J.; DRÁBKOVÁ, V.; ADAM, T.; CWIERTKA, K.; HAJDÚCH, M. Stanovení enzymatické aktivity dihydropyrimidin dehydrogenázy v krevních leukocytech jako prediktoru toxicity fluoropyrimidinových režimů.
13. HORÁČEK, J. M.; TICHÝ, M.; JEBAVÝ, L.; PUDIL, R.; ŽÁK, P.; MALÝ, J. Vliv onkologické léčby na cirkulující markery srdečního poškození v peritransplantačním období u akutních leukémií.
14. HORÁČEK, J. M.; PUDIL, R.; JEBAVÝ, L.; PÁSTOROVÁ, J.; ŠTRASOVÁ, A.; MALÝ, J. Elektrokardiografické změny v souvislosti s onkologickou léčbou.
15. KAPUSTOVÁ, M.; SCHNEIDERKA, P.; KREJČÍ, E.; BENEŠ, P.; CWIERTKA, K. Tumorové markery jako prediktivní a diagnostické faktory.
16. PROKOPCOVÁ, J.; JANATOVÁ, M.; POHLREICH, P. ATM jako predispoziční faktor vzniku karcinomu prsu.
17. SLOVÁČEK, L.; SLOVÁČKOVÁ, B.; JEBAVÝ, L.; BLÁŽEK, M. Kvalita života nemocných po transplantaci krevetvorných buněk na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN Hradec Králové: transverzální, retrospektivní studie.
18. SMOLEJ, L.; ANDRÝS, C.; POUR, L.; ŽÁK, P.; BELADA, D.; MAISNAR, V.; HRUDKOVÁ, M.; NOVOSAD, J.; ŠIROKÝ, O.; KREJSEK, J.; VOGLOVÁ, J.; MALÝ, J. Plasma concentrations of angiogenic activators VEGF and bFGF in patients with multiple myeloma, follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, and chronic myeloid leukemia.
19. SVOBODA, M.; BLAŠTÍK, O.; PRŮŠA, R.; KUKAČKA, J.; ZÍTKA, O.; ADAM, V.; PETRLOVÁ, J.; ZEHNÁLEK, J.; KIZEK, R. Analýza obsahu metalothioneinu u pacientů s nádorovým onemocněním.
20. VIGÁŠOVÁ, J.; KADLECOVÁ, J.; SPĚŠNÁ, R.; GAILLOVÁ, R.; PENKA, M.; HÁJEK, R. Relativní kvantifikace nádorově specifických antigenů MAGE u mnohočetného myelomu.
21. ZEHLEOVÁ, J.; TOPOLČAN, O.; TŘEŠKA, V.; POLÍVKOVÁ, V.; BARTOŠ, V.; ŠAFARČÍK, K.; SVOBODOVÁ, Š.; FÍNEK, J.; HOLUBEC, L. Interpretace výsledků nádorových markerů.
22. VIDLÁKOVÁ, P.; SMEJKALOVÁ, J.; OČADLIKOVÁ, D.; KOVÁŘOVÁ, L.; HANÁK, L.; ZAHRADOVÁ, L.; HÁJEK, R.; MICHÁLEK, J.; PENKA, M. Využití in vitro expandovaných tumor infiltrujících lymfocytů u pacientů s metastazujícím melanomem.
23. SVOBODA, M. Hypoxie, chemorezistence, invazivita, angiogeneze.
24. SMEJKALOVÁ, J.; MICHÁLEK, J.; STEJSKALOVÁ, A.; VIDLÁKOVÁ, P.; ŠTĚRBA, J.; PENKA, M.; HÁJEK, R. První protinádorová vakcína na bázi dendritických buněk připravená v ČR u dětských onkologických pacientů: předběžné výsledky klinické aplikace. (10', 3' diskuze)

Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie Olomouc 9. – 10. 12. 2005 Kongresové centrum RCO, Olomouc

POŘADATEL

Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti
České lékařské společnosti J. E. Purkyně
Laboratoř experimentální medicíny a Laboratoř molekulární patologie LF UP a FN Olomouc
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Fakultní nemocnice v Olomouci
Onkologické centrum Olomouc
Nadace pro výzkum rakoviny
Sdružení Šance

ORGANIZAČNÍ VÝBOR

MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.; MUDr. Katarína Petraková; MUDr. Filip Janků;
RNDr. Jiří Netočný; RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.; Mgr. Jitka Berkovcová, Ph.D.;
Doc. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.

KOORDINÁTOR KONGRESU

MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., LF UP a FN Olomouc

Kongres je ohodnocen 11 kredity pro lékaře v rámci kontinuálního vzdělávání ČLK,
a pro sestry v rámci vzdělávání ČAS 6 kredity za pasivní účast,
15 kredity za aktivní účast a 10 kredity za spoluúčast.

Organizační sekretariát

Ing. Pavel Karas, Solen, s. r. o.,
Lazecká 297/51 779 00 Olomouc,
tel. 582 397 457, mob. 777 557 426,
fax 582 396 099,
e-mail: karas@solen.cz,
web: www.solen.cz/seminare

ISBN 80-239-6302-3

1. PREDIKCE ÚČINNOSTI LÉČIV SMĚROVANÝCH DO EGFR/HER RODINY

10.00–12.05 hod. sál PEGASUS

Předsedající: HAJDÚCH, M.; KOLÁŘ, Z.; JANKŮ, F.

Predikce účinnosti protinádorových léčiv směřovaných do genové rodiny HER

Hajdúch M.

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

Klinická onkologie čelí v posledních několika letech stoupajícímu počtu výsledků plynoucích z molekulárního výzkumu patogeneze maligních onemocnění. Tyto informace jsou implementovány jak v oblasti diagnostické, tak terapeutické. Objevují se nová protinádorová léčiva principiálně odlišného charakteru než klasická cytostatika. Jejich mechanismus účinku je přísně specifický pro určité typy nádorů. Paralelně se zaváděním nových léčiv na trh se do popředí zájmu dostávají biomarkery účinnosti definující s přijatelnou pravděpodobností skupinu pacientů, kteří budou z této specifické léčby profitovat, dochází k individualizaci terapie. Tato individualizace se nevztahuje jenom na daného pacienta, ale může být specifická pro daný nádor v daném čase a postihuje tak biologickou podstatu zhoubného bujení, která je zejména u solidních nádorů založena na mimořádné heterogenitě, přizpůsobivosti a genetické nestabilitě nádorových populací.

Vůbec nejčastěji jsou nová protinádorová léčiva směřována do rodiny HER (ERBB), která zahrnuje receptorovou rodinu pro epidermální růstový faktor (EGF): HER1 (ERBB1, EGFR1), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) a HER4 (ERBB4). Jedním z nejvíce sledovaných protoonkogenů je gen HER2 (synonymum: ERBB2, Her-2/neu, neu, c-erbB-2) lokalizovaný na chromozomu 17q. Gen HER2 kóduje transmembránový protein p185^{HER2}, patřící do rodiny HER a má důležitou úlohu v normálním buněčném růstu a diferenciaci. Ve zdravých tkáních je produkován v nízkých hladinách. Amplifikace HER2 genu vede k nadprodukci receptoru, což se dává do souvislosti se vznikem různých typů nádorů u člověka (například karcinomy prsu, ovária, gastrointestinálního traktu). Patogenetická souvislost mezi nádorovou proliferací a amplifikací HER2 dala podnět k přípravě blokující humanizované protilátky proti extracelulární doméně genu HER2. Toto léčivo bylo později vyvinuto a registrováno pro léčbu metastatického karcinomu prsu pod názvem trastuzumab.

U buněk řady solidních nádorů epiteliálního původu byla popsána aktivace receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR1, HER1). Ten se ukazuje u řady solidních nádorů rovněž jako vhodná mole-

kula k cílenému léčebnému ovlivnění. Ke zvýšené aktivaci proteinu EGFR1 dochází jeho overexpresí, která je často způsobena amplifikací genu v genomu nádorové buňky. Aktivující charakter mají rovněž mutace přítomné v tyrozinkinázové doméně receptoru. Této oblasti proteinu odpovídají exony 18–24 genu *egfr1*. Po navázání příslušného ligandu na vazebné místo v extracelulární části receptoru pro EGF dochází k dimerizaci a následné fosforylaci proteinu, která nastartuje přenosovou kaskádu uvnitř buňky. Aktivovaný protein EGFR1 je zapojen do signálních drah ovlivňujících přežívání (PI3K/AKT, STAT dráha) a proliferaci buněk (MAPK dráha). Proti neřízené aktivaci proteinu EGFR1 je zaměřena cílená terapie nízkomolekulárními i vysokomolekulárními inhibitory EGFR1 tyrozinkinázy, které po navázání na protein inhibují fosforylaci tyrozinkinázové části receptoru (nízkomolekulární inhibitory – gefitinib a erlotinib) nebo brání interakci s ligandem na extracelulární části receptoru (vysokomolekulární inhibitory, např. cetuximab) a následně tak blokují aktivaci následných signálních drah. Receptorová inhibice tak vede ke snížené mitogenní aktivitě buňky a zpomalení, popřípadě regresi nádorového růstu.

Terapie protinádorovými léčivy směřovanými do HER rodiny je mimořádně nákladná a účinná pouze ve skupině pacientů s jednoznačnou patologickou aktivací příslušného genu, což vede ke zvýšeným požadavkům na přesné vyšetření řady prognosticko-prediktivních parametrů, jejíž význam bude v přednášce podrobně diskutován.

Poděkování: Práce na projektu byla podporována firmou Roche, Astra-Zeneca, granty MSM6198959216, IGA MZCR NC7506-3 a NC7495.

Celoštatny projekt detekciu stavu HER2 v novodiagnostikovaných případech karcinomu mléčné žlázy v intervale 1. 1. 2003 – 30. 10. 2005

Barthová M., Janáková L., Kajo K., Kvítkovská Z., Plank L.

Ústav patológie JLF UK a MFN v Martine

S cieľom zaistenia detekcie stavu HER2 vo všetkých novodiagnostikovaných prípadoch v SR bol k 1. januáru 2003 spustený celoslovenský projekt založený na spolupráci všetkých pracovísk slovenskej patológie. Podstatou projektu je štandardizácia biopťickej diagnostiky a regionálna centralizácia prípadov do 8 centier (vrátane nášho ústavu), ktoré štandardizovaným postupom (HerceptTest fy. DAKO-

Cytomation) verifikujú expresiu proteínu HER2 v nádorovom tkanive. Pozitívne prípady sú zasielané do nášho pracoviska ako koordinačného centra projektu s cieľom zaistenia detekcie amplifikácie génu HER2 metódou FISH (kit fy. DAKOCytomation) alebo CISH (kit fy. ZYMED). V doterajšom priebehu projektu bolo k 31. 10. 2005 v projekte zaregistrovaných 3467 prípadov, v ktorých bola verifikovaná expresia HER2 v proteíne. Súčasťou projektu bola aj kontrola kvality laboratorného postupu imunohistochemických vyšetrení vo všetkých zainteresovaných centrách, ako aj kontrola kvality interpretácie imunohistochemickej expresie HER2 proteínu s následným celoslovenským edukačným seminárom. Posledné komplexné zhodnotenie expresie HER2 proteínu prípadov projektu bolo za obdobie 1. 1. 2003 – 31. 12. 2004. V ňom bolo v súbore 2260 prípadov karcinómu mléčnej žľazy verifikovaných 523 prípadov s pozitívnu expresiou HER2 proteínu (23,1 % všetkých), a to 240 prípadov s pozitivitou 2+ (10,6 % všetkých) a 283 prípadov s pozitivitou 3+ (12,5 % všetkých prípadov). Doteraz bolo v období posledného 1,5 roka vyšetrených metódou FISH 32 prípadov a metódou CISH 45 prípadov. Pri použití metódy CISH boli testované prípady s rôznou úrovňou proteínovej expresie, a to nasledovne: z 11 testovaných prípadov s expresiou HER2 proteínu na úrovni 1+ boli všetky bez amplifikácie, z 26 testovaných prípadov s expresiou proteínu 2+ bolo 11 bez amplifikácie a 12 s amplifikáciou génu (3x so slabou a 9x so silnou amplifikáciou) a z 8 prípadov s expresiou proteínu 3+ všetky preukázali amplifikáciu génu HER2 (2x so slabou a 6x so silnou amplifikáciou). V analýze bola overená aj dobrá korelácia výsledkov detekcie amplifikácie HER2 génu metódou FISH a CISH. Získané výsledky v korelácii s ďalšími prognostickými významnými faktormi sú nápomocné pri stratifikácii pacientov do prognosticky relevantných skupín a pri voľbe vhodného terapeutického manažmentu.

Podakovanie: Autori ďakujú všetkým zainteresovaným slovenským patológom za kooperáciu na celoštátnom projekte a firme ROCHE Slovensko s.r.o. za podporu projektu.

Status genu Her-2/neu (c-erbB-2) a zkušenosti s vyšetřováním v referenční laboratoři

^{1,3}Trojanec R., ^{1,3}Hajdúch M., ⁴Palácová M., ⁴Vyzula R., ⁴Petráková K., ^{1,3}Braunerová B., ^{1,3}Bouchalová K., ^{2,3}Kolář Z., ^{2,3}Sedláková E., ^{1,3}Mlčochová S.

¹Laboratoř experimentální medicíny (LEM),
Dětská klinika FN a LF UP v Olomouci

²Laboratoř molekulární patologie při Ústavu
patologie, LF UP, Olomouc

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

⁴Masarykův onkologický ústav (MOU), Brno

Amplifikace a/nebo overexpres Her-2/neu genu indikuje nepříznivou prognózu u pacientek s karcinomem prsu. Přínosem pro tyto pacientky je geneticky cílená léčba trastuzumabem (Herceptin®). Mezinárodní studie Intergroup ukázala, že při vyšetření patientských vzorků v lokálních laboratořích (LL) bylo >27% vzorků určeno nesprávně jako pozitivní. Na základě uvedených dat bylo doporučeno vyšetřovat stav Her-2/neu receptorů pouze ve větších laboratořích, tj. v laboratořích, které vyšetří více než 250 vzorků ročně. Potřeba standardizovaného vyšetření Her-2/neu přinesla vytvoření národních referenčních center pro stanovení tohoto genu, resp. proteinu. Například ve Velké Británii (s 60 miliony obyvatel) pracují 3 taková centra – Londýn, Nottingham a Glasgow.

S cílem verifikace statusu genu Her-2/neu byla 1. 7. 2002 po vzoru zahraničních pracovišť a z iniciativy zdravotních pojišťoven a podpory firmy Roche s.r.o. zřízena Referenční laboratoř pro stanovení Her-2/neu (c-erbB-2) na LF UP v Olomouci. V rámci zvyšování kvality vyšetření byla cytogenetická část RL 31. 3. 2005 akreditována Českým institutem pro akreditaci (ČIA) dle normy ČSN EN ISO/IEC 17025, zbylá část RL v současné době proces akreditace podstupuje.

RL provedla vyšetření již více jak 1000 vzorků karcinomu prsu. U 40,8% případů byla detekována neshoda mezi RL a LL vyšší jak >1 IHC stupeň a u 21,1% dokonce >2 IHC stupně, což je z klinického pohledu významný rozdíl. Pouze 34,3% pacientek s IHC2+ (LL) bylo potvrzeno jako FISH pozitivní a tedy indikovatelných k léčbě Herceptinem.

RL zároveň provedla studii ve spolupráci s MOÚ, zaměřenou na rozdíl v odpovědi na léčbu u pacientek vyšetřených vs. nevyšetřených v RL.

Bylo provedeno statistické srovnání odpovědi na léčbu u 83 pacientek nevyšetřených a 42 vyšetřených v RL. Ačkoliv toto srovnání není zatím konečné, již první statistiky poukázaly na lepší léčebnou odpověď a prodloužení doby přežití u této skupiny pacientek z 37,7 na 64,6 týdne.

Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216, IGA MZCR NC7506-3, NC7495-3 a MPO 1H-PK/45.

Dá sa predpovedať stav HER2?

¹Kajo K., ¹Kviatková Z., ¹Plank L.,

¹Machálek K., ¹Szépe P., ²Žubor P.,

¹Janáková L., ¹Barthová M.

¹Ústav patologickej anatómie JLF UK a MFN,
Kollárova 2, 03659 Martin

²Gynekologicko-pôrodná klinika JLF UK
a MFN, Kollárova 2, 036 59 Martin

CIEL: testovanie modifikovanej schémy na vyjadrenie pravdepodobnosti stavu HER-2 v rámci celoslovenského programu detekcie HER2 v karcinómoch prsnej žľazy (CAP).

MATERIÁL A METODIKA: HER2 stav bol vyšetrený v 1986 prípadoch CAP pomocou imuno-histochemie (HerceptTest, Dako). Išlo o pacientov vo veku 24–93 rokov (medián 60 r.). Kompletne informácie o stave estrogénových (ER), progesterónových (PR) receptorov a histologickom grade (HG) boli známe v 1327 (66,7%) prípadoch.

Pre hodnotenie pravdepodobnosti stavu HER2 bola vytvorená schéma, tzv. Martinský skórovací index (MSI), v ktorej ide o sumarizáciu jednotlivých skóre HG, ER, PR (pri HG 1–2 body, HG 2–1 bod, HG 3–0 bodov; pre ER a PR pri negatívnom stave – 0 bodov, pri ER, resp. PR do 50% pozitívnych buniek – po 1 bode, pri ER a PR nad 50% pozitívnych buniek – po 2 body). Na základe výsledného MSI skóre boli prípady rozdelené do 7 skupín (0–6 bodov), kde skóre 0 bodov tvorili prípady s negatívnym stavom ER i PR a HG 3 (referenčná skupina). Pri skóre 6 bodov išlo o prípady s vysoko pozitívnymi ER, PR a HG 1.

VÝSLEDKY: HER2 bol pozitívny v 441 prípadoch (22,2%), z toho pri intenzite reakcie (IR) 3+ v 245 prípadoch (12,3%) a s IR 2+ v 196 prípadoch (9,9%). Boli zaznamenané štatisticky významné korelácie medzi stavom HER2 a HG, ER, PR (všetky $p < 0,0001$), ako aj stavom lymfatických uzlín ($p < 0,05$). Až 37,9% HER2 pozitívnych prípadov bolo v skupine s MSI 0 bodov, avšak pri MSI skóre 5–6 bodov bolo HER2 pozitívnych len 7,9% prípadov, pričom len v jednom prípade bola zaznamenaná pozitivita HER2 s IR 3+.

Ak boli za pozitívne považované len prípady s IR 3+, tak pravdepodobnosť pozitívneho stavu HER2 v kategóriách so skóre MSI 1–4 bodov je $OR = 0,26$ ($CI = 0,18-0,37$) a v kategóriách s MSI 5–6 bodov je $OR = 0,015$ ($CI = 0,002-0,106$). Ak boli za pozitívne hodnotené prípady s IR 2+ aj 3+, potom pravdepodobnosť pozitívneho stavu HER2 je v kategóriách s MSI 1–4 body približne polovičná voči referenčnej skupine ($OR = 0,42$; $CI = 0,31-0,58$) a v kategóriách s MSI 5–6 bodov je $OR = 0,14$ ($CI = 0,07-0,27$).

ZÁVER: Stav HER2 sa nedá predpovedať, ale dá sa vyjadriť jeho pravdepodobnosť pomocou MSI. Prípady s nejednoznačnou pozitivitou (IR 2+) je nutné podrobiť fluorescenčnej, resp. chromogénnej in situ hybridizácii za účelom potvrdenia, resp. vylúčenia amplifikácie HER2 génu. Zaujímavou je otázka prípadov s MSI skóre 0 a s negatívnym stavom HER2. Z nich časť by mohla predstavovať bazaloidné karcinómy prsnej žľazy, ktoré budú vyžadovať iný terapeutický manažment.

Podakovanie: Roche Slovensko

Sérový HER-2/neu v průběhu terapie Herceptinem u nemocných s karcinomem prsu

¹Šimíčková M., ²Petráková K., ²Svoboda M.,

¹Nekulová M., ³Pecena L., ¹Frgala T., ¹Nenutil R.

¹Masarykův onkologický ústav Brno, odd. laboratorní medicíny

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

³Ústav informatiky AV ČR Praha,

⁴Masarykův onkologický ústav Brno, odd. patologie, Brno

HER-2/neu, onkoprotein ze skupiny receptorů růstových faktorů, je zvýšeně exprimován v primární nádorové tkáni až u 30% nemocných s karcinomem prsu. Extracelulární doména tohoto onkoproteinu přechází do cirkulace a podle dosavadních poznatků má prognostický a prediktivní význam podobně jako průkaz HER-2/neu ve tkáni. V průběhu terapie Herceptinem, specifickou protilátkou proti tomuto onkoproteinu, jsme měli příležitost opakovaně vyšetřit jeho extracelulární doménu, sérový HER-2/neu (S_{HER2}), u 66 nemocných s metastatickým onemocněním karcinomu prsu léčených v letech 2000–2005 v našem ústavu (ELISA mikrodestičkový test firmy DAKO). Z tohoto počtu splňovalo dosud kritéria pro statistická hodnocení polovina nemocných. Pacientky bez odpovědi na terapii vykazují v době prvního restagingu signifikantně vyšší hodnoty koncentrace S_{HER2}, které obvykle od počátku terapie neklesají pod diskriminační hranici. U nemocných, u nichž bylo dosaženo nejlepší klinické odpovědi typu kompletní či partiální remise, je po 3 měsících léčby obvykle hladina S_{HER2} v normě, i když byla před terapií zvýšena. Sérový CA15-3 a CEA nevyskazují při hodnocení těchto dvou skupin responderů signifikantní změny. Rovněž při dlouhodobém monitorování je prediktorem selhání terapie především zvýšená hladina S_{HER2}. Monitorování koncentrace S_{HER2} během aplikace Herceptinu se zdá být vhodným parametrem pro zhodnocení účinnosti této terapie bezprostředně po jejím zahájení, tak i při její dlouhodobé aplikaci.

Poděkování: Práce byla provedena s přispěním výzkumných úkolů: Grant IGA MZ ČR – NR/8335 – 3 a NR/8270 – 3.

Examination of HER-2 SNP 655V gene polymorphism in risk assessment of breast cancer

¹Žubor P., ¹Danko J., ²Vojvodová A., ³Kajo K.,

¹Szunyogh N., ²Kviatková Z., ¹Galo S.,

³Machálek K., ¹Biringer K., ²Barthová M.,

⁴Dussan C.A., ³Plank L.

¹Department of Obstetrics and Gynecology,

²Department of Molecular Biology,

³Department of Pathology, all Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine, Martin, Slovak Republic,

⁴Department of Surgery, Division of Senology, European Oncology Institute, Milan, Italia.

Breast cancer belongs to the most frequent types of cancer affecting women and it occurs at any age. Around 1600–1800 women are getting ill annu-

ally in the Slovak republic. One of the most important factors in connection with cancer genesis refers to changes in specific genes. HER-2 proto-oncogene belongs to low penetrating genes, which increase susceptibility to breast cancer genesis. Clinical studies demonstrated an association between polymorphism at codon 655 of this gene and increased risk for breast cancer development.

The aim of this case-control based prospective study was to determine the distribution of HER-2 genotype and its association with risk factors of breast cancer in the population of Slovak women. HER-2 genotypes were determined with PCR – RFLP method. The DNA was isolated from white blood cell nuclei.

The frequency of Val allele in the cancer group was 29.51 % and was higher than in the control group 15.49 % ($p < 0.05$). The presence of the heterozygote (Ile/Val) genotype was identified in 45.90 % of patients in the case group and in 28.17 % in healthy individuals, and the homozygote (Val/Val) genotype in 6.56 % and 1.41 %, respectively ($p < 0.001$). The risk of breast cancer development for carriers of one valine (Val) allele in genotype was nearly three-times lower ($OR = 2.41$) than for carriers of two Val alleles ($OR = 6.89$) ($p < 0.01$). Risk of cancer genesis for Val allele carriers was higher in multiparas ($OR = 2.78$), among women with positive family history of breast cancer ($OR = 5.4$), BMI > 24 (kg/m^2) ($OR = 5.8$), late menopause ($OR = 1.6$), and early onset of menarche ($OR = 1.2$).

This study revealed relatively high frequency of the Val allele among the Slovak women population. Ile655Val polymorphism of HER-2 gene was associated with a statistically significantly increased risk of breast cancer all above in homozygotes for Val allele.

Acknowledgements: We would like to express our gratitude to the patients participated in this study. This work was supported by grant of Comenius University no. 22/2004.

Existují prognostické a prediktivní markery pro podání gefitinibu (Iressa) v léčbě nemalobuněčného bronchogenního faktoru (NSCLC)?

Skříčková J., Tomášková M., Svobodník A., Kaplanová J., Kadlec B., Babičková L., Pálková I., Nebeský T., Stratil D., Minárik M.**
FN Brno a LF MU (KNPT, RDK a PAÚ),
*Centrum biostatistiky a analýz LF a PŘF MU

** Genomac International Praha

Cíl práce: Gefitinib (Iressa) je selektivní inhibitor tyrozinkinázové aktivity receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Hodnotíme výsledky léčby u 92 nemocných s NSCLC, kterým byl gefitinib podáván v rámci programu časného přístupu a hledáme prediktivní a prognostické markery v léčbě gefitinibem u nemocných, u nichž byla zahájena léčba mezi únorem 2002 a srpnem 2004.

Pacienti a metody: Gefitinibem byli léčeni nemocní s NSCLC, především v pokročilém klinickém stádiu (IIIB a IV) a především ve 2., 3., zcela výjimečně v 1. linii léčby. Lék byl podáván perorálně v dávce 250 mg/den do progresu. Hodnotili jsme léčebnou odpověď, přežití, zlepšení příznaků a dobu do progresu u těchto nemocných. Současně byla zpracována mutační analýza genu pro EGFR, ve které jsme se zaměřili na mutaci v exonu 19 jako možného prediktivního markeru a analýza některých předpokládaných prognostických markerů jako jsou pohlaví, kouření, výkonnostní stav nemocného (PS) či histologický typ nádoru. Na podkladě výsledků získaných analýzou jsme se pokusili potvrdit či vyloučit existenci markerů, které by byly spojeny s lepší léčebnou odpovědí nebo delším mediánem přežití.

Výsledky: Mutační analýza byla úspěšná u 62 z 92 nemocných (76 %). Přítomnost mutace v exonu 19 byla prokázána u 51 %. Mezi skupinami pacientů podle přítomnosti mutace v exonu 19 bylo celkové přežívání 13 měsíců a 13,3 měsíců od data diagnózy a 5 měsíců a 6,4 měsíců od zahájení léčby gefitinibem. Doba do progresu byla u nemocných 6 měsíců a 5,1 měsíců od data diagnózy a 3 měsíce v obou skupinách od data zahájení léčby gefitinibem. Ve skupině nemocných s PS 1 byl medián přežití 10,3 měsíce, ve skupině s PS 2 5,5 měsíce a ve skupině s PS 3 2,9 měsíce. Rozdíl v přežití těchto 3 skupin je statisticky významný.

Závěry: Na základě mutační analýzy genu pro EGFR a statistického zpracování výsledků léčby u souboru 92 nemocných s nemalobuněčným bronchogenním karcinomem léčených selektivním inhibitorem tyrozinkinázové aktivity receptoru pro epidermální růstový faktor – gefitinibem – nebyla nalezena korelace mezi přítomností mutace v exonu 19 a dobou do progresu ani mediánem přežití. Byla nalezena korelace mezi PS a linií léčby gefitinibem mezi předpokládanými prognostickými faktory.

Výsledky analýzy aberací Egfr1, Her2/neu a K-ras u pacientů s karcinomem plic na terapii gefitinibem v rámci programu časného přístupu

¹Berkovcová J., ¹Dziechciarková M.,
¹Trojanec R., ¹Janošťáková A., ¹Wiecek S.,
²Grygárková I., ²Kolek V., ¹Hajdúch M.

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

²Klinika plicních nemocí a tuberkulózy LF UP a FN Olomouc

Dysregulace proteinů z EGFR rodiny byla zjištěna u buněk celé řady nádorů. Znamé patologické změny jsou především u dvou členů této rodiny: Her2/neu a Egfr1, proto jsou vhodným cílem pro terapeutické ovlivnění. Novou možností pro pacienty s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) jsou nízkomolekulární inhibitory Egfr1 – gefitinib a erlo-

tinib. Léčebná odpověď typu kompletní či parciální remise je však zaznamenána u relativně malého počtu pacientů (přibližně 10 %). Ke zvýšené aktivitaci Egfr1 přispívá několik mechanismů: amplifikace genu egfr1, overexprese genu egfr1, popřípadě aktivující mutace genu egfr1 nejčastěji přítomné v exonu 19 (cca 50 % všech mutací) a exonu 21 (cca 40 % všech mutací). Rezistence na léčbu gefitinibem je způsobena mechanismy, které nesouvisejí se zvýšenou aktivitou Egfr1. Přibližně u 10 % rezistentních pacientů se nachází aktivující mutace kodonu 12 nebo 13 genu k-ras. Protein K-ras je členem MAPK signální dráhy a za fyziologických podmínek je aktivovaný proteinem Egfr1.

U souboru 84 pacientů s NSCLC (57 mužů / 27 žen), kteří byli léčeni gefitinibem v rámci programu časného přístupu, byly vyšetřeny aberace genu Egfr1 a K-ras. U 4 pacientů byla zaznamenána parciální regrese onemocnění a u 31 pacientů byla zastavena progresse onemocnění (SD). Výchozím materiálem pro vyšetření byla zamražená nádorová tkáň, nebo parafinové bloky, popřípadě cytologické preparáty. Ze vzorků s >70 % zastoupením nádorových buněk byla izolována DNA pomocí komerčního kitu firmy Qiagen. Ze vzorků s <70 % zastoupením nádorové populace byly nádorové buňky získány metodou laserové mikrodisekce. Bodové mutace genu Egfr1 a K-ras byly detekovány přímou sekvenací exonu 21 genu Egfr1 a exonu 1 genu K-ras. Delece exonu 19 genu Egfr1 byly vyšetřovány pomocí fragmentační analýzy PCR produktů a potvrzeny sekvenací jednotlivých fragmentů. Expresse Egfr1 a Her2/neu byla stanovena imunohistochemicky pomocí myších monoklonálních anti-lidských protilátek firmy DakoCytomation. Metodou FISH byl určen počet kopií genu Egfr1 a Her2/neu na tkáňových řezech či cytologických preparátech nádorových tkání.

Mutace genu Egfr1 byla detekována u 4 pacientů, z toho u 2 pacientů se jednalo o u mutaci L858R v exonu 21 (PR), u jednoho byla přítomna mutace L862Q exonu 21 (klinická odpověď neznámá) a u posledního z nich delece exonu 19 (PR) spojená s inzercí jedné aminokyseliny (del 747–753 ins S). Mutace genu K-ras byly vyšetřeny u 77 pacientů, u žádného pacienta nebyla nalezena současná mutace Egfr1 a genu K-ras v kodonu 12 v exonu 1 a současně žádný z pacientů s mutací v K-ras genu z terapie gefitinibem neprofitoval.

U 28 sledovaných pacientů byla stanovena expresse Egfr1 v nádorových buňkách. U 4 z nich byla expresse Egfr1 negativní. U 16 nemocných byla zaznamenána 80–100 % pozitivita nádorových buněk; ve většině případů se jedná o pozitivitu membránovou, ve 2 případech byla zaznamenána kombinovaná pozitivita (membránová a cytoplazmatická) a ve dvou případech pozitivita pouze aberantní cytoplazmatická. U 4 pacientů byla detekována vyšší než 50 % membránová pozitivita expresse Egfr1 a u zbývajících 4 nemocných menší než 50 % expresse Egfr1. Expresse EGFR1 receptoru v našem souboru pacientů nebyla vázaná na klinickou odpověď

na gefitinib. Expres Her2/neu byla detekována u 24 vyšetřovaných pacientů, z toho pouze u 2 pacientů byla zaznamenána vyšší jak 60 % membránová pozitivita. U těchto nemocných byla rovněž zaznamenána zvýšená exprese Egrf1.

Metodou FISH bylo vyšetřeno celkem 25 pacientů ze sledované skupiny. Amplifikace genu Egrf1 byla zjištěna u 4 pacientů a u 1 nemocného trizomie chromozomu 7. U 2 pacientů byly detekovány hraniční hodnoty ukazující na patologické změny na chromozomu 7 v oblasti genu Egrf1. Většina pacientů s amplifikací genu Egrf1 měla typ klinické odpovědi SD. U pacientů s klinickou odpovědí typu SD či PR bez amplifikace Egrf1 jsme našli amplifikaci genu Her2/neu.

Výsledky naší studie potvrzují publikovaná data a ukazují, že klinickou odpověď NSCLC pacientů na gefitinib lze racionálně predikovat na základě in vitro vyšetření.

Poděkování: Práce na projektu byla podporována firmou Astra-Zeneca, granty MSM6198959216, IGA MZCR NC7506-3 a NC7495.

Cílená biologická léčba nádorů – rizika nových vedlejších nežádoucích účinků léčby

¹Čwierka K., ²Grygáková I., ¹Beneš P., ¹Krejčí E., ²Kolek V.

¹ Onkologická klinika LF UP Olomouc a FN Olomouc, Olomouc

² Klinika TRN LF UP Olomouc a FN Olomouc

Vývoj na poli molekulární biologie vedl k poznání mnoha důležitých buněčných procesů, které hrají významnou úlohu v regulaci proliferace, apoptózy, zvyšují schopnost přežít po vystavení toxickým látkám nebo se podílejí na regulaci angiogeneze, a tím významným způsobem ovlivňují průběh nádorového onemocnění. Tato skutečnost přispěla k intenzivnímu hledání nových možností cíleného zásahu a tím i vývoji nových léků, které by mohly působit selektivně na nádorovou populaci. V klinické praxi se začaly v posledních letech používat monoklonální protilátky proti extracelulární části proteinů z rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (HER1 a HER2),

nízkomolekulární inhibitory tyrosinkinázové aktivity těchto receptorů a monoklonální protilátky proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF).

Trastuzumab (Herceptin®) má v dnešní době již nezastupitelné místo v léčbě nemocných s metastatickým karcinomem prsu s amplifikací genu pro HER2 příp. zvýšenou expresí jeho produktu. Zvláště kombinace s taxany vede k významnému prodloužení přežití. První prezentované výsledky studií, kdy je trastuzumab používán v adjuvantní léčbě nemocných s karcinomem prsu se zvýšenou expresí či amplifikací genu HER2, rovněž slibují zlepšení výsledků léčby ve smyslu snížení rizika recidivy a prodloužení přežití. Dosavadní klinické zkušenosti přinesly základní poznatky o spektru nežádoucích účinků. Mezi příznaky spojené s podáním infuze patří horečka a třesavka, bronchospasmus, tachykardie, alergické a hypersenzitivní reakce a řada dalších. Byly zaznamenány izolované případy závažných plicních příhod, které v několika případech vedly k úmrtí pacientky. Zvláštní pozornost je nutné věnovat kardiotoxicitě. Dochází ke snížení ejekční frakce levé komory, v závažnějších případech dochází k srdečnímu selhávání. Vyšší riziko kardiotoxicity lze pozorovat u nemocných předléčených antracykliny. Podání trastuzumabu v kombinaci s doxorubicinovým režimem vedlo k nepřijatelnému vzestupu klinicky závažné kardiotoxicity. Tato zkušenost vedla k tomu, že v současné době podání s doxorubicinem je nepřijatelné a možnost kombinace s méně kardiotoxickými antracykliny např. s liposomálním doxorubicinem či epirubicinem je předmětem probíhajících klinických studií.

Monoklonální protilátka proti EGFR cetuximab (Erbix®) je v současné době schválena pro 2. linii léčby kolorektálního karcinomu po selhání chemoterapie na bázi irinotekanu. U přibližně 5 % pacientů se mohou objevit během léčby cetuximabem alergické reakce. Přibližně polovina těchto reakcí je závažných. Dochází k nim obvykle v průběhu nebo 1 hodinu po zahájení úvodní. Mezi příznaky patří bronchospasmus, stridor, chrapot, obtíže při mluvení, kopřivka a/nebo hypotenze. U cca 5 % pacientů se může objevit konjunktivitida. Spe-

cifickým problémem je kožní reakce, se kterou se setkáváme u více než 80 % pacientů, z toho přibližně 15 % z těchto reakcí je závažných. Projevují se hlavně jako akneformní vyrážka a/nebo méně často jako poruchy nehtů (např. paronychie). Většina kožních reakcí se objeví během prvních týdnů léčby. Přítomnost závažné kožní toxicity je však dobrým prediktivním faktorem spojeným s lepší odpovědí na léčbu a delším přežitím.

Se specifickou kožní toxicitou se setkáváme i v případě nízkomolekulárních inhibitorů tyrosinkinázové aktivity EGFR – gefitinibu (Iressa®) a erlotinibu (Tarceva®), které byly zkoumány hlavně u nemalobuněčného bronchogenního karcinomu a nádorů hlavy a krku. Tato toxicita vedla u části pacientů k následnému snížení dávky. Rovněž i zde se jeví, že přítomnost závažné kožní toxicity může předpovídat lepší výsledek léčby.

Monoklonální protilátka proti VEGF bevacizumab (Avastin®) je v současnosti jediná schválená antiangiogenetická léčba, a to v první linii léčby metastatického karcinomu tlustého střeva. Mezi nejzávažnější pozorované nežádoucí účinky patří gastrointestinální perforace, riziko krvácení, a riziko tromboembolických příhod. Dále se setkáváme se zhoršením hypertenze, s astenií, průjmami, nauseou a nespecifikovanými bolestmi. Vzhledem k tomu, že léčba bevacizumabem může zhoršovat hojení ran a riziko krvácení, je nutné časné přerušování léčby např. před plánovaným chirurgickým zákrokem.

Závěr: Nové možnosti cílené léčby nádorů (targeted therapy) přináší novou naději pro nemocné s nádorovým onemocněním. Velmi zajímavá je nejen účinnost, ale i možnost predikce odpovědi na léčbu (např. u trastuzumabu). Tam, kde nejsme zatím schopni předpovídat odpověď na léčbu, intenzivně hledáme spolehlivý prediktivní faktor. Nová terapie je však spojena i se specifickou toxicitou, se kterou jsme se v dobách klasické chemoterapie nesetkávali tak často. Léčba by měla být prováděna ve specializovaných centrech s adekvátním laboratorním zázemím.

Poděkování: práce podpořena granty MSM 6198959216, IGA MZ CR NC7506 a NC7495

2. NOVÉ TECHNOLOGIE V DIAGNOSTICE, PROGRAMOVÁNÍ A PREDIKCI ODPOVĚDI NÁDORŮ NA TERAPII

10.00–12.05 hod. sál PERSEUS

Předsedající: JAROŠOVÁ, M.; SVOBODA, M.; Ehrmann, J.

Využití laserové mikrodisekce v diagnostice a prognózování nádorových onemocnění

¹Dziechciarková M., ^{1,2}Hajdúch M., ¹Trojanec R., ¹Berkovcová J.

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

²Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Laserová mikrodisekce (LCM) je rychlá a spolehlivá metoda která umožňuje izolaci cílových buněk ze specifického komplexu tkáně pro jejich následnou molekulární nebo proteinovou analýzu. Základem LCM je inverzní mikroskop se zabudovaným nízko výkonnostním infračerveným laserem. Nařezané tkáně jsou upevněny na standardní podložní sklíčko a termoplastická membrána je umístěna nad dehydratovaný preparát. Ohniskem laserového mikroskopu se aktivuje termoplastická membrána která je navázána k identifikované cílové buňce v mikroskopované části preparátu. Laser roztaví termoplastickou fólii v daném místě, kde je navázána cílová buňka. Laserová mikrodisekce byla použita pro izolaci buněk u řady typů buněčných i tkáňových preparátů, včetně zamražených vzorků, formalímem fixovaných, parafrinovaných tkání či cytologických preparátů. V závislosti na použitém materiálu z mikrodisekovaných buněk je možno extrahovat DNA, mRNA či proteiny v dobré kvalitě. Kombinací s dalšími technikami, jako například cDNA microarrays, by LCM měla pomoci identifikovat nové diagnostické a prognostické markery vedoucí ke zlepšení diagnosticko terapeutických metod v léčbě onkologických onemocnění.

Laserovou mikrodisekcí byly izolovány na našem pracovišti buňky z cytologických preparátů karcinomů plic získaných punkční cytologií (barveno metodou Giemsa-Romanowsky), zamražených či parafrinovaných nádorových tkání (barveno hematoxylinem) a stabilní buněčné linie K562 (barveno neutrální červení). Naším metodickým cílem bylo zavést kombinaci LCM s lineární amplifikací DNA pro účely dalších genetických analýz z biologického materiálu s minimálním obsahem nádorových buněk, či pro studium nádorové heterogenity na jednobuněčné úrovni.

Buňky nasbírané pomocí LCM byly v mikropodmínkách lyzovány proteinázou K a DNA byla uvolněná do roztoku. Po tepelné inaktivaci proteinazy

K, byla dvoušroubovice DNA rozštěpena restričním enzymem *MseI* a na rozštěpené konce byly navázány adaptéry se specifickými sekvencemi. Pomocí těchto sekvencí byla DNA následně amplifikována v PCR reakci. Tento primární produkt byl následně použit pro další genetické analýzy, např. komparativní genomickou hybridizaci z jedné buňky nebo amplifikaci a sekvenování exonů 19 a 21 EGFR1 receptoru pro predikci účinnosti nízkomolekulárních EGFR1 inhibitorů.

Naše zkušenosti potvrzují použitelnost této nové technologie pro rutinní izolaci cílových buněk za účelem amplifikace DNA pro další (cyto)genetické analýzy.

Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216, IGA MZCR NC 7495-3 a MPO 1H-PK/45.

Laserová skenovací cytometrie – použití v histopatologické diagnostice nádorů

Galbavý Š.¹, Kuliffay P.¹, Sanisló L.², Kaušitz J.³

¹Oddelenie patológie Ústavu laboratórných vyšetřovacích metod LFUK a OÚSA Bratislava

²Oddelenie rádioterapie, OÚSA, Bratislava

³Oddelenie imunodiag. Ústavu laboratórných vyšetřovacích metod LFUK a OÚSA, Bratislava

Úvod: Laserová skenovací cytometrie (LSC) je novou diagnostickou metodikou, která umožňuje cytometrickou analýzu histologických preparátů jako aj imobilizovaných buniek získaných inými postupmi na podložnom sklíčku. Buniek sa farbja fluochrómami a analyzujú sa 1 alebo 2 lasermi. Hlavnou výhodou LSC je možnosť analyzovať minimálne množstvo buniek v klinickej vzorke typu FNAC a FNAB a analyzované údaje korelovať so štandardným histopatologickým vyšetrením.

Cieľ práce:

1. Analýza tkanív a stanovenie ploidie (DNA index)
2. Detekcia cirkulujúcich nádorových buniek v periférnej krvi
 - prognostický význam
 - manažment onkologickej liečby

Materiál a metódy: Pilotná štúdia, v ktorej sme použili na vyšetrenie nádorové tkanivo pacientov s nádormi spojivového tkaniva (5). Nádory prsníka (10). Nádory vaječníkov (10) a iné (3). Ďalším ma-

teriálom bola periférna krv pacientiek s karcinómom prsníka (13).

Výsledky: Stanovenie ploidie a DNA indexu vo vyšetrených borderline tumoroch ovária upresnilo diskriminácie medzi low a high grade skupinou. V krvi pacientiek s karcinómom prsníka sme detegovali viabilné nádorové bunky.

Záver: LSC dovoľuje upresniť diagnostický záver histopatologického vyšetrenia. Deteguje nádorové bunky v periférnej krvi s možnosťou stanovenie predikcie chemo- a rádioterapie.

Význam metódy arrayCGH u hematologických nemocných – Přehled a vlastní výsledky

¹Jarošová M., ¹Plachý R., ¹Pospíšilová H.,

²Budinská E., ¹Holzerová M., ¹Papajík T.,

³Mihál V., ¹Indrák K.

¹Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

²Centrum biostatistiky a analýz, LF a PŘF MU Brno

³Pediatrická klinika FN a LF UP Olomouc

V průběhu posledních dvaceti let se významným způsobem změnila naše poznatky o možných příčinách vzniku nádorového onemocnění. Bylo potvrzeno, že vznik nádorového onemocnění je mnohokrát proces, ve kterém dochází ke kumulaci mnoha genetických změn. Jsou to získané aberace, které představují jak změny v počtu chromosomů, tak strukturní změny jako translokace, delece a amplifikace určité cytoteneticke, tak genové přestavby a mutace detekovatelné především molekulárně geneticky. Cílem genetických studií je určení všech genetických změn, ale jejich určení je komplikováno neznalostí jejich počtu a typu u daného onemocnění. Potřebujeme metody s co největším potenciálem k určení většiny, pokud ne všech genetických změn.

Takovou metodou je DNA microarray, která dovoľuje monitorovat v jednom experimentu stovky až tisíce genů najednou.

Metoda array komparativní genomová hybridizace (arrayCGH) (array Comparative Genomic Hybridization) je molekulárně cytogenetická metoda, založená na kohybridizaci rozdílně značené nádorové a kontrolní DNA k microarray neboli čipu. Microarray je hybridizační sklo, na jehož speciálním povrchu jsou umístěny fragmenty DNA klonovaných genů.

Cílem našeho sdělení je informovat o principu, současných možnostech a využití metody arrayCGH

k určení kvantitativních změn genů u nemocných s hemato-onkologickým maligním onemocněním.

Poděkování: Práce je podporována granty IGA NC7644, MŠM 619895920 a Grantem Česko-vlámské spolupráce č.15.

Využití DNA čipů (profilů genové exprese) pro molekulární diagnostiku a predikci u karcinomu prsu

Svoboda M., Grell P., Petráková K.
Masarykův onkologický ústav Brno, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

Naše současné porozumění pro většinu nádorů je stále omezeno především na jejich histologickou klasifikaci, grading, klinický rozsah a ojedinělé molekulární markery choroby. Kombinace těchto kritérií je více či méně úspěšně používána k rozlišení prognosticky odlišných skupin. Z pohledu 21. století charakterizovaného rozvojem nových technologií na poli molekulární biologie a genetiky, a existencí částečně i kompletně zmapovaných genomů již několika organismů, včetně úplné sekvence lidského genomu, se to jeví jako nedostatečné. Je-li aberantní genová exprese skutečně klíčovým krokem iniciace, promoce a progresu tumoru, a platí-li základní dogma informačního toku v biologických systémech (DNA→RNA→protein→fenotyp), vzniká tak předpoklad, že biologické koreláty genové exprese jsou identifikovatelné. Naděje je proto vkládána do DNA čipů (DNA microarrays), které představují zařízení schopné ve velmi krátkém čase paralelně detekovat a kvantifikovat expresi až desítky tisíc genů (profil genové exprese) a nebo identifikovat variabilitu genetického kódu. DNA čipové analýzy nám umožňují globální pohled na genovou expresi nádoru a identifikaci genetických markerů důležitých pro diagnostiku, klasifikaci a predikci nádorového onemocnění (1). To dokazuje celá řada prací na toto téma publikovaných. V naší přednášce se zaměříme na dosažitelné využití DNA čipů a získaných profilů genové exprese u karcinomu prsu. Ve stručném přehledu některé výsledky uvádíme.

Perou a kolektiv publikovali v roce 2000 v *Nature* (2) a v roce 2001 v *PNAS* (3) práce, ve kterých na základě profilu genové exprese identifikovali 4 hlavní skupiny karcinomu prsu. První skupina karcinomu byla charakterizována expresí cytokeratinů lumenálního typu a estrogenových receptorů. Byla proto označena „luminal group“ a podle intenzity exprese rozdělena na podskupinu „luminal-A“, s vysokou expresí těchto markerů, a „luminal-B / luminal C“ s nízkou expresí. Druhá skupina karcinomu byla odlišitelná pomocí vysoké exprese HER2. Třetí skupina, „basal-like“, se vyznačovala vysokou expresí cytokeratinů bazálního typu a sporadickou expresí estrogenových receptorů. Čtvrtá skupina byla pojmenována „normal breast-like“ a byla pro ni charakteristická exprese genů exprimovaných především tukovou a neepiteliální tkání z karcinomu prsu. Uvedené rozdělení mělo silný prognostický

význam. Vicedimenzionální biostatistické zpracování výsledků navíc potvrdilo unikátnost genového profilu konkrétního nádoru, neboť profily párových vzorků z tumoru jednoho pacienta (před a po léčbě, nebo primární tumor a uzlinová metastáza) byly v naprosté většině případů řazeny do těsné vazby k sobě, mezitím co profily tumorů od různých pacientů byly vždy mnohem více rozdílné. Z toho vyplývají dvě důležité informace. Za prvé, každý onkologický pacient je nositelem tumoru jehož molekulární profil je unikátní a odlišitelný, a za druhé, profil genové exprese metastatického ložiska je odvozený od profilu primárního nádoru. Uvedených poznatků lze využít pro výzkum prediktivních a prognostických molekulárních markerů.

Klinického využití DNA mikročipů dosáhla holandská skupina (van't Veer a kolektiv), která objevila profil genové exprese založený na 70 vyselektovaných genech v jejichž expresi se signifikantně odlišovaly pacientky I. a II. klinického stádia, u kterých onemocnění do 5 let od diagnózy metastazovalo nebo dosáhlo 5 let kompletní remise [4]. V současné době byla pod záštitou EORT/BIG zahájena multicentrická prospektivní randomizovaná klinická studie III. fáze s názvem „MINDACT“ (Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy), která si klade za cíl ověřit funkčnost tohoto 70 genového profilu. Bude-li jeho prognostická síla potvrzena, budeme moci v klinické praxi na základě tohoto profilu selektovat pacientky s karcinomem prsu I. a II. klinického stádia k adjuvantní protinádorové léčbě. Identifikace profilu za podobným účelem, který je založen na expresi 76 genů, se podařila i týmu pracovníků Y. Wang. Jejich práce byla publikována v letošním roce v *Lancet* (5). Klinického použití poznatků z DNA mikročipových analýz využívá i americká skupina z Dana Farber Cancer Institute, která svou klinickou studii II. fáze založila na zjištění, že karcinomy prsu charakterizované buď přítomností BRCA1 mutace, nebo „triple negative phenotype“ (ER-, PR-, HER-2 neg), nebo „basal-like group“ genotypu tumoru, mají do jisté míry podobné profily genové exprese (6). Vzhledem k tomu, že v preklinických experimentech byla prokázána zvýšená citlivost buněčných linií karcinomu prsu nesoucích BRCA1 mutaci k interkalačním látkám (7), je u pacientek I. a II. klinického stádia zařazených do studie podávána chemoterapie založená na cisplatině.

Nabízí se řada dalších využití stávajících poznatků z DNA čipových analýz. Například zajímavá je jistě otázka, zda karcinomy z jednotlivých podskupin „luminal A, B a C“ mají stejný benefit z adjuvantní léčby tamoxifenem? Nebo jestli DNA čipy mohou predikovat rezistenci na léčbu trastuzumabem?

DNA mikročipy představují technologii, která bezesporu v blízké budoucnosti dosáhne použití v rutinní klinické praxi. Relativní mladost této technologie a její náročnost na metodiku a biostatistické analýzy se sebou přináší rizika, která nás oprávněně nutí ke zvýšení kritičnosti k dosaženým výsledkům a k vyčkávání na závěry klinických studií.

Poděkování: Práce byla provedena s přispěním výzkumných úkolů: Grant IGA MZ ČR – NR/8335 – 3 a NR/8270 – 3.

Literatura

1. Svoboda M., et al. *Lékař a technika*, 2004; 35 (3): 67–75.
2. Perou, C.M., et al. *Nature*, 2000; 406: 747–752.
3. Sorlie, T. et al. *PNAS*, 2001; 98: 10869–10874.
4. van't Veer, I.J., et al. *Nature*, 2002; 415: 530–536.
5. Wang, Y., et al. *Lancet*, 2005; 365: 671–679.
6. Preoperative Cisplatin in Early Stage Breast Cancer, II Phase Study, DFCI 04-183.
7. Ratanaphan, A. et al. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2005; 1725 (2): 145–151.

Proteomické technologie v biomedicině

Havlíček V.

Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha

Od cca poloviny devadesátých let zcela výsadní postavení mezi analytickými technikami používanými v biologických vědách zaujímá organická hmotnostní spektrometrie, která se nemalou měrou zasloužila o vznik proteomiky. Důvody jejího raketového startu jsou prosté: hmotnostní spektrometrie je nesmírně citlivá, specifická, rychlá a „umi“ pracovat i s velmi komplikovanými směsmi. Nejběžnější proteinově-sekvenční hmotnostně-spektrometrický protokol začíná změřením hmotnosti celé biomolekuly, která je následně enzymově nebo chemicky rozštěpena na menší části. Změřené *m/z* hodnoty protonovaných molekul peptidů se zadají do některého z vyhledávacích algoritmů, který srovnává změřené hodnoty s teoretickými peptidovými mapami dosud charakterizovaných proteinů (peptide mapping). Vyhledávání v databázích se pohybuje v řádu sekund a pokud protein tímto postupem charakterizován není, použije se následně metoda peptidového sekvenování. Kolizní spektra poskytují informaci o pořadí aminokyselin v peptidu, které bývá pro daný protein specifické. Uspořádání experimentu se samozřejmě liší podle typu použitého hmotnostního analyzátoru nebo jejich kombinací. Změřená kolizní spektra lze srovnat s databází teoretických kolizních spekter peptidů, které vznikly štěpením známých proteinů vybranou proteázou, případně hypotetických proteinů, jejichž aminokyselinová sekvence byla získána teoretickým překladem nukleotidové sekvence (pokud byl genom daného organismu osekvenován). Pokud není protein charakterizován ani tímto postupem, zbývají dvě možnosti. Tou první je *de novo* sekvenování celého proteinu, což je procedura značně neelementární. Je třeba stanovit sekvence z kolizních spekter všech peptidů a z nich následně celý protein sestavit. Druhou variantou je získání částečné sekvenční informace (sequence tag) z kolizních spekter několika peptidů, návržení primerů pro syntézu oligonukleotidových sond a finální příprava, izolace a sekvenování cDNA, která daný protein kóduje.

Poděkování: MŠMT (LC545), GAČR (203/04/0799 a 203/05/P575), Evropská Komise (MTKD-CT-2004-014407).

Princip multiplexové analýzy a její využití v onkologické praxi

Karlíková M., Topolčan O., Vrzalová J., Holubec L.

Laboratoř pro imunoanalýzu, Univerzita Karlova – Lékařská fakulta Plzeň

Multiplexová analýza je moderní a rychle se rozvíjející metodou stanovení biomarkerů v různých klinických materiálech. Jedná se o kombinaci průtokové cytometrie a imunoanalytického stanovení. Základem stanovení jsou molekulární reakce probíhající na barevně kódovaných mikrokuličkách. Až 100 různě kódovaných sad mikrokuliček, nesoucích různé biologické „sondy“ (tj. reagentie specifické pro jednotlivé analýzy – antigeny, protilátky, oligonukleotidy, enzymové substráty nebo receptory) pro navázání analytu ze vzorku, umožňuje 100 různých reakcí v jediném alikvotu vzorku, objem vzorku pro analýzu je navíc zapotřebí jen 10–50 mikrolitrů. Testy probíhají na povrchu mikrokuliček a množství reakcí, představující množství stanovovaného analytu, je určeno pomocí fluorescenčně značených referenčních molekul, jež se naváží na molekuly analytu zachycené na mikrokuličkách. Poté jsou mikrokuličky s použitím tzv. nosné kapaliny v řadě za sebou vnášeny do dráhy paprsků dvou laserů o rozdílné vlnové délce. Jeden z laserů excituje směs barviv zabudovanou v mikrokuličkách a určuje druh analytu, druhý laser excituje fluorescenčně značené referenční molekuly na povrchu mikrokuliček a stanovuje množství analytu.

Tento systém multiplexové analýzy má tedy dvě hlavní výhody:

1. možnost stanovení až 100 analytů v jediném alikvotu vzorku
2. malý objem vzorku potřebný pro analýzu – 10–50 µL.

Tyto výhody předurčují metodu pro výzkum, kde je k dispozici jen omezený objem vzorku (práce s laboratorními zvířaty, zpracovávání materiálu z tkáňových kultur a pod). V rutinní praxi se nepochybně metodika uplatní pro vyšetřování biologicky aktivních látek u novorozenců a v pediatrii obecně. Nové možnosti se objeví při vyšetření biotického materiálu. Současné vyšetření rozsáhlého panelu látek umožní daleko podrobněji studovat nejen etiopathogenezi, ale i dynamiku chorobného procesu. V současné době jsou již v rutinní diagnostice používány panely pro stanovení autoprotilátek, což

nejen zlepšuje diagnostiku, ale umožní i objektivní kontrolu léčby autoimunních chorob. Nové možnosti nabízí multiplexová analýza v onkologii. Existující panely na stanovení cytokinů, adhezivních molekul, metaloproteináz a apoptotických markerů, kromě toho že přispějí k lepšímu pochopení invazivity nádoru a procesu metastázování, umožní i daleko spolehlivě určovat prognózu nádorového onemocnění. Nezastupitelné místo bude mít nepochybně multiplexová analýza při volbě, optimalizaci a individualizaci léčby v onkologii. Nepochybně své využití najde i při dynamických dlouhodobých studiích při zkoušení a klinickém ověřování nových léků. Umožní zvolit kombinaci parametrů podle potřeby s ohledem na charakter prováděné terapie a studovat i vzájemné interakce parametrů.

V současné době se jedná o metodu především výzkumnou, ale velice rychle je možno očekávat její použití v rutinní každodenní klinické praxi. Je nutno se zmínit i o některých nevýhodách této metody pro klinickou praxi, což jsou především dlouhé časy inkubace (14–18 h), a tedy nelze analýzy provádět statimově, a též se metoda nevyplácí pro malý počet vzorků (< 10).

V naší laboratoři se již několik měsíců zabýváme stanovením cytokinů, interleukinů a adhezivních molekul v lidském séru a plazmě. Výsledky těchto studií budou uvedeny v rámci prezentace.

Aplikácia Q-RT-PCR pri stanovení hladiny fúzného genu AML1/ETO

Rohoň P., Rožmanová Š., Hubáček J., Szotkowski T., Papajík T., Indrák K., Jarošová M., Rusíňáková Z.

Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Akutná myeloidná leukémie (M2-FAB) má podíl na 20–25 % všech AML. Asi v 7–8 % případů de novo vzniknutých AML M2 (FAB) se vyskytuje přestavba t(8;21), jej výsledkem je fúze genů AML1/ETO (RUNX1/CBFA2T1).

AML1 gén (též nazývaný CBFA2T1) se nachází na chromozóme 21q22, kóduje DNA viažucu podjednotku CBF β (core binding factor) transkripčního komplexu. AML1 protein je organizovaný do 3 úseků: centrální část vykazující Runt homologii s DNA viažucou doménou, sekvence s vazbou k nukleární matrix, C-terminální transaktivní doména. ETO gén (též nazývaný RUNX1) se nachází na chromozóme 8q22, kóduje cicavčí homolog proteinu Nery v Drosophily. RUNX1/CBFA2T1 pro-

tein zvyšuje aktivitu histónové deacetylázy avšak nie histónové acetyltransferázy. Výsledkom týchto zmien je transkripčná represia.

Prítomnosť fúzného génu AML1/ETO znamená vysokú pravdepodobnosť rezponzibility na liečbu s obsahom Ara-C. Sledovanie množstva kópií AML1/ETO fúzného génu umožňuje kontrolovať odpoveď na liečbu a taktiež MRD. Je však zrejmé, že i pacienti, ktorí sú v klinickej remisii, majú často zostatkovú pozitivitu prejavu.

Na našom pracovisku používame metódu real-time PCR určenú pre kvantitatívne monitorovanie fúzného génu u AML-M2. Analýza je realizovaná na prístroji LightCycler s využitím hydrolyzačnej sondy pre transkript AML1/ETO a hladina transkriptov AML1/ETO je vzťahovaná k expresii kontrolného génu ABL.

Metódou Q-RT-PCR má pomocný diagnostický charakter a umožňuje pri dlhodobom sledovaní hladiny fúzného génu AML1/ETO predpovedať relaps ochorenia. V práci sú referované prvé výsledky dosiahnuté u pacientov s AML-M2 metódou Q-RT-PCR.

Podakovanie: Práca je podporovaná grantami MSM 619 895 9205.

Detekce mutací v onkogenu K-ras v pankreatické šťávě pomocí metody Real-Time PCR

Staňková M., Nádvorník R.

Institute of Applied Biotechnologies, a.s., Praha

Karcinom pankreatu patří mezi onemocnění s narůstající incidencí a vysokou mortalitou. Pouze 4% pacientů přežívá pět let po diagnóze. V současné době je s použitím dostupných vyšetřovacích metod karcinom pankreatu odhalen obvykle až v pokročilém stádiu. Proto je nutné hledat takové metody, které pomohou onemocnění určit již v jeho rané fázi.

Somatické mutace v onkogenu K-ras se objevují u pacientů s karcinomem pankreatu, ale i u dalších onemocnění jako např. kolorektální karcinom a karcinom plic. Detekce K-ras mutací v pankreatické šťávě by významně přispěla k časnější diagnostice onemocnění a umožňovala by rychlejší zahájení léčby. Možným problémem je dosažení dostatečné citlivosti stanovení. Tato práce představuje aplikaci Real-Time PCR pro detekci mutací v genu K-ras. Metoda je vysoce citlivá, je možné zachytit až 10 mutovaných buněk v 1 milionu buněk zdravých.

Práce podpořena grantem MPO 1H-PK/45

3. PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY I

13.30–15.35 hod. sál PEGASUS

Předsedající: MIHÁL, V.; NOVOTNÝ, J.; TROJANEC, R.

Evoluce prognostických faktorů u dětské leukémie

Mihál V.¹, Pospíšilová D.¹, Jarošová M.², Holzerová M.², Janošťáková A.³, Hajdúch M.³

¹Dětská klinika LF UP a FN Olomouc

²Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

³Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika LF UP a FN Olomouc

Použitím intensivních léčebných protokolů dokážeme dnes vyléčit až 80 % dětí s akutní lymfoblastickou leukémií. Za tento úspěch vděčíme zavedením:

1. následné kombinované chemoterapie
2. profylaxe CNS
3. stratifikace pacientů podle prognostických faktorů, které predikují riziko relapsu
4. intenzifikované léčby založené na riziku a
5. rozsáhlých, kontrolovaných a obvykle randomizovaných klinických studií.

V klinických studiích u dětí s ALL byla u více než 60 prognostických faktorů nlezena statistická významnost. Prognostické faktory jsou klasifikovány podle jejich původu: související s **hostitelem**, s **nemocí** nebo s **léčbou**. Všechny faktory jsou produktem mimořádného pokroku v oblasti imunologie, buněčné biologie, cytogenetiky, molekulární genetiky, farmakologie, infekčních nemocí, statistiky, formy klinických studií a léčby nádorových onemocnění. Některé prognostické faktory byly odvozovány spíše empiricky než hypoteticky a jejich prediktivní hodnota byla každých 3–5 let ověřována úpravou kritérií pro stratifikaci pacientů. Až Donadieuvova kritická analýza všech dostupných klinických studií v letech 1972–1994 potvrdila, že pouze věk a pohlaví a iniciační počet leukocytů a karyotyp si i v multivariační analýze udržely svou statistickou významnost. Jejich prediktivní hodnota je ale nízká: 1,1 % pro pohlaví, 2,0 % pro věk, 3,5 % pro iniciační počet leukocytů a 1,6 % pro karyotyp. Nízké prediktivní hodnoty reflektují vzácnost vysoce nepříznivých faktorů ale i relativně vysoký počet zemřelých pacientů, kteří mívají příznivé faktory. Žádný z uvedených faktorů ale „nefunguje“ nezávisle.

Autoři hledají korelace mezi vývojem prognostických faktorů a vývojem léčebných výsledků akutní lymfoblastické leukémie u dětí. Blíže se zabývají vlastním přínosem při hledání nových prognostických faktorů z oblasti cytogenetiky, molekulární genetiky, farmakogenetiky (včasná odpověď na indukční léčbu) a lékové rezistence.

Podporováno grantem NC7495-3/2003 a MSM 6198959216.

Experimentální aspekty vyšetřování molekulárních prediktorů nádorové léčby

¹Minárik M., ¹Benešová-Mináriková L.,

¹Hrabíková M., ¹Belšánová B., ²Brůha F.,

²Teřl M., ³Mukenšnábl P., ²Pešek M.

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

²Klinika TRN, FN Plzeň, Plzeň

³Ústav patologické anatomie, FN Plzeň, Plzeň

Vyšetřování molekulárních profilů tumorů se v poslední době stává významným nástrojem při racionální volbě nádorové terapie. Mezi nejčastější patří analýza somatických genetických alterací jako jsou genové amplifikace, genové mutace, či nadměrná genová exprese. K těmto změnám dochází v důsledku neoplastické transformace a lze je proto detekovat v nádorových buňkách získaných např. z biopsií, resekátů nebo cytologických preparátů. Obecně se předpokládá, že na jejich základě lze odhadnout biologickou podstatu daného nádoru a predikovat jeho chování a odpověď na zvolený terapeutický postup. Zcela nové možnosti přináší metody selekce jednotlivých nádorových buněk pomocí laserové mikrodisekce a využití vysokocitlivých technik založených na selektivní PCR amplifikaci.

Přestože jsou uvedena vyšetření často aplikována v onkologické praxi, existuje stále řada faktorů, které mají zásadní význam pro účinnost používaných metod a přesnost získaných výsledků. Mezi nejdůležitější patří metodika přípravy a zpracování vzorků, citlivost používaných metod a správné vyhodnocení získaných dat. Součástí sdělení bude prezentace ukázkových příkladů z oblasti vyšetření molekulárních prediktorů u nemalobuněčného karcinomu plic a karcinomu pankreatu.

Molekulárně cytogenetická analýza buněk mozkových tumorů

Kramář F.³, Zemanová Z.¹, Babická L.¹,

Ransdorfová Š.², Šindelářová L.¹, Březinová J.²,

Michalová K.^{1,2}, Hrabal P.⁴, Kozler P.³

¹Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav

klinické biochemie a laboratorní diagnostiky,

Všeobecná fakultní nemocnice a 1. LF UK, Praha

²Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha;

³Neurochirurgická klinika 1. LF UK, Ústřední vojenská nemocnice, Praha;

⁴Biopoptická laboratoř, Ústřední vojenská nemocnice, Praha.

K nejčastějším nádorům centrální nervové soustavy patří gliomy. Jedná se o heterogenní skupinu

tumorů různých histologických subtypů. Nejpočetnější jsou zastoupeny nádory vycházející z astrocytární řady a z oligodendrocytů. V současné době je klasická léčba gliomů (chirurgie, aktinoterapie, chemoterapie) značně neúspěšná. Rovněž diagnostika gliálních subtypů založená na buněčné morfologii je do značné míry subjektivní a jednotlivé subtypy nelze někdy odlišit ani pomocí specifických imunohistochemických markerů. Proto je nezbytné hledat nové diagnostické a prognostické ukazatele, které by umožnily stratifikaci léčby a vedly tak ke snížení morbidity a mortality nemocných. Jednou z možností je subklasifikace nemocných do diagnostických skupin podle nálezu specifických chromosomových aberací.

K detekci chromosomových aberací v gliálních buňkách používáme I-FISH s lokus-specifickými a/nebo α -satelitními sondami od firmy Abbot-Vysis™ (hodnotíme nejméně 200 interfázních jader; hodnota cut-off 2,5%; směrodatná odchylka $\geq 0,5\%$). V závislosti na typu nádoru sledujeme nejčastější chromosomové aberace, tj. delece tumor-supresorových genů *TP53*, *p16* a *RB1*, delece chromosomových oblastí 1p36 a 19q13.3, amplifikace genu pro *EGFR*, trisomie chromosomu 7 a monosomie chromosomu 10. Vyšetřujeme vzorky tkáně tumoru odebrané pro histologickou diagnostiku a cytogenetickou analýzu provádíme vždy až po morfologické klasifikaci nádoru.

Metodou I-FISH jsme vyšetřili vzorky nádorové tkáně celkem 30 pacientů s histologicky diagnostikovaným gliomem (8x difúzní astrocytom, grade II; 5x anaplastický astrocytom, grade III; 8x glioblastom, grade IV; 2x oligodendrogliom, grade II; 7x anaplastický oligodendrogliom, grade III). U 1 pacienta s anaplastickým astrocytome (AA) byla nalezena amplifikace *EGFR* genu. U tří nemocných s AA jsme prokázali deleci genu *p16*, z toho v jednom případě se jednalo o deleci bialelickou (zhoršená prognóza). Ve skupině nemocných s glioblastomy jsme potvrdili vysokou četnost monosomie chromosomu 10. U 7 pacientů s oligodendrogliomy byla potvrzena kombinovaná delece 1p36 a 19q13.3, u všech byla doporučena chemoterapie jako primární léčebná modalita.

I-FISH poskytla informativní výsledek v 27 případech (90%), u 3 nemocných bylo vyšetření neinformativní z důvodu špatného odběru vzorku. I-FISH je vhodná diagnostická metoda pro detekci chromosomových aberací v buňkách mozkových nádorů. Molekulárně cytogenetická analýza upřesňuje diagnostiku mozkových gliomů a zároveň napomáhá určit prognózu pacienta.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 1A/8237-3.

Prognostický a prediktivní význam proteinů asociovaných s mnohočetnou lékovou rezistencí u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.

¹Škarda J., ²Hajdúch M., ¹Bouchal J.,
²Džubák P., ¹Tichý T., ³Klein J., ⁴Kolek V.,
⁵Fridman E., ¹Kolář Z.

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

²Laboratoř experimentální medicíny při dětské
klinice LF UP a FN Olomouc

³I. Chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

⁴Klinika tuberkulózy a respiračních nemocí LF UP
a FN Olomouc

⁵Ústav patologie, Chaim Sheba Medical Center,
Tel Hashomer, Israel

Jednou z hlavních příčin neúspěšnosti chemoterapie nemalobuněčného karcinomu plic je vývoj mnohočetné lékové rezistence (MDR).

MDR je definovaná jako rezistence na cytostatika s různou strukturou a mechanismem účinku. Její prognostický a prediktivní význam u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic nebyl do dnešní doby uspokojivě objasněn.

Z uvedeného důvodu jsme sledovali imunohistochemickou expresi MDR asociovaných proteinů u 220 pacientů s operabilním nemalobuněčným karcinomem plic.

Detekce exprese byla prováděna standardní dvoustupňovou imunoperoxidázovou metodou za použití komerčně dostupných monoklonálních protilátek anti Pgp (p-glykoproteinu), MRP (multi-drug resistance asociovaného proteinu), Topoisomerase II. alfa, tkáňové transglutaminázy a jiným proteinům zodpovědným za regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Výsledky byly korelovány s délkou přežívání a délkou bezpříznakového období. Dané výsledky byly zároveň korelovány s výsledky testu viability primárních nádorových buněčných kultur (MTT testu). Bylo zjištěno, že exprese Pgp, MRP, stejně jako ztráta exprese p53, je u pacientů s NSCLC nepříznivým prognostickým faktorem. Exprese Pgp, MRP a tkáňové transglutaminázy současně indikuje menší citlivost buněk nádoru na některá cytostatika.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/8386-3/2005 a MSM 6198959216.

Má testování in vitro rezistence prognostický význam u operovaných pacientů s NSCLC st. IIIA ?

Grygárková I., Kolek V., Klein J., Neoral Č.,
Hajdúch M.

Klinika plicních nemocí a tuberkulózy,
I. chirurgická klinika, Laboratoř experimentální
medicíny FN a LF UP Olomouc

Byl hodnocen soubor 65 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic ve stádiu IIIA, kterým byly

podány 3 cykly neoadjuvantní chemoterapie. Skupině 34 nemocných ve složení paklitaxel 200 mg/m² den 1 a karboplatina (AUC 6) d1, v intervalu 21 dnů. Skupině 31 nemocných pak vinorelbin 30 mg/m² d1,8 a karboplatina (AUC 6) d1, rovněž v intervalu 21 dnů. Po 3 cyklech se u všech pacientů provedlo celkové přešetření a byla zvažována operabilita onemocnění. Věkový průměr pacientů činil 52 let ve skupině léčených paklitaxelem a 64,5 let ve skupině léčených vinorelbinem. Nejčastěji byl zastoupen spinocelulární karcinom. Tolerance neoadjuvantní chemoterapie byla velice dobrá, toxicita nízká. Ze skupiny léčených paklitaxelem bylo operováno 26 pacientů (76,5%), RR byl 67,7%, v 11 případech došlo k progresi onemocnění (32,4%). Ve skupině léčených vinorelbinem bylo operováno 21 pacientů (67,7%), RR byl 71% a v 9 případech došlo během neoadjuvantní chemoterapie k progresi onemocnění (29%). Po operaci byly odebrané nádorové buňky testovány MTT testem určujícím chemorezistenci in vitro. Bylo pokračováno selektivní adjuvantní chemoterapií. U operovaných pacientů ve skupině s paklitaxelem činí 3leté přežívání 66,7% a 5leté přežívání 50%, ve skupině s vinorelbinem činí 3leté přežívání 62,5% a 5leté přežívání 40%.

Práce podpořena grantem MSM 6198959216.

Přídavné chromosomové změny u pacientů s CML léčených preparátem Glivec

¹Holzerová M., ¹Faber E., ¹Pospíšilová
H., ¹Strašilová J., ²Voglová J., ³Divoký V.,
³Naušová J., ¹Indrák K., ¹Jarošová M.

¹Hemato-onkologická klinika FN a LF Olomouc

²FN Hradec Králové

³Ústav biologie LF UP Olomouc

Nemocní s chronickou myeloidní leukémií reagující na léčbu interferonem alfa, nemocní v akcelerované fázi CML, případně v blastickém zvratu CML, jsou v současné době léčeni preparátem Glivec – specifickým tyrozinkinázovým inhibitorem aktivity BCR/ABL onkogenu, který hraje zásadní roli v patogenezi CML.

Cílem naší cytogenetické a molekulárně cytogenetické studie byla detekce fúzního genu BCR/ABL a dalších přídavných chromosomových změn u pacientů léčených preparátem Glivec.

72 nemocných bylo vyšetřeno metodami klasické cytogenetiky a pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH) se sondou LSI BCR/ABL-ES (VYSIS™).

Do studie bylo zařazeno 41 mužů a 31 žen s mediánem věku 52 roků (rozpětí 17–71), průměrná délka léčby preparátem Glivec byla 18 měsíců (s rozpětím 1–39). V době zahájení léčby byl u 51 nemocných detekován pouze Ph1 chromosom, u 21 nemocných byly navíc detekovány přídavné chromosomové změny.

Cytogenetická a molekulárně cytogenetická odpověď na léčbu byla kontrolována po 12 měsících

léčby. V průběhu prvního roku léčby zemřelo 11 nemocných. Cytogenetické a molekulárně cytogenetické remise dosáhlo 51 (84%) nemocných (kompletní odpověď 7, velká odpověď 41 a malá odpověď 3), u 10 (16%) nemocných cytogenetická odpověď dosažena nebyla. Všichni nemocní s intersticiální delecí dlouhých ramen chromosomu 9 odpověděli na léčbu, jeden z nich dosáhl kompletní cytogenetické remise. U 4 nemocných se během léčby vyvinuly nové chromosomové aberace, u dvou z nich v Ph pozitivním klonu.

Výsledky cytogenetické a molekulárně cytogenetické studie u 72 nemocných neprokázaly po 12 měsících léčby preparátem Glivec horší odpověď na léčbu u nemocných s delecí 9q ve srovnání s nemocnými bez přídavných chromosomových abnormalit.

Práce je podporována grantem IGA NC7490, GA301/04/1239 a MSM 619 895 9205

Neinvazivní diagnostika karcinomu močového měchýře metodou I-FISH

¹Houšková L., ¹Zemanová Z., ²Březinová J.,
³Babjuk M., ³Peší M., ¹Michalová K.

¹Centrum nádorové cytogenetiky, ÚKB LD, VFN,
Praha

²Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

³Urologická klinika, VFN, Praha

Karcinom močového měchýře je šestou nejčastější malignitou u mužů a třináctou u žen. Může se vyskytovat v povrchové formě (70–80%), která velmi často recidivuje nebo v invazivní formě (20–30%) provázené častými metastázami (50%). Karcinom močového měchýře se vyznačuje velice heterogenním chováním dané jeho biologickým potenciálem. Proto je velmi obtížné stanovit vývoj onemocnění.

Mezi běžné diagnostické metody patří cytologické vyšetření moči a cystoskopie s odběrem biopsického materiálu. Nicméně cystoskopie je metoda invazivní a stejně tak, jako cytologie moči, je málo citlivá při detekci papilárních tumorů a CIS (carcinoma in situ).

Cílem naší studie je zhodnotit citlivost a specifitu metody I-FISH s kitem Urovysion Bladder Cancer Recurrence (Abbot-Vysis). Tento kit obsahuje centromerické sondy pro chromozomy 3, 7 a 17 a lokus-specifickou sondu pro oblast 9p21. Nádorové buňky jsou charakterizovány přítomností aneuploidie chromozomů 3, 7 a 17 nebo bialelickou delecí lokusu 9p21.

Dosud jsme analyzovali 85 vzorků močových sedimentů na přítomnost nádorových buněk u pacientů v rozmezí věku 18–88 let. U 35 pacientů byl nález negativní (41,1%), u 50 byl nález pozitivní (58,9%). U pozitivních nálezů šlo ve 34 případech o aneuploidie (68%), v 16 případech o bialelickou delecí lokusu 9p21. U tohoto souboru nemocných provedeme korelaci cytogenetických a klinických výsledků.

Poděkování: Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM 0021620808.

Naše první zkušenosti s molekulárně genetickým stanovením prognostických faktorů u karcinomu prostaty
Dvořáčková J.¹, Uvírová M.¹, Nedbálek A.²

¹CGB laboratoř spol. s r.o. Ostrava

²Oddělení urologie Vítkovická nemocnice Ostrava

Identifikace pacientů, kteří mají zvýšené riziko postoperativní rekurence karcinomu prostaty je důležitým cílem pro stanovení strategie a léčby a pro „follow up“. Pro identifikaci pacientů s vysokým rizikem rekurence po radikální prostatectomii jsou využívány mnohé prognostické markery jako hladina PSA, histologický grade, velikost nádoru a také DNA ploidie.

Je prokázáno, že s progresí karcinomu prostaty je spojeno mnoho chromozomálních a genetických abnormalit. Nejčastěji postiženým chromozomem u karcinomu prostaty je chromozom 8 a nejčastějšími chromozomálními změnami jsou ztráta oblasti 8p22 a zmnožení oblasti 8q24. Tyto změny jsou asociovány se špatnou prognózou u pacientů s high-grade pokročilým karcinomem prostaty.

Na lokusu 8p22 se nachází tumorsupresorový gen LPL (lipoprotein lipase). Ztráta heterozygosity, která je popisována až u 69% karcinomů prostaty, je pak zodpovědná za iniciaci a časnou událost v tumorigenezi prostaty. Není však na rozdíl od c-myc genu v přímé souvislosti s úrovní Gleasonovým skóre.

Lokus 8q24 je oblastí na které je lokalizován onco-gen c-myc, který reguluje buněčnou proliferaci a apoptózu. Nálezy ukazují, že amplifikace tohoto genu má přímou souvislost s Gleasonovým skóre v tom smyslu, že u pacientů s amplifací genu c-myc je Gleasonovo skóre vyšší a amplifikace genu se nachází u pacientů s progresí nádoru a metastatickou aktivitou.

Pro stanovení amplifikace genu c-myc nebo delece oblasti 8p22 se nejčastěji využívá metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH) na parafínových řezech. Při této metodě se využívá známý úsek DNA (sonda), který je obarven fluorochromem a přihybný k DNA vyšetřovaného vzorku. Pro vyšetřování výše uvedených abnormalit chromozomu 8 u karcinomu prostaty využíváme sondu Pro Vysion Multi-Color Probe firmy Vysis, která obsahuje tři různé značené úseky DNA chromozomu 8.

Nálezy potvrzují literární údaje, avšak retrospektivně vyšetřované materiály pocházející především z TURP nesplňují kritéria pro hodnocení uváděná v zahraniční literatuře. Příčinou je nedostatečné množství diagnostického materiálu, které je jak primárního původu, avšak pravděpodobně také došlo k vykrájení materiálu při použití jiných speciálních metod při diagnostice karcinomu.

Při diagnostice lézí prostaty je vhodné již při prvotním zpracování dodaného materiálu počítat s možným prováděním cytogenetické analýzy a podle toho také volit strategii řezů pro speciální metody. Jedny z prvních řezů by měly být vyčleně-

ny pro možnou následnou metodu FISH, aby bylo zajištěn dostatek nádorových elementů k hodnocení genetických aberací.

Poděkování: děkujeme za spolupráci MUDr. Martě Cibulkové, zástupkyni firmy Abbott.

Význam stanovení biologické aktivity nádoru pro prognózu a volbu terapie

¹Holubec L., ²Topolčan O., ⁴Třeška V., ³Fínek J., ¹Pešta M.

¹Universita Karlova-Lékařská fakulta Plzeň-
Centrální radioizotopová laboratoř

²FN Plzeň – Bory – oddělení nukleární medicíny-
úsek imunodiagnostiky

³FN Plzeň – Bory – Radioterapeutické
a onkologické odd.

⁴FN Plzeň – Lochotín – Chirurgická klinika

Práce je přehledem vybraných biologických markerů, které mají význam pro stanovení prognózy a pro volbu protinádorové léčby. Jedná se o cytokiny, metalloproteinázy, faktory angiogeneze, apoptózy, proliferací nádorové markery a klasické buněčné nádorové markery. Je diskutována jejich souvislost se vznikem a rozvojem nádorového onemocnění a jejich vzájemné interakce. V přehledu je uveden návrh stupňovité diagnostiky a určení prognózy před operací a v průběhu follow up. Je podán návod k optimálnímu monitorování léčby pomocí nádorových markerů.

4. BIOLOGIE NÁDORŮ

13.30–14.50 hod. sál PERSEUS

Předsedající: ŠMADOVÁ, J.; EHRMAN, J.; ECKSCHLAGER, T.

Cancer primary prevention

Ginopulos P.

abstrakt nedodán

Funkční analýza separovaných alel v kvasinkách: spolehlivá metoda k určení statutu nádorového supresoru p53

¹Šmardová J., ¹Svitáková M., ²Ravčuková B.,

¹Grochová D., ¹Vaňková J., ¹Kroupová I.

¹Laboratoř molekulární patologie ÚPA FN Brno

²OLG FN Brno, Brno

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. Somatické mutace genu p53 patří k nejčastěji detekovaným mutacím u lidských nádorů. Zárodečné mutace genu p53 jsou nejčastější příčinou vzácného dědičného onemocnění Li-Fraumeniho syndromu. Pro detekci mutací p53 lze použít několik různých metod, mezi nimi také funkční analýzy separovaných alel v kvasinkách (functional analysis of separated alleles in yeast – FASAY).

FASAY je citlivá semikvantitativní metoda používaná k detekci mutací p53 v klinickém materiálu (v nádorové tkáni, v buňkách periferní krve, apod.). Metoda využívá reparačního mechanismu na principu homologní rekombinace („gap repair“), který se uplatňuje v kvasinkových buňkách, a také faktu, že lidský protein p53 funguje v kvasinkách jako transkripční faktor. Transkripčně aktivní schopnost p53 odvozeného metodou RT-PCR z vyšetřované tkáně je v kvasinkových buňkách testována s využitím reportérského genu ADE2. Míra transaktivní schopnosti p53 je hodnocena podle zbarvení kvasinkových kolonií, které rostou na plotnách s nízkou hladinou adeninu. K výhodám FASAY patří, (1) že analyzuje obě alely genu p53 odděleně, (2) vysoká citlivost – zachytí asi 10% buněk s mutací p53, (3) možnost rozlišit plně inaktivující mutace p53 od částečně inaktivujících, (4) analyzuje podstatnou část genu p53 (kodóny 67-346) a (5) umožňuje přípravu templatů pro sekvenování DNA. Mezi nevýhody patří to, že nezachytí určité typy mutací (např. mutace vedoucí k alternativnímu sestřihu, mutace v promotoru), neanalyzuje celý gen p53 a vychází analyzovanou molekulou je RNA, která se rychle degraduje.

Poděkování: Práce je podporována grantem IGA MZ ČR č. NR/8068-3.

Polycomb geny BMI-1 a EZH2 ukarcinomu cervixu

¹Vrzalíková K., ²Murray P. G., ²Reynolds G. M.,

¹Ehrmann J.

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

²Cancer Research UK Institute for Cancer Studies, The University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham, United Kingdom

Proteiny „Polycomb Group“ (PcG) jsou transkripční represory způsobující stabilní epigenetickou modifikaci cílových genů a podílející se na regulaci buněčného cyklu i udržování buněčné identity. Řada dosud publikovaných prací prokazuje vztah mezi poruchami exprese a regulace genů PcG a nádorovou transformací buněk. Cílem studie bylo přispět k objasnění role proteinů BMI-1 a EZH2 v patogenezi cervixu. Expresce BMI-1 a EZH2 proteinů byla sledována pomocí nepřímé imunohistochemické techniky na souboru 39 vzorků cervixu s normálním a patologickým histologickým nálezem. Dále byla sledována transkripce genů BMI-1 a EZH2 v lidských cervikálních nádorových buněčných liniích HeLa, CaSki, SiHa (HPV+) a C33a (HPV-) metodou kvantitativní PCR. Expresce proteinu BMI-1 u vzorků CIN III a invazivního dlaždicobuněčného karcinomu byla zvýšená ve srovnání s kontrolní skupinou. Expresce proteinu EZH2 byla variabilní. Přítomnost HPV v cervikálních buněčných liniích korelovala se snižující se expresí BMI-1 a EZH2 genů. Zvýšená expresce proteinu BMI-1 u CIN III a dlaždicobuněčného karcinomu cervixu svědčí o možné roli tohoto proteinu v patogenezi karcinomu cervixu.

Práce byla podpořena MSM 6198959216 a Cancer Research UK.

Primární lymfomy CNS a virové infekce EBV a HERV

¹Ehrmann J., ¹Kodoušek R., ¹Sedláková E.,

²Nelson P. N., ³Dvořák P., ³Vavřka M.

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

²Molecular Immunology Laboratories, School of Applied Sciences, University of Wolverhampton, United Kingdom

³Neurochirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

Primární lymfomy CNS (PCNSL) řady B patří mezi vzácnější nádory mozku, avšak jejich incidence v posledních letech vzrůstá. Příčiny nejsou dostatečně objasněny, jedním z důležitých faktorů však může být stav imunitního systému a vliv virové

infekce. Mezi viry, jež se mohou podílet na vzniku PCNSL patří především EBV (virus Epstein Barrové), předpokládá se však role i jiných neurotropních virů. Mezi tyto viry mohou patřit lidské endogenní retroviry (HERV – Human Endogenous RetroVirus) jejichž sekvence tvoří asi 1% lidského genomu a pravděpodobně hrají důležitou roli v procesu kancerogeneze mnoha typů nádorů. Role HERV u PCNSL není známa, bylo ale zjištěno, že EBV je schopen aktivovat některé HERVs. Cílem studie bylo zjistit, zda u PCNSL jsou exprimovány transkripty EBV a HERVs a přispět k objasnění jejich případné role v patogenezi PCNSL. Soubor tvořilo 29 případů PCNSL řady B, jež byly diagnostikovány dle WHO na ÚP LF UP Olomouc v letech 1995-2004. K průkazu exprese transkriptů EBV a HERV byla použita metoda nepřímé imunohistochemie s využitím primárních monoklonálních (LMP, EBNA-2) a polyklonálních (HERV-K10) protilátek. Výsledný signál byl hodnocen semikvantitativně pomocí H-skóre. Negativita exprese LMP a EBNA-2 u všech studovaných případů podporuje v současnosti preferovanou teorii o malém vlivu EBV na patogenezi PCNSL u pacientů s funkčním imunitním systémem. Pozitivita exprese HERV-K10 pak může svědčit o nezávislosti tohoto viru na aktivaci EBV a o jeho roli v genezi PCNSL.

Práce byla podpořena MSM 6198959216.

Lysofosfatidová kyselina u pacientek s ovariálním karcinomem

Sedláková I.¹, Vávřová J.², Tošner J.¹,

Hanousek L.³

¹Porodnická a gynekologická klinika LFUK a FN Hradec Králové

²Ústav klinické biochemie a diagnostiky LFUK a FN Hradec Králové

³Gynekologicko – porodnické oddělení Nemocnice v Pardubicích

Lysofosfatidová kyselina (LPA, 1-acyl-2-lyso-snglycero-3-fosfát) je nejjednodušší formou fosfolipidu. Její koncentrace v plazmě je fyziologicky velmi nízká a má vícečetný efekt na ovariální nádorové buňky. Korelace mezi hladinou LPA v plazmě, začátkem a progresí ovariálního karcinomu se ukazuje neobvykle vysoká. Cílem projektu je zefektivnění diagnostiky ovariálního karcinomu a umožnění zachytu časných stadií tohoto novotvaru. V roce 2003 jsme ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové zavedli metodiku stanovení hladiny LPA. Venózní krev byla odebrána u 93 pacientek – 29 pacientek s ovariálním karcinomem (OC), 66 pacientek bez ovariálního karcinomu. Stanovení hladiny LPA pomocí vysokoúčinné kapi-

lární elektroforézy s nepřímou UV detekcí umožňuje zhodnocení jednotlivých subtypů lysofosfatidové kyseliny. Ve skupině pacientek s ovariálním karcinomem ($n=29$) jsme zjistili signifikantně vyšší hodnoty všech podtypů lysofosfatidové kyseliny: LPA – S-1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycerofosfatidová kyselina (med 2,9 $\mu\text{mol/l}$, min 0,7 $\mu\text{mol/l}$, max 24,8 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$), LPA – O-1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycerofosfatidová kyselina (med 2,8 $\mu\text{mol/l}$, min 0,2 $\mu\text{mol/l}$, max 7,6 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$), LPA – P-1-palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycerofosfatidová kyselina (med 6,4 $\mu\text{mol/l}$, min 1,9 $\mu\text{mol/l}$, max 19,1 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$), LPA – M-1-myristoyl-2-hydroxy-sn-glycerofosfatidová kyselina (med 2,5 $\mu\text{mol/l}$, min 0,1 $\mu\text{mol/l}$, max 10,7 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$), suma lysofosfatidové kyseliny (med 19,9 $\mu\text{mol/l}$, min 4,5 $\mu\text{mol/l}$, max 42,7 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$). Statisticky významně nižší hodnoty jsme diagnostikovali u pacientek bez patologie na obou ovarích ($n=35$): LPA – S-(med 0,7 $\mu\text{mol/l}$, min 0,1 $\mu\text{mol/l}$, max 11,3 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$), LPA – O-(med 0,2 $\mu\text{mol/l}$, min 0 $\mu\text{mol/l}$, max 7,6 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$), LPA – P-(med 1,2 $\mu\text{mol/l}$, min 0,5 $\mu\text{mol/l}$, max 6,5 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$), LPA – M-(med 0,1 $\mu\text{mol/l}$, min 0,03 $\mu\text{mol/l}$, max 7,0 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$), suma lysofosfatidové kyseliny (med 2,6 $\mu\text{mol/l}$, min 0,9 $\mu\text{mol/l}$, max 22,9 $\mu\text{mol/l}$, $p<0,001$). Hodnoty lysofosfatidové kyseliny u pacientek s histologicky potvrzenou benigní ovariální cystou ($n=20$) byly také statisticky významně nižší v porovnání s pacientkami s ovariálním karcinomem. Dosavadní výsledky ukazují lysofosfatidovou kyselinu jako perspektivní nádorový marker u pacientek s ovariálním karcinomem.

Práce je podporována IGA MZCR 7666-3

Expresí proteinů PML a TRF2 v nádorech kolorekta a prsu

^{1,2}Plevová P., ¹Bouchal J., ¹Fiurášková M.,

³Papežová M., ⁴Křepelová A., ⁵Čuřík R.,

⁶Foretová L., ⁶Navrátilová M., ⁷Zapletalová J.

¹Ústav Patologie & Laboratoř molekulární patologie, LF UP, Olomouc

²Oddělení klinické genetiky, FNsP, Ostrava

³Ústav biologie a genetiky 1. LF UK a VFN, Praha

⁴Oddělení genetiky, FN, Praha

⁵Ústav patologie, FNsP, Ostrava

⁶Oddělení genetiky nádorů, Masarykův

onkologický ústav, Brno

⁷Ústav biofyziky a statistiky, LF UP, Olomouc

Protein PML (protein promyelocytární leukemie) je koncentrován v jádře do tzv. PML tělísek. V buněčných liniích a v nádorech, které mají aktivní alternativní mechanismus prodlužování telomer, je zjišťována kolokalizace proteinu PML s proteinem TRF2 a dalšími proteiny. Studovali jsme expresi proteinu PML v buněčných liniích a v nádorech kolorekta a prsu, výsledky jsme korelovali s celou řadou klinických a histopatologických charakteristik a zjišťovali kolokalizaci proteinu PML s proteinem TRF2. Do studie bylo zařazeno 81 vzorků kolorektálního karcinomu (z nich 32 s vysoce frekventní nestabilitou mikrosatelitů a 49 se stabilními mikrosatelity), 47 vzorků nádorů prsu (14 od nosiček zárodečných mutací v genu BRCA1, 10 od nosiček zárodečných mutací v genu BRCA2 a 23 od žen bez zárodečné mutace v BRCA genech). Byla použita metoda fluorescenční imunohistochemie s dvojím barvením. V 7/32 (22%) a 11/49 (22%) nádorech kolorekta s a bez nestability mikrosatelitů byla zjištěna snížená exprese proteinu PML ($p=0.520$). Snížená exprese proteinu PML byla dále zjištěna ve 2/14 (14%), 3/10 (30%) a 15/47 (31%) nádorech prsu žen s mutací v genu BRCA1, BRCA2 a bez mutace genů ($p_{BRCA1}=0.019$; $p_{BRCA2}=0.111$). V nádorech tlustého střeva i prsu nekorelovala exprese proteinu PML s věkem, histologickým nálezem, TNM klasifikací a délkou bezpříznakového a celkového přežívání. Shluky proteinu PML byly zjištěny v 16/81 (20%) nádorech kolorekta a 9/47 (19%) nádorech prsu. Kolokalizace proteinů PML a TRF2 byla detegována ve 2 vzorcích nádorů kolorekta s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (6%) a 4 (9%) nádorech prsu. Na závěr lze říci, že exprese proteinu PML je snížena v přibližně 20% nádorů kolorekta a prsu. Expresí proteinu PML byla statisticky významně vyšší v nádorech prsu nosiček zárodečných mutací v genu BRCA1 oproti ženám bez mutací genů. Nebyla nalezena jiná korelace mezi expresí proteinu PML a klinickými a histopatologickými charakteristikami v nádorech tlustého střeva a prsu.

Poděkování: Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NC6741-3 a VZ MSM 6198959216.

Karcinogeneze z fetálních buněk na příkladu štítné žlázy

¹Korabečná M., ²Ludvíková M.

¹Biologický ústav LF UK v Plzni, ²Šiklův ústav patologické anatomie LF UK v Plzni

V roce 2001 článek v časopise Nature (Reya et al., Nature 414: 105–111) přinesl zcela nový pohled na proces karcinogeneze. Tradiční učebnicový mnohostupňový model karcinogeneze zdůrazňuje nutnost hromadění mutací v buňce, která postupně získává selektivní výhody favorizující její proliferaci. Kumulace mutací vede v konečné fázi ke schopnosti nádorových buněk metastazovat. V literatuře zabývající se genetikou nádorových onemocnění je tradičně diskutován význam jednotlivých cytogenetických aberací a genových mutací pro progresi a prognózu nádoru. Situaci komplikuje skutečnost, že dobře známé a charakterizované mutace se v řadě případů nevyskytují u 100% zkoumaných nádorů daného typu a nelze je najít u typu nádoru, který v sekvenci následuje jako další stupeň karcinogeneze dané tkáně. Právě tuto diskrepanci se pokouší objasnit hypotéza karcinogeneze z fetálních buněk postulující vznik tumorů z nezralých progenitorových nebo kmenových buněk přetrvávajících z fetálního období ve tkáních, nikoliv z již dobře diferencovaných buněk těchto tkání. Opodstatnění této hypotézy přinesly také studie uskutečněné na nádorech mozku a prsu.

Na příkladu karcinogeneze štítné žlázy dokumentujeme možnou platnost této hypotézy i zde. Ve vztahu k lézím štítné žlázy se jeví jako extrémně zajímavým rovněž fenomén fetálního mikrochimerismu. Jako fetální mikrochimerismus je označována situace, kdy v organismu ženy přetrvávají buňky plodu z jejích těhotenství. Tyto buňky mající charakter kmenových buněk perzistují v kostní dřeni, odkud mohou migrovat a diferencovat se v jednotlivých tkáních. Zda role těchto buněk je spíše pozitivní ve smyslu reparace tkání či negativní v souvislosti se vznikem autoimunních onemocnění, není dosud objasněno, existují důkazy pro obě vysvětlení.

Poděkování: Podpořeno grantem GAČR č. 203/03/1025 a výzkumným záměrem č. MSM 0021620819.

5. PROGNOTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY II

16.00–17.50 hod. sál PEGASUS

Předsedající: CWIERTKA, K.; KLEIBL, Z.; BERKOVCOVÁ, J.

Pokroky a vývoj v diagnostice karcinomu prsu – redukce chyb a omylů

J. Macháček, D. Houserková, K. Čwierka

Onkologická a radiologická klinika FN a LF UP Olomouc

Lékařská účast na opoždění detekce nádoru, na chybné diagnóze a oddálení správné diagnózy, může být přímá nebo nepřímá. Přímá účast lékařů osoby na zpoždění diagnózy mívá v pozadí nedostatečnou onkologickou informovanost, slabou znalost problematiky, nepatřičnou úroveň vyšetření, nedbalost. Nepřímá účast spočívá v neadekvátní organizaci zdravotní péče, nedostatečné vybavenosti přístrojové a personální, ale také v možnostech chyb a omylů ve smyslu falešné negativity i při lege artis vedeném diagnostickém postupu. Zaměříme se blíže na falešnou negativitu u jednoho z nejčastějších nádorů ca prsu.

Základní vyšetřovací metody jsou:

- klinické vyšetření, aspexie a palpce,
- mamografické vyšetření – eventuelně doplněné sonografií,
- bioptické vyšetření punkčního materiálu, z excise, extirpace nebo jinak získané části tkáně.

Každý z těchto diagnostických postupů je zatížen více nebo méně rizikem falešné negativity a to i při patřičné erudici a pečlivě provedeném odborném vyšetření.

Falešné negativní výsledky vyšetření, někdy i chybně směřované nálezy, nezřídka navodí významné časové zpoždění správné diagnózy a tím i přiměřené léčby.

Dobře víme, že časový faktor je nesmírně důležitý, základním předpokladem, určujícím a ovlivňujícím nejen radikálnost léčby, ale především její výsledek. Ve vysokém procentu případů je rozsah nemoci určován dobou, než uplyne mezi prvními příznaky nemoci, stanovením diagnózy a zahájením léčby.

Při analýze souboru 710 pacientek s diagnózou ca prsu (1989–1998) zjišťujeme, že při trvání anamnézy do 3 měsíců jde asi v 80 % o I. stadium onemocnění, avšak při její délce nad 6 měsíců až 85 % připadá na stadium IV. S prodlužováním časového intervalu mezi registrovatelnou nádorovou změnou v prsu a stanovením diagnózy stoupá rozsah a pokročilost nemoci. Naopak čím kratší je doba mezi prvními příznaky a stanovením diagnózy, tím větší je pravděpodobnost časného stadia s perspektivou podstatně lepší, účinnější léčby.

Klinické vyšetření není samozřejmě patřičně senzitivní a je nutno jej brát jen jako základ diagnostického procesu, avšak neodmyslitelný, neopomenutelný. Ale ani další metody, které na klinické vyšetření navazují nebývají stoprocentně spolehlivé. Nezřídka jsme se setkávali s případy, kdy jak mamografie, tak cytologie vycházejí negativně a nepotvrzují klinické podezření.

Nálezy falešně negativní se objevují zejména u nádorů menších než 1 cm, u cyst a dysplasií, přiléhajících k vlastnímu karcinomu. U větších nádorů to bývají nejspíše scirhotické formy s menším disociací maligních buněk a tedy s nižší pravděpodobností zachytu. Nejvíce falešné negativity tady nebývá způsobeno omyly při odečítání, ale chyběním rakovinových buněk v materiálu punktátu. Vyšetření je pak nutno při nejmenším opakovat nebo raději rozšířit odběrem většího množství materiálu k histologickému objasnění zvažovaného procesu.

Řada autorů vyzdvihuje význam kombinace klinického vyšetření, mamografie a punkční biopsie tenkou jehlou nebo ještě lépe core cut. Tento postup vykazuje vysokou diagnostickou spolehlivost a falešná negativita dosahuje sotva jednoho procenta.

Diagnostická excise je sice stále jedním z řady vyšetření vedoucích k upřesnění původu změn v prsní žláze, ale dnes je nezbytná jen u výjimečných případů. Excise-extirpace s následným histologickým vyšetřením je závažným konečným rozuzlením mnohých diagnostických rozpaků, ale někdy současně i terapeutickým řešením dříve nejasného nálezu. I když extirpace a následná histologická verifikace je v diagnostickém komplexu tou nejspolehlivější, může mít i tato metoda své nedostatky a omezení. Spolehlivost rutinního odečítání preparátu je určována kromě subjektivních schopností lékaře také zpracovávaným materiálem, minimálním potřebným objemem, který patolog dostává k dispozici. Při nedodržení či nemožnosti splnění žádoucích předpokladů může se i dnes histologický výsledek ukázat jako falešně negativní a důsledky této negativity bývají ještě horší než u dříve zmíněných metod.

V souboru 705 nemocných s ca prsu vyšetřených na odborném pracovišti FN (do roku 1998) bylo původně 133 karcinomů, t.j. víc jak 18 %, falešně negativních a to mamograficky a cytologicky. Nejčastější chybné diagnózy namísto karcinomu byly fibrocystické mastopathie a fibroadenomy – 82 %. Riziko bylo větší u žen mladších 40 let, nad 50 let pak významně klesalo. Kromě věku byla falešná negativita závislá na velikosti nálezu, menší nálezy – obtížnější diagnostika, větší riziko. Obdobné výsledky a problémy v dané době publikovala i ev-

ropská renomovaná pracoviště, např. florentinské Centrum Cancer of Prevention 17 % zjištěné falešné negativity.

V současnosti se zavedením nových vyšetřovacích a verifikačních metod je již situace jiná, optimistická. Od roku 1999 provádíme ve FNO core cut biopsie prsní žlázy. Spolehlivost core cut biopsie pro stanovení histologické diagnózy u solidních lézí je v našem souboru 1510 pacientek až 98,8 %. Falešná negativita této biopsie je tedy relativně velmi nízká (1,2 %) a také plně v souladu s všeobecnými literárními údaji.

Zvláštní skupinu se specifickou problematikou ložiskových změn prsní žlázy představují mikrokalcifikace. Zde se obecně u core cut udává jen asi 50 % spolehlivost pro stanovení histologické diagnózy. U našich vyšetřených, soubor 112 pacientek, vykazovala core cut biopsie mikrokalcifikací pod rentgenovou kontrolou až 73 procentní spolehlivost pro stanovení histologické diagnózy, při sonografické kontrole dokonce až 87 %.

Další pokrok ve zpřesnění histologické diagnózy v případě mikrokalcifikací prsní žlázy přinesla vakuová mamotomie. Ta umožňuje několikanásobné zvýšení počtu, velikosti a i celkové hmotnosti odebraných vzorků. Spolehlivost této biopsie je velmi vysoká, (98–100 %) srovnatelná s biopsií otevřenou. V našem souboru 90 pacientek byla spolehlivost biopsie vakuové mamotomie 99 %.

Počet core cut biopsií provedených pro předoperační histologickou verifikaci maligních lézí v poslední 5 letech jednoznačně převládá, představuje víc jak 70 %. Poměrně vysoké procento vakuových mamotomií (20 %) a jejich úspěšnost při vzrůstajícím počtu zachytu malých lézí souvisí se začleněním do screeningu, zejména pak u DCIS, manifestujícím se velmi často maligními mikrokalcifikacemi. Pouze ve 4 % byly maligní léze verifikovány tenkou jehlovou punkcí (FNAB), a jen u 3 % pacientek byla histologická diagnóza stanovena s pomocí chirurgické biopsie.

Současné slibné výsledky a snižování rizika falešné negativity mají i další nové perspektivy. Obecně je zdůrazňována zásada dvojího čtení, což přináší až 11 % zisk proti čtení jednomu, pokrok v mamografii slibují CT laser mamografy a tak zvané DOBI – dynamicko optické prsní (breast) zobrazení (image). V souhrnu lze však konstatovat, že možnost falešné negativity existuje i při sofistikovaném postupu lege artis, na technicky dobře vybavených a personálně erudovaných pracovištích. Tuto skutečnost je třeba mít na paměti stále, dnes i zítřka spolu se snahou redukovat zmiňovaná rizika na minimum.

Práce podpořena grantem MSM 6198959216.

High grade osteosarkom dospělého věku, prognostické a prediktivní faktory

Adámková Krákorová D., Brančíková D., Spurný V., Veselý K., Hušek K.

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

Úvod: Osteosarkom je maligní sarkom charakterizovaný přímou tvorbou kosti nebo osteoidní tkáně nádorovými buňkami. Nádor je vysoce maligní, šíří se lokálně dřevnou 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, protože je v zásadě multimodální. Vyjma primárně operabilních osteosarkomů G I, kde je považováno radikální chirurgické řešení za léčbu dostatečnou, je u všech ostatních typů osteosarkomů kladen důraz na maximálně agresivní předoperační chemoterapii s následným chirurgickým řešením, histopatologickým hodnocením odpovědi nádoru případně metastáz na předoperační chemoterapii a pooperační chemoterapii.

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-leté přežití mezi 20–30 %, zavedením agresivní chemoterapie u primárně lokalizovaných osteosarkomů, sestávající z kombinací HD MTX, DDP, ADM, IFO (vysokodávkovaný methotrexát, cis platina, adriamycin, ifosfamid) udávají dnes specializovaná centra dlouhodobé přežití mezi 70–80 %. U primárně metastatických osteosarkomů nepřevyšuje 5 leté přežití i po agresivní terapii včetně resekce metastáz 50 %. 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 % nekrozy 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 radiační onkologie FN u sv. Anny v Brně (2002–2005), u kterých jsme se zaměřili na stanovení overexpresy 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 overexpresy ani mutace TP 53 genu neměli zásadní význam pro biologii high grade osteosarkomu u pacientů v našem souboru. Srovnání s dosud publikovanými daty.

Ovariální karcinom – ideální model pro ověření možnosti predikce odpovědi na chemoterapii stanovením rezistence na cytostatika in vitro pomocí MTT testu?

¹Čwierka K., ²Lipert J., ²Srovnal J., ³Pilka R.,

¹Švébišová H., ³Kudela M., ²Nosková V.,

²Hajdúch M.

¹ Onkologická klinika LF UP Olomouc a FN Olomouc

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

³ Gynekologická klinika LF UP Olomouc a FN Olomouc

Karcinomy vaječníků mají mezi gynekologickými zhoubnými nádory nejhorší prognózu. Většina žen je diagnostikována s pokročilým nádorem, tj. ve III. nebo IV. klinickém stadiu. Prognóza 5letého přežití v takovém případě je velmi špatná. Základními prognostickými faktory jsou histologický typ a stupeň diferenciaci, dále rozsah (radikalita) chirurgického zákroku a v případě bohužel častých suboptimálních operací, či pouze diagnostických operací jsou to i rozměry reziduálního nádoru. V současné době je považován za základní léčbu 1. linie režim paklitaxel s karboplatinou. Léčba recidivujících a refrakterních forem je stále otevřeným problémem a dosahované výsledky nejsou uspokojivé. Máme sice celou řadu nových cytostatik jako je topotecan, gemcitabin, liposomální doxorubicin, máme možnost se vrátit k léčbě shodné s 1. linií (pokud je dostatečně dlouhý interval od ukončení předchozí léčby do progresu). Nicméně efekt chemoterapie 2. řady bývá velmi často pouze krátkodobý.

Cíl: Vyhodnotit výsledky MTT testu rezistence na cytostatika in vitro ve vztahu ke klinickému průběhu onemocnění u pacientek s karcinomem ovaria.

Metody: V období od března 1998 do ledna 2005 bylo provedeno celkem 174 vyšetření rezistence na cytostatika MTT testem u 124 žen ve věku 25–82 let (median 54 let) s karcinomem vaječníků. Většina pacientek byla diagnostikována v klinickém stadiu III C. Vzorek nádoru na vyšetření rezistence byl odebrán buď během operace nebo byly vyšetřeny nádorové buňky získané z ascitu. U 109 pacientek, které byly léčeny na onkologické klinice FN Olomouc, hodnotíme výsledek testu ve vztahu k přežití nemocné

a použité terapii. MTT test in vitro byl prováděn v Laboratoři experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FNO dle dříve popsané metodiky. Jeho výsledek je uváděn jako TCS₅₀, tj. koncentrace, kterou přežívá 50 % nádorových buněk. Klinická odpověď byla hodnocena podle poklesu nádorového markeru CA 125, dále bylo hodnoceno přežití nemocných ve vztahu k výsledku testu a použité terapii.

Výsledky: Celkem bylo provedeno 174 testů rezistence u 124 pacientek. Ve 29 případech test nebyl proveden pro nedostatečné množství vitálních nádorových buněk. U 25 pacientek byl test proveden opakovaně (2-krát u 12, 3-krát u 7, 4-krát u 3, 5-krát a více u 3 pacientek) v průběhu jejich nemoci. Testované nádory nebyly rezistentní na: cisplatinu v 49,6 % (70 ze 141 vyšetřených vzorků), median TCS₅₀ 11,19 µg/ml, karboplatinu v 40,5 % (45 ze 111) median TCS₅₀ 34,67 µg/ml, paklitaxel ve 37,3 % (47 ze 126), median TCS₅₀ 15,02 µg/ml, topotecan v 61,6 % (61 z 99), median TCS₅₀ 0,88 µg/ml, doxorubicin ve 23,9 % (22 z 92), daunorubicin ve 43,4 % (40 z 92), gemcitabin ve 32,6 % (30 z 92). Nebyl zjištěn rozdíl v přežití pacientek cisplatinou senzitivních a cisplatinou rezistentních, stejně tomu bylo i v případě výsledků pro karboplatinu. Při srovnání výsledku testu pro oba platinové deriváty jsme zjistili, že 26 % nádorů nejvíce běžně uváděnou zkříženou rezistenci. Median přežití pro pacientky paklitaxel senzitivní léčené paklitaxelem median přežití nebyl dosažen, zatímco ve skupině paklitaxel rezistentních léčených paklitaxelem median přežití byl 13,7 měsíců. Z opakovaných vyšetření je zřejmé, že v průběhu protinádorové léčby dochází ke změnám spektra rezistence.

Závěr: Ovariální karcinom je vhodným modelem pro ověřování spolehlivosti testování rezistence na cytostatika v in vitro podmínkách ve vztahu ke klinické odpovědi. Hodnocení výsledků je velmi obtížné vzhledem k tomu, že jsme testovali jednotlivá cytostatika a v klinické praxi byly běžně používány kombinace cytostatik. Z našich dat vyplývá, že 26 % nádorů nejvíce zkříženou rezistenci mezi cisplatinou a karboplatinou.

Práce podpořena grantem MSM 6198959216.

Četnost Leydenské mutace, protrombinové mutace a mutace v MTHFR genu v populaci 470 pacientek s karcinomem prsu

Novotný J.¹, Tesařová P.¹, Pešta M.², Holubec L.²

¹ Onkologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

² Centrální radioizotopová laboratoř FN Plzeň

Úvod: Hluboká žilní trombóza i další tromboembolické komplikace (plicní embolie, cévní mozkové příhody) jsou velmi častou komplikací nádorových onemocnění. V jejich patogenetice se uplatňuje tzv. Virchowova triáda – poškození žilní stěny, stáza krve v žíle a hyperkoagulace způsobená mimo jiné použitím některých léčiv (tamoxifenem, gestageny apod.).

Přesná znalost četnosti nejběžnějších vrozených prokoagulačních stavů a zhodnocení jejich relativní

Tabulka 1. Mutační analýza kódující sekvence u pacientů léčených fluoropyrimidiny

Mutace v DPD	c.85T>C	c.187A>G	c.496A>G	c.579T>A	c.1601G>A	c.1627A>G	IVS14+1G>A	c.2194G>A
Změna proteinové sekvence	C29R	K63E	M166V	F193L	S534N	I543V	e14 del	V723I
Exon	e2	e3	e6	e6	e13	e13	i14	e18
Charakter genetické změny	PM	M?	PM?	M?	PM	PM	M	PM
Pacienti s toxicitou (N=31)	12 (38,7%)	1 (3,2%)	14 (45,2%)	1 (3,2%)	1 (3,2%)	9 (29,0%)	1 (3,2%)	3 (9,7%)
Pacienti bez toxicity (N=21)	12 (57,1%)	0	8 (38,1%)	0	1 (4,8%)	6 (28,6%)	0	2 (9,5%)

ho rizika při výskytu trombembolických komplikací by mohla přispět ke zlepšení terapeutického poměru u žen léčených antiestrogenní léčbou (např. záměnou tamoxifenu za inhibitory aromatáz u skupin žen se zvýšeným rizikem výskytu komplikací).

Cíl: Cílem studie bylo Četnost Leydenské mutace, protrombinové mutace a mutace v MTHFR genu v populaci 470 pacientek s karcinomem prsu

Metody: DNA byla izolována na automatickým izolátoru Quiagen. Vlastní detekce proběhla v laboratořích Onkologického centra J.G. Mendela Nový Jičín s využitím multiplex PCR reakce s následnou RFLP.

Výsledky

	Analýza protrombinové mutace	Analýza leydenské mutace	Analýza mutace v MTHFR genu
Celkem hodnotitelných pacientek	463	462	435
Nález homozygotní formy mutace (No.)	0	0	49
Nález heterozygotní formy mutace (No.)	9	31	195

Závěr: Mutace v genu MTHFR je velmi často abnormalitou pozorovanou u více než poloviny studovaných osob. Naproti tomu mutace v genech pro faktor II a V jsou poměrně vzácným nálezem v populaci českých žen s karcinomem prsu. Četnost těchto genetických poruch ve vztahu k jejich výskytu v běžné populaci bude prezentována na setkání. Četnost trombembolických komplikací ve vztahu k jednotlivým mutacím a formě antiestrogenní léčby je právě studována a výsledky budou zveřejněny na BOD 2006.

Poděkování: Studie byla vytvořena s podporou grantu Ligy proti rakovině Praha.

Vliv 48 hodinové kontinuální infuze 5-fluorouracilu na expresi dihydropyrimidindehydrogenázy a thymidinfosforylázy

Jan Novotný¹, Viktor Sýkora², Robin Strnad³, Martin Pešta⁴, Vera Tomancova¹, Martina Zimovjanova¹

¹Onkologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

²Ústav patologické fyziologie 1. LF UK, Praha

³Chirurgické oddělení ÚVN, Praha

⁴Centrální radioizotopová laboratoř FN Plzeň

Úvod: Thymidinfosforyláza (TP) a dihydropyrimidindehydrogenáza (DPD) hrají zásadní úlohu v aktivaci i katabolismu fluoropyrimidinů používa-

ných v léčbě nádorů. Změny jejich exprese a/nebo mutace mohou ovlivnit účinnost a/nebo toxicitu prováděné léčby. V případě zjištění významné indukce genu pro DPD by bylo vhodné používat kontinuální infuzi 5-fluorouracilu s proměnnou, a nikoliv konstantní rychlostí podání léku.

Cíl: Cílem studie bylo zhodnotit vliv podání 48 hodinové kontinuální infuze 5-fluorouracilu na expresi TP a DPD. Genová exprese byla měřena u 16 nemocných s kolorektálním karcinomem před zahájením chemoterapie a po jejím skončení s využitím komerčně dostupných kitů (Roche).

Výsledky: Medián genové exprese před léčbou a po jejím ukončení se statisticky výrazně nelišil pro DPD (Wilcoxonův párový test: $p=0,7002$) ani TP (Wilcoxonův párový test: $p=0,7869$).

Závěr: Nezměnili jsme statisticky významné ovlivnění exprese TP ani DPD 48 hodinovou kontinuální infuzí 5-fluorouracilu.

Poděkování: Studie byla vytvořena s podporou grantu IGA MZ ČR 7575-3.

Predikce toxicity způsobené fluoropyrimidiny na základě mutační analýzy kódující sekvence genu pro dihydropyrimidindehydrogenázu (DPD)

Kleibl Z.¹, Kleiblová P.^{1,2}, Ševčík J.¹, Novotný J.³

¹Ústav biochemie a experimentální onkologie,

1. LF UK v Praze

²Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK

a VFN v Praze

³Onkologická klinika, 1. LF UK a VFN v Praze

Fluoropyrimidiny patří mezi nejčastěji aplikovaná protinádorová léčiva u nemocných s diagnózou malignit trávicího traktu, nádorů v oblasti hlavy a krku a pacientky s karcinomem prsu. U přibližně 5–15 % z nich se setkáváme s projevy závažné toxicity, charakterizované nejčastěji myelosupresí, mukositidou a průjmami; asi 1 % nemocných umírá na komplikace spojené s léčbou tímto preparátem. Za příčinu fatálních komplikací léčby fluoropyrimidiny se považuje vrozená porucha metabolismu 5-fluorouracilu nebo jeho derivátů na úrovni hlavního katabolického enzymu dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD).

Cílem naší práce byla mutační analýza kódující sekvence genu DPD u pacientů ze závažnými projevy toxicity po aplikaci fluoropyrimidinů.

Pacienti byli do studie zařazeni na základě široké spolupráce organizované Komplexním onkologickým centrem (www.koc.cz). Mutační analýza u 31 pacientů s projevy závažné toxicity po aplikaci

fluoropyrimidinů (Grade III-IV, NCIC CTC) a 21 pacientů s velmi dobrou tolerancí léčby (Grade 0-I; NCIC CTC) byla provedena na základě sekvenování cDNA DPD. Nalezené mutace/polymorfismy byly potvrzeny sekvenováním z genomové DNA. Celkem bylo nalezeno 11 typů genetických alterací - jedna sestřihová mutace, 7 missense variant (Tabulka) a 3 tiché mutace; 42 ve skupině 31 pacientů s projevem závažné toxicity a 29 ve skupině pacientů bez toxicity. Ve skupině pacientů se závažnou toxicitou byla více než 1 změna nalezena u 14/31 pacientů, a více než 2 u 4/31 pacientů. Ve skupině pacientů bez toxicity byla kombinace více než 1 změny charakterizována u 11/21 pacientů, a více než 2 u 2/21 pacientů (tabulka 1).

V zahraničí je nejčastější popisovanou kauzální alterací mutace sestřihového místa (IVS14+1G>A). Četnost alely IVS14+1G>A se v zahraničních údajích pohybuje mezi 2,2–0,7 % v obecné populaci. V souboru vyšetřovaných pacientek byla jediná osoba s touto genetickou variantou. Námí provedené vyšetření kontrolního souboru 223 pacientek ukázalo četnost nosičství této alely v naší populaci 0,22 %.

Překvapivě vysoký počet nalezených genetických změn u pacientů bez zjevných příznaků toxicity významně zpochybňuje genetickou analýzu DPD, jako samostatnou metodu predikce vzniku toxicity po aplikaci fluoropyrimidinů v naší populaci.

V nedávné době byla provedena řada studií u nás i v zahraničí zaměřených na hodnocení exprese DPD a dalších katabolických/cílových enzymů fluoropyrimidinů, jejichž výsledky jsou nejednoznačné. Z důvodů validního statistického hodnocení mutační analýzy DPD v naší populaci probíhá v současnosti vyšetření další skupiny pacientů, avšak pro nalezení klinicky použitelného testu bude nezbytné provést další studie zaměřené nejen na analýzu samotné DPD, ale i ostatních enzymů katabolické cesty fluoropyrimidinů. Paralelně s tímto bude nezbytné uvažovat i o funkčním metabolickém vyšetření.

Poděkování: Práce byla podpořena finančními prostředky Ligy proti rakovině, a Běhu Terryho Foxe a IGA MZ ČR 1A8708-4.

Korelace mezi expresí estrogenových a progesteronových receptorů, hladinou CEA a CA 15-3 před léčbou a tradičními klinicko-patologickými charakteristikami karcinomu prsu u žen starších 70 let

¹Dvořák J., ²Ryška A., ²Tomšová M., ¹Veselý P.,

¹Jansa J., ³Štuk J., ¹Melichar B., ²Zoul Z.,

⁴Jandík P., ¹Petera J.

¹Klinika onkologie a radioterapie, FN Hradec Králové

²Fingerlandův ústav patologie, FN Hradec Králové

³Lékařská fakulta UK Hradec Králové

⁴Chirurgická klinika, FN Hradec Králové

Cíl: Cílem sdělení je retrospektivní hodnocení korelace mezi expresí estrogenových a progesteronových receptorů, hladinou karcinoembryonálního antigenu (CEA) a antigenu CA 15-3 v séru před léčbou a tradičními klinicko-patologickými charakteristikami karcinomu prsu u žen starších 70 let.

Pacienti a metody: Od listopadu 1998 do září 2005 bylo na našem oddělení léčeno 81 pacientek starších 70 let. Medián věku činil 75 (71–90) let. Vstupní TNM klasifikace: 27 pacientek I. stadium, 28 pacientek II. stadium, 20 pacientek III. stadium a 6 pacientek IV. stadium. Histologický grading byl dobře diferencovaný u 5 pacientek, středně diferencovaný u 41 pacientek a málo diferencovaný u 35 pacientek. U všech pacientek byly imunohistochemicky vyšetřeny estrogenové a progesteronové receptory, jejichž hodnoty byly vyjadřovány v procentech. Expresce byly hodnoceny semikvantitativně, modifikovanou metodou dle Remmeleho a Stegnera se stanovením imunoreaktivního skóre – IRS (0–12). Onkomarkery CEA a CA 15-3 v séru byly odebrány před zahájením léčby. Byl spočítán Spearmanův korelační koeficient pro kombinace následujících kontinuálních a ordinálních proměnných: estrogenové receptory, progesteronové receptory, hladina CEA před léčbou, hladina CA 15-3 před léčbou, stadium, T-stadium, N-stadium, M-stadium a histologický grading. Výsledky v korelační analýze byly považovány za signifikantní na hladině 0,05.

Výsledky: Byly nalezeny následující signifikantní korelace (korelační koeficient větší než 0,300): estrogenové a progesteronové receptory ($r = 0,510$),

CEA a CA 15-3 před léčbou ($r = 0,417$), CA 15-3 před léčbou a stadium ($r = 0,400$), CA 15-3 před léčbou a T-stadium ($r = 0,348$), CA 15-3 před léčbou a M-stadium ($r = 0,489$), CA 15-3 před léčbou a histologický grading ($r = 0,304$).

Závěr: Výsledky této studie ukazují signifikantní vztahy fenotypických parametrů karcinomu prsu u žen starších 70 let.

Délka domény kódující polyglutaminovou oblast genu AIB1 jako prediktor vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací genu BRCA1

Havránek O.¹, Kleibl Z.¹, Lukešová M.², Novotný J.³, Janatová M.¹, Foretová L.², Pohlreich P.¹

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

²Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav v Brně

³Onkologická klinika, 1. LF UK a VFN v Praze

Karcinom prsu patří mezi nejzávažnější nádorová onemocnění v populaci žen u nás. Přibližně 5–10% onemocnění je podmíněno hereditárně. Domínující příčinou dědičných forem karcinomu prsu jsou mutace v genech BRCA1 a BRCA2. Nosičky mutací mají vysoké celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu, avšak individuální věk vzniku onemocnění se velmi liší. V nedávné době byl popsán polymorfismus v polyglutaminové (polyQ) doméně koaktivátoru steroidního receptoru – genu AIB1 (amplified in breast cancer gene 1), jako možný prediktor rizika vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací genu BRCA1.

Cílem práce byla analýza polyQ AIB1 v populaci nemocných s hereditárními a sporadickými karcinomy prsu. Frekvence alelotypů polyQ AIB1 byla analyzována i v kontrolní nenádorové populaci.

Analýza polyQ AIB1 byla provedena u 221 pacientek se sporadickým karcinomem prsu, 96 nemocných nosiček mutací genů BRCA1 a BRCA2 a 176 zdravých kontrol. Oblast polyQ AIB1 byla amplifikována pomocí PCR; délky alel byly charakterizovány polyakrylamidovou gelovou elektroforézou s přidávkou Spraedexu, případně denaturační HPLC systému WAVE. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny. Na porovnání distribucí jednotlivých parametrů v různých skupinách a podskupinách, vzhledem k distribucím těchto proměnných, byly použity neparametrické testy (Kruskal-Wallisův a Wilcoxonův). Pro zjištění závislosti zkoumaných znaků byl použit Spearmanův koeficient korelace.

Ve všech analyzovaných populacích mají nejvyšší zastoupení alely kódující 26, 28 nebo 29 Q, vzácné jsou alely s 25, 27, 30, 31 a 39 Q. Distribuce alelotypů se liší ve skupině pacientek se sporadickými nádory, ve srovnání s kontrolní populací ($p=0,0195$), ale není odlišná ve skupině pacientek s hereditárními tumory ($p=0,150$). Analýza závislosti doby vzniku nádoru na genotypu AIB1 ukázala, že v populaci pacientek s mutací genu BRCA1 a oběma alelami s <29Q byl průměrný věk diagnózy karcinomu 46,76 let, zatímco u pacientek s alespoň jednou alelou s ≥29Q 40,33 let ($p=0,1399$). Tento trend nebyl patrný u pacientek s mutacemi v genu BRCA2 (48,20 vs. 50,00; $p=0,974$).

Dosavadní výsledky naší analýzy ukazují, že v populaci pacientek s hereditárním karcinomem prsu v důsledku mutace genu BRCA1 existuje negativní korelace mezi dobou vzniku onemocnění a délkou polyQ AIB1. Tato závislost však nedosahuje statisticky signifikantních výsledků a nelze ji proto využít jako prediktivní znak pro odhad rizika vzniku onemocnění v klinických podmínkách.

Poděkování: Práce byla podpořena finančními prostředky Ligy proti rakovině, VZ MŠMT ČR číslo MSM0021620808.

6. NOVÉ MOŽNOSTI STAGINGU A ULTRASTAGINGU NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ I

8.30–10.05 hod. sál PEGASUS

Předsedající: DVOŘÁČKOVÁ, J.; JANKŮ, F.; HAJDÚCH, M.

Historie a současnost

sentinelové uzliny

Dvořáčková J.

CGB laboratoř spol. s r.o.

Metoda identifikace a biopsie sentinelové uzliny (SIN) vyšla z techniky mapování lymfatické drenáže, jejíž počátky sahají do roku 1692, kdy Anton Nuck jako první aplikoval do lymfatických cév rtuť a tímto způsobem popsal lymfatické cévy a uzliny v oblasti dělohy.

Termín „sentinelová uzlina“ poprvé použil E. Gould při studiu karcinomu příušní žlázy v roce 1960. Šlo o konkrétní anatomicky definovanou uzlinu, bez identifikace mapování lymfatické drenáže.

Za autora koncepce sentinelové LN je považován R. M. Cabañas, který roce 1977 publikoval práci na téma specifické lymfografie při ca penisu.

Zásadní práce týkající se zavedení vyšetření SLN do praxe pocházejí z roku 1992 od skupiny vědců z Kalifornské univerzity při studiu maligního melanomu.

Průlom v dosavadní tradiční prognostické a terapeutické koncepci lymfadenektomie u solidních tumorů způsobilo použití radionuklidu a scintilační sondy, které zavedl k mapování lymfatického systému v roce 1993 A. Alex a ke zdokonalení této techniky přispěli lékaři v roce 1994 z John Wayne Cancer Center.

Sentinelovou uzlinu lze v současné době prakticky detekovat preoperačně a perioperačně pomocí radionuklidu, konkrétně techniciem značeným koloidem, perioperačně pak navíc pomocí značení lymfatické patentní modří.

Koncepce SLN je založena na předpokladu, že vyšetření SLN (jedné nebo event. jejich omezeného počtu) může predikovat pravděpodobnost postižení dalších lymfatických uzlin i ve vyšších etážích. Při provedení technicky (i ekonomicky) náročnější histopatologické diagnostiky na základě doporučeného standardního postupu hovoříme o tzv. ultrastagingu.

Doporučený standardní postup při zpracování sentinelové uzliny www.patologie.info

Tento Standard byl přijat na schůzi Výboru Společnosti českých patologů ČLS JEP dne 22. 4. 2005 v Litomyšli s tím, že bude předán Onkologické Společnosti a Zdravotním pojišťovnám (odborům zdravotní péče).

Obecná charakteristika:

Technika „sentinelové biopsie“ byla vyvinuta v roce 1992 Mortonem a spol., u nás jako rutinní metoda zavedena v roce 1994.

Mnohé maligní nádory metastazují nejprve lymfatickou cestou. Nádorové buňky se s největší pravděpodobností zachytí v první lymfatické uzlině, která je metastáze v cestě. Oblast nádoru je obvykle drénována lymfatickou cévou, která ústí do jedné (vyjimečně více) uzliny. Tuto uzlinu nazýváme „sentinelovou“ (strážní). Tuto uzlinu lze poměrně přesně identifikovat a vyjmout (sentinelová biopsie). Na základě histologického vyšetření sentinelové uzliny lze zjistit přítomnost metastáz (mikrometastáz) a stanovit další léčebný postup. Mezi postižením sentinelové uzliny a postižením dalších axilárních uzlin je významná shoda (UICC: Prognostic factors in Cancer).

Metodika: Sentinelovou uzlinu musí označit operátor a musí být dodána v samostatné, označené nádobě s poznámkou na průvodce, že se jedná o sentinelovou uzlinu.

Uzlina přikrojena v podélné ose na bločky 3–4 mm silné. Malé uzliny jsou zpracovány celé, v jednom bloku.

Z každého tkáňového bločku zhotovit celkem čtyři řezy s rozstupem 5–10 mikronů: tři řezy barvené hematoxylinem-eozinem a jeden řez s imunohistochemickým průkazem cytokeratinu.

Záchytnost karcinomu navrhovanou metodou je údajně 97,9 % (Am J Surg Pathology).

Zdroj: International Union Against Cancer: Prognostic factors in Cancer. 2nd Ed. Edited by M.K. Gospodarowicz Wiley-Liss 2001. Am. J. Surgical Pathology: 2002; 26 (3): 337–382, 2002; 26 (3): 382–385, 2002; 27 (6): 842–845, 2003; 27 (3): 385–389.

Metoda identifikace a biopsie SLN má své historické kořeny, není tedy žádnou „novou“ zázračnou metodou. V současnosti se standardní odběr SLN provádí u CA mammy a maligního melanomu.

Významné výsledky poskytla skupina olomouckých a brněnských lékařů v identifikaci a hodnocení stavu SLN u nemalobuněčných CA plic.

Další lokality jsou ve stadiu experimentu (kolorektální CA, CA jícnu, urologická a gynekologická lokalizace, ORL indikace, thyroidea)

Poděkování: Čtělba bych poděkovat všem členům výboru Společnosti patologů za cenné rady a úpravy při vypracování standardy SNL.

Detekce minimální reziduální choroby v kostní dřeni – je čas na změnu klinické praxe?

Janků F.

Onkologická klinika 1. LF UK; Praha

Přítomnost minimální reziduální choroby (MRD) v kostní dřeni může být u solidních nádorů potenciálním zdrojem pro vznik vzdálených metastáz i několik let po ukončení primární léčby. MRD lze detekovat pomocí imunocytochemických metod s využitím monoklonálních protilátek proti cytokeratinům či jiným povrchovým buněčným markerům nebo pomocí molekulárně genetických metod na podkladě polymerázové řetězové reakce (PCR). Mezi solidními nádory byla tato problematika nejvíce zkoumána u pacientek s karcinomem prsu. Prognostický význam MRD u pacientek s karcinomem prsu podpořila nedávno publikovaná metaanalýza s více než 4000 zařazenými pacientkami prokazující horší výsledky u pacientek s MRD po primární léčbě.

Rutinnímu využití detekce MRD brání zatím nedostatky ve standardizaci jednotlivých technik. Navíc zatím nejsou k dispozici studie využívající MRD v terapeutických rozhodnutích. Kromě prognostické významu by se dalo využít MRD k stanovení specifické adjuvantní cílené léčby na základě fenotypu okultních nádorových buněk. Perzistující MRD by mohla vést k indikaci prodloužené adjuvantní léčby. Nicméně dokud nebudou k dispozici výsledky z velkých kontrolovaných studií je nutné MRD zahrnovat do terapeutických rozvah pouze v rámci klinického výzkumu.

Poděkování: Podpořeno granty Ligy proti rakovině v Praze, RASO grantem ČOS a výzkumným zámerem MSM0021620808.

Chirurgické aspekty minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu

Skalický P.¹, Vysloužil K.¹, Duda M.¹, Klemental.¹, Starý L.¹, Hajdúch M.², Srovnal J.², Kořínková G.²

¹II. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

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

O výskytu a zejména klinickém významu reziduální choroby a mikrometastáz u nemocných s kolorektálním karcinomem je dosud i v mezinárodním měřítku velmi málo informací. Detekce minimální reziduální

choroby (MRD) u kolorektálního karcinomu je prováděna na našich pracovištích v rámci řešení grantu IGA MZCR NR/7804-5. Odběr materiálu k laboratorní detekci minimální reziduální choroby provádíme ve dvou fázích operačního výkonu a při následné ambulantní kontrole nemocného. Na počátku operace odebíráme kostní dřeň, systémovou krev a portální krev po kanylaci mesenterické vlny. Druhou skupinu odběrů tvoří systémová a portální krev, které odebíráme na závěr operace po resekci tumoru. Poslední skupinu vzorků (kostní dřeň a systémová krev) získáváme při ambulantní kontrole v odstupu jednoho měsíce od operace. Laboratorní detekci nádorových buněk v kostní dřeni a krvi provádíme metodou real-time RT-PCR, jako marker nádorových buněk používáme karcinoembryonální antigen (CEA).

Od března 2004, kdy byl projekt zahájen, bylo operováno a kompletně vyšetřeno více než 210 pacientů s kolorektálním karcinomem. Nemocné jsme rozdělili do skupin podle lokalizace tumoru. Základem operační techniky při operacích kolorektálního karcinomu je „no touch“ technika, tj. podvaz cévního zásobení tumoru předtím, než dojde k peroperační manipulaci s nádorem. Vzhledem k anatomickému uspořádání lze tento přístup uplatnit při operacích na rektu event. na colon sigmoideum, zatímco při operacích na pravém i levém tračníku podvazu mesenteria musí předcházet rozsáhlá mobilizace tračníku.

Z předběžných výsledků lze zjistit častější výskyt minimální reziduální choroby na pravém tračníku. Příčinou může být jak manipulace s tumorem při mobilizaci, tak i objemnost tumorů lokalizovaných na pravém kolon.

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

Minimální reziduální choroba u kolorektálního karcinomu – korelace s klinicko-patologickými charakteristikami nemoci.

¹Srovnal J., ¹Kořínková G., ²Vysloužil K.,

²Duda M., Skalkický P., ³Cwiertka K.,

³Švebišová H., ³Gajová B., ^{1,3}Hajdúch M.

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

²II. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

³Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Minimální reziduální choroba (MRD) u nemocných s kolorektálním karcinomem znamená přítomnost nádorových buněk v těle pacienta, u něhož byla provedena radikální resekce primárního tumoru a který je v současnosti bez klinických známek onemocnění. Tyto izolované nádorové buňky lze na základě současných znalostí považovat za prekursor mikrometastáz. Současnými vyšetřovacími metodami nejsme schopni exaktně odlišit onkologicky nemocné pacienty vyléčené chirurgickým zákrokem a kteří již nepotřebují adjuvantní léčbu, od pacientů s vyšším rizikem rekurence onemocnění. Nové mo-

lekulárně-biologické metody nám však v rozhodování o podání adjuvantní léčby mohou výrazně pomoci. Detekce minimální reziduální choroby s využitím metody založené na principu reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase, tzv. real-time RT-PCR je v podstatě studiem genové exprese, kdy hledaným znakem epiteliálních nádorových buněk je informační, messengerová RNA. Touto metodou je možno detekovat až jednu nádorovou buňku mezi deseti miliony buňkami nenádorovými.

V rámci naší studie minimální reziduální choroby u pacientů s kolorektálním karcinomem jsme v období od března 2004 do současnosti kompletně vyšetřili a statisticky zpracovali vzorky od více než 210 pacientů operovaných ve FN Olomouc pro kolorektální karcinom. Vyšetřovali jsme expresi karcinoembryonálního antigenu (CEA), nepřímo tedy přítomnost nádorových buněk, v systémové a portální krvi před a po operaci, v kostní dřeni, ve vzorku tumoru. U více než 150 pacientů byly provedeny a vyšetřeny následné odběry systémové krve a kostní dřene jeden měsíc po operaci.

Z předběžného statistického zpracování výsledků vyplynulo několik zajímavých závěrů. Objem nádoru souvisel s pozitivitou MRD v portální krvi a kostní dřeni, na rozdíl od invazivity (T staging), kde jsme vztah zatím nenašli. Dále, pozitivita lymfatických uzlin (N status) souvisela s pozitivitou MRD v portální a systémové krvi. Dále jsme zjistili, že s nižší expresí CEA v tumoru souvisí větší objem tumoru, vyšší invazivita, pozitivita lymfatických uzlin i klinické stadium dle Dukese. Celková pozitivita MRD alespoň v jednom ze sledovaných kompartmentů jednoznačně souvisí s objemem nádoru a s klinickým stadiem dle Dukese.

Ačkoliv doposud není zcela objasněn prognostický význam tohoto vyšetření u solidních nádorů, stanovení MRD a monitoring adjuvantní terapie metodou real-time RT-PCR se však jeví jako technicky proveditelné, i když zatím zůstává na úrovni experimentální metody.

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

Zkušenosti z provozu pracoviště pozitronové emisní tomografie Masarykova onkologického ústavu v Brně

Bolčák B.
Oddělení nukleární medicíny a pozitronové emisní tomografie, Brno

Pracoviště pozitronové emisní tomografie Masarykova onkologického ústavu v Brně bylo uvedeno do provozu v září roku 2003 jako druhé pracoviště pozitronové emisní tomografie v České republice.

Instalována zde byla PET kamera Siemens E.CAT Accel s LSO krystaly.

Na vyšetření pacientů se používá zatím jediné radiofarmakum, ¹⁸F-fluoro-deoxy-glukóza, které se dováží 2x denně od výrobce z Prahy (ÚJV, Praha – Homolka).

Příprava radiofarmaka pro konkrétního pacienta probíhá za pomoci poloautomatického systému firmy Thema Sinergy instalovaného v únoru 2004, který umožnil podstatně zredukovat radiační zátěž pracovníků radiofarmace.

Velikost aplikované aktivity se liší podle druhu studie.

Pro celotělové vyšetření se aplikuje v průměru 370 MBq, pro vyšetření mozku a myokardu v průměru 200 MBq ¹⁸F-FDG pro standardního 70 kg pacienta.

Denně se z dodané aktivity realizuje v průměru 17–18 vyšetření, pacienty vyšetřujeme i o sobotách a nedělích, celkový počet vyšetření za měsíc je v současnosti cca 500.

Od zahájení provozu v roce 2003 do konce listopadu 2005 jsme realizovali více než 10.000 vyšetření.

Studie hodnotí nezávisle na sobě 2 lékaři s atestací z nukleární medicíny.

Obrazová dokumentace studií obsahující reprezentativní řezy – zpravidla koronální, soubor MIP – pseudotřírozměrné zobrazení (Maximum Intensity Projections), semikvantifikaci lézí za pomoci stanovení SUV (Standardized Uptake Value), popřípadě fúze obrazů PET s CT anebo MR, se odesílá na PACS archive, čímž je zpřístupněna pro klinickou prezentaci a další zpracování.

Analýza podle klinických oborů.

Vzhledem k orientaci Masarykova onkologického ústavu je spektrum pacientů z hlediska jednotlivých oborů medicíny odlišné od světového průměru. Poměr vyšetření podle diagnóz je následující:

- onkologie 94 %
- neurologie 4 %
- kardiologie 2 %.

Indikace PET vyšetření.

1. diferenciální diagnostika ložisek nejisté povahy,
2. vyšetření při sledování (follow up) pacienta po léčbě s vysokým rizikem relapsu nebo relapsem již v minulosti prodělaným,
3. vyšetření při patologických zvýšených hodnotách nádorových markerů s negativitou nebo neurčitým nálezem ze základních zobrazovacích metod,
4. monitoring efektu léčby, především chemoterapie, zejména při existenci jiné léčebné alternativy nebo vysoké náročnosti léčby (ekonomické, toxické zátěží a pod.),
5. neonkologická indikace,
6. plánování radioterapie dle PET / CT,
7. podrobné vyšetření před zamýšlenou radikální operací – rozšíření radikality, vysokého rizika nebo s důsledky významně snižujícími kvalitu života,
8. staging lokoregionálně rozšířených nádorů s vysokým rizikem diseminace po ukončeném standardním adjuvantním režimu.

Fúze obrazů

Od února 2004 se po instalaci programu Syngo na pracovišti PET provádí softwarová fúze obrazů

PET s CT anebo MR. Data CT anebo MR v digitální podobě ve formátu DICOM 3.0 jsou pro fúzi dostupná přes PACS archiv nebo na CD (z externích pracovišť nenapojených na PACS).

Význam fúzí spočívá v:

- zpřesnění lokalizace ložisek zobrazených pozitronovou emisní tomografií,
- stanovení lokalizace metabolicky aktivní tkáně v rozsahu ložisek a odlišení fibroticky změněné tkáně od částí obsahujících viabilní buňky.

V současnosti se počítačová fúze obrazů provádí cca u 1/3 vyšetření a stala se neodmyslitelnou součástí denní rutinní praxe umožňující výraznou mírou zkvalitnit hodnocení nálezů.

Analýza nálezů FDG – PET v korelaci s hodnotami nádorových markerů

Ve spolupráci s Oddělením laboratorních metod MOÚ jsme analyzovali korelaci nálezů PET s hodnotami nádorových markerů u pacientů s opakovaným FDG-PET vyšetřením.

Podle předběžných výsledků je FDG-PET pozitivní dříve než elevace nádorových markerů u 1/3 až 1/5 pacientů v závislosti od diagnózy.

V budoucnosti bude předmětem zájmu další analýza a statistické zhodnocení dat v návaznosti na kliniku a upřesnění začlenění PET do algoritmu diagnostických metod.

Využití PET v sledování účinnosti terapie

U pacientů s opakovaným FDG-PET vyšetřením před a po terapii srovnáváme:

- počet a v omezené míře velikost ložisek hypermetabolismu glukózy,
- metabolickou aktivitu ložisek pomocí stanovení SUV (Standardized Uptake Value).

Snížení metabolické aktivity ložisek, redukcí jejich počtu a velikosti hodnotíme jako dobrou odpověď na terapii a vice versa.

Jako příklad uvádíme komparativní studii hodnocení účinnosti terapie u pacienta s GIST (Gastrointestinální stromální tumor) před a po léčbě (Glivec) (obrázek 1).

Dolní polovina obrázku – Vstupní FDG-PET detekuje mnohočetná ložiska výrazně zvýšené akumulace radiofarmaka v oblasti jater a břišní dutiny. Nález svědčí pro přítomnost viabilní nádorové tkáně.

Horní polovina obrázku – Kontrolní FDG-PET vyšetření po terapii. Úplné vymizení všech metabolicky aktivních ložisek svědčí pro kompletní remisi onemocnění.

Využití pozitronové emisní tomografie v kardiologii.

S úspěchem využíváme FDG-PET na vyšetření viability myokardu levé komory srdeční u pacientů s překonaným akutním infarktem myokardu před a po transplantaci autologních kmenových buněk.

Provedli jsme zatím více než 250 vyšetření.

Snížení aktivity postižené části levé komory o více než 50 procent ve srovnání s aktivitou referenčního myokardu hodnotíme jako projev nekrózy.

Za pomoci programu 4D-MSPECT hodnotíme aktivitu jednotlivých segmentů myokardu s využitím polárních map.

Příklad:

Srovnání viability myokardu levé komory před a po aplikaci kmenových buněk u pacienta s překonaným infarktem myokardu.

Zřetelná je výrazná redukce rozsahu nekrózy apikálně a anteroseptálně po aplikaci kmenových buněk (obrázek 2 – dolní řada jednotlivých projekcí – vstupní FDG-PET před aplikací kmenových buněk. Výpad aktivity anteroseptálně a apikálně, horní řada jednotlivých projekcí – zvýšená aktivita v postižené oblasti myokardu po podání kmenových buněk).

Neurologická diagnostika – FDG-PET provádíme:

- u pacientů s epilepsi rezistentní na farmakoterapii s předpokladem stereotaktické intervence.

Vyšetření se provádí v interiktálním stadiu, na FDG-PET nacházíme ložisko sníženého metabolismu mozkové kůry v místě epileptogenního ložiska,

- u pacientů po terapii pro primární nádory mozku anebo mozkové metastázy po radioterapii anebo chirurgické terapii. FDG –PET umožňuje odlišení fibroticky změněné tkáně od recidivy anebo rezidua nádoru. V oblasti mozku je z hlediska hodnocení nálezů nezbytné mít k dispozici nálezy CT anebo MR v digitální podobě umožňující SW fúzi obrazů.

Na ONM a PET MOÚ pracuje v současnosti 5 lékařů s atestací z nukleární medicíny, 1 lékař s atestací z nukleární medicíny a radiodiagnostiky, 9 laborantů a 1 fyzik. Přípravu radiofarmak zajišťují pracovníci ústavní lékárny MOÚ.

Význam pozitronové emisní tomografie u plicních malignit

¹Jakubec P., ¹Grygárková I., ¹Jakubcová T., ¹Kolek V., ²Benýšek V.

¹Klinika plicních nemocí a tuberkulózy FN a LF UP, Olomouc

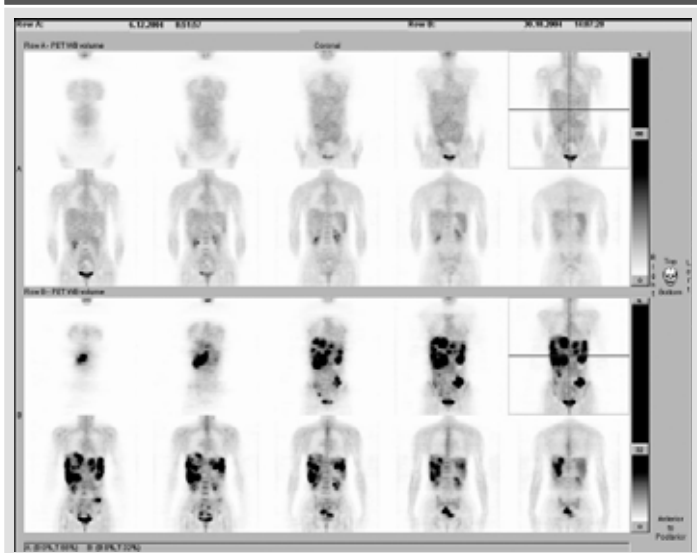
²Radiologická klinika FN a LF UP, Olomouc

Pozitronová emisní tomografie (PET) je neinvazivní vyšetřovací metoda, jejíž výhoda spočívá v tom, že na rozdíl od ostatních zobrazovacích metod detekuje rozdíly v metabolismu buněk různých tkání a nikoliv anatomické struktury. V dnešní době je až 90 % všech PET vyšetření provedeno z onkologické indikace.

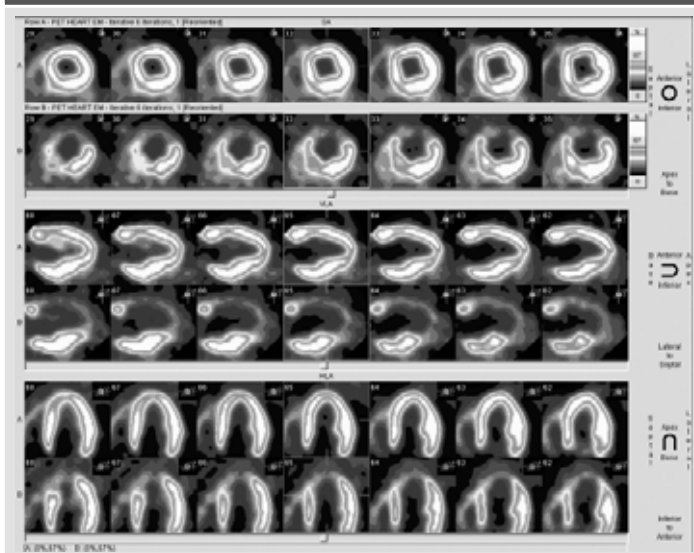
Uvádíme jednotlivé indikace PET v pneumo-onkologii a srovnáváme její výtěžnost a přesnost s ostatními zobrazovacími metodami. Mimo diagnostiky se PET také používá k hodnocení efektu léčby, relapsu a prognózy nemoci.

V druhé části práce předkládáme tři kazuistiky ukazující pozitiva, ale i úskalí a limity tohoto vyšetření.

Obrázek 1.



Obrázek 2.



7. VARIA A KAZUISTIKY

8.30–10.00 hod. sál PERSEUS

Předsedající: CWIERTKA, K.; MIHÁL, V.; Novotný, J.

Riziko diagnostického omylu při zriedkavých nádoroch maternice v kyretovanom bioptickom materiáli

Szépe P., Kajo K., Slávik P., Felcanová D., Plank L.

Ústav patologickej anatómie JLF UK a MFN, Martin, Slovensko

Predmetom prezentácie je kazuistika 35 ročnej pacientky s klinickou diagnózou myómu maternice, ktorej bola urobená diagnostická kyretáž. V bioptickom materiáli bol s použitím tak morfológických ako aj imunohistochemických metód diagnostikovaný regresívne zmenený leiomyóm, avšak pre pretrvávajúce klinické obtiaže bola pacientke s odstupom 10 mesiacov následne vykonaná hysterektómia s peroperačnou biopsiou. Pri tomto vyšetrení bol nájdený invazívne rastúci mezenchymálny nádor, ktorý zodpovedal myxoidnému leiomyosarkómu (MLMS). Ide o veľmi zriedkavý variant leiomyosarkómu, ktorý bol v anglicky písanej literatúre dosiaľ opísaný v menej než 30-tich prípadoch. Vyskytuje sa tak u žien vo fertilnom veku, ako i postmenopauzálné, pričom zvyčajne vytvára makroskopicky veľkú nádorovú masu. Charakteristickou morfológickou črtou je nízka celularita a mitotická aktivita (celkom ojedinelé mitózy), ktorá MLMS odlišuje od všetkých ostatných LMS. Imunohistochemické vyšetrenia a konvenčné kritériá malignity pre tumory z hladkej svaloviny uteru pri tomto type nádoru nie sú platné a diagnosticky prínosné. V diferenciálnej diagnostike treba odlišiť najmä regresívne zmenený leiomyóm, pričom v minulosti boli zrejme tieto nádory často poddiagnostikované. Na prezentovanom prípade možno túto skúsenosť plne potvrdiť, navyše koincidencia s malým konvenčným leiomyómom bola hlavným zavádzajúcim faktorom nesprávnej diagnózy pri bioptickom vyšetrení kyretáže dutiny maternice.

Molekulárne cytogenetická charakterizácia tří dětských feochromocytomů

Vicha A.¹, Sumerauer D.¹, Stejskalova E.¹, Jarosova M.², Holzerova M.², Puchmajerová A.³, Křepelová A.³, Krutílková V.³, Eckschlagner T.¹

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

²Klinika hematatoonkologie, LF a FN Olomouc

³Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN Motol, Praha

Feochromocytom je u dětí velmi vzácný nádor s incidencí menší než 1 na milion dětí a rok. Je odvo-

zen od chromafinních buněk sympatického nervového systému dřeně nadledviny nebo extraadrenálně (extraadrenální se nazývá paraganglion). Většinou se vyskytuje jako sporadický, ale může být součástí hereditárních syndromů (MEN- 2A, MEN- 2B, VHL choroba a NF-1) (1). Hlavním problémem feochromocytomu je nemožnost předpovědět klinický průběh – na základě histologického obrazu nelze určit, zda se jedná o benigní či maligní formu. Předpokládá se, že průkaz genetických změn by mohl posloužit k predikci chování. U feochromocytomu dospělých byl nejčastěji popsán ztráty 1p, 3q a/nebo 3p, 6q, 17p, 11q a zmožení 9q a 17q (2). Aberace postihující 11. chromozom a delece 17q se vyskytovaly převážně u maligních forem (3). U feochromocytomu dětí jsou informace o chromozomálních aberacích velmi omezené.

My jsme užili CGH k detekci chromozomálních aberací u dvou feochromocytomů a jednoho paragangliomu.

Případ č. 1. Asymptomatický třináctiletý chlapec, který byl přijat pro hypertenzi zjištěnou při preventivní prohlídce. Na ultrazvuku byly nalezeny masy v obou nadledvinách. Dvacetičtyřhodinový sběr prokázal zvýšené vylučování VMA (52,2 mmol/mol krea a den) a při vyšetření očního pozadí byl nalezen kapilární angiom. Byly odstraněny obě nadledviny s nádorem, histologie: feochromocytom. Vyšetření po operaci včetně ¹³¹I-MIBG scintigrafie neprokázala reziduální nádor ani metastázy a nyní je 3 roky po operaci v kompletní remisi včetně normálních odpadů katecholaminů v moči.

U chlapce byla detekována zárodečná mutace VHL genu NM 000551:c.374A>C (p.His125Pro) v exonu 2 genu *VHL*.

Případ č. 2. Čtrnáctiletý chlapec akutně přijatý pro krátké bezvědomí s trismem. Byla zjištěna hypertenze (160/100 mm Hg). V anamnéze udával bolesti hlavy, únavnost a zvracení.

MR mozku neprokázala patologický nález, ale na CT břicha bylo prokázáno nádorové ložisko v pravé nadledvině a dvacetičtyřhodinový sběr prokázal zvýšené vylučování VMA (19,2 mmol/mol kreatininu a den). Po kompenzaci hypertenze byla provedena pravostranná adrenaektomie a histopatologické vyšetření verifikovalo diagnózu feochromocytomu. Nyní je 14 měsíců v kompletní remisi včetně ¹³¹I-MIBG scintigrafie a odpadů katecholaminů v moči.

Případ č. 3. Třináctiletý chlapec přijatý pro rezistenci v břiše zjištěnou při preventivní prohlídce. Na sonu a CT tumor velikosti 10 x 7 x 7 cm lokalizovaný vlevo para a prevertebrálně. Nádor byl radi-

kálně exstirpován. Histologie: paragangliom. Deset měsíců po operaci je v kompletní remisi včetně ¹³¹I-MIBG scintigrafie a odpadů katecholaminů v moči.

Tabulka: Výsledky CGH

Př. č.	Zmnožení	Ztráty
1.	5q14-q21; 6q15-q16.1; Xq21.3-q23	1p34.1-pter; 3p12-pter; 9q34-qter; 11p; 16p12-p13; 19; 22
2.	/	3; 11
3.	1q	1p; 11p; 17p

Diskuze: U všech tří dětí s feochromocytomem jsme detekovali delecii postihující 11p (dvakrát pouze 11p a jednou celého 11. chromozomu) a delece 1p a části 3p respektive celého 3. chromozomu byla u dvou pacientů. Ztráty 1p a 3q patří k nejčastějším změnám nacházejícím u feochromocytomů dospělých (2, 3, 4, 5). Různé změny v oblasti 11. chromozomu (del 11p nebo 11q, zmožení 11q) a del 17 p jsou udávány převážně u maligních forem feochromocytomů dospělých (3, 4). My jsme našli delecii 11p u dvou a celého 11. chromozomu u třetího z našich pacientů a u jednoho navíc delecii 17p přestože neměli známky malignity (metastázy). Otázkou je, zda metastázy nebyly přítomny, protože onemocnění bylo zachyceno relativně včas. Druhou možností samozřejmě je, že genetické změny u dětských feochromocytomů se mohou lišit od změn nacházejících u dospělých. Řada nádorů, které jsou typické pro dospělý věk, ale vzácněji se vyskytnou i u dětí, má v obou těchto věkových skupinách odlišnosti biologické, klinické i genetické. Největší počet genetických změn byl nalezen u chlapce s mutací genu *VHL* a oboustranným feochromocytomem. Pokud je nám známo námi prokázaná mutace dosud nebyla u von Hippel Lindauova syndromu popsána.

Práce vznikla za finanční podpory VZ MŠMT 0021620813 a grantu IGA NC/7441-3.

Literatura

1. Leung YPK, et al.: Hong Kong Med J, 2002; 8: 452.
2. Dannenberg H, et al.: Am J Pathol, 2000; 157: 353.
3. Eldstrom E, et al.: Am J Pathol, 2000; 156: 651.
4. Gunawan B, et al.: Cancer Genet Cytogenet, 2004; 154: 163.
5. Koch CA, et al.: Endocrin Regulations, 2001; 35; 43.

Nezvyčajná asociácia nádorov typu GIST a NET u pacienta s neurofibromatózou – limity klinickej a patologickej diagnostiky
Machálek K., Kajo K., Szépe P., Plank L.
Ústav patologickej anatómie JLF UK a MFN, Martin, Slovensko

Autori opisují případ 44-ročného pacienta s klinicky a biochemicky verifikovaným Zollinger-Ellisonovým syndrómom s recidivujúcou ťažkou vredovou chorobou gastro-duodena, pre ktorú bol pacient opakovane operovaný. Zobrazovacími metódami (octeoscan) bol detekovaný nádorový proces v oblasti pankreasu, ktorý však tak v biotickom ako aj v nekroptickom materiáli nebol potvrdený, pričom v pankrease bol zaujímavým nálezom obraz difúznej nesidioblastózy. Naviac boli operačne zistené mnohopočetné nádorové uzly na seróze tenkého čreva, ktoré spĺňali morfológické kritériá gastrointestinálneho stromálneho tumoru (GIST). Napokon u pacienta boli prítomné známky neurofibromatózy 1 (café au lait, viacpočetné neurofibrómy kože).

Aj keď dôkladným vyšetrením pacienta počas života ako i po smrti nebol klinicky a morfológicky supponovaný neuroendokrinný nádor (NET) s prejavmi hypergastrinémie nájdený v typických lokalizáciách (gastrinómový trojuholník), ostáva tento prípad zaujímavý a raritný asociáciou neurofibromatózy s nádorom typu GIST a klinicky supponovaným NETom. Jednou z možných ciest doriešenia prípadu ostáva analýza DNA pacienta molekulárne-genetickými metódami.

Stanovení radiačního poškození tenkého střeva měřením střevní propustnosti

Horák L.¹, Kohout P.², Kubecová M.³

¹chirurgická klinika 3.LF UK Praha

²interní klinika FTN Praha

³radioterapeutická a onkologická klinika 3LF UK, Praha

Přes veškeré pokroky v radioterapii dochází při léčbě některých solidních nádorů k poškození tenkého střeva. Nejčastěji jde o stavy po radioterapii nádorů čípku hrdla děložního, pracoviště autorů má bohužel zkušenost i s mírně stoupající incidencí u nemocných po adjuvantní radioterapii pro rakovinu konečníku. Jedná se sice o malé procento nemocných, kteří však přicházejí s rozvinutým stavem – (malnutrice, chronický ileus, entero enterální píštěle).

Tito nemocní vyžadují obvykle dlouhodobou parentální a řízenou enterální výživu, u některých je posléze nutný i chirurgický zákrok. (resekce tenkého střeva, či bypass s vyřazením postiženého úseku).

Ke zlepšení péče o nemocné je vhodné pokusit se specifikovat ohroženou skupinu, které by zasluhovala zvýšený dohled případně léčbu po skončení radioterapie a ne v okamžiku kdy přicházejí s rozvinutou symptomatologií.

Navíc v současné době vstupují nemocní do léčebného programu, aniž bychom měli informace funkčního stavu jejich tenkého střeva před zahájením léčby.

Naše studie se zabývala vyšetřením střevní permeability LAMA testem před zahájením radioterapie a po jejím skončení.

LAMA test je test střevní propustnosti s použitím laktulózy – je relativně nenáročný pro nemocného, není invazivní.

Cílem studie bylo je ověřit tento test jako metodu vhodnou k detekci radiačního poškození tenkého střeva – s perspektivou vytýpat skupinu nemocných, které bude vhodná pro modifikovaný léčebný model.

Metodika projektu:

1. Podání preparátu – sběr moči – před RT
2. Podání preparátu a sběr moči po RT
3. zhodnocení výsledků- ústav biochemie LF UK Hradec Králové
4. korelace s klinickým stavem, definitivní hodnocení výsledků

V současné době máme zpracována data 35 nemocných před, bezprostředně po a 6 měsíců po ukončení radioterapie. Výsledky korelují s klinickým stavem nemocných. V další fázi studie bude spočívat v dlouhodobém sledování nemocných a měření propustnosti v 6 měsíčních intervalech.

Autoři děkují Lize Proti Rakovině Praha za podporu první fáze projektu.

BNP (brain natriuretic peptide) – marker kardiálního selhávání u pacientů léčených radioterapií

^{1,2}Holubec L., ¹Fínek J., ¹Salvát J., ²Topolčan O.

¹Radioterapeutické a onkologické oddělení, FN Plzeň

²Centrální izotopová laboratoř, ONM FN Plzeň

Úvod: V průběhu radiační onkologické léčby horní poloviny hrudníku, hlavy a krku dochází velmi často v důsledku záření k poškození funkce myokardu. Klinická manifestace je patrná především v ovlivnění funkce levé komory srdeční, což má za následek srdeční selhání. K těmto poruchám dochází nejen u pacientů, kteří již byli před radiační terapií pro srdeční selhání léčeni, ale také u pacientů bez klinické manifestace srdeční choroby. Kromě fyzikálního vyšetření patří k základním metodám diagnostiky srdečního selhání provedení echokardiografického vyšetření a EKG. Pro potřeby onkologických a radioterapeutických pracovišť však toto vyšetření není vždy aktuálně dostupné. V rychlé diagnostice srdečního selhání zde proto může hrát důležitou úlohu stanovení kardiocíckých enzymů. Jedná se především o stanovení natriuretického peptidu typu B (BNP). Natriuretický peptid typu B je tvořený řetězcem 32 aminokyselin. Původně byl izolován z mozkové tkáně vepře, proto se označuje B (z angličtiny brain). Gen pro lidský BNP je lokalizován na chromozomu č. 1. Prohormon BNP je při průchodu membránou kardiomyocytu štěpen na biologicky aktivní BNP a biologicky neaktivní N-terminální zbytek prohormonu NT- pro BNP, který má 76 aminokyselin. Cirkulující prohormon, BNP i NT-pro BNP mohou být stanoveny radioimunologicky. Hlavním stimulem

pro uvolnění NP do cirkulace je dispenze (střech) kardiomyocytů. Nejprve rychle stoupne plazmatická koncentrace atriačního NP (ANP), který je skladován v intracelulárních granulech myocytů především srdečních síní. S malým zpožděním stoupá plazmatická koncentrace BNP rychlou vystupňovanou transkripcí genu pro BNP s následným vzestupem mRNA především v myokardu srdečních komor. Volný BNP se váže na efektorové receptory A a B s následným vzestupem koncentrace cGMP v buňce a stimulací natriuridy a vasodilatace. BNP je z krve eliminován jednak vazbou na receptor typu C (bez biologického efektu), jednak proteolýzou neutrální endopeptidázou (NEP). Renální exkrece jak BNP, tak NT-pro BNP není dosud objasněna. Existuje však nepochybná pozitivní korelace S-Cr a S-BNP, respektive NT- pro BNP.

Jako perspektivní se dále zdá být stanovení markeru Seristra, což je střední část molekuly ANP, která se uvolňuje v síních a je také potenciální marker srdečního selhání.

Metodika: V pilotní studii jsme u 37 pacientů léčených zářením stanovili BNP (Chemiluminescence, Beckmann Coulter), NT-pro BNP (ELISA, Biomedica) a Seristra (Imunoluminescence, BRAHMS) před zahájením radiační léčby a po jejím skončení (do 5 dnů). Laboratorní hodnoty byly korelovány s klinickým stavem pacienta, pomocí fyzikálního vyšetření, které bylo provedeno kvalifikovaným internistou se zaměřením na známky kardiálního selhávání. U dvou pacientů, kteří měli pozitivní anamnézu a byly pro chronické srdeční selhávání léčeny již před radiační léčbou, bylo současně při pozitivitě hodnot BNP a klinické manifestaci provedeno kontrolní echokardiografické vyšetření a to před a po skončení radioterapie.

Celkem bylo vyšetřeno 37 pacientů, z toho mělo 20 pacientů negativní anamnézu kardiálního onemocnění, u 20 pacientů byla pozitivní anamnéza z hlediska kardiálního onemocnění (vysoký krevní tlak, poruchy rytmu, srdeční selhání). Z 37 pacientů bylo 29 ozařováno pro karcinom prsu (vlevo), 5 pacientů s karcinomem jícnu, 2 pacienti s karcinomem plic a 1 pacient s m. Hodgkin.

BNP bylo stanoveno pomocí komerčně dostupného kitu od společnosti Merck na přístroji ACCESS, Beckman Coulter, NT-pro BNP metodou ELISA, kit společnosti Biomedica a Seristra imunoluminescenčně, pomocí komerčního kitu společnosti BRAHMS.

Výsledky: U srovnání hodnot kardiocíckých markerů mezi skupinou kardiaků a nekardiaků bez ohledu na léčbu jsme zjistili statisticky signifikantní rozdíly u BNP ($p > 0.009$), Seristry ($p > 0.04$), u NT-pro BNP nebyl mezi skupinami žádný rozdíl. U skupiny pacientů s negativní anamnézou kardiocíckých onemocnění byl před a po léčbě zářením pozorován statisticky signifikantní rozdíl u hodnot BNP ($p > 0.05$), u hodnot NT-pro BNP a Seristry nebyl mezi skupinami žádný rozdíl. U skupiny pacientů s pozitivní anamnézou kardiocíckých onemocnění

onemocnění byl před a po léčbě zářením pozorován statisticky signifikantní rozdíl u hodnot BNP ($p > 0.001$), u hodnot NT-pro BNP a Seristry nebyl mezi skupinami žádný rozdíl.

Před zahájením léčby byly patologické hodnoty BNP (nad 100 pg/l) naměřeny u 3 ze 37 (8%) pacientů. Ve všech případech se jednalo o pacienty léčené pro chronické srdeční selhání. Po skončení radiační léčby byly naměřeny patologické hodnoty u 11 ze 37 (30%) pacientů, kdy došlo ke zhoršení manifestní choroby, či došlo ke kardiální dekompenzaci u dosud kompenzovaných pacientů. V případě dvou pacientů, u kterých bylo zároveň provedeno echokardiografické vyšetření před a po skončení léčby, koreloval echokardiografický nálezný s patologickými hodnotami BNP a klinickou manifestací kardiálního selhání.

Diskuze: Z výsledků pilotní studie vyplývá, že manifestní srdeční selhání se vyskytlo u 30% pacientů po skončení radiační terapie. Většinou se jednalo se o dekompenzaci stávajícího onemocnění či novou klinickou manifestaci. Ve většině případů korelovaly patologické hodnoty BNP s klinickými příznaky počínajícího srdečního selhání, které by byly jinak přehlédnuty.

U obou kazuistik, kde byla provedena korelace hodnot BNP s echokardiografickým vyšetřením byla prokázána korelace mezi mírou patologických hodnot a stupněm kardiálního selhávání. U obou pacientů byla v průběhu radioterapie upravena léčba srdečního selhání a pacienti bez komplikací dokončili ozáření, které by jinak bylo pro špatnou toleranci ukončeno.

V rutinní klinické praxi je často v případě onkologických pracovišť echokardiografické vyšetření obtížně dostupné. Rovněž frekvence vyšetření, které by bylo nutné provést v případě manifestního kardiálního selhávání v průběhu radioterapie by byla finančně neúnosná. Laboratorní stanovení BNP jako markeru srdečního selhání se proto u pacientů léčených radioterapií zdá jako perspektivní zvláště v situaci, kde není aktuálně dostupné echokardiografické vyšetření a kde je z důvodu již manifestního onemocnění nutné monitorovat pacienty za účelem úpravy terapie srdečního selhání.

Vedlejší příznaky provázející radiační terapii bývají častou příčinou přerušení či zkrácení terapie pro její intoleranci. Z prospektivních multicentrických studií je prokázáno, že obojí má nepříznivý vliv na bezpříznakové i celkové přežití, což znamená, že pacienti žijí kratší dobu, než když dosáhnou maximální celkové dávky záření. Vedle častých vedlejších příznaků, které jsou všeobecně známy (lokální kožní reakce, útlum krvetvorby) existuje celá řada dalších, na které není myšleno (kardiální selhávání, dysfunkce štítné žlázy). U těchto pacientů je zhoršení aktuálního zdravotního stavu většinou špatně diagnostikovano. Pacient se „zhoršil“, proto je protinádorová léčba přerušena a pacientovi je doporučena návštěva „specializovaného lékaře dle spádu“. Při správně diagnostikované příčině zhoršení zdravotního stavu,

jako je tomu v případě kardiálního selhávání, pak vede pouze úprava terapie k výraznému zlepšení a pacient může započatou terapii dokončit. K tomu je však nutná úzká interdisciplinární spolupráce radioterapeuta, onkologa, internisty a laboratorního specialisty, která bohužel ve většině případů chybí.

Závěr: Z výsledků pilotní studie vyplývá, že především měření brain natriuretického peptidu (BNP) má význam pro monitoraci funkce myokardu a to především u rizikových pacientů, kteří podstupují aktinoterapii.

Poděkování: Tato práce vznikla za podpory grantu uděleného Ligou proti rakovině pro rok 2005/2006.

Literatura

1. Loerzel VW, Dow KH. Cardiac toxicity related to cancer treatment. Clin J Oncol Nurs. 2003 Sep-Oct; 7 (5): 557–562.
2. Yu X, Prosnitz RR, Zhou S, Hardenbergh PH, Tisch A, Blazing MA, Borges-Neto S, Hollis D, Wong T, Marks LB. Symptomatic cardiac events following radiation therapy for left-sided Breast cancer: possible association with radiation therapy-induced changes in regional perfusion. Clin Breast Cancer. 2003 Aug; 4 (3): 193–197.
3. Timour Q, Lombard-Bohas C, Slim R, Barel C, Bui-Xuan B, Tabib A, Bricca G, Malonne H, Vial T, Iordescu D, Descotes J. Cardiotoxicity of 5 fluorouracil: report of 6 cases. Therapie. 2002 May-Jun; 57 (3): 302–306.
4. Lacko A, Wlodarska I, Zymliński R, Mazur G, Wrobel T, Gisterek I. Cardiac toxicity in cancer therapy. Pol Merkuriusz Lek. 2002 Jul; 13 (73): 79–85.
5. Auner HW, Tinchon C, Brezinschek RI, Eibl M, Sormann S, Maizen C, Linkesch W, Schmon-Kampel R, Quehenberger F, Tiran A, Sill H. Monitoring of cardiac function by serum cardiac troponin T levels, ventricular repolarisation indices, and echocardiography after conditioning with fractionated total body irradiation and high-dose cyclophosphamide. Eur J Haematol. 2002 Jul; 69 (1): 1–6.
6. Meinardi MT, van Veldhuisen DJ, Gietema JA, Dolsma WV, Boomsma F, van den Berg MP, Volkers C, Haaksma J, de Vries EG, Sleijfer DT, van der Graaf WT. Prospective evaluation of early cardiac damage induced by epirubicin-containing adjuvant chemotherapy and locoregional radiotherapy in breast cancer patients. J Clin Oncol. 2001 May 15; 19 (10): 2746–2753.
7. Hardenbergh PH, Munley MT, Bentel GC, Kedem R, Borges-Neto S, Hollis D, Prosnitz LR, Marks LB. Cardiac perfusion changes in patients treated for breast cancer with radiation therapy and doxorubicin: preliminary results. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001 Mar 15; 49 (4): 1023–1028.
8. Keefe DL. Cardiovascular emergencies in the cancer patient. Semin Oncol. 2000 Jun; 27 (3): 244–255.
9. Shapiro CL, Hardenbergh PH, Gelman R, Blanks D, Hauptman P, Recht A, Gates DF, Harris J, Henderson IC. Cardiac effects of adjuvant doxorubicin and radiation therapy in breast cancer patients. J Clin Oncol. 1998 Nov; 16 (11): 3493–3501.
10. Calzas J, Lianes P, Cortes-Funes H. Heart pathology of extracardiac origin. VII. Heart and neoplasm. Rev Esp Cardiol. 1998 Apr; 51 (4): 314–331.

Využití technik asistované reprodukce v péči o onkologické pacienty

¹Hüttelová R., ²Kleibl Z.

¹Ústav pro péči o matku a dítě, Praha

²Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK v Praze.

S rozvojem léčebných protokolů používaných v onkologii významně stoupá počet dlouhodobě přežívajících a trvale vyléčených pacientů. Do po-

předí zájmu se tak dostává otázka zlepšení kvality jejich života a minimalizace pozdních nežádoucích účinků léčby. Léčba nádorových onemocnění má často za následek poškození gonád s následným deficitem hormonů a sterilitou. Mezioborová spolupráce a využití technik asistované reprodukce tak může zajistit reprodukční ochranu pacientů různých věkových skupin.

V rámci reprodukční ochrany pacienta lze provést zamražení a uschování spermií, embryí a v některých případech i oocytů před zahájením protinádorové léčby. U žen a dívek v pubertě a po pubertě lze zamezit poškození ovárií při onkologické léčbě pomocí analogů gonadoliberinu. U dětí a dospívajících je perspektivou pro uchování plodnosti zamražení a pozdější rozmražení zárodečných buněk primordiálních folikulů a nezralých stadií mužských pohlavních buněk odebraných z gonád pomocí biopsie.

Další možností péče o onkologické pacienty je oblast preimplantační diagnostiky u zdravých nosičů mutací podmiňujících hereditárními nádorová onemocnění. Je nezbytné, aby přesné vymezení cílové skupiny klientek pro tuto diagnosticko-preventivní modalitu vzešlo z mezioborová spolupráce s účastí onkologů, embryologů, klinických genetiků, molekulárních biologů a psychologů. Metody molekulární biologie prokazují praktickou použitelnost detekce mutací v embryích pomocí single-cell PCR a následné sekvenční analýzy.

Poděkování: Autoři děkují Lize proti rakovině za finanční podporu projektu.

Víme co léčíme? Jak zlepšit detekci postižení uzlin u kolorektální rakoviny

Horák L.¹, Lisý P.¹, Ducháč V.¹, Štukavec J.¹, Švec A.², Jirásek T.²

¹Chirurgická klinika 3 LF UK Praha

²Patologicko-anatomický ústav 3LF UK Praha

Současné situace v detekci postižení lymfatické kolorektálním karcinomem není uspokojivá. Situaci nejlépe vystihuje sdělení Žaloudíka z roku 2003, kdy kritériu na 12 vyšetřených uzlin v resekčním preparátu vyhověla necelá čtvrtina z téměř 300 operovaných nemocných.

Kromě exaktně provedeného chirurgického zákroku je nutná spolupráce patologa. Ten má dispozici buď zvýšení počtu rutinních řezů až na 250 jak udávají japonští autoři. Další možností je časově náročná dissoluce tuu v mesocolon a v mesorektu. Autoři zavedli v roce 2003 metodiku dodatečného zvýraznění uzlin podle Korena pomocí roztoku diethyleteru, kyseliny octové-ledové ethanolu a formolu. Uzliny se jeví jako bělavé uzle v tuku mesocolon.

Metoda prodlužuje přípravu preparátu pro vyšetření o 30–45 minut. V rutinním provozu v roce 2004 byl průměrně vyšetřených uzlin 14.7 na preparát.

Výrazně stoupl i počet zachytu pozitivních uzlin.

Metodiku lze považovat za jednoduchou a přitom velice přínosnou pro rozhodování o adjuvantní léčbě.

Autoři děkují Lize Proti Rakovině Praha za dar, který jim umožnil zavést metodiku do klinické praxe a Onkologické společnosti za příspěvek, díky kterému mohou v této metodice pokračovat.

Autofluorescenční diagnostika kolorektálního karcinomu

¹Ducháč V., ¹Horák L., ²Zavadil J., ²Ležal D., ¹Štukavec J.

¹Chirurgická klinika 3. LF UK, Praha

²ČAV, Praha

Cíl: Ve své práci si autoři dali za cíl ověřit možnosti ex vivo a in vivo diagnostiky kolorektálního karcinomu pomocí rozdílných autofluorescenčních vlastností zdravé a postižené tkáně tlustého střeva.

Metodika: Ve spolupráci s Ústavem radiotechniky a elektroniky AV ČR byl vytvořen přenosný autofluorescenční analyzátor pracující v systému „svůj-cizí“. Jako budící světelný zdroj byly použity 1/ Ar ion laser pracující na vlnové délce 514,5nm a 2/ He-Ne laser pracující na 632,8 nm a posléze LED zdroj o vlnové délce 481nm. Tímto zařízením byly analyzovány vzorky zdravé a nádorové tkáně tlustého střeva získané při operacích nemocných pro kolorektální nádor. Zpočátku jsme odebírali 2 vzorky 1/ z oblasti nádoru a 2/ z oblasti orální resekční linie. V současné době jsme schopni tkáň vyšetřit okamžitě po jeho vyjmutí z těla pacienta a při rektoskopii.

Každá měřená oblast je po té histologicky zpracována k ověření nálezu.

Standardně v každé oblasti provádíme 5 měření, která posléze průměrujeme.

Výsledky: U nádorové tkáně v zásadě získáváme 2 typy odpovědí na excitaci.

1. pokles intenzity v celém šíři měřeného spektra – který je vysvětlován zánětlivou infiltrací nádorem postižené tkáně a
2. významné zvýšení intenzity emitovaného záření v oblasti červeného spektra, respektive na vlnových délkách 630 a 680 nm, které je vysvětlováno zvýšeným množstvím protoporfyrinu v nádorové tkáni.

Závěry: Autoři experimentálně ověřili možnost autofluorescenční diagnostiky kolorektálního karcinomu, jehož hlavní využití autoři předpokládají při diagnostických rozpacích při stanovování bezpečné resekční linie nízko uložených kolorektálních karcinomů a perspektivně při endoskopických kontrolách po výkonu pro kolorektální karcinom

Poděkování: Autoři děkují za podporu práce IGA MZ- ČR- grant ND-7581.

8. NOVÉ MOŽNOSTI STAGINGU A ULTRASTAGINGU NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ II

10.30–12.05 hod. sál PEGASUS

Předsedající: DVOŘÁČKOVÁ, J.; PILKA, R.; SROVNAL, J.

Detekce sentinelové uzliny u plicního karcinomu pomocí patentní modři a její klinický význam

¹Bohanes T., ¹Klein J., ¹Neoral Č.,

¹Szkorupa M., ²Koranda P.

¹I. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

²Klinika nukleární medicíny LF UP a FN Olomouc

Názory na význam a nejvhodnější způsob lymfadenektomie u nemalobuněčného karcinomu plic nejsou dosud jednotné. Metoda identifikace a biopsie sentinelové uzliny, ověřená dosud u některých jiných tumorů, představuje i u plicního karcinomu slibnou alternativu či přinejmenším doplněk dosud užívaných postupů.

V rámci prospektivní nerandomizované studie, probíhající ve FN Olomouc v letech 2000–2003, byla provedena identifikace sentinelové uzliny u 48 pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem s využitím lymfatického mapování pomocí patentní modři. Sentinelová uzlina byla identifikována u 40 nemocných (83,3 %), falešná negativita sentinelové uzliny byla zjištěna ve 3 případech (7,5 %). Získané výsledky byly porovnávány s výsledky dalších studií, včetně prací publikovaných v poslední době.

Závěr: Studie prokázala klinickou využitelnost metody identifikace a biopsie sentinelové uzliny u nemalobuněčného plicního karcinomu pomocí patentní modři. Spolehlivost detekce se při jisté zkušenosti s technikou blíží výsledkům detekce sentinelové uzliny pomocí radionuklidu. Klinický význam metody však zůstává nadále poněkud sporný.

Identifikace sentinelové uzliny a její význam u karcinomu jícnu a kardie

¹Vrba R., ¹Neoral Č., ¹Aujeský R., ¹Bohanes T.,

¹Klein J., ¹Král V., ²Koranda P.

¹I. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

²Klinika nukleární medicíny LF UP a FN Olomouc

Cíl studie: Technika identifikace a biopsie sentinelové uzliny je jednou z možností jak zpřesnit staging onemocnění u karcinomu jícnu a žaludku. To je přínosné hlavně u nemocných s postižením D2 uzlin, jelikož pouze u nich je prokázán přínos D2 lymfadenektomie pro zlepšení přežívání. Cílem studie bylo ověřit možnost využití techniky u pacientů, u nichž byla indikována před radikální operací neoadjuvantní terapie.

Metoda: Sentinelová uzlina byla identifikována pomocí radio-koloidu a/nebo patentní modři, aplikovaných endoskopicky do oblasti tumoru. Uzlina byla poté vyhledána pomocí videolaparoskopie a odebrána na histopatologické vyšetření včetně detekce mikrometastáz. Metoda byla využita v letech 2002–2005 u 30 nemocných.

Výsledek: Nebyly zaznamenány žádné komplikace z metody, výtěžnost techniky pro získání sentinelové uzliny je 60 %.

Závěr: Popsaná technika byla ověřena jako použitelná u nemocných s karcinomem jícnu a kardie, jakkoliv sebou nese jisté metodické obtíže. Definitivní náhled na další využitelnost postupu mohou umožnit až další studie.

Poděkování: Studie byla podpořena grantem IGA MZdr ČR NA 7668-3/2003

Detekce sentinelových lymfatických uzlin pomocí ^{99m}Tc-nanokoloidu u Ca endometria

¹Pilka R., ¹Kudela M., ¹Dzvinčuk P., ²Koranda P.²

¹Gynekologicko – porodnická klinika FN a LFUP Olomouc

²Klinika nukleární medicíny FN a LFUP Olomouc

Cíl: Vyhodnocení efektivity předoperační lymfoscintigrafie a peroperační radionavigace v detekci sentinelových lymfatických uzlin (SLN) u pacientek s karcinomem endometria po transcervikální intra-myometrální aplikaci značeného koloidu.

Materiál a metodika: Nanokoloid značený techniciem Tc^{99m} (aktivita 50MBq) byl podán předoperačně 33 pacientkám s karcinomem endometria od dubna 2002 do března 2005. Radiofarmakum bylo aplikováno 25 gauge jehlou transcervikálně do myometria. Následovala série statických lymfoscintigramů v rozmezí 20 až 90 minut po podání. Za dvě hodiny byla zahájena terapeutická operace. U 28 pacientek byla provedena abdominální hysterektomie, oboustranná adnexektomie a pánevní lymfadenektomie. Laparoskopicky asistovaná vaginální hysterektomie s bilaterální adnexektomií a pánevní lymfadenektomií byla provedena v 5 případech. U 11 pacientek byly odstraněny para-aortální uzliny. Radioaktivní lymfatické uzliny byly lokalizovány detekční gama sondou. Každá aktivní uzlina byla odstraněna a zaslána k histopatologickému vyšetření zvlášť.

Výsledek: U 26 pacientek (79 %) ze 33 byly identifikovány sentinelové lymfatické uzliny. Průměrně bylo detekováno 2,9 sentinelových uzlin (rozmezí 1–10). Z celkově získaných 472 uzlin bylo 72 (15,3 %) radiopozitivních. Histopatologicky byly zjištěny metastázy v 5 uzlinách (7 %) ze 72. V paraaortální oblasti byly sentinelové uzliny detekovány u 11 pacientek (33 %). Žádné falešně negativní sentinelové uzliny nebyly nalezeny.

Závěr: Pomocí předoperační lymfoscintigrafie a peroperační radionavigace lze detekovat SLN u významné části pacientek s karcinomem endometria, což umožňuje detailní histologické vyšetření těchto uzlin. Detekce paraaortálních SLN představuje rozšíření operace i na tuto nestandardně vyšetřovanou oblast. Radionavigace zlepšuje peroperační vizualizaci SLN.

Detekce minimální reziduální choroby technikou PCR v reálném čase v sentinelových uzlinách u karcinomu prsu

¹Kořínková G., ¹Srovnal J., ^{1,3}Hajdúch M.,

²Švach I., ²Žlámalová N., ³Švébišová H.,

³Cwierotka K., ³Minařík J.

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

²Chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

³Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Pro vyšetřování minimální reziduální choroby v sentinelových, popřípadě v axilárních uzlinách u karcinomu prsu využíváme v naší laboratoři metodu RT-PCR v reálném čase. Pomocí této metody jsou na základě detekce typických epitelálních znaků nádorových buněk na úrovni mRNA detekovány izolované nádorové buňky v lymfatickém systému. Metoda spadá do oblasti ultrastagingu, její citlivost se pohybuje na úrovni detekce jedné nádorové buňky mezi deseti miliony buněk nenádorových. Proto se zde ve srovnání s klasickým histopatologickým vyšetřením nabízí velké možnosti pro zpřesnění základního stagingu u pacientek s karcinomem prsu.

Markery používané v naší laboratoři pro diagnózu reziduální choroby u karcinomu prsu jsou maglobin MGB1, karcinoembryonální antigen CEA a jako kontrolní gen používáme gen pro glycerinaldehydfosfátdehydrogenázu GAPDH. Dosud bylo u nás na minimální reziduální chorobu u karcinomu prsu

vyšetřeno zhruba 40 vzorků sentinelových uzlin a 10 vzorků axilárních uzlin. Na přednášce budou diskutovány nejen výsledky RT-PCR vyšetření v reálném čase, ale především korelace našich výsledků s výsledky histopatologického vyšetření.

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

Molekulární detekce okultních nádorových buněk v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu pomocí kvantitativní RT-PCR pro CEA

¹Janků F., ²Srovnal J., ²Kořínková G.,

²Hajdúch M.

¹Onkologická klinika 1. LF UK, Praha

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

Východiska: Karcinoembryonální antigen (CEA) je sérovým markerem celé řady nádorů. Nedávno bylo vyvinuto několik systémů pro CEA-RT-PCR detekci v periferní krvi a kostní dřeni. V naší studii jsme zkoušeli kvantitativní CEA-RT-PCR v diagnostice izolovaných nádorových buněk v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu před zahájením adjuvantní systémové léčby.

Metodika: Celkem 70 pacientkám po kompletním odstranění nádoru nebo před neoadjuvantní léčbou s radikálním záměrem byl odebrán aspirát kostní dřene. Rozložení klinických stádií bylo následující: stádium I (37%), II (60%) a III (3%). Pro izolaci mRNA byl použit QIAamp RNA blood mini kit (Qiagen®). Následně bylo provedeno kvantitativní RT-PCR na expresi CEA.

Výsledky: Transkripty CEA byly zjištěny ve vzorcích od 29 (41%) ze 70 pacientů. Při mediánu sledování 22 měsíců jsme zaznamenali 8 událostí registrovaných pro dobu do události (tzv. disease free survival DFS) včetně 4 vzdálených recidiv, 1 duktálního karcinomu in-situ (DCIS), 1 lokální recidivy a 2 úmrtí bez nádoru. Čtyři DFS události (2 vzdálené recidivy, 2 úmrtí bez nádoru) byly zjištěny u pacientů s CEA transkripty v kostní dřeni a 4 (2 vzdálené recidivy, 1 DCIS, 1 lokální recidiva) u pacientů bez prokázaných transkriptů CEA v kost-

ní dřeni. Byl pozorován trend ke kratšímu DFS ve skupině s expresí CEA, který nicméně nedosahoval statistické významnosti ($p=0,05548$). Celkové přežití vzhledem k tomu, že byly hlášeny pouze 2 úmrtí (u pacientek bez nádoru), hodnoceno nebylo.

Závěr: Kvantitativní RT-PCR pro CEA by mohlo být užitečnou technikou pro detekci okultních nádorových buněk v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu. Klinický a prognostický význam takto zjišťované minimální reziduální choroby je zatím nejistý. Z prognostického hlediska je naše výsledky je nutné posuzovat opatrně vzhledem k tomu, že mohou být ovlivněny výskytem 2 úmrtí u pacientek bez recidivy s expresí CEA v kostní dřeni.

Poděkování: Podpořeno granty Ligy proti rakovině v Praze, RASO grantem ČOS, výzkumným záměrem MSM0021620808 a MSM 6198959216.

Monitorování minimální reziduální nemoci u nemocných s CML pomocí real-time RT-PCR

Rožmanová Š., Plachý R., Faber E., Rohoň P., Novosadová A., Jarošová M., Indrák K.

Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

Pro diagnostiku a monitorování léčebné odpovědi u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML) je nezbytná detekce fúzního genu BCR/ABL. Nejcitlivější metodou pro zjištění přítomnosti této aberace je kvalitativní analýza metodou reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) dovolující určit transkript BCR/ABL na úrovni 1 leukemické buňky mezi 10^5 – 10^6 normálními buňkami. Výrazným pokrokem ve sledování léčebné odpovědi a minimální reziduální nemoci je kvantifikace hladiny BCR/ABL transkriptů pomocí kvantitativní RT-PCR (Q-RT-PCR) s použitím fluorescenčně značených sond. Nárůst a vysoká hladina transkriptu BCR/ABL signalizují špatnou odpověď na léčbu a špatnou prognózu, naproti tomu pokles či vymizení transkriptů BCR/ABL dobrou odpověď na léčbu a dobrou prognózu.

Na našem pracovišti jsme zavedli metodu real-time PCR pro kvantitativní monitorování minimální reziduální nemoci u pacientů s CML. Analýza je prováděna na přístroji LightCycler s využitím specifické hydrolyzační sondy pro transkript BCR/ABL

a hladina transkriptů BCR/ABL je vztažena k expresi kontrolního genu ABL.

Cílem sdělení je poskytnout podrobnější informace o metodickém přístupu kvantifikace exprese fúzního genu BCR/ABL a zároveň prezentovat výsledky analýz provedených v molekulárně genetické laboratoři HOK FN Olomouc. Ověřili jsme, že poměr BCR-ABL/ABL velmi dobře koreluje s cytogenetickou odpovědí a že technika Q-RT-PCR je spolehlivá a citlivá metoda pro monitorování pacientů s CML během léčby nebo po alogenní transplantaci.

Cytologické a biochemické vyšetření laváže dutiny břišní u nádorů horní části GIT

¹Hoskovec D., ¹Antoš F., ³Kudrmann

J., ²Benková K., ¹Varga J.

¹Chirurgická klinika 1. LF UK a IPVZ

²Ústav radiační onkologie 1. LF UK

³Patologicko-anatomické oddělení, Praha

Výsledky léčby maligních onemocnění horní části GIT (žaludek, biliopankreatický systém) jsou přes pokroky v diagnostice, operační léčbě a chemoradioterapii neuspokojivé. Chirurgická léčba těchto onemocnění je primární, ale je zatížena vysokým procentem recidiv.

V literatuře je uváděno cytologické vyšetření laváže dutiny břišní jako dobrý prognostický ukazatel případné peritoneální recidivy. Ve snaze identifikovat nemocné, kteří by mohli profitovat z agresivních chirurgických postupů, jsme zavedli vyšetřování lavážní tekutiny na přítomnost volných nádorových buněk a hladiny CEA a Ca 19-9.

V období 2003/6 – 2005/10 jsme vyšetřili lavážní tekutinu (příp. ascite s) u 44 nemocných s podezřením na malignitu horního GIT. Ve 14 případech (31,8%) bylo cytologické vyšetření pozitivní ve smyslu výskytu maligních buněk ve výplachové tekutině. Cytologická pozitivita korelovala s vyššími stupni onemocnění a méně příznivým průběhem. Vyšší hladiny tumorových markerů jsme také našli u pokročilých onemocnění.

Positivní cytologické či biochemické vyšetření laváže dutiny břišní může být dobrým indikátorem pro aplikaci nových onkochirurgických postupů (hypertermická peroperační cytostatická laváž).

9. PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY III

10.30–12.15 hod. sál PERSEUS

Předsedající: HAJDÚCH, M.; PLANK, L.; SVOBODA, M.

Úskalí a možnosti akreditačního procesu a význam akreditace z pohledu laboratoráře

Braunerová B., Trojanec R., Hajdúch M., Bouchalová K., Mičochová S., Micková S.

Laboratoř experimentální medicíny (LEM), Dětská klinika FN a LF UP v Olomouci

Cytogenetické pracoviště Laboratoře experimentální medicíny (CP LEM) při Dětské klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc (www.LEM-Olomouc.cz) existuje již 6 let a od 1. 7. 2003 je součástí Referenční laboratoře pro stanovení Her-2/neu (c-erbB-2) u pacientek s metastatickým karcinomem prsu, indikovaných k léčbě trastuzumabem. CP LEM provádí cytogenetická vyšetření metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a komparativní genomové hybridizace (CGH). Pracoviště rovněž provádí akreditovanou metodu „ověření kvality cytogenetických kitů“, která je určena pro standardizaci komerčně vyvíjených in vitro diagnostik.

V rámci zvyšování kvality vyšetření, prokázání objektivitu při provádění jednotlivých technik a v rámci získání mezinárodního kreditu podstoupilo CP LEM akreditační řízení, prováděné národním akreditačním orgánem Českým institutem pro akreditaci (ČIA; www.cia.cz) a dne 31. 3. 2005 získalo akreditační osvědčení, dle normy ČSN EN ISO/IEC 17025. Tato norma je českou verzí evropské normy EN ISO/IEC 17025:2000 a získané osvědčení je platné ve všech zemích Evropské unie. Obsahuje všechny požadavky, které musí zkušební a kalibrační laboratoře splňovat, chtějí-li prokázat, že provozují systém jakosti, že jsou odborně způsobilé a schopné dosahovat platných výsledků.

Systém zavedený na CP LEM umožňuje monitorování průchodu vzorků laboratoří a zajišťuje dodržení všech parametrů nutných pro úspěšné provedení zkoušky. Správné provedení zkoušek je rovněž zajišťováno včleněním pracoviště do systému externích kontrol jakosti, porovnávajících výsledky jednotlivých vyšetření v návaznosti na jiné pracoviště. Vysoká erudice jednotlivých pracovníků je zajišťována individuálními plány školení a dodržování předepsaných postupů je prověřováno interními audity. Jednotlivé audity, včetně horizontálních a vertikálních prověrek, mají za úkol v průběhu roku prověřit funkčnost všech zavedených systémů a navrhnout řešení u nalezených neshod.

Ačkoliv získání akreditačního osvědčení klade vysoké nároky na jednotlivé pracovníky CP LEM a akreditační proces není levnou záležitostí, umož-

ňuje CP LEM včlenit se do systému evropských laboratoří.

Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216, IGA MZCR NC7506-3 a NC7495-3 a MPO 1H-PK/45.

Validace metod molekulární genetiky určených pro analýzu lidského genomu

Vraná M., Brdička R., Otáhalová E.

Národní referenční laboratoř pro DNA diagnostiku Ústavu hematologie a krevní transfuze, Praha

Analýza lidského genomu metodami molekulární genetiky se dnes stala nedílnou součástí diagnostiky mnoha maligních i jiných onemocnění. Vzhledem k tomu, že v současnosti se dá očekávat zvýšený pohyb pacientů mezi jednotlivými pracovišti ať už v rámci republiky nebo i do zahraničí, je i u těchto metod zvýšená potřeba možnosti vzájemné kompatibility výsledků provedených různými metodami na různých pracovištích. Proto by se měla stát samozřejmou součástí prováděných metod jejich dostatečná validace. Požadavek validace metod je současně jedním z požadavků norem ČSN EN ISO/IEC 17025 „Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří“ a ČSN EN ISO 15189 „Zdravotnické laboratoře – Zvláštní požadavky na jakost a způsobilost“.

Nicméně pravidla pro provádění validací nejsou zatím striktně stanovena. Proto v rámci Národní referenční laboratoře pro DNA diagnostiku a Koordináčního centra k řešení problematiky organizace laboratorního vyšetřování metodami molekulární genetiky a cytogenetiky ve spolupráci s dalším odborníky připravujeme návrh doporučení pro validace molekulárně genetických metod pro analýzu lidského genomu. Ten vychází z podobných mezinárodních doporučení připravovaných v rámci Best laboratory practise pod záštitou OECD. Je však přizpůsoben omezené dostupnosti referenčních materiálů a reálné situaci oboru v naší republice. Návrh je v současnosti dopracováván a otevírán pro diskusi odborníků. Text je možné vyžádat na adrese molgen@uhkt.cz nebo mlena.vrana@uhkt.cz, připomínky lze adresovat tamtéž. Cílem je dosažení co nejvyššího standardu oboru porovnatelného se zahraničními pracovišti a zároveň praktické použitelnosti pro rutinní laboratoře, které genetické testy provádějí.

Nedílnou součástí standardizace je i jednotné chápání a používání termínů, které jsou s metodikou a validací spojeny. Výklad používaných ter-

mínů není dosud zcela ustálen v českém ale ani v anglickém jazyce. Proto zde přikládáme tabulku termínů v angličtině s jejich českým překladem, vysvětlením a použitelností pro molekulárně genetická vyšetření.

Rozdělení případů difúzního velkobunkového B-lymfómu do prognosticky relevantních skupin s využitím internetového registru pacientů Lymfómovej skupiny Slovenska

¹Plank L., ²Vranovský A., ³Balvan B., ¹Szépe P., ¹Kviatkovská Z.

¹Ústav patológie a Konzultačné centrum bioprotektivej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a MFN v Martine

²Interné oddelenie Národného onkologického ústavu v Bratislave

³JD software, s.r.o., Žilina

Diagnostická a léčebná činnost v hematatoonkologii sú vzájomne úzko späté a vyžadujú vzájomnú informovanosť zainteresovaných odborníkov. Na podporu tohto cieľa Lymfómovej skupiny Slovenska (LySk) bol vytvorený počítačový program registra pacientov s malignými lymfómami, dostupný na internetovej stránke LySk na adrese www.lymphoma.sk. Register pacientov bude od decembra 2005 vytváraný prospektívne na klinických pracoviskách zapojených do LySk, pričom bude zaznamenávať výsledky komplexnej laboratórnej diagnostiky a liečby pacientov v rámci monitorovania priebehu ich ochorenia. Register bude zachytávať všetky prípady maligných lymfómov (ML), pričom v prvej fáze budú výhody elektronického registra overované na subtypizácii prípadov difúzného velkobunkového B-lymfómu (DLBCL) ako jedného z najčastejších typov ML v slovenskej populácii. DLBCL je nádor, ktorý vykazuje veľkú heterogenitu morfológického obrazu, fenotypovej a genotypovej exprese, ako aj klinickej manifestácie a prognózy nádorového ochorenia. Na základe imunohistochemicky verifikovanej exprese znakov „buniek zárodočného centra“, resp. znakov „aktivovaných B-buniek“ s použitím protilátok na detekciu vybraného panelu antigénov (CD10, CD30, bcl-2-proteín, bcl-6-proteín, CD138 a MUM1) možno prípady s DLBCL deliť na prinajmenej 4 rozdielne skupiny: „GC“ typ, „aktivovaný GC“ typ, „aktivovaný B-non-GC“ typ a mediastinálny typ. Aplikácia týchto metód nám napomáha pri hodnotení každého individuálneho pacienta a jeho zaradení do jednotlivých prognosticky rozdielných podskupín DLBCL.

Term in English	Český ekvivalent	Význam	POUŽITELNOST
Biological reference interval	Biologický referenční rozsah	Centrální 95% interval rozložení referenčních hodnot. Jen pro kvantitativní stanovení např. transkripce	Není vhodný parametr pro genetické testování (struktury) Nepoužívá se
Positive control sample	Positivní kontrola	Templátem je např. certifikovaný materiál nebo alelový žebřík	Nezbytné
Positive control of the function of all analytical steps	Positivní kontrola funkčnosti všech analytických kroků	Např. při PCR amplifikace nepolymorfního genu	Nezbytné
Negative control sample	Negativní kontrola	Templátem je např. standardní alela, nebo vzorek neobsahující mutaci	Nezbytné
Blank = Contamination control	Slepý vzorek = kontrola kontaminace	Templátem je voda	Nezbytné
Detection limits	Mez detekce	Koncentrace při které je testovaný gen/alela ještě spolehlivě detekována	Vhodné
Limit of quantification	Mez kvantifikace	Koncentrace při které lze u testovaný genu/alely spolehlivě určit množství	Pro kvantitativní stanovení nezbytné
Sensitivity	Citlivost	Schopnost odhalit správnou negativitu	Nezbytné v rámci validace
Specificity	Specifita	Schopnost odhalit správnou pozitivitu	Nezbytné v rámci validace
Repeatability	Opakovatelnost	Těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti, tj. prováděných v sérii	Nezbytné v rámci validace, při úplné validaci doporučený počet analyzovaných vzorků nejméně 10, při redukované viz verifikace
Reproducibility	Reprodukovatelnost	Těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek reprodukovatelnosti, tj. neprováděných v sérii	Nezbytné v rámci validace
Verification	Ověření	Redukovaná validace	Doporučený počet analyzovaných vzorků nejméně 6
Validation	Validace	Ověření funkčnosti testu	Nezbytné při každém zavádění nové zkoušky
Uncertainty of measurement	Nejistota měření	rozmezí hodnot v němž leží skutečná hodnota měřené veličiny	Nezbytné při validaci kvantitativních měření, vhodné pro validaci kvalitativních testů
Robustness	robustnost	Odolnost testu k odchylkám v proceduře např. použití různých termocyklérů při PCR	Vhodné v rámci validace

Podakovanie: Autori ďakujú firme ROCHE Slovensko s.r.o. za podporu LySk

Studie chromosomových změn u nemocných s mnohočetným myelomem

¹Stražilová J., ¹Holzerová M., ¹Chludová K., ²Ščudla V., ²Zemanová M., ¹Pospíšilová H., ¹Lakomá I., ¹Prekopová I., ¹Hanzlíková J., ¹Kropáčková J., ¹Indrák K., ¹Jarošová M.

¹Hemato-onkologická klinika FN a LF Olomouc

²III. Interní klinika FN a LF Olomouc

Výsledky cytogenetických a molekulárně cytogenetických studií nemocných s mnohočetným myelomem (MM) provedené v době diagnózy onemocnění potvrdily, že chromosomové změny jsou důležitým prognostickým faktorem, který může nemocné stratifikovat do prognostických podskupin.

Cílem studie bylo provést cytogenetickou a molekulárně cytogenetickou analýzu souboru 60 nemocných s diagnózou MM, určit frekvenci chromosomových změn a porovnat nalezené změny s některými klinickými daty.

Celkem 55 nemocných bylo vyšetřeno v době diagnózy, 5 v relapsu onemocnění, 59 nemocných bylo vyšetřeno z kostní dřeně a 1 pacient z periferní krve. Nemocní byli vyšetřeni metodami klasické cytogenetiky a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s využitím metody FICTION (imunofluorescenční značení myelomových buněk pomocí protilátek). U nemocných byla sledována delece chromosomu 13 v oblasti

RB1 genu s použitím sondy LSI RB1 (Abbott-Vysis™, Downers Grove, IL, USA) a přestavba genu **IgH** na 14. chromosomu se sondou LSI IGH dual color (Abbott-Vysis). Nemocní s přestavbou genu **IgH** byli dále vyšetřeni genově specifickými sondami pro detekci nejčastěji se vyskytujících přestaveb **IgH** genu s jinými partnerskými geny. K detekci hypo- a hyperdiploidie byly provedena FISH s použitím centromerických sond (Abbott-Vysis). U nemocných s komplexně přestavěným karyotypem byly chromosomové přestavby analyzovány pomocí M-FISH a u nemocných, u kterých byla k dispozici DNA, byla k detekci nebalancovaných změn použita metoda CGH. 10 nemocných bylo vyšetřeno metodou FICTION s použitím barvicího systému Shandon a cytospinových preparátů připravených z fixovaných buněk.

Kombinací cytogenetických a molekulárně cytogenetických metod (FICTION, FISH, M-FISH a CGH) se podařilo určit chromosomové změny, na jejichž základě lze nemocné s mnohočetným myelomem společně s klinickými daty stratifikovat do prognostických skupin.

Práce je podporována grantem IGA NC 7490, NR-8183-4, MSM 6198959205.

Sledování defektů ve fosforylaci STAT1, STAT3 proteinů a jejich význam pro stanovení prognózy u CLL pacientů

¹Chumchalová J., ¹Klimešová D., ¹Kuhrová V.,

¹Dvořáková D., ²Brychtová Y., ¹Francová H.,

²Mayer J.

¹Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK, FN Brno, Černopolní 9, Brno 625 00

²Interní hematologická klinika, FN Brno, Jihlavská 20, Brno 625 00

STAT (Signal transducer and activator of transcription) proteiny patří do rodiny cytoplasmatických transkripčních faktorů zapojených do cytokinové signalizace. Bylo identifikováno 7 členů této rodiny, které se podílí na regulaci proliferace, diferenciaci a apoptózy a hrají tak významnou roli v ontogenezi a maligní transformaci. Kromě toho mohou defekty STAT1 dráhy ovlivnit odpověď buněk po aplikaci fludarbinu. STAT signální dráha je aktivována po vazbě cytokinu na receptor. Prvním krokem je fosforylace tyrozinu 701 u STAT1 nebo 705 u STAT3 a následná tvorba homo- nebo heterodimerů. Tyto dimery jsou translokovány do jádra, kde se váží jako transkripční faktory na cílové sekvence. Po tvorbě dimerů dochází navíc k fosforylaci na serinu 727, která modifikuje jejich transkripční aktivitu. V naší práci sledujeme defekty ve fosforylaci STAT1 a STAT3 signální dráhy po aktivaci IFN alfa a IFN gama u pacientů s CLL. Tyrozinová a serinová fosforylace STAT1 a STAT3 proteinů je detekována metodou Western blot se specifickými protilátkami. Do této doby bylo vyšetřeno 10 pacientů s CLL před terapií. Naše výsledky ukazují silnou konstitutivní aktivaci STAT1 proteinů na serinu u všech CLL pacientů a slabší konstitutivní aktivaci na tyrozinu u většiny pacientů. U dvou pacientů jsme neprokázali konstitutivní aktivaci na tyrozinu

u STAT3. Navíc jsme prokázali indukci fosforylace u STAT1 na tyrozinu po IFN alfa i gama a minimální indukci na serinu. STAT3 je aktivován po IFN alfa na tyrozinu i serinu, ale kromě jednoho případu jsme neprokázali aktivaci STAT3 po IFN gama na tyrozinu a serinu.

Práce je podporována grantem IGA NR8443-3/2005.

Využití polymorfismu DNA při monitorování bunkového chimérismu u pacientů po alogénnej transplantaci hematopoetických kmeňových buniek

¹Katrinčáková B., ¹Pacovská T., ¹Raida L., ¹Faber E., ¹Vondráková J., ²Vodička R., ²Vrbická D., ²Vrtěl R., ¹Jarošová M., ¹Indrák K.

¹Hemato – onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc

²Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny, LF UP a FN Olomouc

Transplantácia hematopoetických kmeňových buniek (HSCT) predstavuje uznávaný liečebný postup pri terapii rôznorodých hematologických malígnych stavov. Klinický vývoj pacientov po HSCT je pritom nutné pravidelne a efektívne monitorovať z dôvodu včasného rozpoznania relapsu choroby, odvrhovania transplantátu, prípadnej reakcie štepú proti hostiteľovi (graft versus host disease), rovnako ako z dôvodu sledovania minimálnej reziduálnej choroby. Analýza DNA založená na existencii polymorfnych miest v ľudskom genóme umožňuje s vysokou citlivosťou odlišiť pôvod hematopoetických buniek po alogénnej HSCT (donor versus príjemca), čo je v danom prípade základným predpokladom sledovania bunkového chimérizmu. Následné stanovenie podielu krvotvorby darcu a príjemcu na báze individuálne špecifických polymorfnych lokusov umožňuje prispieť k monitorovaniu klinického vývoja pacientov stanovením chimérizmu na úrovni DNA. Na našom pracovisku vykonávame detekciu chimérizmu na báze vysoko polymorfnych lokusov typu VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) a STR (Short Tandem Repeats), pričom vyšetrojeme panel 8 VNTR lokusov a 15 STR lokusov. Analýza DNA sa zakladá na metóde jednokolovej polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a následnej detekcii elektroforeticky separovaných PCR produktov na agarózovom géli (VNTR lokusy), resp. na detekcii fluorescenčne značených PCR produktov na kapilárnej elektroforéze (STR lokusy).

Cieľom práce je prezentovať naše výsledky získané na základe monitorovania chimérizmu hematopoetických buniek v súbore pacientov po alogénnej HSCT a predovšetkým zhodnotiť prínos danej diagnostickej metódy pre klinickú prax.

Podakovanie: Práca je podporovaná grantom MSM 619 895 9205.

Korelace DNA ploidie s lokalizáciou a biologickou povahou spontánného melanomu u psů – možný model

Hraběta J.¹, Jelínek F.², Eckschlagner T.¹

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

²Veterinární histopatologická laboratoř, Praha

Úvod: Melanom představuje 7 % všech zhoubných nádorů psů a je nejčastějším novotvarem dutiny ústní a druhým nejčastějším subunguálním novotvarem psů. Na rozdíl od lidského maligního melanomu má melanom u psů i benigní formy. Pro melanom u psů je charakteristický variabilní histopatologický a cytologický nálezy a zvláště u amelanotických forem může být stanovení diagnózy obtížné. V 10–40 % případů nekorelují biologické vlastnosti benigních orálních a kožních melanomů s histopatologickým nálezem.

Cíle: V retrospektivní studii jsme sledovali mitotický index, DNA ploidii a parametry buněčného cyklu ve vztahu k lokalizaci a histopatologické diagnóze melanomu u psů. Naší snahou bylo zpřesnit diagnostiku a prognostiku melanomu u psů pro účely veterinární medicíny a zpřesnit údaje o modelu, který může být využit pro účely experimentální onkologie.

Metoda: Vyšetřili jsme 62 archivních vzorků melanomů psů. Lokalizace: kůže 16, oko 11, prst 10, tlama 21 a metastáza 4. Histologické typy: benigní kožní melanom 6, složený melanom 5, maligní- melanocytický 41, amelanotický 5, uveální 2, metastázy 4.

Cytometrická DNA analýza. 50 µm silné řezy z bločků zalitých do parafinu byly deparafinizovány a rehydratovány. Z deparafinizovaných rehydratovaných řezů byla připravena suspenze jader roztokem pepsinu v ředěné HCl. Jádra jsme barvili propidium jodidem s RNázou a intenzitu fluorescence jsme měřili průtokovým cytometrem FACSCalibur, vyhodnocení získaných histogramů jsme prováděli softwarem ModFit.

Statistické hodnocení: rozdíly ve výskytu aneuploidie mezi jednotlivými skupinami byly hodnoceny testem χ^2 jako tabulka 2x2.

Výsledky a diskuse: Statisticky významný byl rozdíl ve výskytu aneuploidie mezi benigním melanomem (1 aneuploidní ze 14) a maligním (maligní a amelanotický) (21 ze 48) hladina významnosti $p < 0,05$ - test χ^2 jako tabulka 2x2. Aneuploidie se nevyskytla u kožních melanomů, tento rozdíl byl statisticky významný proti ostatním lokalizacím (tlama, oko, lůžko drápu) hladina významnosti $p < 0,01$ test χ^2 jako tabulka 2x2. Mitotický index byl významně nižší u kožních melanomů než u nádorů jiných lokalit.

Aneuploidní nádory se častěji vyskytovaly u maligních forem a v lokalizacích, kde se častěji vyskytují maligní formy (tlama, oko, lůžko drápu). To je v souladu s prací Bolona (Bolton B, Calderwood Mays MB, Hall BJ. Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA

ploidy to their biologic behavior. Vet Pathol. 1990; 27: 96–102) i se zkušenostmi z humánní medicíny, kde u melanomu je DNA aneuploidie známkou horší prognózy (Ruiter DJ Clinical and pathologic diagnosis, staging and prognostic factors of melanoma and management of primary disease. Curr Opin Oncol. 1992; 4: 357–367).

Závěrem lze shrnout, že nález DNA aneuploidie u psiho melanomu vzbuzuje podezření na maligní formu. Cytometrii lze pro její jednoduchost a rychlost použít ve veterinární patologii. Spontánně vzniklé nádory u malých zvířat mohou posloužit i jako velmi vhodný model pro onkologický výzkum.

Práce vznikla za finanční podpory VZ MŠMT 0021620813.

Ověření senzitivity elektrochemického stanovení metalothioneinu jako potencionálního markeru nádorových onemocnění

¹Blašík O., ¹Svoboda M., ²Průša R., ²Kukačka J., ⁴Stiborová M., ^{1,3}Adam V., ¹Petrová J., ⁵Beklová M., ¹Zehnálek J., ¹Kizek R.

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně

²Ústav klinické biochemie a pathobiochemie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

³Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně

⁴Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

⁵Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně

Úvod: Metalothionein, protein se schopností vázat těžké kovy o molekulové hmotnosti okolo 7 kDa, byl objeven v roce 1957 Margosheem a Vailem, kteří ho izolovali z koňských ledvin. Výzkum metalothioneinů je stále velmi intenzivní, což dokládá fakt, že do července roku 2005 bylo v databázi Web of Science více než 8500 odkazů, které obsahovali v názvu, klíčových slovech anebo abstraktu výraz „metalothionein“. V databázi Expert Protein Analysis System (ExPASy) Proteomics Server byly v roce 2005 popsány čtyři skupiny metalothioneinů: MT1, MT2, MT3 a MT4. Molekulové hmotnosti těchto metalothioneinů se pohybují od 6.0 – 6.9 kDa, počet aminokyselin v polypeptidickém řetězci se pohybuje kolem 61 a hodnota isoelektrického bodu kolísá kolem hodnoty 8.3. Pouze MT3 má ve své molekule 68 aminokyselin a hodnota isoelektrického bodu byla vypočtena jako 4.8. Doposud nejvíce zařazených a identifikovaných metalothioneinů je ve skupině lidských, MT1 metalothioneinů (MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1I, MT1K, MT1L a MT1R). Zjistilo se, že obsah jednotlivých aminokyselin je u jednotlivých lidských metalothioneinů obdobný.

Absolutně nejvíce je u všech skupin MT zastoupena aminokyselina cystein (více než 30%). V molekule MT vytváří dvacet cysteinů klustery v několika se vyskytujících repetitcích: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X představuje jinou aminokyselinu než cystein. Mezi další významně zastoupené aminokyseliny patří A, K, S a G, a dále se v molekule MT nevyskytují aromatické aminokyseliny. Molekuly metallothioneinu vytváří díky cysteinům struktury se dvěma vazebnými doménami pro atomy kovů označované jako α a β . Ačkoliv byl MT objeven před více jako 40 lety, jeho biologická funkce v organismu není stále uspokojivě objasněna. MT se účastní řady fyziologických procesů, jako je homeostáza kovů a jejich detoxikace, ochrana před oxidačním poškozením, v buněčné proliferaci a apoptóze či chemo- či radioterapeutické rezistenci buněk. MT izoformy mohou souviset s řadou změn v procesu karcinogeneze, vývoje a progresu nádorových onemocnění. MT exprese může být také spojena s cytoprotektivním efektem vyvolaným zraněním a stresovou reakcí. Lze se domnívat, že MT může být využit jako potenciální marker nádorové diferenciace a buněčné proliferace anebo jako ukazatel prognózy nádorového onemocnění.

Cíl.

Práce je zaměřena na senzitivní analýzu metallothioneinu pomocí elektrochemických technik.

Materiály a metody

Biologický materiál: Jako biologické vzorky byly použity orgány ryb (okoun říční, *Perca fluviatilis*) odchycených v roce 2004 v řece Svratce. Získané vzorky jednotlivých tkání (svalovina, gonady, játra a slezina) byly do doby analýzy MT zamrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky pro analýzu byly připraveny podle postupů uveřejněných dříve. Zjednodušeně: vzorek byl umístěn na $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ do termobločku (Eppendorf 5430, USA) na 15 min, poté ochlazen. Denaturované proteiny byly odstraněny centrifugací při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 15 000 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA). Jako standard byl použit králičí metallothionein (Sigma, Aldrich).

Elektroanalytické stanovení metallothioneinu pomocí AdTS CPSA

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Netherlands) ve spojení

s VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky $0,4\text{ mm}^2$, referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt ($0,1\text{ M H}_3\text{BO}_3 + 0,05\text{ M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Sigma Aldrich, ACS), $\text{pH} = 8,0$) byl po každých 5 analýzách vyměněn. AdTS CPSA parametry byly následující: počáteční potenciál $-0,1\text{ V}$, konečný potenciál $-1,8\text{ V}$, aplikovaný proud $I = -1\text{ }\mu\text{A}$, doba akumulace byla 90 s, teplota $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro úpravu získaných experimentálních dat bylo využito GPES software EcoChemie.

Výsledky

V našich experimentech byl MT stanoven technikou adsorptivní přenosové techniky (AdTS) v kombinaci s chronopotenciometrií (CPSA) při aplikovaném proudu $1\text{ }\mu\text{A}$, při vyšších vkládaných proudcích je získána horší elektrochemická odezva. Metallothionein v množství 1 ng/ml poskytoval velmi dobře reprodukovatelný signál při potenciálu kolem $-1,70\text{ V}$. Podobný katalytický signál MT byl získán i v našich předešlých experimentálních pracích. MT byl adsorbován na povrch pracovní elektrody po různou dobu akumulace. Získali jsme závislost s pozorovaným maximem při 90 s. Koncentrační závislost nebyla v celém úseku lineární, a proto byla rozdělena na dva lineární úseky $0\text{--}2\text{ ng MT/ml}$ ($y = 14386x + 129,55$; $R^2 = 0,9916$) a $2\text{--}20\text{ ng MT/ml}$ ($y = 2134, 2x + 24520$; $R^2 = 0,996$), $n = 3$, S. D. = 8%. Uvedený postup byl dále ověřován pro detekci MT v biologických vzorcích. Pro naše experimenty bylo využito tkání ryb. Okouni velikosti $10\text{--}20\text{ cm}$ (*Perca fluviatilis*) byli vyloveni v řece Svratce v létě roku 2004 a jednotlivé tkáně (svalovina, gonády, játra a slezina) byly do doby analýzy MT zamrazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pomocí námi vypracovaného postupu byl detekován obsah metallothioneinu v jednotlivých tkáních okounů. Nejvyšší obsahy MT byly pozorovány v játrech a slezině ($100\text{--}350\text{ ng MT/g}$). Z dostupných údajů je známo, že významný je obsah MT také v gonádách všech obratlovců, v našich experimentálních vzorcích se obsah pohyboval mezi $25\text{ až }250\text{ ng MT/g}$. Předpokládá se, že v těchto orgánech probíhá velmi intenzivní metabolismus kovů, a proto jsou zde detoxikační mechanismy velmi účinné, a tak je i obsah MT relativně vysoký. Avšak námi nově vyvinutá a navržená metodika nabízí stanovení MT i v tkáních, kde to doposud nebylo možné. Zjistili

jsme, že obsahy MT byly ve svalovině zkoumaných ryb skutečně velmi nízké a pohybovaly se v jednotkách až desítkách ng/g . Všechny zkoumané ryby byly zdravé a nebyly vystaveny žádnému kontrolované experimentální dávce těžkých kovů. Koncentrace těžkých kovů v řece jsou nízké, avšak obsah MT v rybách zcela jistě ovlivňují. Proto zjištěný obsah MT pravděpodobně souvisí jednak s i) metabolismem jednotlivé ryby a ii) délkou jejího života, tedy její expozicí těžkým kovům.

Závěr

MT představuje nový potenciální marker pro diagnostiku nádorových onemocnění anebo zátěže životního prostředí člověka. Z tohoto důvodu je nezbytné popsat vhodné analytické postupy, které umožní snadnou, rychlou, přesnou a levnou diagnostiku. Jak se ukazuje, elektrochemické metody mohou tyto podmínky splnit.

Poděkování. Tato práce byla podpořena granty: GA ČR 525/04/P132, RASO 8/2005 a MŠMT 6215712402.

Literatura

- Petrova J, Blastik O, Prusa R, Kukacka J, Potesil D, Mikelova R, Adam V, Zehnalek J, Kizek R: Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. Biomed Papers 2005; 149 (2): in press.
- Prusa R, Blastik O, Potesil D, Trnkova L, Zehnalek J, Adam V, Petrova J, Jelen F, Kizek R: Metallothioneins as a marker of tumor diseases. Clin Chem 2005; 51 (6): A56.
- Prusa R, Kizek R, Trnkova L, Vacek J, Zehnalek J: Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSA method. Clin Chem 2004; 50 (6): A28–A29.
- Kizek R, Trnkova L, Palecek E: Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. Anal Chem 2001; 73 (20): 4801–4807.
- Trnkova L, Kizek R, Vacek J: Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: a combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping. Bioelectrochemistry 2002; 56 (1–2): 57–61.
- Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Klejdus B, Havel L: Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins. Chem Listy 2004; 98 (4): 166–173.
- Palecek E, Masarik M, Kizek R, Kuhlmeier D, Hassmann J, Schulein J: Sensitive electrochemical determination of unlabeled MutS protein and detection of point mutations in DNA. Anal Chem 2004; 76 (19): 5930–5936.
- Strouhal M, Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Nemec M: Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. Bioelectrochemistry 2003; 60 (1–2): 29–36.
- Petrova J, Potesil D, Mikelova R, Blastik O, Adam V, Trnkova L, Jelen F, Prusa R, Kukacka J, Kizek R: Attomole voltammetric determination of metallothionein. Electrochim Acta 2005; submitted.

10. NOVÉ MOŽNOSTI PROTINÁDOROVÉ LÉČBY

13.30–16.00 hod. sál PEGASUS

Předsedající: STRNAD, M.; ECKSCHLAGER, T.; ŠIMÁNEK, V.; HAJDÚCH, M.

Molecular modelling in the design of anticancer drugs

Filgueira de Azevedo W. jr.

Faculdade de Biociências-PUCRS-Av. Ipiranga, Porto Alegre-RS CEP 90619-900. Brazil.

Cell cycle progression is tightly controlled by the activity of cyclin-dependent kinases (CDKs). CDKs are inactive as monomers, and activation requires binding to cyclins, a diverse family of proteins whose levels oscillate during the cell cycle, and phosphorylation by CDK-activating kinase (CAK) on a specific threonine residue. The central role of CDKs in cell cycle regulation makes them a promising target for studying inhibitory molecules that can modify the degree of cell proliferation, the discovery of specific inhibitors of CDKs such as purine derivatives and polyhydroxylated flavones has opened the way to investigation and design of antimitotic compounds. More than 50 CDK2 inhibitors have now been described, some presents IC₅₀ at nanomolar concentrations. The structures of CDK2 in complexes with several different inhibitors have been described using biocrystallography and structural bioinformatics. These compounds inhibit CDKs by binding to the catalytic domain of the CDK molecule in place of ATP, which prevents transfer of a phosphate group to the substrate. It has been observed in several structures of CDK2 complexed with inhibitors the participation of a molecular fork, composed by a C=O group of Glu81 and the N-H and C=O group of Leu83, in intermolecular hydrogen bonds between CDK2 and the inhibitors. This molecular fork, composed of two hydrogen bond acceptors (C=O) and one hydrogen bond donor (N-H), allows a wide range of different molecules to dock on to the ATP binding pocket. All these inhibitors have pairs of hydrogen bond partners that show complementarity to the molecular fork on CDK2, most of them involving at least two hydrogen bonds with the molecular fork. The relevant structural features that may guide the structure based-design of a new generation of CDK inhibitors will be discussed in this lecture.

Roskovitin (Seliciclib)

Strnad, M.

Abstrakt nedodán

Léčba experimentálních nádorů cytostatiky vázanými na polymery na bázi HPMA vede ke vzniku dlouhodobé systémové resistance proti nádoru

¹Šírová M., ¹Mrkvan T., ¹Hovorka O.,

¹Rossmann P., ¹Kovář M., ²Strohalm J.

²Šubr V., ²Etrych T., ²Plocová D., ²Chytil P.,

³Rozprimová L., ⁴Kubáčková K., ²Ulbrich K.,

¹Říhová B.

¹Lab. humorální imunity, Mikrobiologický ústav AVČR, Praha

²Odd. biolékařských polymerů, Ústav makromolekulární chemie AVČR, Praha

³AGILAB, Praha

⁴Fakultní nemocnice Motol, Praha

Vazba nízkomolekulárního léčiva (cytostatika) na vodorozpustný syntetický polymer na bázi N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu (HPMA) je jednou z perspektivních cest vývoje nové generace protinádorových léčiv. Je již dostatečně prokázáno, že vazba léčiva na polymerní nosič zásadně mění farmakokinetiku léčiva a významně omezuje jeho systémovou toxicitu, která je hlavním limitujícím faktorem úspěšné léčby. V naší laboratoři se testují protinádorové účinky konjugátů s různou strukturou, různým typem vazby nízkomolekulárního léčiva na polymerní nosič (vazba enzymaticky štěpitelná nebo degradovatelná v závislosti na pH), a s různým typem směřování (tumor-specifické protilátky, nespecifický lidský imunoglobulin, nesměrované konjugáty). Přednáška se bude věnovat zejména dvěma typům polymerních cytostatik: nesměrovanému konjugátu s pH-degradovatelnou vazbou léčiva, a konjugátu obsahujícímu doxorubicin a intravenosní lidský imunoglobulin, s enzymaticky štěpitelnou vazbou léčiva.

Protinádorové účinky polymerních cytostatik jsou studovány na řadě nádorových modelů. Konjugát P-AH-Dox⁺, kde léčivo (doxorubicin, Dox) je navázáno hydrazonovou vazbou a uvolňuje se v závislosti na pH, má pozoruhodnou protinádorovou účinnost. *In vitro* je jeho toxicita (IC₅₀) téměř srovnatelná s toxicitou volného Dox.HCl. *In vivo* je tato toxicita vůči nádorovým buňkám zachována, avšak nežádoucí systémová toxicita je značně snížena, neboť v porovnání s Dox.HCl jsou *in vivo* tolerovány vysoké dávky léčiva. Konjugát Dox-PHPMA-Hulg má Dox vázaný enzymaticky štěpitelnou vazbou přes tetrapeptidickou spojkou GlyPheLeuGly a obsahuje lidský intravenosní imunoglobulin jako pasivně/aktivně směřující strukturu. Osud obou těchto konjugátů uvnitř nádorových buněk je odlišný v důsledku jiné vazby léčiva. Oba konjugáty jsou schopné vyléčit již vyvinuté nádory u myší nebo alespoň zpomalit růst nádorů a prodloužit přežití. Podstatné je, že u významného podílu vyléčených myší se ustavuje systémová resistance,

která je dlouhodobá a specifická vůči původnímu nádoru. Tato protekce je udržována imunologickým mechanismem, kde rozhodující buněčnou populaci představují CD8⁺ lymfocyty.

Konjugát Dox-PHPMA-Hulg byl testován v rámci pilotní klinické studie u pacientek s generalizovanými nádory. Jeho podání bylo u všech pacientek dobře tolerováno, projevila se stabilizace choroby bez progresu po dobu týdnů až měsíců, u některých pacientek i částečné klinické zlepšení se známkami aktivace některých protinádorových imunologických mechanismů.

Poděkování: Práce je financována z výzkumného záměru S5020101 a z grantů IGA AVČR A4050201, GAČR 305/02/1425, GAČR 310/03/H147.

Fytochemikálie s chemopreventivními a protinádorovými účinky Šimánek V.

Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta, Palackého Univerzita, Olomouc

Jedním ze zásadních požadavků moderní společnosti je zlepšení kvality života a snížení nákladů na zdravotní péči všech věkových skupin populace. Epidemiologické studie potvrdily, že složení diety má významnou úlohu v udržení dobré kvality života. Ochrana organismu fytochemikáliemi/nutraceutiky, t.j. látkami obsaženými v potravě, před rizikem vzniku některých nádorových onemocnění může být dána (i) jejich účinkem na enzymy aktivující karcinogenitu látek v transformační fázi I, (ii) ovlivněním detoxikace karcinogenů ve fázi II, (iii) eliminací poškození DNA genotoxickými látkami, (iv) potlačením abnormální proliferace buněk u ranných preneoplastických lézí a/nebo (v) inhibicí některých látek v signální kaskádě nádorové buňky. Chemopreventivní/protektivní účinek rostliny není zpravidla vyvolán jednou chemicky definovanou látkou působící na jeden cíl v buňce (bílkovinu, glykoprotein, lipoprotein, DNA), ale desítkami obsahových látek, které komplexně působí na metabolické děje v organismu jako jsou např. flavonoidy, isoflavonoidy, polyfenoly, fytosteroly, karotenoidy, β-oligofruktany, glykosinoláty, ω-3 polynenasycené mastné kyseliny a další.

Přednáška je kritickým přehledem o (i) některých přírodních látkách/rostlinných extraktech s chemopreventivním účinkem, (ii) biomarkerech používaných k ověření jejich účinků v experimentech *in vitro/in vivo* a (iii) výsledcích klinických/epidemiologických studií s chemopreventivními látkami/extrakty rostlinného původu.

Příspěvek vznikl za podpory MŠMT ČR (grant MSM 6198959216).

Literatura

1. Courtney EDJ, Melville DM, Leicester RJ. (2004) Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 19, 1–24.
2. Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, Cooke M, Coolen S, Haenen G, Hoberg A-M, Loft S, Lunec J, Olinski R, Parry J, Pompella A, Poulsen H, Verhaegen H, Astley SB. (2002) Biomarkers. *Molecular Aspect of Medicine* 23, 101–208.
3. Loktionov A. (2003) Common gene polymorphisms and nutrition: emerging links with pathogenesis of multifactorial chronic diseases (Review). *J Nut Biochem* 14, 426–451.
4. Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. (2003) Natural product for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacol Ther* 99, 1–13.
5. Sugr Y-J. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev* 3, 768–780.

Roscovitin-induced P-Ser-46 wt p53 activates p53AIP1 protein resulting in apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells

Węsierska-Gądek J., Gueorguieva M., Horky M., Ranftler C.

Cell Cycle Regulation Group, Division: Institute of Cancer Research, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

The efficacy of distinct anti-cancer drugs used in the chemotherapy of human malignancies varies between tumor tissues and depends primarily on the ability of the therapeutic agents to simultaneously inhibit cell proliferation and to eliminate malignant cells by apoptosis. Human breast cancer MCF-7 cells are relatively resistant to conventional chemotherapy due to the lack of caspase-3 activity. Exposure of MCF-7 cells to roscovitin (ROSC), a potent CDK inhibitor, resulted in a strong inhibition of cell proliferation. Detailed analysis revealed that ROSC arrested MCF-7 cells in G₂ phase of the cell cycle and concomitantly induced apoptosis. Post-incubation of G₂ arrested cells for 24h in a drug-free medium did not diminish the number of the G₂ cell population indicating that ROSC-mediated cell cycle arrest was prolonged. ROSC activated wt p53 tumor suppressor protein in MCF-7 cells in a time and dose-dependent manner. ROSC-mediated stabilization of p53 protein was attributable to its site-specific phosphorylation. At 4h after ROSC administration a strong phosphorylation of serine at position 46 was observed. The onset of Ser-46-p53 phosphorylation preceded the induction of apoptosis. P-Ser-46-p53 upregulated p53AIP1 protein, a component of mitochondria. Upregulated p53AIP1 protein accumulated in the cytosol and then was translocated into mitochondria and altered the potential of the mitochondrial membrane resulting in a release of mitochondrial proteins such as AIF and cytochrome C as well as activation of the apoptotic protease Htr2/Omi. Reconstitution of MCF-7 cells with human caspase-3 did not enhance the ROSC mediated apoptosis.

Fotodynamická terapie v léčbě malignit GIT, experimentální PDT kolorektální rakoviny

Horák L., Štukavec J., Poučková P.
Chirurgická klinika 3 LF UK Praha
Ustav biofyziky I LF UK Praha

Fotodynamická terapie (PDT) je vedle chemoterapie, radioterapie a imunoterapie jednou z možností léčby nádorového onemocnění. Je to druh fototerapie, který kromě světla a aplikované látky – fotosensibilizátoru, vyžaduje také přítomnost kyslíku. PDT je založena na principu selektivní akumulace fotosensibilizující látky v nádoru a následném ozáření tumoru světelnou energií vhodné vlnové délky. Vlivem absorpce světla dochází ve fotosensibilizátoru ke vzniku excitovaných stavů, které v zásadě podléhají dvěma typům deaktivčních reakcí. Buď excitovaná forma fotosensibilizátoru reaguje přímo se substrátem za vzniku volných radikálů substrátu nebo dochází k transferu energie z fotosensibilizátoru na kyslík a ke vzniku vysoce reaktivní singletové formy kyslíku. Volné radikály, zvláště pak radikály lipidických složek buněčných membrán, jsou příčinou destrukce nádoru. Výsledným terapeutickým efektem je nekróza a (nebo) apoptóza nádorových buněk. Příspěvek se shrnuje stav PDT v léčbě malignit trávicího traktu a popisujeme experimentální léčbu lidského kolorektálního karcinomu pomocí chlorhlinitého disulfonovaného ftalocyaninu na athymických myších.

Účinek reoviru na nádorové buňky

Figová K.¹, Hrabeta J.¹, Činát J.¹, Činát J. jr.², Michaelis M.², Vonka V.³, Sobotková E.³, Eckschlager T.¹

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

²Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der J.W.Goethe – Universität, Frankfurt a.M., SRN

³ÚHKT, Praha

Zhoubné nádory jsou druhou nejčastější příčinou smrti ve všech rozvinutých zemích. Možnosti současných léčebných modalit (operační léčba, aktinoterapie, chemoterapie) jsou omezené a nejsou příliš úspěšné právě u nejčastěji se vyskytujících nádorů jako je kolorektální, bronchogenní nebo renální karcinom. Proto se hledají nové léčebné postupy – monoklonální protilátky, modifikátory imunitní odpovědi a protinádorové vakcíny, inhibitory angiogeneze, specifické inhibitory receptorů a přenašečů signálu a genová léčba. Za jednu z forem genové léčby jsou považovány i **onkolytické viry**. Jedná se o viry replikující se v nádorových buňkách, které se ale nemnoží se ve zdravých tkáních. Kromě přímé lýzy napadených nádorových buněk při uvolnění viru se uplatňuje i stimulace protinádorové imunity antigeny uvolněnými z rozpadlých nádorových buněk a efekt lokálně indukovaných interferonů. Předpokládá se i zvýšení citlivosti k chemoterapii, efekt v kombinaci s aktinoterapií je zatím předmětem výzkumu.

Onkolytické viry lze rozdělit do tří skupin: 1/ přirozeně se vyskytující viry (např. virus Newcastle

nemoci, virus vezikulární stomatitidy, reovirus); 2/ geneticky modifikované viry, u kterých jsou inaktivovány geny nezbytné k replikaci v normálních buňkách, ale které se mohou množit v nádorových buňkách (např. adenovirus ONYX 015 množící se pouze v buňkách s defektem p53 nebo herpes virus G207 vyžadující ke svému množení vysoké hladiny ribonukleotid reduktázy); 3/ viry s vloženým tkáňově nebo buněčně specifickým promotorem (např. Adenovirus CV706 kde je PSA restringovaná exprese E1A a E1B a adMycTk vážící se selektivně na protein myc). Ve světě probíhají klinické studie fáze I a II s některými onkolytickými viry (adenovirus ONYX 015, CV706, CG7870 a Ad5-CD/Tkrep, herpes simplex viry G207, NV 1020, HSV 1716 a OncoVEX, viry Newcastle nemoci MTH-68 a PV 701 a reovirus). V České republice dosud žádné klinické studie neprobíhají.

Naše laboratoř zahajuje preklinický výzkum reoviru serotyp 3 kmene Dearing což je virus identický s Reolysinem – virem se kterým probíhá několik klinických studií a jehož neškodnost již prokázaly klinické studie.

Cíle: 1/ověřit účinek reoviru na onkogenní buněčné linie připravené transfekcí geny HPV16 a aktivovaným H-ras a na linie odvozené od dětských mozkových nádorů; 2/ zhodnotit možnosti potenciace účinku reoviru cytostatikem.

Metody: buněčné linie – **MK-16, TC-1** – myší onkogenní buněčné linie připravené transfekcí geny E6/E7 lidského papiloma viru typu 16 (HPV 16) a aktivovaným H-ras onkogenem. Od mozkových nádorů odvozené linie – jedna v naší laboratoři připravená linie odvozená od **glioblastoma multiforme** a linie odvozená meduloblastomu – ATCC HTB 186 (**Dabo**). Jako kontrolu jsme použili **normální lidské fibroblasty**. Účinek viru na buňky jsme hodnotili mikrofotograficky a MTT testem.

Výsledky a diskuze: Mikrokinematografie i MTT test prokázal, že reovirus měl silný cytotoxický účinek na všechny testované linie s výjimkou normálních lidských fibroblastů. Morfologicky byly patrné změny typické pro apoptózu – kondenzace chromatinu a vznik apoptotických tělísek. Bylo prokázáno, že reovirus indukuje apoptózu aktivací NFκappaB

U buněk odvozených od mozkových nádorů prokázali synergistické působení reoviru s testovanými cytostatiky – vinkristinem, cisplatinou a vepesidem. Tyto dosud nepopsané nálezy poslouží jako podklad k testům na zvířatech na jejichž základě by bylo možné zahájit klinickou studii.

Práce vznikla za finanční podpory grantů GA ČR 301/05/2240 a výzkumných záměrů MŠMT č.0021620813

Protinádorové účinky derivátů kyseliny betulinové jsou způsobeny přímou interakcí s cytochromem c

¹Džubák P., ¹Hajdúch M., ¹Vydra D.,

²Anzenbacher P., ³Šarek J., ⁴Novák P.,

⁴Havlíček V.

¹Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika, LF UP Olomouc

²Ústav farmakologie, LF UP Olomouc

³Katedra organické a jaderné chemie, PŘF UK Praha

⁴Ústav Mikrobiologie, Akademie věd ČR.

Na našem pracovišti se zabýváme hodnocením cytotoxického účinku triterpenoidních látek odvozených od kyseliny betulínové, které jsou syntetizovány na Katedře organické a jaderné chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Nejúčinnější z těchto sloučenin dosahují v cytotoxických testech hodnot $IC_{50} = 0,2 \mu M$. Zajímavé je, že tyto sloučeniny jsou účinné pro většinu testovaných nádorových linií a to i p53 negativních, pRb negativních, bez ohledu na jejich histogenetický původ, přičemž vykazují výrazně nižší toxicitu vůči nenádorovým buňkám. Molekulární mechanismy účinku studujeme na jednom z nejúčinnějších derivátů β -ketobetulínové kyseliny (JS8) $IC_{50} = 1 \mu M$ pro CEM buněčnou linii. Pokud se na námi zjištěné výsledky podíváme v časové dynamice tak již po 30 min. působení JS8 se uvolní cytochrom c, následně dochází k aktivaci kaspáz 3,8 a ke štěpení specifických substrátů PARP a laminu B. Štěpení je možné zainhibovat jak pan-inhibitorem kaspáz Z-VAD-fmk, tak i acetylcysteinem, což je látka používaná jako antioxidant. Inhibice aktivity apoptózy pomocí acetylcysteinu nás vede k domněnce, že klíčovou roli bude hrát zvýšená produkce kyslíkových radikálů, případně změny v mitochondriálním respiračním řetězci. V této souvislosti pozorujeme časný nárůst produkce kyslíkových radikálů cca 10 min., zvýšení transmembránového mitochondriálního potenciálu (10–20 min.) a následně (30 min.) otevření mitochondriálních pórů. Tato pozorování podporuje i fakt, že indukce apoptózy byla významně inhibována nejen po působení acetylcysteinu, ale její nástup byl opožděn i po působení KCN, který je inhibitorem komplexu IV mitochondriálního respiračního řetězce, přičemž inhibitory komplexu I, III a V nevykazovaly protektivní efekt.

Výsledky naší studie naznačují, že molekulární cíl betulínu JS8 je lokalizován mezi komplexy III a IV mitochondriálního respiračního řetězce, kde dochází k ovlivnění transportu elektronů. Mezi těmito komplexy je hlavním přenašečem elektronů právě cytochrom c který se jeví cílovou molekulou našeho léčiva. Jeho roli v indukci apoptózy jsme studovali pomocí UV/VIS spektrofotometrie a hmotnostní spektrometrie. Naše pozorování zatím svědčí o nekompetitivní inhibici funkce cytochromu c, v důsledku čehož dochází k oxidačnímu vzplanutí v ošetřené buňce a následně apoptóze.

Publikované experimentální údaje a i naše zkušenosti nás vedou k závěru, že klasické mechanismy mnohočetné lékové rezistence se u derivátů kyseliny betulínové neuplatňují. Vzhledem k tomu, že se jedná také o nový cíl protinádorové chemoterapie, je vysoce pravděpodobné, že tyto slouče-

niny mohou být přínosem pro pacienty s chemorezistentním, na léčbu nereagujícím, zhoubným onemocněním.

Tato práce byla financovaná z grantů MSM6198959216, GAČR 301/03/1570 a MPO FT-TA/027.

Potencionální využití naftochinonů v medicíně

¹Babula P., ^{2,5}Mikelová R., ¹Sladký Z., ³Havel L., ^{2,4}Adam V., ¹Kizek R.

¹Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně

²Ústav chemie a biochemie

³Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně

⁴Katedra analytické chemie

⁵Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně

Úvod: Naftochinony jsou látky přírodního původu, především se jedná o barevné pigmenty. V buňkách jsou deponovány ve vakuolách, kde jsou přítomny ve formě glykosidů. Je známo, že naftochinony se jako skupina sekundárních metabolitů vyskytují v přírodě v rámci různých čeledí rostlin (*Plumbaginaceae*, *Juglandaceae*, *Ebenaceae*, *Boraginaceae*, *Dioncophyllaceae*, *Ancistrocladaceae*, *Iridaceae*, *Verbenaceae*, *Scrophulariaceae*, *Avicenniaceae*, *Balsaminaceae*, *Bignoniaceae*, *Gentianaceae*, *Droseraceae*, *Nepenthaceae*, *Lythraceae*, *Euphorbiaceae*) a rovněž u hub a mikroorganismů (*Streptomyces*, *Fusarium*). Biosyntéza naftochinonů probíhá šesti možnými biosyntetickými cestami, některé jsou charakteristické pro určité čeledi nebo rody rostlin. Bylo zjištěno, že základním prekurzorem biosyntézy většiny naftochinonů je kyselina šikimová. Naftochinony mají pro své výrazné cytotoxické účinky nepochybně budoucnost v terapii různých onemocnění, zejména nádorových. Je jen otázkou času, kdy budou vhodnou technologickou úpravou omezeny jejich nežádoucí účinky a naopak se zvýší jejich terapeutická účinnost a terapeutický index. Proto je velmi důležité vytvořit a optimalizovat metody jejich izolace a identifikace, neboť se v rostlinách nikdy nevyskytují samostatně, ale v komplexu řady látek různé povahy (flavonoidy, třísloviny, organické kyseliny atd.).

Využití naftochinonů v tradiční medicíně

Naftochinony se již dlouhou dobu používají v tradičních medicínách různých národů, a to většinou ve formě extraktů. V Číně a některých dalších asijských zemích se používají rostliny rodu olověnc (Plumbago; *P. zeylanica*, *P. rosea* a *P. europaea*) ve formě extraktů k léčbě rakoviny, revmatoidní artritidy a bolestivé menstruace, zevně pak při léčbě otoků a zhmožděnin. Ve Francii se dosud používá *Plumbago europaea* ke zmírnění bolesti zubů. *Plumbago zeylanica* se v lidovém lé-

čitelství využívá pro své diaforetické účinky. Konkrétně v Indii má používání tohoto druhu širokou tradici a jsou jím léčeny průjmy, poruchy trávení a různé kožní problémy; používání této drogy může ovšem vést k trvalé sterilitě a používá se i k vyvolání potratu. Kůra z kmene bolivijské rostliny *Pera benensis* je využívána Indiány k léčbě kožní formy leishmaniózy (parazitóza způsobená prvky rodu *Leishmania*). Kůra a listy z ořešáku (*Juglans nigra*) se využívají pro své svíravé, projímavé a detergentní účinky k léčbě kožních chorob, zejména ekzémů, oparů a kožních vředů. Tradiční medicíny doporučují kůru rovněž k léčbě syfilis a parazitóz. Zevně se používá ve formě různých extraktů jako rubefaciens (látky dráždící pokožku a sliznice, které způsobují jejich překrvení; tímto mechanismem ohraničují a urychlují zánět). V českých zemích má dlouhou tradici (od 13. století) používání extraktů z rosnatky *Drosera rotundifolia* proti infekčním nemocem dýchacích cest, jako je nachlazení, bronchitida, kašel a astma. Přípravky z této rostliny se ještě dnes doporučují pro prevenci aterosklerózy, při cukrovce a jako silný antibakteriální a antivirální prostředek. Uvádí se rovněž účinek spasmolytický a sekretolytický. V Americe jsou extrakty oblíbeny jako geriatikum. V indické tradiční medicíně se používá *Drosera burmannii* jako účinné rubefaciens, v Jižní Americe zase jiné druhy k léčbě bradavic, kuřích ok, keratóz a k odstranění pih.

Využití naftochinonů v univerzitní medicíně

Při kašli a nachlazení se používá v ČR schválený přípravek Tussilen® kapky, který obsahuje extrakt z druhu *Drosera rotundifolia*. Jiné zdroje doporučují homeopatické zpracování *Drosera rotundifolia* na nemoci dýchacích cest; schválená homeopatika z *Drosera rotundifolia* jsou dostupná v četných lékových formách – tablety, roztok, globule, čípky, masti v několika potencích – homeopatických ředěních. Mucholapka podivná (*Di- onaea muscipula*) nemá v současnosti v ČR terapeutické využití. V Německu se vyrábí přípravek Carnivora® – extrakt z mucholapky v lékových formách kapky a injekce – použití jako imunomodulans při malignitách, jako imunostimulans, podpůrná léčba Crohnovy nemoci a ulcerózní kolitis. Extrakt z mucholapky je také dostupný v USA, kde je vyráběn firmou Vital Health Products jako potravinový doplněk.

Závěr

Naftochinony mají pro své výrazné cytotoxické účinky nepochybně budoucnost v terapii různých onemocnění, včetně nádorových. Lze tedy předpokládat, že v příštích letech bude růst zájem nejen o jejich dokonalejší charakterizaci a popis účinku na živé organismy ale také o vývoj nových metod pro jejich studium.

Poděkování. Tato práce byla podpořena granty: IGA VFU 1/2005; GAČR 525/04/P132 a INCHEM-BIOL 0021622412.

Literatura

1. P. Babula, L. Havel, M. Strnad, Z. Sladký and R. Kizek Studium biologické aktivity naftochinonů, in: R. Vyzula and J. Žaloudík (Eds.), XXVIII. Brněnské onkologické dny, Masarykův onkologický ústav, Brno, Česká republika, 2004; 273–277.
2. P. Babula, R. Mikelová, D. Potěšil, R. Kizek, L. Havel and Z. Sladký Naphoquinones - appearance in nature, biological properties, in: R. Cerkal (Ed.), MendelNET, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, Česká republika, 2004.
3. P. Babula, R. Kizek, L. Havel, M. Strnad and Z. Sladký Studium biologické aktivity naftochinonů na buněčné kultury, in: M. Wimmerová and P. Beneš (Eds.), VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita v Brně, Brno, Česká republika, 2004, pp. 10.
4. P. Babula, R. Mikelová, D. Buchtová, V. Adam, D. Potěšil, R. Kizek, L. Havel and Z. Sladký Spectrophotometrical analysis of plant naphthoquinones, in: J. Bříza, D. Pavingerová and J. Špak (Eds.), 6th International Symposium in the Series: Recent Advances in Plant Biotechnology, Institute of Plant Molecular Biology ASCR, České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic, 2005, pp. 110.
5. P. Babula, R. Mikelová, V. Adam, D. Potěšil, J. Zehnálek, R. Kizek, L. Havel and Z. Sladký Chromatografické stanovení naftochinonů v rostlinách, in: E. Čellárová, P. Čupka, D. Grančaj, V. Oravec, V. Suchý and V. Štalmach (Eds.), 10. pracovní deň Sekcie prírodných liečiv a 20 rokov odborných konferencií o liečivých rastlinách, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského, Lubovnianske kúpele, Slovensko, 2005, pp. 14.
6. P. Babula, R. Mikelová, V. Adam, D. Potěšil, R. Kizek, B. Klejdus, L. Havel and Z. Sladký Liquid chromatography coupled with diode array detector as a tool for separation, detection and characterization of secondary metabolites - naphthoquinones in plant tissue samples, in: J. Ševčík (Ed.), Chiral 2005, Univerzita Palackého Olomouc, Olomouc, Česká republika, 2005, pp. 5.
7. P. Babula, J. Víteček, D. Buchtová, R. Mikelová, D. Potěšil, V. Adam, R. Kizek, L. Havel and Z. Sladký Biologické vlastnosti naftochinonů a jejich vliv na buňky BY-2, in: M. Wimmerová and P. Beneš (Eds.), IX. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita v Brně, Brno, Česká republika, 2005, pp. 3–4.
8. P. Babula, R. Mikelová, D. Potěšil, V. Adam, R. Kizek, L. Havel and Z. Sladký Simultaneous determination of 1,4-naphthoquinone, lawsone, juglone and plumbagin by liquid chromatography with UV detection, in: J. Ulrichová (Ed.), Toxcon 2005; 10. Interdisciplinary Czech and Slovak Toxicological Conference, Palacký University, Olomouc, Czech Republic, 2005, pp. 25–28.
9. P. Babula, R. Mikelová, D. Potěšil, V. Adam, R. Kizek, L. Havel and Z. Sladký Liquid chromatography coupled with diode array detector as a tool for separation, detection and characterization of secondary metabolites - naphthoquinones in plant tissue samples, in: J. Blatná, A. Horna and T. Zima (Eds.), Vitamins 2005 - Targeted Nutritional Therapy, Univerzita Pardubice, Pardubice, Czech Republic, 2005, pp. 172–174.
10. P. Babula, R. Mikelová, J. Víteček, R. Kizek, L. Havel and Z. Sladký Naftochinony – výskyt v přírodě, biologické vlastnosti a jejich chromatografické stanovení v biologickém materiálu, in: J. Žaloudík and R. Vyzula (Eds.), XXIX. Brněnské onkologické dny, Masarykův onkologický ústav v Brně, Brno, Česká republika, 2005, pp. 390–393.

SOLEN: časopisy • kongresy • semináře

Interní medicína pro praxi, Medicína pro praxi, Pediatrie pro praxi, Psychiatrie pro praxi, Neurologie pro praxi, Urologie pro praxi, Praktické lékařství, Intervenční a akutní kardiologie, Klinická farmakologie a farmacie, Zdravotnické právo v praxi

Vydavatel a distributor časopisů v ČR:

SOLEN, s.r.o., Lazebká 297/51, 779 00 Olomouc
tel. 582 397 457, fax 582 396 099, e-mail: solen@solen.cz, www.solen.cz

Distributor časopisů v SR:

MEDUCA, s.r.o. Šafárikovo nám. 7, 811 02 Bratislava
fax: 02 / 5263 2408, telefon: 02 / 5263 2409
e-mail: meduca@meduca.sk, www.meduca.sk

MEDUCA
MEDICAL EDUCATION

MEDUCA – MEDICAL EDUCATION®
je ochranná známka vydavatelství Solen
pro vzdělávání lékařů

POSTERY

Sérový N-terminální propeptid kolagenu typu I (P1NP) a kostní metastázy karcinomu prsu

¹Nekulová M., ¹Šimíčková M., ²Petráková K., ⁴Pecen L., ³Staniček J., ¹Pilný R., ¹Frgala T., ¹Valík D.

¹Oddělení laboratorní medicíny Masarykův onkologický ústav, Brno

²Klinika komplexní onkologické péče Masarykův onkologický ústav, Brno

³Oddělení nukleární medicíny Masarykův onkologický ústav, Brno

⁴Ústav informatiky AV ČR, Praha

Pro monitorování procesu osteoformace je v současnosti doporučován N-terminální propeptid kolagenu typu I (P1NP). Cílem naší práce bylo vyhodnotit sérovou hladinu P1NP v souboru nemocných karcinomem prsu bez kostního rozsevu ve srovnání se souborem s kostními metastázami a korelovat s výsledky scintigrafie kostí, ev. dalších zobrazovacích vyšetření. Hladiny P1NP byly hodnoceny ve vztahu ke klinickým údajům o typu terapie (radioterapie a chemoterapii). Speciální zaměření patřilo terapii bisfosfonáty, které se podílejí na inhibici maligní osteolýzy.

V souboru 83 nemocných průměrného věku 63 let (rozsah 40–86 let) léčených pro karcinom prsu v MOÚ Brno (celkem 186 vzorků krve) jsme vyšetřili P1NP metodou elektrochemiluminiscence (na imunoanalýzátoru Elecsys 2010, firma ROCHE) a srovnali s výsledky scintigrafického vyšetření kostí.

Byly hodnoceny parametry validity (senzitivita, specifita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, relativní riziko a ROC křivka). Bodové odhady parametrů validity byly doprovázeny výpočtem 95 % konfidenčních intervalů. Ke statistickému hodnocení jednotlivých proměnných byl užít neparametrický Wilcoxonův test.

Koncentrace P1NP ve skupině nemocných s prokázanými kostními metastázami se signifikantně lišila od skupin s jinými typy metastáz nebo s neprokázanými metastázami. Stanovení vykazuje senzitivitu 46 % při 90 % specifitě. Metoda rovněž vykazuje dynamické změny při monitorování efektu léčby bisfosfonáty, proto nemocné s kostními metastázami léčené Bonafosem dle protokolu byly opakovaně vyšetřovány vzhledem k posouzení efektu terapie. U 10 z nich nedošlo po 6 měsících k efektu terapie, nález progredoval a také u poloviny z nich došlo ke zvýšení hodnoty P1NP i při terapii. U 12 nemocných naopak došlo ke stabilizaci či parciální remisi a hladina P1NP klesala. K definitivnímu zhodnocení významu sérového P1NP pro monitorování vývoje onemocnění a sledování účinku specifické terapie bude třeba rozšíření studie o další nemocné.

Práce byla provedena s podporou Vědecko výzkumného záměru MZ00020980501–5.

Vliv steroidních látek na viabilitu buněčných linií mnohočetného myelomu

Malíková J., Nowaková M., Hlobilková A., Kolář Z.

Laboratoř molekulární patologie, Ústav patologie LF UP a FN Olomouc

V poslední době byl zjištěn protinádorový vliv steroidní látky 2-methoxyestradiolu a retinoidů na buněčné linie mnohočetného myelomu (MM). Účinek látek je uskutečňován aktivací členů superrodiny jaderných receptorů, se kterými tvoří komplexy a působí jako transkripční regulační faktory. Také 17- β -estradiol jeví účinky na buňky MM prostřednictvím vazby na estrogenové receptory.

Méně prozkoumanou skupinou látek jsou brassinosteroidy, polyhydroxylované deriváty sterolu, které představují jeden z typů regulátorů růstu rostlin. O mechanismu brassinosteroidů je známo jen velmi málo, některé deriváty byly testovány in vitro na nádorových buněčných liniích a u některých se podařilo prokázat velmi výraznou cytotoxickou aktivitu. Cílem této studie bylo zjistit vliv derivátů brassinosteroidů na buněčnou viabilitu a proliferaci v porovnání s látkami 2-methoxyestradiolem a all-trans retinovou kyselinou. Dále vybrat látky s potenciálně antiproliferační aktivitou a následně se zaměřit na hodnocení jejich vlivu na buněčný cyklus a genovou expresi na proteinové úrovni. V naší studii byly použity buněčné linie RPMI 8226 a U-266 odvozené od MM. Účinek těchto látek na buněčnou viabilitu a proliferaci byl MTT-testem stanovován po dobu 24 a 48 h a byla určena koncentrace IC_{50} . Pomocí průtokové cytometrie byl pozorován vliv studovaných látek na buněčný cyklus a na základě Western blot analýzy byla sledována exprese proteinů uplatňujících se při regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Výsledky byly dále doplněny sledováním inkorporace bromodeoxyuridinu do DNA proliferujících buněk a detekcí apoptotických buněk pomocí metody TUNEL a fragmentace DNA. Z testovaných steroidních látek byl vybrán brassinosteroid kar3883, jehož účinek se projevil v koncentracích 8×10^{-5} – 8×10^{-6} mol/l po 24 a 48 h aplikaci u testovaných buněčných linií. Průtokovou cytometrií bylo zjištěno, že kar3883 způsoboval zvýšení podílu buněk v G2/M fázi buněčného cyklu u linie RPMI 8226 a mírné zvýšení podílu buněk v G1 fázi buněčného cyklu u linie U-266. Dále byla zjištěna indukce p53 a inhibitorů cyklin-depndentních kináz p21^{Waf1/Cip1} a p27^{Kip1}. U buněk U-266 byl po ovlivnění testovanými látkami zaznamenán pokles hladin cyklinů A, B, D1, E a cdk6. U obou buněčných linií také došlo ke změně aktivity proteinů

regulujících apoptózu (proteiny rodiny Bcl-2, caspáza-3, PARP). Naše výsledky by mohly přispět k potenciálnímu terapeutickému užití studovaných látek.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem MSM 6198959216.

Studium úlohy genů BRCA1 a BRCA2 u sporadického karcinomu prsu

Janatová M., Prokopcová J., Pohlreich P.
Ústav biochemie a experimentální onkologie
1. LF UK, Praha

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem v naší ženské populaci. Vyskytuje se v hereditární (5–10 % případů) a sporadické formě. Příčinou většiny dědičných karcinomů jsou zárodečné mutace genů BRCA1 a BRCA2. Kromě inaktivující mutace závisí vývoj nádoru i na ztrátě druhé, intaktní alely. U karcinomů prsu, které vznikají v nepřítomnosti dědičné mutace, není úloha genů BRCA1/2 dostatečně známa. Ztráty alel v lokusech BRCA1 a BRCA2 jsou sice častým nálezem, somatické mutace těchto genů se však podařilo prokázat jenom v ojedinělých případech. Dalším způsobem inaktivace těchto genů by mohla být hypermetylace promotorových oblastí.

V naší studii jsme se zaměřili na analýzu inaktivace genů BRCA1/2 u 40 neselektovaných vzorků karcinomu prsu. Ztráta heterozygosity intragenových nebo v blízkosti genu ležících mikrosatelitových markerů byla využita k určení výpadku alel BRCA1/2. U vzorků se ztrátou heterozygosity jsme provedli mutační analýzu a analýzu metylace promotorů. Prescreening mutací byl prováděn pomocí PTT (protein truncation test) analýzy a přímého sekvenování produktů RT-PCR. K potvrzení a charakterizaci mutací bylo použito sekvenování vhodných fragmentů PCR. Analýza hypermetylace byla provedena sekvenováním promotorových oblastí po bisulfitové modifikaci.

Ztráta alely BRCA1 byla prokázána u 8 nádorových vzorků (21 %), ztráta alely BRCA2 pak u 13 nádorů (33 %). Ve čtyřech vzorcích (10 %) patrně došlo ke kompletní inaktivaci genu BRCA1. Ve dvou případech byly příčinou somatické mutace, způsobující zkrácení genového produktu. Jedná se o zatím nepopsané somatické mutace genu BRCA1. U dvou nádorů pak byla zjištěna hypermetylace promotorové oblasti genu BRCA1.

Výsledky naší studie potvrzují úlohu genu BRCA1 v tumorigenezi sporadického karcinomu prsu a naznačují způsoby genové inaktivace. Časté výpadky BRCA1 alely mohou být doprovázeny somatickými mutacemi druhé alely nebo její inaktivací v důsledku metylace promotorové oblasti.

Tato studie byla podpořena grantem GAUK č. 37/2005 a výzkumným projektem MŠMT č. MSM0021620808.

Kvantitativní stanovení matrix metaloproteináz 2 a 7 (MMP-2 a MMP-7) a jejich inhibitorů (TIMP-1 a TIMP-2) u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu

Pešta M.¹, Holubec L. jr.¹, Topolčan O.¹, Rupert K.², Černá M.¹, Holubec L. sen.², Třeška V.², Fínek J.³, Černý R.⁴

¹II. interní klinika

²Chirurgická klinika

³Onkologické oddělení, FN Plzeň

⁴Ústav klinické biochemie LF UK Plzeň

Úvod: Matrix metaloproteinázy hrají důležitou roli v procesu degradace extracelulární matrix. Cílem naší studie bylo stanovení hladin MMP-2, MMP-7, TIMP-2 a TIMP-1 mRNA exprese u tkáňových vzorků kolorektálního karcinomu pomocí real-time RT PCR a korelovat tyto hodnoty s klinickým stavem pacienta.

Metodika: Nádorová tkáň byla vyšetřena u 38 pacientů s histologicky ověřeným kolorektálním karcinomem. Od 19 pacientů byla zároveň vyšetřena zdravá tkáň střeva z bezpečnostního lemu (ověřeno histologicky). Dále byla vyšetřena tkáň střeva u 11 pacientů s benigním onemocněním GIT (ulcerózní kolitida, morbus Crohn). Expres hladin mRNA stanovených metaloproteináz, jejich inhibitorů a GAPDH (housekeeping gen) byly kvantifikovány pomocí metod real-time PCR.

Výsledky: Zjistili jsme, že hodnoty mRNA exprese MMP-2, MMP-7 a TIMP-1 byly signifikantně vyšší u nádorové tkáně než u tkáně kontrolní ($p < 0.0005$, resp. $p < 0.0007$ a resp. $p < 0.0004$). Dále jsme zjistili, že hodnoty mRNA exprese MMP-2, MMP-7 a TIMP-2 a TIMP-1 nekorelovaly se stadiem nádorového onemocnění ($p < 0.7129$, resp. $p < 0.5334$, resp. $p < 0.3648$ a resp. $p < 0.6068$), 5-letým přežitím ($p < 0.5196$, resp. $p < 0.9197$, resp. $p < 0.6997$ a resp. $p < 0.6525$) a výskytem vzdálených metastáz ($p < 0.4893$, resp. $p < 0.6721$, resp. $p < 0.9752$ and resp. $p < 0.4599$).

Závěr: V pilotní studii jsme prokázali signifikantní rozdíl v expresi mRNA MMP-2, MMP-7 a TIMP-1 kontrolní a nádorovou tkání kolorektálního karcinomu.

Poděkování: Práce byla podpořena výzkumným zámerem MSM 0021620819

EM-G3 linie progenitorových buněk: nový experimentální model studia vývoje lidského mamárního karcinomu

Brožová M.¹, Kleibl Z.², Zadinová M.³, Netíková I.⁴, Scholzová E.², Matoušková E.¹

¹Oddělení buněčné biologie, ÚMG AVČR

²Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK

³Ústav biofyziky a informatiky, 1. LF UK

⁴Oddělení přípravy cytostatik, VFN v Praze

Stabilní buněčné linie jsou nepostradatelným modelovým systémem pro studium kancerogene-

Tabulka 1.					
Antigen	Linie EM-G3		Původní vzorek nádoru od pacienta		
	In vitro	In vivo (nu/nu myš)	Buňky duktálního karcinomu	Nenádorové mamární epitelální buňky	
				Luminální	Myoepitelální
K5	+	+	-	-	+
K14	+	+	-	-	+
K18	+	-	+	+	-
K19	-	-	+	+	-
SMA	-	-	-	-	+
p63	+ a	+ a	-	-	+a
ER	-b	-	+a	+	-
PR	-b	-	+ a	+	-
EGFR	+	+	N.S.	N.S.	N.S.

a) Pozitivita ve většině jader; b) Nukleární negativita, slabá membránová/cytoplasmatická pozitivita; N.S. – nebylo stanoveno

ze. Do současnosti se podařilo získat a stabilizovat méně než 100 linií, avšak většina experimentálních studií byla provedena na třech (T47D, MCF-7, MDA-MB-231), z metastatických ložisek derivovaných linií. Ustanovení permanentní buněčné linie z primárního ložiska karcinomu prsu je mimořádně vzácné.

Cílem práce bylo získání stabilní nádorové linie z primárního ložiska karcinomu prsu.

Nádorová buněčná linie byla získána z primární léze pacientky s infiltrujícím duktálním karcinomem pomocí feeder layer techniky. Od 10. pasáže byly buňky schopné růst bez přítomnosti letálně ozářených 3T3 fibroblastů (feeder) a bylo dosaženo stabilní generační doby 34h. Ve 130. pasáži byla provedena klonální expanze EM-G3 klonu, který byl podroben další analýze. V současnosti bylo dosaženo množství více než 200 pasáží.

U nové buněčné linie byla provedena rozsáhlá imunocytochemická analýza, která umožnila srovnání EM-G3 buněk s buněčnou populací v originálním nádoru (tabulka 1).

Provedená cDNA-array analýza prokázala vysokou expresi integrinů, EGFR a CD44. Na základě imunocytochemické analýzy a expresního vzorce lze usuzovat, že EM-G3 buňky pocházejí ze společného bazálního prekursoru luminálních a myoepitelálních buněk (K5⁺, K18⁺) imortalizovaných v časném stadiu tumorogeneze. Tyto buňky v originálním nádoru pacientky reprezentují minoritní populaci nádorových progenitorů. Buňky EM-G3 se vyznačují schopností růstu v imunodeficientních nu/nu myších, u nichž vytvářejí v průběhu 3 týdnů nemetastazující, lokálně rostoucí ložisko s imunofenotypem totožným s *in vitro* buňkami. Buňky se v vyšším nádoru uspořádávají do primitivních duktálních struktur.

Metodou vícebarevné FISH byl prokázán stabilní diploidní genom s relativně malými genetickými změnami [karyotyp 44, XX, s monosomií chromosomů 15 a 20 a translokacemi 3(9), 6(15), 12(12) a 13(20)].

Současné dostupné buněčné linie prsních nádorových buněk většinou pocházejí z pokročilého stádia karcinomu se značnou genomovou nestabilitou. Domníváme se, že stabilní buněčná linie EM-

-G3, která se vyznačuje relativně krátkou generační dobou a stabilním karyotypem, může sloužit jako důležitý biologický model mamární karcinogeneze. Unikátnost EM-G3 linie spočívá v její schopnosti diferenciace a původu v progenitorových nádorových buňkách.

Poděkování: Práce byla finančně podporována granty č. NR8145-3 a NR8345-4 udělenými IGA MZ ČR a grantem č. 93/2005/C GAUK. Další podpora byla poskytnuta AV ČR (VZ AVOZ50520514) a MŠMT ČR (VZ MSM0021620808).

Vliv nádorového mikroprostředí na progresi maligního melanomu.

¹Fiurášková M., ¹Brychtová S., ²Tichý T. jr.,

³Beneš P., ⁴Hirňák J., ⁴Zálešák B.

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

²Klinika chorob kožních a pohlavních LF UP a FN Olomouc

³Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

⁴Klinika plastické chirurgie LF UP a FN Olomouc

Progrese nádoru je kromě genetických a epigenetických změn samotných nádorových buněk významně ovlivňována mikroprostředím, které nádorové buňky obklopuje a vzájemnými interakcemi mezi nádorovými a stromálními elementy. Maligní buňky působí na stromální složky autokrinní a parakrinní produkcí růstových faktorů, jejich receptorů, cytokinů, regulačních molekul a remodelujících enzymů. Takto ovlivněné stroma reciprocně podporuje růst a diseminaci nádoru. Z buněk stromálního mikroprostředí se zde nejvíce uplatňují fibroblasty, endotelie a zánětlivé buňky, zejména makrofágy. V naší práci jsme sledovali expresi onkoproteinu c-Myc, růstového faktoru krevních destiček (PDGF), bazického růstového faktoru fibroblastů (bFGF) a nestinu u maligních a benigních kožních melanocytárních lézí s cílem posoudit rozdíly proteinové exprese zejména ve stromálních elementech. Vyšetření byla provedena na tkáňových řezech metodou nepřímé imunohistochemie na souboru čítajícím 78 případů superficiálních a nodulárních melanomů

a 43 kožních pigmentových névů. Bylo prokázáno, že u maligních nádorů dochází k signifikantním změnám exprese c-Myc, PDGF, bFGF a nestinu nejen v melanoblastech maligních melanomů, ale i v buňkách nádorového stromatu. Jednalo se o fibrocyty/fibroblasty, makrofágy i endotelie. Kromě zvýšení exprese sledovaných proteinů jsme také pozorovali zmnožení jednotlivých typů buněk. Popsané změny byly zaznamenány již u časných stádií onemocnění. Ukazuje se, že stejně jako u jiných solidních nádorů, tak i u maligního melanomu by léčba měla být zaměřena nejen proti vlastním nádorovým buňkám, ale i proti buňkám stromatu.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 1A8245-3/2004 a MSM 6198959216.

Angiogenní cytokiny u chronické B-lymfocytární leukémie: souvislost s moderními prognostickými faktory

¹Smolej L., ²Andrýs C., ¹Žák P., ¹Belada D., ¹Široký O., ²Krejsek J., ¹Malý J.

¹II.interní klinika, Oddělení klinické hematologie, LF UK a FN, Hradec Králové

²Ústav klinické imunologie a alergologie, LF UK a FN, Hradec Králové

Angiogeneze (AG), tedy novotvorba cév z již existující vaskulatury, hraje nezastupitelnou roli v patogenezi a metastázování solidních nádorů. V posledních letech došlo k mohutnému rozvoji výzkumu AG také v oblasti hematologických malignit. Zvýšená AG byla prokázána u akutních i chronických leukémií, lymfomů, mnohočetného myelomu, myelodysplázií i myeloproliferací. Chronická B-lymfocytární leukémie (B-CLL) je maligním lymfoproliferativním onemocněním vznikajícím ze zralých lymfocytů, projevujícím se hromaděním lymfocytů v kostní dřeni, periferní krvi a lymfatických orgánech. Jejím charakteristickým rysem je velmi výrazná heterogenita prognózy – třetina nemocných nikdy nevyžaduje léčbu a délka jejich přežití je shodná se zdravými vrstevníky, naproti tomu někteří nemocní s agresivním průběhem choroby žijí méně než 2 roky. Proto jsou intenzivně zkoumány nové prognostické faktory (např. stanovení mutačního stavu genů pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinů – IgVH a stanovení genetických aberací metodou FISH) s cílem zhodnotit individuální riziko a optimalizovat intenzitu léčby. Publikace z posledních let vyzdvihují význam AG v patogenezi a progresi B-CLL. V naší práci jsme hodnotili AG u 60 nemocných s neléčenou B-CLL stanovením koncentrací angiogenních aktivátorů – růstového faktoru pro cévní endotelie (VEGF), zásaditého růstového faktoru pro fibroblasty (bFGF) v plazmě periferní krve metodou ELISA. Solubilní CD105 (sCD105) byl hodnocen u 42 nemocných. Prokázali jsme statisticky signifikantní zvýšení bFGF, VEGF i sCD105 v porovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků ($p < 0,0001$, $p = 0,002$, $p = 0,0296$). Již nemocní s časnou B-CLL, tedy ve stádiu 0 dle Raije, měli signifikantně vyšší

bFGF a VEGF ($p < 0,0001$, $p = 0,005$). U podskupiny nemocných, u kterých byla k dispozici data týkající se genetických aberací a mutačního stavu IgVH, jsme provedli subanalýzu souvislosti koncentrací angiogenních faktorů bFGF a VEGF s těmito prognostickými faktory. Bylo zjištěno signifikantní zvýšení bFGF u nemocných s mutovanými geny pro IgVH ($p = 0,032$). Tato pilotní data budou použita jako základ pro další výzkum angiogeneze u B-CLL, který je cenný diagnosticky, ale do budoucna má význam i pro léčbu, protože se již nyní v klinických studiích u B-CLL zkoušejí antiangienní preparáty (thalidomid, lenalidomid, bevacizumab).

Poděkování: Práce byla podpořena grantem NR/8373-3 IGA MZ ČR.

Quality Control Measurements of PET System Siemens Ecat Accel

Havlíček M.¹, Bartl J.², Petláková V.³

¹Brno University of Technology, Brno

²Nuclear Medicine, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno

³Hospital Pharmacy, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno

Aim of this work is quality control measurements of PET system Siemens Ecat Accel in practice.

Material and Methods: EC emission phantom T43004 for PET and SPET (PTW Freiburg, Germany), dose calibrator Curiemeter 3 (PTW Freiburg, Germany), PET system Ecat Accel (Siemens, Germany). For periodic quality tests of PET system is often selected and at once recommended by manufacturer homogeneity test only. Other important information about PET system quality as Spatial resolution capability, Scatter fraction, Sensitivity (efficiency) and Dead time are measured usually at acceptance test only or even not at all. All mentioned quality tests match to NEMA Standard NU 2-1994 or 2001 (Spatial resolution capability) and they can be made in both acquisition modes (2 and 3-dimensional).

Results respond specifications mentioned by manufacturer.

Conclusion: Benefit of all quality tests (except Dead time) is short time of measurement and small used activity of ¹⁸F-FDG. Therefore is possible to do mentioned tests after each normalization of PET scanner (usually each two or three months).

Karcinoembryonální antigen (CEA) u medulárního karcinomu štítné žlázy (kasuistika).

Engliš M.¹, Zamrazil V.², Jirkovská A.³, Zeman J.⁴, Bělohávek O.⁵, Prášek J.⁶

¹Katedra klinické biochemie IPVZ

²Endokrinologický ústav

³Klinika diabetologie IKEM

⁴Odd. patol. anatomie II.LFUK

⁵Odd. nukleární medicíny Nemocnice Na Homolce, Praha

⁶Odd. nukleární medicíny FN Brno

U nemocné D.V. (1944), sledované a léčené 24 let pro chronickou tyreoiditidu v nodózní strumě byl v r. 1999 sonograficky prokázán v pravém laloku št. žlázy cystoidní uzel o přibliž. průměru 2 cm s několika dutinami, které byly hodnoceny jako rozpadové. V r. 2002 byly před plánovanou operací (uterus myomatosis) zjištěny velmi vysoké hladiny CEA ($> 50 \mu\text{g/l}$), které přetrvávaly na přibližně stejných hodnotách po 18 měsících. Jejich příčinu se přes veškeré diagnostické úsilí nepodařilo zjistit.

V červnu 2004 byla provedena totální thyreidektomie pro podezření na medulární karcinom. Na naši žádost se operující lékař úspěšně pokusil punkcí získat obsah uzlu, ve kterém byly zjištěny extrémně vysoké koncentrace CEA a kalcitoninu.

Po operaci došlo k velmi rychlému poklesu jak CEA na prakticky neprokazatelné hodnoty, tak i kalcitoninu do oblasti fyziologických koncentrací.

PET/CT? Diskrepance nálezů Nižňanská V.

Oddelenie nukleární medicíny, PET pracovisko, Masarykův onkologický ústav, Brno

Ciel': při hodnocení FDG PET/CT občas vznikají problémy při interpretaci závěrů vyšetření a to zejména při výrazně odlišných nálezech (resp. popisoch). Na příkladech niekoľkých kazuistik poukazujeme na možné příčiny a súvislosti týchto diskrepancií.

Metóda: V priebehu štyroch mesiacov tohoto roka bežnej pracovnej prevádzky PET pracoviska sme vyčlenili tieto prípady, zaradili do určených kategórií a pokúsili sa ich analyzovať.

Výsledky: Poznatky a skúsenosti, získané touto prácou sú prínosné pre lekárov nukleárnej medicíny a spolupracujúcich klinikov a môžu pomôcť pri diferenciálnej diagnostike ochorení.

Studium flavonoidů pomocí elektrochemické detekce na uhlíkové pastové elektrody

¹Hanuštiak P., ^{1,2}Mikelová R., ¹Křížková S.,

^{1,3}Adam V., ⁴Hodek P., ⁴Stiborová M.,

⁵Beklová M., ⁶Zeman L., ¹Kizek R.

¹Ústav chemie a biochemie a ⁶Ústav výživy zvířat, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně

²Katedra teoretické a fyzikální chemie a ³Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně

⁴Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

⁵Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně

Úvod

Jen málokdo by oponoval tvrzení, že látky přijímané v potravě ovlivňují naše zdraví. Průměrný člověk západního typu nemá problémy s nedosta-

tečným příjmem potravy a živin, naopak zkonsumuje běžně více, než je třeba. Je tedy nutné se podrobně dívat i na látky obsažené v potravinách v minoritním množství. Vyloučili-li se z tohoto „množství“ všechny známé esenciální látky jako například vitamíny či minerální prvky, stále nám zbude velká směs sloučenin, které buď pozitivně či negativně ovlivňují zdraví konzumenta. V této souvislosti někteří autoři mluví o potravinách, které se nazývají nutraceutika. Nutraceutika jsou potraviny, které mají pozitivní fyziologické účinky na lidský organismus. Bylo prokázáno, že mají vliv na celkový zdravotní stav člověka a mohou výrazně podporovat fyziologický výkon či snižovat riziko vzniku některých nemocí. Mezi významné látky, které takto efektivně působí, patří rozdílné skupiny metabolitů rostlin, jako fenolové kyseliny, lignany, fytoosteroly, karotenoidy, glukosinoláty a mnoho dalších skupin, mezi které náleží i flavonoidy. Flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou rostlinných fenolů. V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí nové. Jsou odvozeny od kyslíkaté heterocyklické sloučeniny flavanu, tvořeného dvěma benzenovými kruhy spojenými heterocyklickým pyranem. Běžně bývají všechny tři kruhy substituovány hydroxyskupinami nebo methoxyskupinami, a jednotlivé deriváty se liší pouze stupněm substituce a oxidace. Rozeznáváme následující základní struktury flavonoidů: katechiny, leukoanthokyanidiny, flavanony, flavononoly, flavony, flavonoly a anthokyanidiny. Přírodní flavonoidy se nejčastěji vyskytují ve formě O-glykosidů, obsahují tedy ve své molekule necukernou součást (aglykon) a cukernou složku. Volné aglykony se vyskytují pouze zřídka. V některých případech (při technologickém zpracování při vyšších teplotách a v kyselém prostředí) může docházet k hydrolýze glykosidů a vzrůstu koncentrace aglykonů.

Cíl

V naší práci jsme se zaměřili na vypracování elektroanalytického stanovení quercetinu, quercitrinu, rutinu, diosminu a chrysinu na uhlíkové pastové elektrodě.

Materiály a metody

NaH₂PO₄, Metanol, Diosmin, Chrysin, uhlíkový prášek a minerální olej byly dodány firmou Sigma Aldrich Corp. (USA). Rutin trihydrát a Quercitrin dihydrát byly dodány firmou Roth GmbH, Karlsruhe (Ger.). Na₂HPO₄ byla dodána firmou Merck, Darmstadt (Ger.). Quercetin dihydrát byl dodán firmou Fluka chemie AG (USA). Všechny chemikálie byly ACS čistoty, stejně tak i voda (Sigma), ve které byly připraveny pracovní roztoky.

Elektroanalytické stanovení flavonoidů

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Netherlands) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland) v klasickém tří-elektrodevém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou

kapky 0,4 mm², referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Square wave voltametrické (SWV) experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Měření bylo prováděno v potenciálovém rozsahu od −0,1 V do 1,2 V s těmito parametry: potenciálový krok 1,95 mV, pulzní amplituda 49,85 mV. Jako základní elektrolyt jsme použili fosfátový pufr o pH = 7,0. Uhlíková pasta (asi 0,5 g) byla vyrobena z uhlíkového prášku a minerálního oleje (bez DNáz, RNáz a proteáz). Poměr uhlíkového prášku a minerálního oleje byl 70/30 (w/w). Pasta byla vložena do teflonového těla elektrody s průměrem plochy elektrody 2,5 mm. Před každým měřením byl povrch elektrody vždy obnoven. Pro úpravu získaných experimentálních dat bylo využito GPES software EcoChemie.

Výsledky

V našich předešlých experimentech bylo zjištěno, že vysoký podíl organické složky zhoršuje elektrochemickou analýzu. Při studiu flavonoidů rozpuštěných v methanolu (96 %) byl však podíl organické fáze v základním elektrolytu (2 ml) jen 0,1 %. Na získaných voltamogramech byly pozorovány čtyři oxidační signály, které byly označeny jako pík 1, pík 2, pík 3 a pík 4. Brettová popisuje signály i) pík 1 a ii) pík 2 jako oxidace hydroxylové skupiny v poloze 7 flavonoidního skeletu. Předpokládáme, že další dva pozorované signály iii) pík 3 a iv) pík 4 odpovídají oxidaci hydroxylové skupiny v poloze 5 flavonoidního skeletu. Navíc byl pozorován vliv cukerné složky flavonoidů na výsledný elektrochemický signál. Pozorovali jsme, že pík 1 quercetinu se objevil při potenciálu 0,15 V a signály rutinu a quercitrinu při potenciálu 0,25 V. Potenciálový posun o 100 mV může být zapříčiněn přítomností sacharidové skupiny na flavonovém skeletu quercetinu. Elektrochemické signály u chrysinu a diosminu byly výrazně nižší. Pozorovaná elektrochemická odezva bude pravděpodobně souviset s rozdílnou chemickou strukturou studovaných flavonoidů. Nejvyšší vliv na elektrochemické signály byly pozorovatelné u diosminu. I zde lze rozdíly mezi potenciály signálů flavonoidů vysvětlit přítomností disacharidové skupiny u diosminu.

Závěr

Elektrochemická detekce jako možnost stanovení flavonoidů je málo diskutovanou oblastí. Analytické stanovení flavonoidů se v současné době provádí především metodami chromatografickými a kapilární elektroforézou. Ovšem elektrochemické metody mají velkou výhodu v miniaturizaci a umožňují detekci látek in vivo bez usmrcení organismu.

Poděkování. Tato práce byla podpořena granty: GA ČR 525/04/P132, RASO 8/2005, MŠMT 6215712402 a INCHEMBIOL 0021622412.

Literatura

1. P. Hanuštiak, R. Mikelová, D. Potěšil, P. Hodek, M. Stiborová a R. Kizek Electrochemical behaviour of flavonoids on a surface of a carbon paste electrode, in: J. Ulrichová (Ed.), Toxcon 2005; 10. Interdisciplinary Czech and Slovak Toxicologi-

cal Conference, Palacký University, Olomouc, Czech Republic, 2005: 44–47.

2. P. Hanuštiak, R. Mikelová, D. Potěšil, P. Hodek, M. Stiborová a R. Kizek Determination of flavonoids using of square wave voltammetry, in: J. Blatná, A. Horna a T. Zima (Eds.), Vitamins 2005 – Targeted Nutritional Therapy, Univerzita Pardubice, Pardubice, Czech Republic, 2005: 175–176.
3. P. Hanuštiak, R. Mikelová, A. Kučerová, P. Hodek, M. Stiborová a R. Kizek Analýza flavonoidů pomocí elektrochemických technik, in: J. Žaloudík a R. Vyzula (Eds.), XXIX. Brněnské onkologické dny, Masarykův onkologický ústav v Brně, Brno, Česká republika, 2005: 387–390.
4. R. Mikelová, B. Klejdus, P. Hrstková a R. Kizek Chromatografické stanovení isoflavonů ve vegetativních a generativních částech rostlin soje (glycine max), in: R. Cerkal (Ed.), MendelNET, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, Česká republika, 2003.
5. R. Mikelová, B. Klejdus, J. Petřelová, D. Potešil, V. Adam, J. Vacek, R. Kizek a V. Kubáň Application of ultra fast column in HPLC/DAD determination of isoflavones, in: J. Lehotay (Ed.), 12th International symposium advances and applications of chromatography in industry, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovenská republika, 2004, pp. CD-ISSN 1335-8413.
6. R. Mikelová, B. Klejdus, J. Petřelová, D. Potěšil, V. Adam, M. Stiborová, P. Hodek a R. Kizek Rapid isoflavone determination in soy plants (Glycine max) by high performance liquid chromatography coupled with diode-array detector, in: J. Blatná, A. Horna a T. Zima (Eds.), Vitamins 2004 Targeted nutritional therapy, Univerzita Pardubice, Pardubice, Česká republika, 2004: P42.
7. R. Mikelová, B. Klejdus, J. Zehnálek, J. Vacek, R. Kizek a V. Kubáň Vliv extrakčních postupů na chromatografické stanovení obsahu isoflavonů ve vybraných potravinách vyrobených ze soji, in: L. Trnková, P. Jandera a R. Kizek (Eds.), IV. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, Masarykova univerzita v Brně, Brno, Česká republika, 2004: 27.
8. R. Mikelová, J. Petřelová, B. Klejdus, R. Kizek, J. Zehnálek, V. Adam, J. Vacek, L. Trnková a V. Kubáň Stanovení isoflavonů pomocí vysoko účinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí, in: M. Wimmerová a P. Beneš (Eds.), VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita v Brně, Brno, Česká republika, 2004: 42.
9. R. Mikelová, B. Klejdus, J. Zehnálek, J. Vacek, R. Kizek a V. Kuban Chromatografické stanovení obsahu isoflavonů ve vybraných potravinách ze soji, in: I. Ingr (Ed.), XXXI. Seminář o jakosti potravin a potravinových surovin, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno, Česká republika, 2004: 11.
10. R. Mikelová, J. Petřelová, P. Babula, V. Adam, L. Trnková, A. Horna a R. Kizek An using of glassy carbon electrode in connection with liquid chromatography for determination of silver, in: P. Jandera (Ed.), 11th International Symposium on Separation Sciences; ISSS 2005, Univerzita Pardubice, Pardubice, Czech Republic, 2005: 204–205.

Stanovení enzymatické aktivity dihydropyrimidin dehydrogenázy v krevních leukocytech jako prediktoru toxicity fluoropyrimidinových režimů

¹Hlídková E., ²Lipert J., ²Drábková V., ¹Adam T., ³Cwiertka K., ^{2,3}Hajdúch M.

¹Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie FN Olomouc

²Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika LF UP a FN Olomouc

³Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Nejpoužívanějším představitelem fluoropyrimidinových chemoterapeutik je 5-fluorouracil (5-FU). Účinek 5-FU je limitován jeho degradací dihydropyrimidin dehydrogenázou. Dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD, EC 1.3.1.2) je počátečním a limitujícím enzymem v katabolismu pyrimidinových bází.

Vysoká aktivita DPD v nádorových buňkách může způsobit inaktivaci 5-FU dříve než by se mohl projevit cytotoxický efekt chemoterapeutika. Naopak deficit DPD v somatické nenádorové tkáni vede ke vzniku vážné systémové toxicity, často s letálním následkem.

Aktivitu DPD stanovujeme v krevních mononukleárních buňkách, které se izolují z plné krve s přidavkem EDTA. Z izolovaných buněk se připraví lyzát, ve kterém se stanoví koncentrace celkových proteinů. Po inkubaci leukocytárních proteinů s reakční směsí obsahující [4-¹⁴C]-thymin se provede HPLC analýza s radiometrickou detekcí, ve které kvantitativně detekujeme 5,6-dihydrothymin.

Aktivita DPD byla vyšetřena u souboru 50 vzorků zdravých dárců krve a z nich byla stanoveno referenční rozmezí pro normální populaci 22.3±12.1 nmol-mg-1-h⁻¹. Dále byla analyzována stabilita DPD v čase 0, 12 a 24 hodin, která potvrdila dostatečnou stabilitu enzymu, která umožní dopravu materiálu do laboratoře při pokojové teplotě do 24 hodin.

Sledování aktivity enzymu umožňuje optimalizaci terapie fluoropyrimidiny, výběr vhodného preparátu a jeho dávkování. Detekce exprese a aktivity enzymu periferních leukocytech v nádoru před zahájením terapie může odhalit pacienty, kteří s velkou pravděpodobností na léčbu fluoropyrimidiny budou reagovat závažnou toxicitou. V těchto případech by pak pacient nemusel být vystavován známému riziku toxicity a mohla by pro něj být navržena jiná forma terapie. Dihydropyrimidin dehydrogenáza je enzym, který katabolicky degraduje více než 80 % přijatého 5-fluorouracilu a limituje tak jeho účinnost.

Poděkování: Práce na projektu byla podporována granty MSM6198959216 a IGA MZCR NC7495.

Vliv onkologické léčby na cirkulující markery srdečního poškození v peritransplantačním období u akutních leukémií

^{1,4}Horáček J. M., ^{2,4}Tichý M., ^{1,4}Jebavý L.,

³Pudil R., ¹Žák P., ¹Malý J.

¹II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie FN a LF UK Hradec Králové

²Ústav klinické biochemie a diagnostiky FN a LF UK Hradec Králové

³I. interní klinika FN a LF UK Hradec Králové

⁴Katedra válečného vnitřního lékařství FVZ UO Hradec Králové

Úvod: Kardiotoxicita je dobře známou a obávanou komplikací onkologické léčby. Antracykliny a vysokodávkovaná chemoterapie představují největší riziko. V poslední době se do popředí zájmu diagnostiky kardiotoxicity dostávají biochemické markery poškození struktury a funkce myokardu, zatím však chybí definitivní klinické vyhodnocení.

Cíl: Hodnocení kardiotoxicity v peritransplantačním období u akutních leukémií (AL) pomocí cirkulujících markerů srdečního poškození – N-ter-

minální pro brain natriuretický peptid (NT-proBNP) a srdeční troponin T (cTnT). NT-proBNP je markerem kardiální dysfunkce, hodnoty pod 125 pg/ml jsou považovány za normální a umožňují vyloučit srdeční selhání. Pozitivita cTnT svědčí pro poškození struktury kardiomyocytů.

Soubor a metodika: Ve studii bylo 19 pacientů s AL (věk 42,8±10,0 let, 13 mužů), všichni byli v minulosti léčeni antracykliny v kumulativní dávce (KD) 446,4±91,6 mg/m². Přípravný předtransplantační režim (PR) obsahoval vysokodávkovaný cyklofosfamid (HD-C) a busulfan u 13 pacientů, HD-C a celotělové ozáření (TBI) 12 Gy u 6 pacientů. U 10 pacientů byla provedena alogenní transplantace krvetvorných buněk (TKB), u 9 autologní TKB. Koncentrace NT-proBNP a cTnT byly měřeny den před PR, den po PR, den po TKB a s odstupem 14 dní tj. v době reparační krvetvorby.

Výsledky: Vstupní hodnota NT-proBNP byla 106,3±55,7 pg/ml. Po PR došlo k vzestupu na 426,1±391,5 pg/ml. Po TKB došlo k dalšímu vzestupu na 847,6±780,6 pg/ml. Za 14 dní po TKB byla koncentrace NT-proBNP 330,8±236,8 pg/ml, hodnoty byly zvýšené u 12 pacientů. Rozdíly byly statisticky významné v porovnání se vstupní hodnotou (p<0,01). Vzestup NT-proBNP byl vyšší u pacientů s KD antracyklinů nad 450 mg/m² (p<0,05), u pacientů s PR obsahujícím TBI (p<0,05) a u pacientů s alogenní TKB (p<0,05). Koncentrace cTnT byly negativní (<0,01 ng/ml) během studie u všech pacientů.

Závěry: Naše výsledky ukazují, že podání PR a TKB je u většiny pacientů s AL provázeno akutní neurohumorální aktivací (významný vzestup NT-proBNP). Perzistující elevace NT-proBNP, v našem souboru u 12 (63,2%) pacientů, naznačují subklinickou kardiotoxicitu (riziko pro rozvoj srdečního selhání) a vyžadují další sledování. Více vyjádřené elevace NT-proBNP při podání vyšších KD antracyklinů a při PR obsahujícím kombinaci vysokodávkované chemoterapie s radioterapií potvrzují, že tyto léčebné postupy jsou více kardiotoxické a nepříliš vhodné pro pacienty s kumulací rizikových faktorů kardiotoxicity. Negativní koncentrace cTnT ukazují, že během PR a TKB nedochází k detekovatelnému poškození struktury kardiomyocytů.

Elektrokardiografické změny v souvislosti s onkologickou léčbou

^{1,4}Horáček J. M., ²Pudil R., ^{1,4}Jebavý L.,

³Pástorová J., ¹Štrasová A., ¹Malý J.

¹II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie FN a LF UK Hradec Králové

²I. interní klinika FN a LF UK Hradec Králové

³Klinika gerontologická a metabolická FN a LF UK Hradec Králové

⁴Katedra válečného vnitřního lékařství FVZ UO Hradec Králové

Úvod: Kardiotoxicita je závažnou komplikací onkologické léčby. Největší riziko představují antracykliny. Vzhledem k riziku chronické a pozdní kardiotoxicity je nutné sledování kardiálních funkcí jak během léčby antracykliny, tak po jejím ukončení. Elektrokardiografie (EKG) je jednou z diagnostických možností kardiotoxicity. QT interval korigovaný na srdeční frekvenci – tzv. QTc interval – odráží trvání komorové repolarizace a jeho prodloužení představuje riziko pro rozvoj maligních komorových arytmií a náhlé smrti.

Cíl: Sledování EKG změn v průběhu léčby antracykliny a v období po jejím ukončení u pacientů s akutní leukémií (AL). Porovnání EKG změn s nálezem na echokardiografickém (ECHO) vyšetření.

Soubor a metodika: Ve studii bylo 26 pacientů s nově dg. AL (věk 46,2±12,4 let, 15 mužů). Pacienti byli léčeni 2–6 cykly chemoterapie (CHT) obsahují antracyklinový preparát (idarubicin, daunorubicin, mitoxantron). Průměrná kumulativní dávka antracyklinů činila 464,4±117,5 mg/m². U 16 pacientů byl následně podán přípravný režim a provedena transplantace krvetvorných buněk. Klidové 12svodové EKG vyšetření s posunem 50 mm/s bylo provedeno před zahájením léčby (před CHT), po první CHT s antracykliny (po 1. CHT), po poslední CHT s antracykliny (po posl. CHT) a s odstupem přibližně 6 měsíců po ukončení léčby (1/2 R po CHT). Hodnoceny byly EKG parametry časové (srdeční frekvence, RR interval, PQ interval, délka QRS, QT interval, QTc interval), voltážové (voltáž QRS) a přítomnost repolarizačních změn, poruch srdečního rytmu či jiných abnormalit. Celkem bylo vyhodnoceno 104 EKG křivek.

Výsledky: Výsledky studie jsou přehledně uvedeny v tabulce 1 a 2.

Vysvětlivky: tachykardie – srdeční frekvence nad 100/min; bradykardie – srdeční frekvence pod 60/min (pod 50/min); AV blok I. stupně – PQ interval delší než 200 ms; iRBBB (inkompletní blok pravého Tawarova raménka) – RSR' V1 (V2), délka QRS menší než 120 ms; LAH (levý přední hemiblok) – deviace srdeční osy doleva, osa méně než

Tabulka 1. Změny EKG parametrů v průběhu léčby a sledování AL (n=26)

EKG parametry	před CHT	po 1. CHT	po posl. CHT	1/2 R po CHT
frekvence [1/min]	83,2 ± 15,8	76,3 ± 15,1	70,2 ± 8,8	81,7 ± 15,6
RR interval [ms]	748,3 ± 152,4	814,1 ± 150,3	866,8 ± 150,3	762,0 ± 157,4
PQ interval [ms]	156,2 ± 20,2	160,4 ± 25,1	165,8 ± 25,5	158,8 ± 20,1
délka QRS [ms]	84,6 ± 10,3	87,3 ± 11,9	89,2 ± 8,9	87,7 ± 9,1
QT interval [ms]	357,5 ± 33,3	357,6 ± 21,8	397,5 ± 22,9	373,1 ± 34,4
QTc interval [ms]	414,7 ± 16,0	419,6 ± 21,6	428,0 ± 16,2	430,1 ± 18,4
voltáž QRS [mV]	4,58 ± 1,31	4,57 ± 1,55	4,42 ± 1,15	4,22 ± 1,06

Tabulka 2. Výskyt patologických EKG nálezů v průběhu léčby a sledování AL (n=26)

EKG patologie	před CHT	po 1. CHT	po posl. CHT	1/2 R po CHT
tachykardie	4	3	0	3
bradykardie	1 (0)	3 (0)	1 (0)	1 (1)
AV blok I. st.	0	1	5	2
iRBBB	1	2	3	3
LAH	0	1	2	3
nespec. repol. změny	5	8	11	12
prodloužený QTc	6 (1)	8 (3)	16 (7)	15 (9)
snížení voltáže QRS	-	3	5	6

-30°; nespecifické repolarizační změny – změny úseku ST a vlny T ve 2 a více svodech; prodloužený QTc – QTc interval nad 420 ms pro muže, nad 430 ms pro ženy (nad 440 ms bez rozdílu pohlaví); snížení voltáže QRS – snížení o 1,0 a více mV v porovnání s hodnotou před CHT.

Po posl. CHT a 1/2 R po CHT došlo ke statisticky významnému prodloužení QTc intervalu ve srovnání se vstupní hodnotou ($p < 0,01$). Prodloužený QTc interval nad 440 ms byl před CHT u 1, po 1. CHT u 3, po posl. CHT u 7 a 1/2 R po CHT u 9 pacientů. Ke snížení voltáže QRS o 1 a více mV oproti hodnotě před CHT došlo po 1. CHT u 3, po posl. CHT u 5 a 1/2 R po CHT u 6 pacientů. Prokázali jsme statisticky významnou korelaci mezi sníženou voltáží QRS, prodlouženým QTc intervalem na EKG a poruchou systolické a diastolické funkce LK na ECHO vyšetření. Repolarizační změny v souvislosti s prodělanou léčbou (nově vzniklé nebo zhoršení již vstupně existujících změn) byly 1/2 R po CHT přítomny u 9 pacientů.

Závěry: V naší studii jsme prokázali, že během léčby antracykliny i v období po léčbě dochází ke změnám elektrické aktivity myokardu. Prodloužený QTc interval, v našem souboru u 9 (34,6%) pacientů 1/2 R po CHT, představuje riziko pro vznik komorových arytmií a náhlé smrti. U těchto pacientů je nutné sledování QTc intervalu v čase, pátrání po minerálové dysbalanci s eventuální korekcí a racionální preskripce léků prodlužujících QTc interval.

V naší studii prodloužený QTc interval a snížená voltáž QRS po léčbě antracykliny dobře korelovaly s poruchou funkce LK na ECHO vyšetření. Pokud bude toto zjištění ověřeno v dalších studiích na větším počtu pacientů, mohly by v budoucnosti tyto EKG změny sloužit jako dostupná a neinvazivní screeningová metoda naznačující poruchu funkce LK po léčbě antracykliny.

Tumorové markery jako prediktivní a diagnostické faktory

Kapustová M.¹, Schneiderka P.¹, Krejčí E.², Beneš P.², Cwierzka K.²

¹OKB a ²Onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc

Humorální tumorové markery jsou jsou běžně laboratorně dostupné molekulární prediktory, které pomáhají v klinické praxi včas hodnotit efekt daného typu léčby, u neléčených zase s předstihem předvídat pravděpodobnost vzniku i lokalizaci metastáz.

Jen výjimečně lze některé markery použít také pro primární diagnostiku.

Nádorové markery jako prognostické faktory se využívají pro individuální výběr a predikci klinické účinnosti adjuvantní léčby.

Počítačové matematicko-statistické programy (BIANTA, CRACLES) nám pomáhají hledat primární nádor při průkazu metastáz neznámého původu na základě vyšetření markerů, věku a pohlaví nemocného a epidemiologických údajů.

Naše sdělení uvádí několik kazuistik, které slouží jako příklady přínosu vyšetření cirkulujících tumorových markerů.

ATM jako predispoziční faktor vzniku karcinomu prsu

Prokopcová J., Janatová M., Pohlreich P.

Ústav biochemie a experimentální onkologie,

1. LF UK, Praha

Úvod: Ataxia-telangiectasia (A-T) je autozomálně recesivní onemocnění způsobené mutacemi v genu ATM (A-T mutated). Přibližně 70% všech mutací odpovědných za A-T jsou mutace, které způsobují předčasně zkrácení proteinu. A-T je onemocnění charakterizované mozečkovou ataxií, okulokutánními telangiectasiemi, defekty imunitního systému, zvýšenou citlivostí k ionizujícímu záření a predispozicí ke vzniku nádorů. U nosičů mutace genu ATM, kteří tvoří 0,5–1% běžné populace, bylo zjištěno vyšší riziko vzniku karcinomu prsu. Cílem studie bylo analyzovat výskyt mutací genu ATM u pacientů s dědičnou predispozicí ke karcinomu prsu a/nebo ovaria.

Materiál a metody: Kódující sekvence genu ATM byla analyzována u pacientek z rizikových rodin s výskytem karcinomu prsu a/nebo ovaria s negativním výsledkem mutační analýzy hlavních predispozičních genů BRCA1/2. K analýze byla použita RNA izolovaná z lymfocytů periferní krve. Její sekvence byla zpětně přepsána do cDNA a amplifikována v sedmi překrývajících se fragmentech. Pre-screening mutací způsobujících předčasně zkrácení proteinu byl proveden pomocí PTT (Protein Truncation Test). Mutace byly potvrzeny automatickým sekvenováním.

Výsledky: Bylo vyšetřeno 135 pacientek s karcinomem prsu a byly nalezeny 3 inaktivující mutace – nonsense mutace c.5932G>T a dvě sestříhové mutace: IVS36+1G>A a IVS43-9del5. Mutace c.5932G>T vede k předčasné terminaci translace

v kodonu 1978. Tato mutace byla popsána jako příčina A-T. Mutace IVS36+1G>A, která vede k porušení 5'místa sestříhu a aberantnímu sestříhu exonu 36, nebyla dosud popsána ani u A-T pacienta, ani jako příčina vzniku nádoru. Druhá sestříhová mutace, IVS43-9del5, která porušuje polypyrimidinový úsek v intronu 43 a vede k sestříhu exonu 44, byla popsána u A-T pacienta v heterozygotním stavu. Obě mutace vedou k sestříhu sousedících exonů (36, resp. 44) a způsobují posun čtecího rámce a předčasně ukončení translace.

Diskuze: Ve skupině 135 pacientek s dědičnou predispozicí ke karcinomu prsu byly zachyceny 3 mutace způsobující předčasně ukončení translace (2,2%). Podobná četnost mutací ATM (2,6%) byla nalezena i v rakouských vysoce rizikových rodinách. Obě studie shodně prokazují zvýšený výskyt ATM mutací v analyzovaných rodinách a naznačují úlohu tohoto genu při vývoji dědičného karcinomu prsu. Četnost dědičných mutací je ovšem výrazně nižší než četnost mutací hlavních predispozičních genů. Analýza vyššího počtu rizikových rodin bude nutná pro přesné určení úlohy genu ATM v tumorigenезi.

Poděkování: Studie byla podpořena grantem IGA MZ ČR, č. NC 7527-3 a Výzkumným záměrem MŠMT č. MSM0021620808

Kvalita života nemocných po transplantaci krvetvorných buněk na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN Hradec Králové: transversální, retrospektivní studie

^{1,2} Slováček L., ³ Slováčková B., ^{1,2} Jebavý L., ² Blažek M.

¹Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové

²II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie Fakultní nemocnice, Hradec Králové

³Psychiatrická klinika Fakultní nemocnice, Hradec Králové

Transplantace krvetvorných buněk je specifickou léčebnou metodou užívanou nejen v terapii hematologických onemocnění, ale i v terapii solidních tumorů a v neposlední řadě i v terapii nenádorových onemocnění. Podobně jako jiné léčebné metody, transplantace krvetvorných buněk ovlivňuje další průběh onemocnění, a tím i kvalitu života nemocného.

Kvalita života je obecně definována jako „subjektivní posouzení vlastní životní situace“. Pojem kvalita života zahrnuje údaje o fyzickém, psychickém, sociálním a spirituálním stavu jedince. Hodnocení kvality života je prováděno generickými a specifickými dotazníky. Generické dotazníky všeobecně hodnotí celkový stav nemocného bez ohledu na dané onemocnění. Specifické dotazníky jsou koncipovány pro hodnocení celkového stavu nemocného u konkrétního typu onemocnění nebo pro hodnocení specifického aspektu kvality života (např. bolest, únava,

apod.). Se specifickými dotazníky jsou často užívány tzv. moduly zaměřené na specifické symptomy a obtíže u daného typu onemocnění.

Na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky Fakultní nemocnice v Hradci Králové, proběhla v roce 2004 transversální, retrospektivní studie analyzující vybrané faktory ovlivňující kvalitu života nemocných po transplantaci krevetvorných buněk. Celkový počet nemocných po transplantaci krevetvorných buněk na Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN Hradec Králové v letech 2001–2003 byl 171 (135 nemocných po autologní transplantaci, 36 nemocných po alogenní transplantaci), celkový počet respondentů byl 95 (po odečtu 60 exitů a 16 retransplantací z celkového počtu 171). Počet respondentů transplantovaných v letech 2001–2003 byl následující: rok 2001: 20 respondentů (10 mužů, 10 žen), věkový medián 55,5 roku, rok 2002: 20 respondentů (10 mužů, 10 žen), věkový medián 55,0 let, rok 2003: 31 respondentů (19 mužů, 12 žen), věkový medián 55,5 roku. Z celkového počtu 71 respondentů bylo 66 respondentů po autologní transplantaci a 5 respondentů po alogenní transplantaci (za rok 2001 žádný respondent, za rok 2002 2 respondenti a za rok 2003 3 respondenti). Ve skupině alogenně transplantovaných nemocných byli 3 nemocní s chronickou formou reakce štěpu proti hostiteli I. stupně, jednalo se o nemocné s akutní myeloidní leukémií.

K otestování byla použita česká verze mezinárodního generického dotazníku **European Quality of Life Questionnaire – Version EQ-5D**. Dotazník hodnotí 2 ukazatele, objektivní a subjektivní. Objektivní ukazatel zahrnuje 5 dimenzí kvality života: pohyblivost, sebeobsluha, obvyklá činnost, bolest (obtíže, úzkost) deprese. Výstupem je EQ-5D index (dimenze kvality života) nabývající hodnot 0–1 (0 – nejhorší zdravotní stav, 1 – nejlepší zdravotní stav). Subjektivní ukazatel zahrnuje vizuální analogovou škálu (hodnota 100 – nejlepší zdravotní stav, hodnota 0 – nejhorší stav). Výstupem je EQ-5D VAS (subjektivní zdravotní stav) nabývající hodnot 0–100. Dotazník s osobním průvodním dopisem vysvětlující danou akci a s žádostí o pečlivé vyplnění dotazníku byl zaslán na adresu pacienta s ohranovanou obálkou k zpětnému zaslání. Návratnost dotazníků byla 72,1% (od 71 respondentů), hodnotitelných dotazníků bylo 100%.

Sledovanými faktory byly: **věk, pohlaví, vzdělání, rodinný stav, abusus kouření, religiozita, polymorbidita, typ transplantace krevetvorných buněk (autologní / alogenní), typ onemocnění, časový odstup od provedení transplantace krevetvorných buněk**. Statistické zpracování dat bylo provedeno analýzou rozptylu.

Z výše uvedených faktorů jsme prokázali statisticky významnou závislost EQ-5D indexu a EQ-5D VAS **na věku** (v obou případech $p < 0,01$), **polymorbiditě** (v obou případech $p < 0,01$), **religiozitě** (v obou případech $p < 0,01$) a **typu onemocnění** (v obou případech $p < 0,05$). EQ-5D index (dimenze kvality života) a EQ-5D VAS (subjektivní zdravotní stav) s rostoucím věkem a vyšším počtem přídr-

žených onemocněním signifikantně klesá. U věřících nemocných je signifikantně vyšší kvalita života v porovnání s nemocnými bez náboženské vyznání. Signifikantně nejnižší kvalita života byla prokázána u nemocných s mnohočetným myelomem. Vliv ostatních faktorů na EQ-5D index a EQ-5D VAS se jako statisticky významný neprokázal.

Jsmo si vědomi, že naše studie je limitována několika faktory:

1. transversální typ studie nás informuje pouze o stávajícím stavu kvality života našich pacientů po transplantaci krevetvorných buněk, neukazuje vývojový trend. Transversální studii jsme volili vzhledem k časově omezenému trvání doktorského studia.
2. studie se zabývá vlivem pouze vybraných faktorů na kvalitu života. Několik dalších faktorů by bylo možno doplnit. Volili jsme však ty faktory, které byli pacienti schopni a ochotni v retrospektivně a anonymně prováděné studii poskytnout.
3. malý soubor alogenně transplantovaných nemocných a zejména malý soubor alogenně transplantovaných nemocných s projevy chronické reakce štěpu proti hostiteli (cGVHD). Nemůžeme tedy blíže zhodnotit vliv cGVHD na kvalitu života. Velikost a složení souboru respondentů je dána spektrem pacientů léčených na našem oddělení.

V klinické praxi je běžné posuzovat zdravotní stav pacienta a úspěšnost léčby pouze v jedné medicínské rovině, nejčastěji pomocí somatických, laboratorních a zobrazovacích markerů. Trendem moderní medicíny však je posuzovat stav pacienta komplexněji, za pomoci i dalších aspektů. Více dimenzionální měřítka k posouzení celé řady životních aspektů představuje kvalita života. Různé aspekty mohou být v různé fázi onemocnění a léčby rozdílně zasaženy. A právě tyto informace obohacují naše poznání o potřebách pacienta a mohou tak významně přispět ke kvalitě péče. Také nám mohou odhalit mechanismy, které modifikují vznik a průběh onemocnění. V zahraničí jsou velmi dobré zkušenosti s tzv. „Quality of Life Team“ personálně obsazených ošetřujícím lékařem, v případě transplantace krevetvorných buněk lékař – hematolog – transplantolog, střední zdravotnický personál edukovaný v problematice kvality života nemocných, klinický psycholog, psychoterapeut, sociální pracovník a v neposlední řadě datamanager. Důvodem, proč zřizovat tyto speciální týmy je, že péči o nemocného a jeho rodinu je připravováno prostředí, do kterého se nemocný vrací po proběhlé transplantaci krevetvorných buněk a které ovlivňuje jeho adaptaci.

Pokud je nám známo, je naše studie jednou z mála českých studií týkající se kvality života u hematologických nemocných. Studie mapuje kvalitu života u těchto nemocných, konkrétně u nemocných po transplantaci krevetvorných buněk. Přestože je transplantace krevetvorných buněk pro pacienty velmi fyzicky i psychicky náročná, zachovává jejich

kvalitu života na velmi dobré úrovni. Do budoucna bychom rádi navázali na tuto studii longitudinální studií zaměřenou na hodnocení kvality života ve vztahu ke zdraví, která bude více orientovaná na charakteristiky příslušných onemocnění a způsobů předtransplantační přípravy a typu transplantace.

Literatura

1. The EUROQOL GROUP. EuroQol – a new facility for the measurement of health-related quality of life. *Health Policy*, 1990; 16 (3): 199–208.
2. VAN AGTHOVEN M. – VELLENGS E. – FIBBE W.E., et al. Cost analysis and quality of life assessment comparing undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation or autologous bone marrow transplantation for refractory or relapsed non-Hodgkins lymphoma or Hodgkins disease, a prospective randomised trial. *Eur J Cancer*, 2001; 37 (14): 1781–1789.
3. WANG W.Q., LIN, G.W. Study on quality of life in long-term survivors with acute leukemia in Shanghai. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 2003; 24 (11): 1049–1051
4. WONG R. – GIRALT S.A. – MARTIN T., et al. Reduced-intensity conditioning for unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation as treatment for myeloid malignancies in patients older than 55 years. *Blood*, 2003; 102 (8): 3052–3059
5. YOU L.M. – FIELDING R. – CHAN C.L.W. et al. (2000). Measuring Quality of Life of Chinese Cancer Patients – A validation of the Chinese Version of the Functional Assessment of cancer Therapy-general (FACT-G) Scale. *Cancer*, 2000; 88 (9): 1715–1722.
6. ZITTOUN R. – ACHARD S. – RUSZNIEWSKI M. (1999). Assessment of quality of life during intensive chemotherapy bone marrow transplantation. *Psychooncology*, 1999; 8 (1): 64–73.

Plasma concentrations of angiogenic activators VEGF and bFGF in patients with multiple myeloma, follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma, and chronic myeloid leukemia

¹Smolej L., ²Andrýs C., ³Pour L., ¹Žák P., ¹Belada D., ¹Maisnar V., ¹Hrudková M., ²Novosad J., ¹Šíroky O., ²Krejsek J., ¹Voglová J., ¹Malý J.

¹2nd Department of Internal Medicine, Department of Clinical Hematology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové

²Institute of Clinical Immunology and Allergology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové

³Internal Hematooncology Department, Masaryk University Hospital and Medical School, Brno

Background: Angiogenesis, i.e. development of new blood vessels from preexisting vasculature, has been recently shown to be involved in pathogenesis and progression of various hematological malignancies. Angiogenic cytokines, e.g. vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) can be detected in peripheral blood in virtually all hematological malignancies. In our study, we measured peripheral blood concentrations of VEGF and bFGF in patients with newly diagnosed untreated multiple myeloma. Commercially available sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to determine peripheral blood plasma levels of VEGF and bFGF in patients with multiple myeloma (MM, n=45), follicular lymphoma (FL, n=11), diffuse large B-cell lym-

phoma (DLBCL, n=15), and chronic myeloid leukemia (CML, n=9). Plasma specimens from 50 healthy donors served as the control group.

Results: We found significant increased bFGF in MM ($p<0,0001$) and FL ($p=0,0119$) whereas VEGF was significantly elevated in MM ($p=0,0386$) and CML ($p<0,0001$). Conclusions: We detected significant elevation of peripheral blood plasma VEGF and bFGF in patients with multiple myeloma and chronic myeloid leukemia and significantly elevated bFGF (but not VEGF) in follicular lymphoma. Diffuse large B-cell lymphoma was not significantly different from controls in both investigated cytokines. Our future study will include analysis of prognostic significance on patients' survival, especially in those who undergo high dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation.

Acknowledgement: Supported by grants NR/8076-3 and NR/8373-3 from Ministry of Health, Czech Republic.

Analýza obsahu metalothioneinu u pacientů s nádorovým onemocněním

¹Svoboda M., ¹Blašík O., ²Průša R.,

²Kučačka J., ^{1,4}Zitka O., ^{1,3}Adam V., ¹Petřová J.,

¹Zehnálek J., ¹Kizek R

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně

²Ústav klinické biochemie a pathobiochemie, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze

³Katedra analytické chemie a ⁴Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně

Úvod: Každým rokem je ve světě diagnostikováno více než 10 miliónů nových případů nádorových onemocnění. Zhoubná onemocnění mají za následek úmrtí více než 6 milionů lidí v rozvinutých zemích (první místo žebříčku stále náleží kardiovaskulárním onemocněním). Ministerstvo zdravotnictví ČR a Česká onkologická společnost vyhlásili program zaměřený na pokles výskytu zhoubných onemocnění v české populaci. Značná pozornost by měla být věnována především (ve smyslu Národního onkologického programu ČR);

- primární prevenci a výchově k udržení zdraví
- „screeningovým“ programům využívajícím nových moderních technologií
- zlepšení časné diagnostiky mezi něž náleží i nové potencionální markery
- vytvoření sítě specializovaných pracovišť
- podpora výzkumných projektů.

Řada výzkumných skupin hledá vhodné markery pro nádorovou diagnostiku, anebo pro sledování efektivity použité protinádorové léčby. Nedávno bylo publikováno, že množství metalothioneinu (MT) se mění u řady zhoubných nádorů (nádory prsu, kůže a pankreatu a další). Metalothioneiny patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních, na cystein

velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30 % v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa. Je pravděpodobné, že změny v expresi MT mohou být případným prognostickým markerem u celé řady zhoubných nádorových onemocnění. Z tohoto důvodu je potřebné studovat změny MT u pacientů se zhoubnými nádory pomocí jednoduchých a rychlých analytických postupů.

Cíl. Práce je zaměřena na studium obsahu metalothioneinu u pacientů s nádorovým onemocněním.

Materiály a metody

Klinický materiál: V průběhu prvního pololetí roku 2005 byla získána séra od pacientů léčených pro zhoubný nádor na různých odděleních FN Motol. Pokud to bylo možné, byly sledovány základní biochemické ukazatele (ALP, AST, ALT, GMT a nádorový marker CA 15–3). Krevní séra byla ihned zmrazena na -20 °C do doby jejich dalšího zpracování. Celkem bylo analyzováno 70 sér pacientů.

Elektroanalytické stanovení metalothioneinu pomocí Brdičkovy reakce metodou AdTS DPV

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Netherlands) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland) v klasickém tříelektroodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol.dm⁻³ Co(NH₃)₆Cl₃ a 1 mol.dm⁻³ amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl, pH = 9,6) byl po každých 5 analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, E_{ads} = 0 V, teplota 0 °C.

Výsledek: Před více než sedmdesátí lety objevil Rudolf Brdička katalytické vylučování vodíku ze základního elektrolytu v přítomnosti proteinů. V této práci jsou popsány prvotní experimentální výsledky stanovení obsahu metalothioneinu u pacientů se zhoubnými nádory (v různém stadiu a fázi onemocnění a léčby) pomocí Brdičkovy reakce. Vzorky krevních sér byly odebírány v průběhu prvního pololetí roku 2005, a pokud to bylo možné, byly charakterizovány z hlediska základních biochemických ukazatelů. Analýza MT byla provedena námi modifikovaným elektroanalytickým postupem (diferenční pulzní voltametrie v kombinaci s adsorptivní přenosovou voltametří). Vzorek byl adsorbován z 5 µl kapky na povrch pracovní elektrody, poté byl přebytný roztok z povrchu elektrody omyt a modifikovaná elektroda byla umístěna do měřicí nádoby. Na získaných voltamogramech byl pozorován rozdílný průběh záznamu u pacientů s různými zhoubnými nádory. Nejvýraznější katalytické signály byly pozorovány u pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva. V naší předešlé práci jsme se pokusili určit průměrnou hladinu MT u zdravých lidí, která kolísá

okolo 0,6±0,3 µmol.dm⁻³ MT. Zjistili jsme, že u pacientů s nádory prsu byl průměrný obsah MT 1,6 µmol.dm⁻³. V případě pacientů s melanomem byla průměrná hladina MT 1,97 µmol.dm⁻³. U pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva byla průměrná hladina MT 3,2 µmol.dm⁻³, tedy 2krát vyšší než u pacientů s nádorem prsu. Vyšší hladina MT byla pozorována u všech pacientů s vyššími hodnotami jaterních enzymů. Velmi zajímavá shoda byla také pozorována mezi hodnotou nádorového markeru CA 15-3 a hladinou MT. Vztahu nádorového markeru CA 15-3 a hladiny MT se bude věnovat naše další práce.

Závěr: Elektroanalytických technik je možné využít pro analýzu významných biologicky aktivních proteinů u pacientů se zhoubnými nádory. Ze získaných experimentálních výsledků je zřejmé, že hladina sérového MT výrazně stoupá u většiny pacientů se zhoubnými nádory. Navíc u pacientů se zhoubným nádorem tlustého střeva a melanomem byl nárůst hladiny MT výrazně vyšší ve srovnání s pacienty se zhoubným nádorem prsu.

Poděkování. Tato práce byla podpořena granty: GA ČR 525/04/P132 a RASO 8/2005.

Literatura

1. R. Kizek et al.: Anal. Chem. 73 (2001) 4801.
2. M. Strouhal et al.: Bioelectrochemistry 60 (2003) 29.
3. L. Trnkova et al.: Bioelectrochemistry 56 (2002) 57.
4. R. Prusa et al.: Clin. Chem. 50 (2004) A28.
5. R. Prusa et al.: Clin. Chem. 51 (2005) A56.
6. J. Petřová et al.: Klinická Onkologie (2005) odesláno.
7. J. Zelena et al.: Klinická Onkologie 17 (2004) 190.
8. R. Kizek et al.: Klin. Biochem. Metab. 12 (2004) 72.
9. R. Kizek et al.: Chem. Listy 98 (2004) 166.
10. E. Paleček et al.: Anal. Chem. 76 (2004) 5930.

Relativní kvantifikace nádorově specifických antigenů MAGE u mnohočetného myelomu

^{1,2} Vigášová J., ² Kadlecová J., ² Spěšná R.,

² Gaillyová R., ³ Penka M., ^{1,4} Hájek R.

¹Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie při odd. klinické hematologie, FN Brno

²Oddělení lékařské genetiky, FN Brno

³Oddělení klinické hematologie, FN Brno

⁴Interní hematologická klinika, FN Brno

Geny MAGE (Melanoma Antigen Gene) rodiny kódují antigenní peptidy, které jsou prezentovány HLA molekulami třídy I a rozpoznávány na lidských nádorech cytotoxickými T lymfocyty. MAGE patří mezi tzv. cancer/testis antigeny (CTA), které bývají exprimovány u mnoha typů solidních nádorů, avšak nikoliv ve zdravé tkáni. Jedinou zdravou tkání exprimující tyto antigeny jsou mužské zárodečné buňky (spermatogonie) a placentární trofoblast. MAGE antigeny jsou nádorově specifické, tudíž jsou využívány jako onkologické markery a při nádorové imunoterapii. MAGE se aktivují v nádorových buňkách následkem demethylace CpG dinukleotidů ve svých promotorech. Expres MAGE A rodiny byla prokázána u melanomu,

karcinomu plic, vaječníků, močového měchýře, žaludku, jícnu, kolorektálního karcinomu, karcinomu hlavy a krku, neuroblastomu, mnohočetného myelomu (MM) a dalších malignit. Často bývají koexprimovány s jinými rodinami cancer/testis antigenů, např. BAGE, GAGE, NY-ESO-1/LAGE-1.

V myelomových buňkách byla prokázána přítomnost RNA transkriptů kódujících některé geny MAGE, nejčastěji MAGE A-1, MAGE A-3 a dále NY-ESO-1 a CT-7/MAGE-C1. Cílem této práce bylo zavedení metody kvantitativního stanovení nádorových antigenů u pacientů s MM, kteří jsou rovněž prospektivně sledováni po stránce genetické, biochemické a imunologické. Kvantitativní stanovení nádorových antigenů MAGE A-1 a MAGE A-3 bylo zavedeno pomocí metody Q-PCR v reálném čase na přístroji LightCycler (Roche Diagnostics, Germany). Toto vyšetření umožňuje vysoce specifickou, dobře reprodukovatelnou a citlivou kvantifikaci mRNA transkriptů v průběhu několika hodin. Z kostní dřeně nebo periferní krve se metodou TRIzol (Invitrogen) izoluje celková RNA, která se následně přepíše do cDNA s použitím Transcriptor reverzní transkriptázy. Pro Q-PCR se využívá systému dvojice fluorescenčně značených hybridizačních sond (FRET), které jsou komplementární k vnitřní části amplifikované sekvence. K relativní kvantifikaci se využívá ředící řady externího standardu, kterým je vhodně zvolený referenční gen (G6PDH). Cílová koncentrace je vyjádřena v poměru ke koncentraci referenčního genu měřené ve stejném vzorku. Optimalizace metody byla provedena na myelomové linii U266, která exprimuje MAGE A-1 a MAGE A-3. Metoda je ověřována na souboru pacientů s diagnózou monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS) a mnohočetný myelom (stádium tzv. doutnající myelom, I.A a pokročilá stadia). Výsledky kvantitativního stanovení antigenů MAGE u pacientů s různým stádiem onemocnění MM budou prezentovány.

Interpretace výsledků nádorových markerů

²Zehleová J., ²Topolčan O., ⁴Třeška V.,

¹Polívková V., ⁵Bartoš V., ⁵Šafářčik K.,

¹Svobodová Š., ³Fínek J., ³Holubec L.

¹Universita Karlova-Lékařská fakulta Plzeň-
Centrální radioizotopová laboratoř

²FN Plzeň – Bory – oddělení nukleární medicíny-
úsek imunodiagnostiky

³FN Plzeň – Bory – RTO

⁴FN Plzeň – Lochotín – chirurgická klinika

⁵FNsP Ostrava – Poruba – klinika nukleární
medicíny-úsek imunoanalýzy

Cíl studie: Zajistit optimální vyhodnocení nádorových markerů v klinické praxi.

Výsledky: Autoři prezentují různé možnosti interpretace výsledků nádorových markerů. Prezentují návrh optimálního stanovení senzitivity, specifity a ROC křivek pro posouzení jak předoperačních hodnot tak při follow up nádoru. Současně prezentu-

jí nejčastější chyby s kterými se lze setkat v rutinní praxi. Věnují se otázce normálních hodnot, vyhodnocení a interpretaci výsledků a diskutují optimální prezentaci výsledku (počítačová, grafická, slovní komentář).

Závěry: Interpretace nádorových markerů musí být pojata interdisciplinárně (úzká spolupráce laboratorních a klinických pracovníků). Výsledek (předešlým follow up) by měl mít obdobně jak je tomu v doporučení EGTM grafický výstup a současně i slovní komentář.

Využití in vitro expandovaných tumor infiltrujících lymfocytů u pacientů s metastazujícím melanomem

Vidláková P.¹, Smejkalová J.¹, Očadlíková D.¹,

Kovářová L.¹, Hanák L.¹, Zahradová L.¹,

Hájek R.¹, Michálek J.¹⁻³, Penka M.¹

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

²I. dětská interní klinika, Fakultní nemocnice Brno

³Univerzitní onkologické centrum, Masarykova univerzita Brno

Cíl: Cílem této pilotní studie je využití protinádorového potenciálu expandovaných Tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) u pacientů s metastatickým melanomem. Účinnost adoptivního převodu T lymfocytů při léčbě nádorového onemocnění byla prokázána u laboratorních zvířat a v současné době také u pacientů s metastatickým melanomem.

Metodika: V naší studii byla nejprve prospektivně validována expanze lymfocytů periferní krve pěti zdravých dárců a poté čtyř pacientů s metastazujícím melanomem. Nejprve byly lymfocyty zdravých dárců stimulovány in vitro nádorovým antigenem. Stimulované aktivované klonální T lymfocyty exprimují celou řadu aktivačních markerů, včetně interferonu gama a lze je tudíž separovat pomocí imunomagnetických interferon gama pozitivních kuliček. Takto separované aktivované T lymfocyty byly stimulovány vysokými dávkami IL-2 (1000U/ml) 2–3 × týdně a jednorázově phytohemagglutininem (10 µg/ml) in vitro za přítomnosti tzv. „feeder cells“.

Výsledky: Úvodní počet separovaných T buněk činil $0,56 \pm 0,13 \times 10^6$ a po 4-týdenní expanzi dosáhl počtu $214,00 \times 10^6 \pm 103,46 \times 10^6$. Na základě těchto úspěšných experimentů bylo přistoupeno k expanzi TIL u 4 pacientů (3× lymfatická uzlina, 1× primární ložisko kožního melanomu) přímo z nádorové tkáně. V případě všech tří nádorových uzlin byla expanze TIL zahajována s počtem buněk $5,2 \times 10^6$, $2,9 \times 10^6$, $15,8 \times 10^6$ po kultivaci došlo k nárůstu na $27,0 \times 10^9$, $56,0 \times 10^9$ a $3,4 \times 10^9$ TIL buněk. V případě kultivace TIL z primárního ložiska nádoru došlo pouze k minimálnímu nárůstu z $2,2 \times 10^6$ na $12,1 \times 10^6$ TIL. Z tohoto důvodu je rovněž v protokolu klinické studie navrhováno využívat pouze lymfatických uzlin postižených nádorovým procesem a nikoliv primárních ložisek nádoru.

Závěr: Takto připravený preparát expandovaných TIL lze snadno připravit in vitro a je možno jej využít klinicky jako buněčná imunoterapie metastazujícího melanomu.

Podporováno grantem: GAČR č.: 301/04/1387

Hypoxie, chemorezistence, invazivita, angiogeneze. Postřehy z konference: 2nd Annual International Tumor Metabolism Summit, Genova, October 7–8, 2005, Italy

Svoboda M.

Masarykův onkologický ústav, Brno

Mezinárodní konference byla zaměřena na vliv hypoxických stavů na chemorezistenci.

Z prací prezentovaných na konferenci jednoznačně vyplývá, že hypoxické stavy, indukují chemorezistenci a invazivní chování populací buněk vzdálených od krevních vlásečnic v rostoucím nádoru.

Několika technikami bylo prokázáno, že v nádoru vedle sebe koexistují nejméně dvě populace nádorových buněk – jedna populace s dostatečným přístupem ke kyslíku a druhá populace žijící za hypoxických podmínek. Tyto dvě populace se liší v expresi desítek až stovek genů. Hypoxická populace buněk má reprimovány mnohé proapoptotické geny, naopak indukovány jsou geny odpovědné za invazivní chování jako např. scattering faktory, metastasis-associated protein MTA-1, indukovány jsou geny angiogeneze.

Hypoxické oblasti zároveň produkují chemoatraktanty přitahující makrofágy a indukují polarizaci těchto makrofágů na populaci M1 – prozánětlivou a cytotoxickou frakci. To vysvětluje velký podíl makrofágů v nádorech a rovněž úspěšnou aplikaci Xelody v mnoha nádorech, včetně těch které neodpovídají na léčbu 5-FU. Xeloda je totiž aktivována thymidin fosforylázou a ta je ve zvýšené míře v tumoru produkována právě infiltrujícími makrofágy.

S hypoxickými stavy je vždy spojena zvýšená exprese HIF-1 α , který je klíčovým transkripčním faktorem odpovědným za indukci nebo represí genů spojených s adaptací k hypoxii. Cílovými indukovanými geny jsou geny pro glykolytický metabolismus, ale také geny indukující invazivní chování nádorových buněk. To vysvětluje, proč nádory produkují velké množství laktátu i v přítomnosti kyslíku (Wartburgův efekt). Zvýšené hladiny glykolytických enzymů způsobují vyšší produkci ribosy z glukosy v rámci pentosa fosfátové dráhy. Ribosa je pak využita při syntéze nukleových kyselin při dělení nádorových buněk.

Prezentované práce jednoznačně ukazují že chemorezistence má vždy nezbytné dva aspekty:

1. nespecifickou rezistenci asociovanou s hypoxickými stavy
2. specifickou rezistenci asociovanou s přítomností určitých proteinových variant metabolizujících odlišně dané cytostatikum nebo ovlivňujících transport cytostatika.

Tento fakt má konkrétní závěr: až na vyjíměčné případy nelze předpovědět rezistenci na dané cytostatikum jen s využitím markerů specifických pro metabolismus (deaktivaci nebo naopak aktivaci) daného cytostatika. Zároveň je zřejmé, že chemorezistence, hypoxické stavy, invazivita a angiogeneze jsou navzájem velmi úzce provázané jevy, které je třeba hodnotit ve vzájemném kontextu.

Poděkování: Práce byla provedena s podporou Vědecko výzkumného záměru MZ00020980501 –5.

První protinádorová vakcína na bázi dendritických buněk připravená v ČR u dětských onkologických pacientů: předběžné výsledky klinické aplikace

¹Smejkalová J., ¹⁻³Michálek J., ¹Stejskalová A., ¹Vidláková P., ²⁻³Štěrbá J., ¹Penka M., ¹Hájek R.

¹Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, OKH, FN Brno

²Univerzitní onkologické centrum Masarykovy

univerzity, Brno

³Klinika dětské onkologie, FN Brno

Cílem této probíhající studie, která byla zahájena v roce 2004, je testování toxicity protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk pro individuální podání u terminálně nemocných dětských pacientů. K přípravě protinádorové vakcíny bylo využito zavených laboratorních postupů. Byly získány nádorové buňky z nádorové tkáně a mononukleární buňky periferní krve, které obsahují prekursor dendritických buněk a lymfocyty. Prekursory dendritických buněk byly kultivovány in vitro v přítomnosti cytokinů (IL-4, GM-CSF, TNF-alfa) umožňujících jejich vyzrání ve zralé formy dendritických buněk. Dendritické buňky byly naloženy autologními ozářenými nádorovými buňkami. Během této inkubace dochází k tzv. „primingu“ dendritických buněk nádorovými antigeny. Takto připravená protinádorová vakcína byla rozdělena do 3-6 alikvotů, uchovávána zmrazená až do doby podání pacientovi současně s imunopotenciační látkou KLH (keyhole

limpet hemocyanin). Samotné očkování probíhalo ve 14-denních intervalech a byla sledována toxicita podané vakcíny. Dosud (červenec 2005) byla vakcína podána 5 pacientům, předpokládáme aplikaci celkem 12 pacientům s následným konečným vyhodnocením výsledků. Dosavadní výsledky ukazují, že podání vakcíny není spojeno s toxicitou vyšší než stupně I dle WHO klasifikace, vakcína je dobře snášena. Lokální imunologická odpověď byla zaznamenána u všech 5 pacientů. Klinický benefit u terminálně nemocných pacientů vedl ke stabilizaci choroby u 2 pacientek, 3 pacienti zemřeli na progresi choroby.

Dosavadní výsledky ukazují, že příprava a aplikace individuální vakcíny na bázi dendritických buněk je bezpečná bez výrazných vedlejších účinků. U terminálně nemocných pacientů dochází sice k lokální imunitní odpovědi avšak bez významné celkové odezvy, která by vedla ke klinicky signifikantní léčebné odpovědi u těchto terminálně nemocných pacientů. Po dokončení studie bude provedeno celkové zhodnocení dosažených výsledků.

INZERCE

INZERCE