
klinická onkologie

5/2007

ROČNÍK / VOLUME 20

15. října 2007

vydává / PUBLISHER
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST
J. E. PURKYNĚ
CZECH MEDICAL ASSOCIATION
J. E. PURKYNĚ
IČO 444359

V NAKLADATELSTVÍ / PUBLISHING HOUSE
ApS BRNO, spol. s r. o.
IČO 00543535
Božetěchova 2
612 66 Brno
e-mail: papezova@aps-brno.cz

REDAKCE / EDITORIAL OFFICE
Masarykův onkologický ústav Brno
Žlutý kopec č. 7
656 53 Brno

Sekretář redakce / Journal coordinator
ing. Zdeněk Bouša
tel., fax: 543 134 226
mobil: 604 226 113
Přijetí příspěvků:
e-mail: vukfait@centrum.cz
e-mail: bousa@mou.cz

Tiskne Moravská typografie, a. s.
Brno, Moravské náměstí 13
IČO 15549763

Vychází 6krát ročně / Issued six times a year
Roční předplatné 180 Kč
pro studenty LF 90 Kč

Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce

Ministerstvo kultury ČR
MK ČR 5158
ISSN 0862-495 X (print)
ISSN 1802-5307 (online)

INTERNET – vstupní adresa:
<http://www.linkos.cz>
<http://www.mou.cz>

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA
EXCERPTED IN BIBLIOGRAPHIA
MEDICA CZECH

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK ONCOLOGICAL SOCIETIES

VÝKONNÁ REDAKČNÍ RADA MANAGING EDITORS

VEDOUcí REDAKTOR
EDITOR-IN-CHIEF

REJTHAR ALEŠ

VÝKONNÝ REDAKTOR
DEPUTY EDITOR

FAIT VUK

REDAKTOŘI ASSOCIATE EDITORS

ČOUPEK PETR, Brno
FORETOVÁ LENKA, Brno
HÁJEK ROMAN, Brno
KOCÁK IVO, Brno

SVOBODA MAREK, Brno
VALÍK DALIBOR, Brno
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
ŽALOUdlík JAN, Brno

REDAKČNÍ RADA EDITORIAL BOARD

ADAM ZDENĚK, Brno
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava
BARTOŠ JIŘÍ, Liberec
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno
CWIERTKA KAREL, Olomouc
JURGA LUDOVIT, Trnava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava
KLENER PAVEL, Praha
KOVÁŘÍK JAN, Brno

KOZA IVAN, Bratislava
MAYER JIŘÍ, Brno
MELICHAR BOHUSLAV, Hr. Králové
ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
VYZULA ROSTISLAV, Brno
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice

ČESTNÍ ČLENOVÉ REDAKČNÍ RADY EDITORS EMERITI

BILDER JOSEF, Brno
ECKARDT SANDOR, Budapešť
KLAŠTERSKÝ JAN, Brusel
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

MECHL ZDENĚK, Brno
NĚMEC JAROSLAV, Brno
PLEŠKO IVAN, Bratislava
UJHÁZY VILIAM, Bratislava

Přehled

Dziechciaruková M., Berkovcová J., Trojanec R., Srovnal P., Bouchalová K. I. Hajdúch M. Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz	323
Cingelová S., Jurga L., Mladosičevićová B. Kardiotoxicita adjuvantní léčby karcinomu prsníka	330

Původní práce

Hubáčková M., Václavíková R., Kubala E., Kodet R., Mrhalová M., Novotný J., Vrána D., Gut I., Souček P. Úloha exprese genů chinonoxidoreduktázy 1 a 2 v rozvoji karcinomu prsu	335
M. Trněný, I. Vášová, R. Pytlík, D. Belada, M. Jankovská, K. Kubáčková, J. Šálková, E. Kolečková, Ž. Hofmanová, Š. Hrabětová, V. Kajaba, A. Sýkorová, J. Pirnos, J. Přibyllová, J. Švecová, J. Číberová, I. Bolomská, E. Skácelíková, M. Brejcha, D. Adamová, H. Fraňková, L. Barsová, K. Benešová, V. Šenigl, V. Campr, L. Boudová, J. Štříteský, M. Petrová, H. Krejčová, B. Procházka, P. Klener Distribuce podtypů non-hodgkinského lymfomu v České republice a jejich přežití.	340
Wasiková, S., Piskač, P., Spurný, V., Rotnáglová, S. Perkutánní endoskopická gastrostomie u pacientů s tumory hlavy a krku	349

Kazuistika

Rečková M., Lawrence H. Einhorn Nezvyčajný prípad dlhodobého prežívania pacientky s chemorefraktným Merkelovým karcinómom	354
--	-----

Sdělení

Boroňová I., Bernasovský I., Bernasovská J. Detekcia philadelphia chromozómu u pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou v prešovskom kraji (1995-2004)	357
--	-----

Zprávy

Nováková V. Zpráva z 1. Světového Kongresu International Academy of Oral Oncology	361
Petráková K. Zpráva z konference ASCO 2007	362

Informace - seminář	364
----------------------------------	-----

Informace ČOS	365
----------------------------	-----

CONTENTS**Reviews**

Dziechciaruková M., Berkovcová J., Trojanec R., Srovnal P., Bouchalová K. I. Hajdúch M. Application of laser capture microdissection in preparation of complex malignant tissue samples for microgenomic analyses	323
Cingelová S., Jurga L., Mladosičevićová B. Cardiotoxicity of Breast Cancer adjuvant treatment	330

Original publications

Hubáčková M., Václavíková R., Kubala E., Kodet R., Mrhalová M., Novotný J., Vrána D., Gut I., Souček P. Role of gene expression of quinone oxidoreductase 1 and 2 in progression of breast cancer	335
M. Trněný, I. Vášová, R. Pytlík, D. Belada, M. Jankovská, K. Kubáčková, J. Šálková, E. Kolečková, Ž. Hofmanová, Š. Hrabětová, V. Kajaba, A. Sýkorová, J. Pirnos, J. Přibyllová, J. Švecová, J. Číberová, I. Bolomská, E. Skácelíková, M. Brejcha, D. Adamová, H. Fraňková, L. Barsová, K. Benešová, V. Šenigl, V. Campr, L. Boudová, J. Štříteský, M. Petrová, H. Krejčová, B. Procházka, P. Klener The Non-Hodgkin's Lymphoma subtype distribution and survival in Czech Republic	340
Wasiková, S., Piskač, P., Spurný, V., Rotnáglová, S.* Percutaneous Endoscopic Gastrostomy in patients with neoplasm of the head and neck	349

Case report

Rečková M., Lawrence H. Einhorn Unusual case of long-term survival in a patient with chemorefractory Merkel cell carcinoma	354
---	-----

Communications

Boroňová I., Bernasovský I., Bernasovská J. Detection of the philadelphia chromosome in patients with chronic myeloid leukemia from the prešov region in Slovakia (1995-2004)	357
--	-----

Report

Nováková V. International Academy of Oral Oncology	361
Petráková K. ASCO	362

Notification - tutorial	364
--------------------------------------	-----

Notification of Czech Oncological associations	365
---	-----

VYUŽITÍ LASEROVÉ MIKRODISEKCE PRO PŘÍPRAVU KOMPLEXNÍCH VZORKŮ Z NÁDOROVÉ TKÁNĚ PRO ÚČELY MIKROGENOMICKÝCH ANALÝZ

APPLICATION OF LASER CAPTURE MICRODISSECTION IN PREPARATION OF COMPLEX MALIGNANT TISSUE SAMPLES FOR MICROGENOMIC ANALYSES

DZIECHCIARKOVÁ M.¹, BERKOVCOVÁ J.¹, TROJANEC R.¹, SROVNAL P.¹, BOUCHALOVÁ K.¹ HAJDÚCH M.^{1,2}

¹ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY PŘI DĚTSKÉ KLINICE LF UNIVERZITY PALACKÉHO A FN V OLOMOUCI

² ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UNIVERZITY PALACKÉHO A FN V OLOMOUCI

Souhrn

Laserová záchytná mikrodisekce (Laser capture microdissection, 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 nízkovýkonnostním infračerveným laserem. Nařezané tkáně jsou upevněny na standardní podložní sklo a termoplastická membrána (TM) je umístěna nad dehydratovaný preparát. V ohnisku laserového mikroskopu je umístěna TM, kterou laser roztaví v požadovaném místě a naváže tak cílovou buňku či strukturu k membráně. V současné době máme k dispozici několik laserových mikrodisekčních systémů, které se liší způsobem zachycení disekovaných buněk, v konfiguraci systému i v jednotlivých aplikacích. Laserovou mikrodisekcí lze použít pro izolaci buněk u řady typů buněčných i tkáňových preparátů, včetně zamražených vzorků, formalínem fixovaných parafinizovaných tkání či cytologických preparátů. V závislosti na použitém materiálu je možno z mikrodisekovaných buněk extrahovat DNA, RNA či proteiny v dobré kvalitě. Kombinací s dalšími technikami, jako je například cDNA microarray, LCM pomáhá identifikovat nové diagnostické a prognostické znaky vedoucí ke zlepšení diagnosticko-terapeutických metod v léčbě onkologických onemocnění. Na našem pracovišti byly laserovou mikrodisekcí izolovány buňky z cytologických preparátů adenokarcinomu plic získaných punkční cytologií zmražených či parafinizovaných nádorů a také buněčné linie, např. myeloidní leukemii K562. V této práci popisujeme naše zkušenosti se zavedením LCM s následnou mikroizolací DNA/RNA a lineární amplifikací DNA/RNA pro účely dalších genetických analýz jako je např. komparativní genomická hybridizace, expresní studie, či přímé sekvenování vyšetřovaných genů z biologického materiálu s minimálním obsahem nádorových buněk, či pro studium nádorové heterogeneity na jednobuněčné úrovni.

Klíčová slova: EGFR1, komparativní genomická hybridizace, laserová mikrodisekce, lineární amplifikace DNA/RNA, izolace DNA/RNA, K-ras.

Summary

Laser capture microdissection (LCM) is a rapid, reliable method to obtain pure populations of targeted cells from specific microscopic regions of tissue sections for subsequent analysis. LCM is based on the adherence of visually selected cells to a thermoplastic membrane, which overlies the dehydrated tissue section and is focally melted by triggering of a low energy infrared laser pulse. Tissue sections are mounted on standard glass slides, and transparent thermoplastic membrane is then placed over the dry section. The laser provides enough energy to transiently melt this thermoplastic film in to the target cells. Several systems are available for LCM, and vary in cell-capture method, system configuration and applications. LCM was applied to a wide range of cell and tissue preparations including frozen samples, formalin-fixed paraffin-embedded tissues or cytology smears. Depending on the starting material, DNA, good quality mRNA, and proteins can be extracted successfully from captured tissue fragments, down to the single cell level. In combination with another techniques like expression library construction and cDNA array hybridisation, LCM will allow the establishment of new diagnostic and prognostic markers, in order to indicate therapy individually tailored to the molecular profile of a given tumour. In this paper we refer our experiences with the LCM isolation of single cells from cytology smears of lung carcinomas, frozen and paraffin embedded tumour tissues as well as cell line cytospin preparation. Our ultimate goal was to introduce LCM technology in combination with DNA/RNA isolation and linear amplification for subsequent genomic analyses such as comparative genomic hybridisation, RNA expression studies and specific amplifications of investigated genes from tissue specimens with minority of tumour cells and/or for tumour heterogeneity studies based on one the single cell level.

Key words: EGFR genes, genomic hybridisation, laser capture microdissection, nucleic acid amplification techniques, isolation, K-ras genes.

Úvod:

V současné době molekulárně biologické vyšetření buněk a tkání na úrovni DNA, RNA a proteinů představuje revoluční obrat v diagnostice a charakterizaci biologických

vlastností nádorových onemocnění. Nicméně, problém proteomických a genomických studií v případě analýzy komplexních nádorových vzorků spočívá v přípravě homogenizované buněčné populace. Průtoková cytometrie byla dlouhou

dobu používána jako výhradní technologie k získání jednotlivých buněčných typů do suspenze, avšak možnost získání čistých buněk ze vzorků solidní tkáně, jako je biopsie, je časově zdoluhavá. Další nevýhodou průtokové cytometrie je, že vyžaduje specifický selekční marker (1). Pro zlepšení metody izolace jednotlivých buněk nebo samostatných buněčných populací byla proto vyvinuta technika laserové mikrodisekce (LCM) (2, 3, 4). Laserová mikrodisekce byla použita pro izolaci buněk u řady typů buněčných i tkáňových preparátů, včetně zamražených vzorků, formalínem fixovaných a parafinizovaných tkání či cytologických preparátů. V závislosti na použitém materiálu je možno z mikrodisekovaných buněk extrahovat DNA, RNA či proteiny v dobré kvalitě. Kombinací s dalšími technikami, jako například cDNA microarrays, pak LCM pomáhá identifikovat nové diagnostické, prediktivní a prognostické markery, vedoucí ke zlepšení diagnosticko-terapeutických metod v léčbě onkologických onemocnění.

Princip a vývoj laserové mikrodisekce

Laserová mikrodisekce je rychlá a spolehlivá metoda, která umožňuje izolaci cílových buněk ze specifického komplexu tkáně pro jejich následnou molekulární nebo proteinovou analýzu (5).

Počátek laserové mikrodisekce se datuje do roku 1970, kdy byl poprvé použit laser pro zachycení a manipulaci s buněčnými populacemi. V polovině 90. let minulého století byl vyvinut první prototyp laserového mikrodisekčního systému ve spolupráci několika ústavů z National Institutes of Health (NIH). Později ze spolupráce NIH a firmy Arcturus (www.arctur.com) vznikl první komerční mikrodisekční systém (6). Tento systém vyřezává buňky pomocí laserových pulsů cílených na okrsky tkáně, které jsou překryty speciální membránou, tzv. fúzováním tkáně a membrány. Po disekci příslušných buněk je termoplastická fólie s adherovanými buňkami odstraněna a zbytek tkáně, která nebyla vybrána k disekci, zůstává na podložním sklíčku. Buňky na membráně pak mohou být podrobeny příslušným extrakčním podmínkám pro jejich následnou mikrogenomickou analýzu.

Rozdílné LCM technologie

LCM umožňuje disekci nejen jednotlivých buněk či buněčných kolonií z komplexu tkáně uchycené na podložním sklíčku, ale také vyřezání jednotlivých chromozómů a v některých případech i disekci živých buněk přímo z kultivační misky. V současné době máme k dispozici několik mikrodisekčních systémů, které se liší v metodě odchytávání buněk, v konfiguraci systému i v aplikacích (tab.1) (7). Některé systémy umožňují bezdotykové katapultování označených buněk přímo do sběrných zkumavek, nebo vyzvednutí vyřezaných buněk přímo víčkem mikrocentrifugační zkumavky. LCM systémy mohou mít zabudovaný infračervený, nízko výkonnostní infračervený, ultrafialový laser, nebo i jejich kombinace. Všechny mikrodisekční systémy mají laser zabudovaný do standardního mikroskopu.

Technologie zachytávání buněk:

Membránové (fúzní) technologie

Jedna z možností, jak zachytávat vyřezané buňky, je tzv. fúzní technologie. Fúzní technologie zachytávání buněk je

založena na selektivní přilnavosti cílových buněk a fragmentů tkání k termoplastické membráně, která je upevněna na průsvitné víčko mikrozkuhavky (CapSure™) (viz. www.arctur.com). Termoplastická membrána je aktivována nízkovýkonnostním infračerveným laserovým pulsem. Nařezané tkáně jsou upevněny na standardní podložní sklíčko a termoplastická membrána je umístěna nad dehydratovaný preparát. V ohnisku laserového mikroskopu se aktivuje termoplastická membrána, která je navázána k identifikované cílové buňce v mikroskopované části preparátu. Laser roztaví termoplastickou fólii v místě vybrané cílové buňky (1,5,8). Protože termoplastická folie absorbuje většinu tepelné energie a laserový puls trvá jen zlomek sekundy, poškození biologických makromolekul je minimální nebo nedetekovatelné. Po disekci příslušných buněk, je termoplastická fólie s adherovanými buňkami odstraněna a zbytek nepoužité tkáně zůstává na podložním sklíčku. Tuto technologii využívá PixCell II laserový mikrosektor firmy Arcturus. Novější verze laserového mikrodisektoru (Veritas) této společnosti má zabudovaný jak nízkovýkonnostní infračervený laser, tak UV laser. Pro disekci pomocí UV laseru jsou tkáňové preparáty upevněny na tenkou polyetylenovou fólii. Polyetylenová fólie s dehydratovaným preparátem je převrstvena víčkem s termoplastickou membránou (CapSure™). Cílové buňky jsou mikrodisekovány prostřednictvím ultrafialového laseru, který přesně obkrouží řeznou dráhu podél obvodu disekovaných buněk. Mikrodisekované části tkáně tak zůstávají přichyceny na spodní části víčka.

Cell Robotics (www.cellrobotics.com) využívá tzv. techniku „Pick-Up Sticks“, která umožňuje zachycení disekovaných buněk. Tento mikrodisekční systém je založen na UV laseru. Mikroskalpel produkuje fototermální reakci v ohniskovém bodu čočky mikroskopu, kde laserový paprsek protíná cílový vzorek. Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá tenkou polyetylenovou fólií, vyřezávané buňky či okrsky tkáně jsou laserem obkrouženy. Fototermální reakce v ohniskovém bodu laseru vypaří nebo odstraní velmi malou část cílových buněk či tkáně. Disekované okrsky tkáně jsou směřovány elektrostatickou silou směrem k filmu a film s buňkami je pak vložen do mikrocentrifugační zkumavky a zpracován.

Podobný systém vyřezávání buněk má i mikrodisektor mmi-CellCut firmy MMI Molecular Machines & Industries AG (www.molecular-machines.com), tento systém se však liší od Cell Robotics ve způsobu zachytávání buněk po disekci. Buňky jsou vyřezávány automaticky pomocí velmi přesného UV laseru. Vzorky jsou uchyceny na speciální membrány upevněné v rámečku. Takto připravené vzorky jsou překryty skleněným podložním sklíčkem. Toto přikrytí efektivně ochrání vzorek před nečistotami z okolí a je rozhodující pro všechny aplikace, u kterých je klíčové zabránit zevní kontaminaci. Vyřezané okrsky tkáně jsou zachyceny víčky, která jsou pokryta adhesivní vrstvou.

Systém Bio-Rad Colonis (viz. www.microscopy.bio-rad.com) používá rovněž film pro zachycení buněk, ale jinou cestou. Tento systém umožňuje i aplikace s živými buňkami. Film je umístěn do kultivační misky a živé buňky jsou na něm přímo kultivovány. Po vypěstování kolonií je možno řezat buňky přímo v kultuře. Vyřezaný film je z kultury odloupen a požadované buňky zůstanou na něm uchyceny. Je také možno provést ablaci nežádoucích kolo-

Tab.1: Srovnání různých komerčně dostupných mikrodisekčních systémů.

VÝROBCE	LCM systém	Vlastnosti					Aplikace
		Technologie zachytávání buněk	Technologie sběru buněk	Kompatibilní mikroskop	Typ laseru	Fluorescence	
ARCTURUS	PixCell II VERITAS	Termoplastická membrána uchycená na sběrná víčka. Laser roztaví termoplastickou fólii v daném místě, kde jsou navázány cílové buňky.	Odstraněním víčka z preparátu. Cílové buňky zůstávají uchyceny na membráně víčka.	Invertovaný Olympus IX 50	IF laser IF a UV laser	ano	Zamražené tkáně Parafinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka
CELL ROBOTICS	Cell Robotics	Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá polyetylenovou fólií, buňky jsou laserem obkrouženy.	Vyřezaný kousek fólie s buňkami je vtlačen do víčka mikrozkuhavky elektrostatickou silou.	Invertovaný Leica, Nikon, Olympus a Zeiss	UV laser	ano	Zamražené tkáně Parafinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka
MMI Molecular Machines	mmi CellCut mmi SmartCut	Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá polyetylenovou fólií, buňky jsou laserem obkrouženy.	Vyřezané okrasky tkáně jsou zachyceny víčky která jsou pokryta adhesivní vrstvou.	Invertovaný Nikon, Olympus	UV laser	nevíme	Zamražené tkáně Parafinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka Mikromanipulace
PALM	MicroBeam's	Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá polyetylenovou fólií, buňky jsou laserem obkrouženy.	Mikrodisekované části tkáně padají do víčka nanozkuhavky pomocí proudu fotonů.	Invertovaný Zeiss Axiovert 200	UV laser	ano	Zamražené tkáně Parafinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka Mikromanipulace
LEICA	Leica AS LCM	Tkáňové preparáty jsou uchyceny na skla pokrytá polyetylenovou fólií, buňky jsou laserem obkrouženy.	Mikrodisekované části tkáně padají do víčka nanozkuhavky pomocí gravitace.	Invertovaný Leica DMLA	UV laser	ano	Zamražené tkáně Parafinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka
EPPENDORF	PPMD microdissector	Mikroskalpel seškrabává potřebný úsek tkáně do kapky vody či jiného média.	Kapka s izolovanými buňkami je aspirována pipetou a vnesena do mikrozkuhavky.	Invertovaný Leica DM IRB	Ultrazvuk	ne	Zamražené tkáně Parafinované tkáně Cytologické preparáty Živé buňky Jedna buňka

nií buněk. Ty jsou následně odmyty a zbylé buňky mohou být dále kultivovány (7).

Paprskové technologie

Zachytávání buněk pomocí speciálního filmu není jedinou cestou jak izolovat disekovaný materiál (7). PALM Micro-Beam's (www.palm-microlaser.com) využívá tzv. technologii laserově tlakového katapultování (Laser Pressure Catapulting, LPC). Pulzní UV-A laser je zabudovaný do standardního mikroskopu. Laser je zaostřen přes objektiv čočky do bodu o velikosti 1 µm. Uvnitř úzkého bodu laserového ohniska je vytvořena síla pro ablaci materiálu, zatímco okolní tkáň zůstává zcela neporušena. Použitím tohoto laserového systému mohou být separované buňky nebo vybrané oblasti tkáně vyzvednuty a zachyceny do sběrného zařízení. Toto je zcela bezkontaktní proces zachytávání buněk, kdy pro transport selektovaných oblastí do sběrných systémů je použito jenom zaostřené světlo. Vzorek je přemístěn několik milimetrů proti gravitaci. Stejný systém je také aplikován pro získávání živých buněk z buněčných kolonií (9, 10, 11). Katapultovaný materiál může být dále centrifugován a použit pro následnou molekulární analýzu, nebo další experimenty jako je rekultivace selektovaných vitálních buněk.

Další široce používanou technikou je laserový mikropaprskový mikrodisekční systém (12) (viz. www.leica-microsystems.com). Tento systém používá pulzní ultrafialový laser s malým paprskem pro vyřezávání cílových buněk prostřednictvím fotoablace sousední tkáně. Tkáňové preparáty jsou uchyceny na tenkou polyetylenovou fólii. Cílové buňky jsou mikrodisekovány prostřednictvím UV laseru, který přesně obkrouží řezanou dráhu podél obvodu disekovaných selektovaných buněk. Touto „studenou“ ablací není materiál vystaven přímému laserovému záření. Mikrodisekované části tkáně jsou sbírány do víčka nanozkumavky bezkontaktně, tzn. buňky padají do víčka zkumavky na základě gravitace, a mohou být následně použity pro molekulární analýzu.

Mechanické technologie

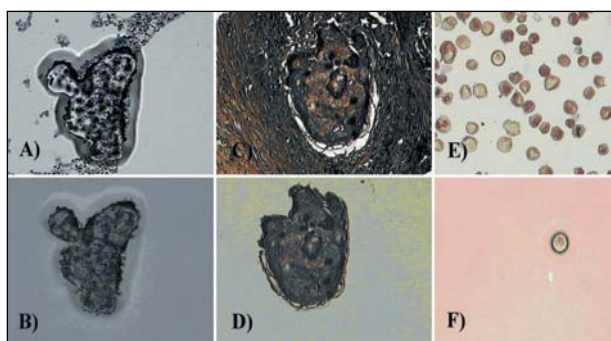
Další možností zachytávání buněk nabízí např. společnost Eppendorf (www.eppendorf.com) prostřednictvím tzv. „Piezo power for microdissection“ (PPMD) technologie. Tento systém zahrnuje ultrazvukový piezo-mikroskalpel s velmi tenkou kovovou špičkou, který je napojen na standardní mikroskop propojený s počítačem. Disekce je prováděna v kapce vody, xyleny či jiného média a to tak, že na preparát je nanášena kapka daného média, a mikroskalpel kmitavými pohyby seškrabává potřebný úsek tkáně do této kapky. Kapka s izolovanými buňkami či okrsky tkáně je aspirována speciální pipetou a vnesena do sběrné mikrozskumavky.

Aplikace LCM v diagnostice a prognózování nádorových onemocnění

Na našem pracovišti používáme laserový mikrodisektor Veritas (Arcturus) (obr. 1). Vypracovali jsme rutinní postupy pro laserovou mikrodisekci z cytologických preparátů karcinomů plic získaných punkční cytologií barvených metodou Giemsa-Romanovski, zamražených či parafinizovaných nádorových tkání (barveno hematoxylinem) a také cytospinových preparátů z nejrůznějších buněčných



Obr. 1: Laserový mikrodisektor Veritas firmy Arcturus.



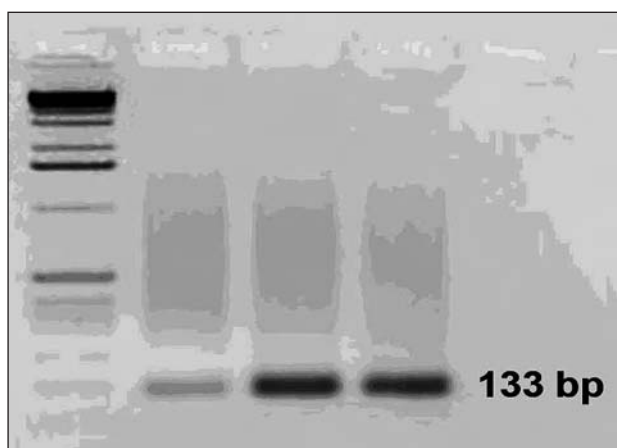
Obr. 2: Laserová záchytná mikrodisekce nádorových buněk z cytologického preparátu karcinomu plic získaného punkční cytologií (barveno metodou Giemsa-Romanowski), zamražených či parafinizovaných nádorových tkání (barveno hematoxylinem) a stabilní buněčné linie K562 (barveno neutrální červení): Na obrázku jsou **A)** označené nádorové buňky cytologického preparátu karcinomu plic; **B)** disekované buňky karcinomu plic; **C)** označené nádorové buňky z řezu formalinem fixované a parafinizované nádorové tkáně; **D)** vyřezané buňky z tohoto tkáňového řezu; **E)** cytospin buněčné nádorové linie K562; **F)** disekovaná buňka nádorové buněčné linie K562.

linií (barveno neutrální červení) (obr. 2). Metodickým cílem bylo zavést kombinaci LCM s lineární amplifikací DNA i RNA pro účely dalších mikrogenomických analýz z biologického materiálu s minimálním obsahem nádorových buněk, či pro studium nádorové heterogenity na jednobuněčné úrovni. V další části tohoto sdělení referujeme naše odzkoušené metodické postupy, které snad usnadní práci dalším zájemcům o přípravu genetického materiálu technikou LCM spojenou s amplifikací DNA či RNA a následnými genetickými analýzami.

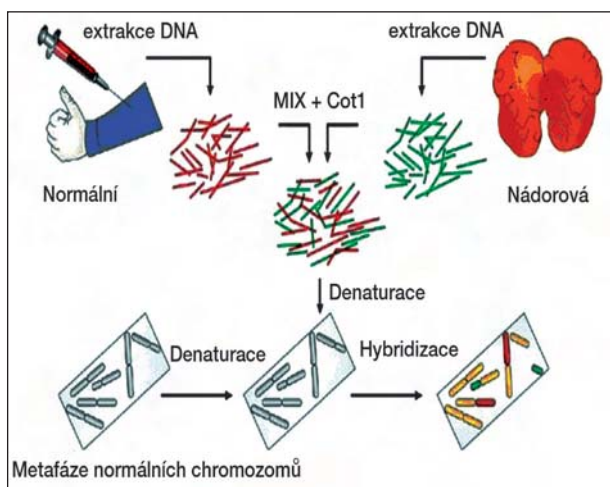
Izolace a lineární amplifikace DNA

Technika lineární amplifikace DNA byla modifikovaná podle dříve publikovaných prací (13-16). Buňky získané pomocí LCM (1-1000 buněk) byly v mikropodmínkách lyzovány proteinázou K. K mikrodisekovaným buňkám bylo přidáno 5 µl PK pufru [50mM Tris-HCl (Sigma, USA) pH=8.1, 1 mg/ml proteinázy K (New England Biolabs, USA), 1 mM EDTA (Serva, Německo)] a 5 µl minerálního oleje (Sigma, USA). Vše bylo inkubováno přes noc při 40°C. Druhý den byly zkumavky s natrávenými buňkami krátce centrifugovány a inkubovány 10 min. při teplotě 95°C. Při této teplotě dochází k inaktivaci proteinázy K.

Poté byla dvoušroubovice DNA rozštěpena restriktčním enzymem *MseI* (New England Biolabs, USA). K 5_1 lyzátu bylo přidáno 0,2_1 One-Phor-All-Buffer-Plus (Amersham Biosciences, USA), 1_1 *MseI* (10 jednotek) a 0,8_1 H₂O. Směs byla inkubována 3 hodiny při 37°C. Po restrikci byly na rozštěpené konce navázány adaptéry se specifickými amplifikačními sekvencemi. Pro annealing primerů byly použity primery *MseLig* – 21 merový (5_-AGT GGG ATT CCG CAT GCT AGT-3) a *MseLig* -12 merový (5_-TAA CTA GCA TGC-3_) (Generi Bitech, Česká republika), 0,5_1 One-Phor-All-Buffer-Plus a 1,5_1 H₂O. Annealing byl zahájen inaktivací restriktčních enzymů při 65°C, pak se teplota snižovala po 1°C/min až na 15°C. Při 15°C bylo k reakční směsi přidáno 1_1 T4 DNA ligázy a 1_1 T4 DNA ligázového pufru (New England Biolabs, USA), obsahujícího 10mM ATP. Ligace probíhala přes noc při 15°C. Pomocí výše zmiňovaných sekvencí primerů byla DNA následně amplifikována v PCR reakci. Pro primární amplifikaci bylo k 12_1 ligovaného produktu přidáno 40_1 primární PCR směsi, která obsahovala 3_1 Expand Long Template, buffer 1 (Expand Long Template PCR Systém, Roche, Švýcarsko), 2_1 dNTPs (10mM deoxynukleotidy, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Sigma, USA), 35_1 H₂O. Primární amplifikace byla započata 4 min. denaturací při 68°C. V tomto kroku jsou odstraněny přebytečné oligonukleotidy z vazby na DNA řetězec. Po denaturaci bylo do reakční směsi přidáno 0,7_1 (3,5 jednotek) DNA polymerázové směsi Taq a Pwo polymerázy (Expand Long Template PCR Systém, Roche, Švýcarsko). V termocykléru byly nastaveny tyto amplifikační podmínky: 14 cyklů – 94°C (40s), 57°C (30s), 68°C (1min. 15s); 34 cyklů – 94°C (40s), 57°C (30s), 68°C (1min. 45s) a 1 cyklus – 94°C (40s), 57°C, 68°C (5min.). Pro kontrolu kvality a senzitivity DNA amplifikace byla použita specifická PCR amplifikace exonu 2 genu pro lidský magaglobin B1 (Obr. 3). Naše výsledky ukazují, že lineární amplifikací lze reprodukovatelně namnožit DNA z jediné disekované buňky do množství postačujícího pro běžné genetické analýzy založené na PCR.



Obr.3: Výsledek genově specifické PCR amplifikace exonu 2 genu pro lidský magaglobin B1 z mikrodisekovaných buněk, jejichž DNA byla lineárně amplifikována. Produkt selektivní amplifikace exonu 2 genu pro lidský magaglobin B1 se nacházel v oblasti 133bp. Zleva: 1)DNA ladder, 2)templát připravený lineární amplifikací DNA z 1 buňky, 3)templát připravený lineární amplifikací DNA z 10 buněk, 4)templátem byla kontrolní DNA.

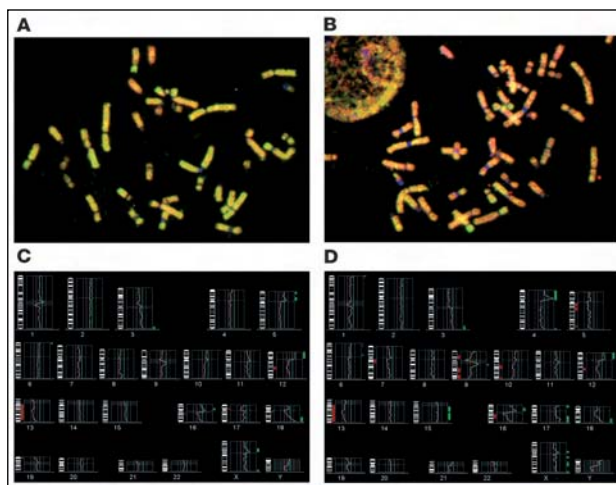


Obr.4: Schématický princip komparativní genomické hybridizace (CGH).

Komparativní genomická hybridizace (CGH) jako jedna z možností použití lineárně amplifikované DNA získané z buněk izolovaných LCM.

Principem komparativní genomické hybridizace (CGH; obr.4) je porovnání referenční a vyšetřované DNA. Každá z obou DNA je označena jinou fluorescenční barvou. Na našem pracovišti konsenzuálně značíme referenční DNA červeně a vyšetřovanou DNA zeleně. Obě DNA jsou smíchány v poměru 1:1 a hybridizovány na normální lidské metafázní chromozómy. Interpretace výsledků je založena na změně poměru intenzity zelené a červené fluorescence u chromozómů, na nichž obě DNA byly hybridizovány (17,18,19). Delece (loss) ve vyšetřované DNA způsobí barevný posun směrem do červená, amplifikace (gain) posun do zelená. Nevýhodou CGH je fakt, že dokáže zachytit pouze nebalancované cytogenetické změny, které jsou přítomny alespoň u 50% jader, z nichž byla izolována DNA. V případech nádorových preparátů je vzorek více či méně „kontaminován“ i nenádorovými populacemi buněk, které mohou výsledky CGH ovlivnit naředěním cytogenetických alterací pod detekční limit CGH. Laserová mikrodisekce proto umožňuje citlivější zachycení cytogenetických změn, výběrem požadovaných nádorových populací či pouze jediné (ne)nádorové buňky.

Příkladem tohoto tvrzení je jeden z našich experimentů, ve kterém jsme technikou u laserové mikrodisekce izolovali jednotlivé buňky z linie myeloidní leukémie K562. Technikou lineární amplifikace byla DNA namnožena a produkt primární amplifikace byl použit pro CGH. Pomocí CGH jsme porovnávali DNA získanou izolací klasickým způsobem ze směsné kultury buněk a DNA po LCM jediné buňky s následnou lineární amplifikací. Na obrázku 5 jsou zobrazeny výsledky této CGH studie, včetně idiogramů po LCM a lineární amplifikaci DNA z jediné buňky v porovnání se směsným vzorkem myeloidní leukemické linie K562. Z výsledných idiogramů je patrné, že se nálezy částečně liší díky nádorové heterogenitě buněk v tkáňové kultuře. U myeloblastu podrobeného LCM je např. patrná nová amplifikace v oblasti chromozómu 15. Z analýzy také vyplývá, že při vyšetření DNA získané ze směsné populace bylo detekováno menší množství cytogenetických změn, než v případě DNA izolované z jedné buňky. U směsného



Obr. 5: Výsledek komparativní genomické hybridizace: **A)** Výsledný preparát (mitóza) při vyšetření cytogenetických změn DNA získané ze směsného vzorku kultury myeloidní leukemické linie K562. **B)** Výsledný preparát (mitóza) při vyšetření DNA po LCM a lineární amplifikaci získané z jedné buňky myeloidní leukemické linie K562. **C)** Idiogram získaný stanovením cytogenetických změn u DNA získané ze směsného vzorku kultury myeloidní leukemické linie K562. Cytogenetický nálezn: REV ISH ENH (3q29qter; 5p12-13.3; 5p15.2pter; 6p25.1pter; 12p11.1pter; 16p11.2-12; 18q21.3qter) REV ISH DIM (9q34.1qter; 12q21.1-21.3; 13q11.1qter; 16q12.1-13; 17p11.1-11.2; 18q11.2-12.1; 19p13.3pter). **D)** Idiogram cytogenetických změn DNA po LCM a lineární amplifikaci získané z jedné buňky myeloidní leukemické linie K562. Cytogenetický nálezn: REV ISH ENH (1p36.2pter; 3q26.3qter; 4p11.1pter; 4q35qter; 6p11.1-12.1; 9q13-21; 12p11pter; 15q11.2-24.1; 16p11.2-12; 17p12.1pter; 17q22qter; 18q22qter) REV ISH DIM (5q11.2-15; 5q34.0-35.1; 7q11.2-21.1; 9p12-21; 9q21.3qter; 10q22.1-22.3; 10q26.1qter; 12q21.1-21.3; 13q11.1qter; 16q12.1-22; 19p13.3pter)

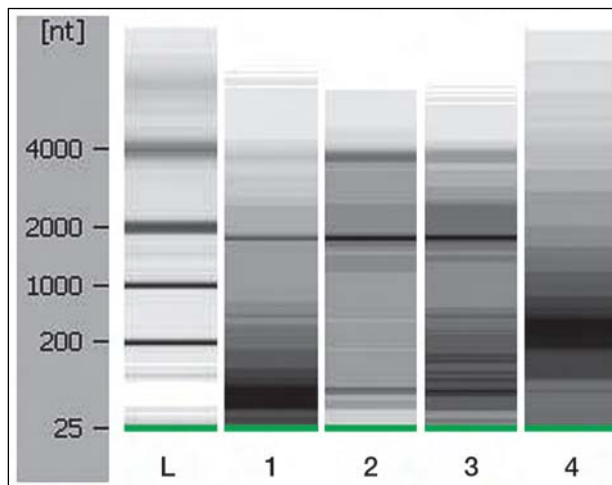
vzorku tedy nebyly zachyceny aberace méně frekventní, nedosahující zastoupení alespoň u 50% buněk v celkové populaci.

Specifická amplifikace vyšetřovaných genů pro účely mutačních studií

V současné době používáme techniku laserové mikrodisekce zejména při analýze mutací genů *egfr1* a *k-ras* u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem (20). Oddělením nádorové populace od nenádorových buněk si totiž významně zvyšujeme sensitivitu DNA sekvenace. DNA získaná z 300-500 mikrodisekovaných buněk je amplifikována ve dvoukolové nested PCR. Dvoukolová nested PCR je založena na 30 cyklech amplifikace s externím párem genově specifických primerů. Vzniklý PCR produkt je využit jako templát pro druhé kolo amplifikace ve 30 cyklech s interním párem primerů. Výsledný ampikon je pak podroben klasické sekvenační analýze.

Izolace, lineární amplifikace a hodnocení kvality mikrodisekované RNA po LCM s použitím IR nebo UV laseru

Laserovou mikrodisekcí byly izolovány buňky kryoprezervované nádorové tkáně karcinomu rekta. Pro srovnání byly buňky disekovány IR laserem nebo UV laserem a to jednak jako 1) rozsáhlejší úseky tkáně čítající >1000 buněk a také jako 2) jednotlivé shluky 1-3 nádorových buněk. RNA



Obr. 6: Analýza kvality RNA získané z nádorové tkáně karcinomu rekta po mikrodisekci IR nebo UV laserem na bioanalyzátoru Agilent 2100 kitem RNA 6000 Pico: **1)** RNA získaná po disekci celé tkáně pomocí IR laseru. **2)** RNA získaná po disekci izolovaných nádorových buněk pomocí IR laseru. **3)** RNA získaná po disekci celé tkáně pomocí UV laseru. **4)** Degradovaná RNA získaná po disekci izolovaných nádorových buněk pomocí UV laseru. **L)** Specifický selekční marker kontroly kvality a reprodukovatelnosti elektroforetické separace.

byla izolovaná pomocí PicoPure™ RNA Isolation kitu (Arcturus, USA), který umožňuje purifikaci přes centrifugační kolonky. Kontrola degradace získané RNA byla provedena pomocí RNA 6000 Pico Kitu na bioanalyzátoru Agilent 2100. Na obrázku 6 je znázorněn výsledek získané RNA po mikrodisekci IR versus UV laserem. Vidíme, že při disekci malých okrásk tkáně (např. jednotlivé infiltrující či metastatické buňky) je vhodnější použít IR laser, protože během disekce malých úseků tkáně pomocí UV laseru dochází ke značné tepelné degradaci RNA.

RiboAmp RNA amplifikační kit (Arcturus, USA) byl použit pro amplifikaci vyzizolované RNA. Tento kit umožňuje amplifikaci již nanogramového množství celkové RNA na mikrogramové. Lineární amplifikace RNA byla započata přepisem jednovláknové molekuly RNA na cDNA reverzní transkriptázou se současnou inkorporací T7 promotoru. Druhé vlákno cDNA bylo dosyntetizováno pomocí exogenních primerů s následným přečištěním dvoušroubovice cDNA. *In vitro* transkripce cDNA na antisense RNA byla provedena pomocí T7 RNA polymerázy. Amplifikace RNA byla ukončena izolací a přečištěním získané antisense RNA. Takto připravenou RNA lze použít pro účely většiny expresních analýz.

Závěr:

V současnosti existuje celá řada mikrodisekčních systémů, které se liší nejen metodou zachytávání buněk, (tzv. membránové nebo-li fúzní technologie, paprskové technologie či mechanické technologie), ale také konfigurací systému a v následných aplikacích. Pomocí všech těchto systémů lze vyšetřovanou tkáň prohlédnout pod mikroskopem před a po mikrodisekci. Tím je zkontrolována homogenita studovaného materiálu a zachování morfologie disekované části tkáně na víčku. Tyto systémy také umožňují obrazovou dokumentaci po každé disekci, což poskytuje příleži-

tost ke korelaci histopatologických nálezů s výsledky molekulární analýzy.

Na našem pracovišti je k dispozici laserový mikrodisekční systém Veritas firmy Arcturus, který má zabudovaný jak IR tak UV laser, což nám umožnilo provedení různých aplikací. Laserovou mikrodisekcí byly izolovány buňky z cytologických preparátů karcinomů plic, zamražených či parafinizovaných nádorových tkání, i ze stabilních buněčných linií. Za účelem získání dostatečného množství DNA/RNA jsme zavedli techniku lineární amplifikace DNA/RNA. V současné době používáme techniku laserové mikrodisekce zejména při analýze mutací genu *EGFR1* a *k-ras*, pro

techniku komparativní genomické hybridizace (CGH) a pro izolaci RNA za účelem dalších expresních analýz. Z našich zkušeností jednoznačně vyplývá nutnost použití LCM pro přesnou diagnostiku, predikci terapeutické odpovědi a prognózování solidních nádorů vyznačujících se vysokou tkáňovou i buněčnou heterogenitou.

Poděkování:

Práce na tomto projektu byla podpořena výzkumným záměrem MŠM 6198959216, granty Interní Grantové Agentury Ministerstva zdravotnictví ČR NR/9076 a Ministerstvem průmyslu a obchodu ČR 1H-PK/45.

Literatura:

- Curran S., McKeay J.A., McLeod H.L., Murray G.I.: Laser capture microscopy. *J Clin Pathol*, 2000; 53:64-68.
- Simone N.L., Bonner R.F., Gillespie J.W. et al.: Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet.*, 1998; 14(7):272-276.
- Banks R.E., Dunn M.J., Forbes M.A. et al.: The potential use of laser capture microdissection to selectively obtain distinct populations of cells for proteomic analysis—preliminary findings. *Electrophoresis*, 1999; 20(4-5):689-700.
- Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Chuaqui R.F. et al.: Laser capture microdissection. *Science*, 1996;274(5289):998-1001.
- Bonner R.F., Emmert-Buck M., Cole K., Pohida T. et al.: Laser capture microdissection: Molecular analysis of tissue. *Science*, 1997; 278: 1481-1483.
- Brignole E.: Laser-capture microdissection. *Modern Drug Discovery*, 2000; 3:69-70, 73.
- Willingham E.: Laser Microdissection Systems. *The Scientist*, 2002; 16(10): 42.
- Fend F., Raffeld M.: Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol*, 2000; 53: 666-672.
- Burgemeister R., Stich M.: Laser mediated live cell handling: Detection and collection of single live cells by laser microdissection and pressure catapulting (LMPC). *Zellbiologie*, 2004; 23-24.
- Gjerdrum L.M., Lielpetere I., Rasmussen L.M. et al.: Laser-assisted microdissection of membráně-mounted paraffin section. *J Mol Diagn*, 2001; 3:105-110.
- Zhang L., Yang N., Conejo-Garcia J.R. et al.: Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovary carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003; 9:264-272.
- Chimenti C., Pieroni M., Russo A., Sale P. et al.: Laser microdissection in clinical cardiovascular research. *American College of Chest Physicians*, 2005; 128: 2876-2881.
- Klein Ch.A., Schmidt-Kittler O., Schardt J.A. et al.: Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1999; 96: 4494-4499.
- Stoecklein N.H., Erbersdobler A., Schmidt-Kittler O. et al.: SCOMP is superior to degenerated oligonucleotide primed-polymerase chain reaction for global amplification of minute amounts of DNA from microdissected archival tissue samples. *American Journal of Pathology*, 2002; 161: 43-51.
- Serth J., Kuczyk M.A., Paeslack U. et al.: Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. *Am J Pathol*, 2000; 156:1189-1196.
- Kuukasjarvi T., Tanner M., Pennanen S. et al.: Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997; 18:94-101.
- Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D. et al.: Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992; 258(5083):818-21.
- Kallioniemi O.P., Kallioniemi A., Piper J. et al.: Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994 10(4): 231-43.
- Speicher M.R., du Manoir S., Schrock E. et al.: Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DANN-amplification. *Hum Mol Genet*, 1993; 2:1907-1914.
- Berkovcová J., Hajdúch M., Dziechciarková M., Trojanec R., Janošťáková A., Wiecek S., Grygárková I., Kolek V., Vorlíček J.: Predikce účinnosti tyrozinkinázových inhibitorů Egfr1 v léčbě nemalobuněčných plicních karcinomů. *Klin Onkol*, 2006 (v tisku).

Korespondenční adresa:

MUDr Hajdúch M. (MUDr.Dziechciarková M.)
Onkologická klinika FN Olomouc
Hněvátinská 3, 775 15 OLOMOUC
mdziechciarkova@seznam.cz

Došlo / Submitted: 10. 8. 2007

Přijato / Accepted: 29. 6. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů. The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

KARDIOTOXICITA ADJUVANTNEJ LIEČBY KARCINÓMU PRSNÍKA

CARDIOTOXICITY OF BREAST CANCER ADJUVANT TREATMENT

CINGELOVÁ S.,¹ JURGA L.,¹ MLADOSIEVIČOVÁ B.²

¹ONKOLOGICKÁ KLINIKA FN TRNAVA,

²ODDELENIE KLINICKEJ PATOFYZIOLÓGIE LFUK BRATISLAVA

Súhrn

Pacientky s včasným štádiom karcinómu prsníka patria z hľadiska kardiotoxicity spolu s pediatrickými onkologickými pacientmi k najprísnejšie sledovaným skupinám. Kardiotoxicita protinádorovej liečby sa z krátkodobého aj dlhodobého hľadiska dostáva do popredia najmä teraz, keď karcinóm prsníka vo včasnom štádiu je považovaný za kurabilnú malignitu. Keďže významná časť týchto pacientiek prežíva dlhodobo, je vyššia pravdepodobnosť vzniku neskorkej kardiotoxicity. Naším cieľom je ponúknuť prehľad súčasných poznatkov o mechanizmoch kardiotoxicity, o jej incidencii, detekcii a prevencii v súvislosti s adjuvantnou terapiou. Rozšírením spektra cytostatík (taxány, trastuzumab) sa situácia skomplikovala, pretože tieto farmaká sú kardiotoxické a navyše môžu potencovať kardiotoxicitu doxorubicínu. F. Pein et al., (2004) popísal významný vzostup incidence zlyhania srdca až po 12 rokoch po podaní antiracyklínov, i pri nižších kumulatívnych dávkach. Súčasné techniky rádioterapie („respiratory-gating“ a Intensity modulated radiotherapy - IMRT) znižujú dávku žiarenia na myokard, a tým znižujú riziko vzniku kardiotoxicity. Napriek tomu pri rádioterapii ľavostranného karcinómu prsníka po prsník zachovávajúcej operácii, môže tiež dôjsť k poškodeniu myokardu. Optimálny spôsob a frekvenciu monitorovania kardiotoxicity doteraz nepoznáme. Použitie lipozomálneho doxorubicínu, alebo kardioprotekcie dexrazoxanom v adjuvantnom usporiadaní ostáva kontroverzné. Hľadanie vyváženého postupu, ktorý minimalizuje riziko recidívy nádoru a zároveň riziko neskorkej kardiotoxicity, je stále aktuálnym problémom.

Kľúčové slová: kardiotoxicita, adjuvantná terapia karcinómu prsníka.

Summary

Patients with early stage breast cancer along with pediatric oncology patients belong to most thoroughly monitored groups due to cardiotoxicity of chemotherapy and transcatheter radiotherapy. Both short-term and long-term cardiotoxicity of the anticancer treatment is getting all the more attention nowadays when early stage breast carcinoma is considered and treated as a curable disease. Since many of these patients benefit from a long-term survival, the probability of late cardiotoxicity development increases. Our goal is to offer a summary of contemporary knowledge about mechanisms of cardiotoxicity, about its incidence, detection and prevention in the context of breast cancer adjuvant therapy. Current therapeutic alternatives such as the addition of taxanes and trastuzumab to anthracyclines increased the complexity of the situation, as these drugs are cardiotoxic and may potentiate the cardiotoxicity of doxorubicin. Significant increase of heart-failure incidence was described by F. Pein et al., 2004, more than 12 years after anthracycline treatment was administered, notwithstanding the low cumulative doses. Contemporary radiotherapy techniques („respiratory-gating“ and intensity modulated radiotherapy - IMRT) reduce the dose administered to myocardium, thereby reducing the risk of cardiotoxicity. In spite of the improved radiotherapy techniques myocardial damage can be caused by the left thorax irradiation after breast-conserving surgery. Optimal way and frequency of cardiac monitoring are still unknown. The use of liposomal doxorubicin and cardioprotection with dexrazoxan in adjuvant setting remain controversial. Therefore, the search for a well-balanced procedure which would minimize the risk of relapse while consequently lowering the risk of late cardiotoxicity is still on.

Key word: cardiotoxicity, breast cancer; adjuvant drug therapy.

Kardiotoxicita cytostatík v adjuvantnom usporiadaní

Mechanizmy kardiotoxicity jednotlivých cytostatík uvádzame v tabuľke č. 1.

Liečba	Hlavný mechanizmus	Toxicita
Antracyklíny	Tvorba voľných radikálov	Kardiomyopatia, arytmie, myokarditída-perikarditída syndróm, infarkt myokardu, náhla kardiálna smrť, zlyhanie srdca
Taxány	Potencuje konverziu doxorubicínu na doxorubicinol	Potencuje kardiotoxicitu antracyklínov, arytmia, infarkt myokardu, náhla kardiálna smrť
Trastuzumab	Inhibícia HER2/neu	Potencuje kardiotoxicitu antracyklínov, zlyhanie srdca, infarkt myokardu
Rádioterapia na oblasť hrudníka	Tvorba voľných radikálov v endoteli	ICHs, infarkt myokardu, kardiomyopatia, perikarditída, arytmie, chlopňové chyby

Tabuľka 1. Poškodenie srdca adjuvantnou liečbou karcinómu prsníka. Podľa: Swain SM a Bird BR, 2006 (1). ICHS-ischemická choroba srdca

Antracyklíny

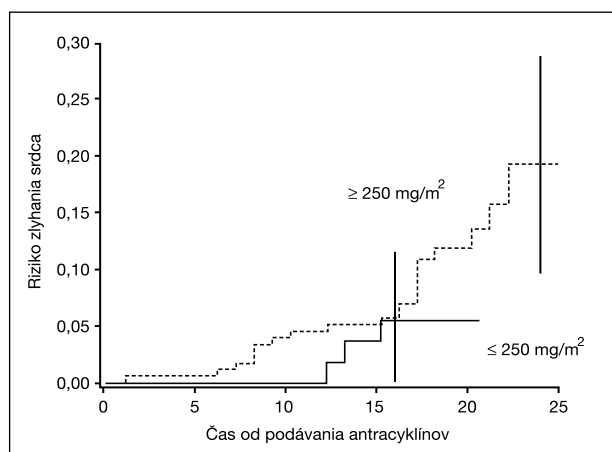
Z hľadiska nástupu toxického poškodenia myokardu poznáme akútnu kardiotoxicitu, ktorá sa prejavuje ako perikarditída alebo myokarditída hodiny až dni po prvej dávke, je zriedkavá a manifestuje sa obvykle poruchami rytmu. Subakútna kardiotoxicita sa prejaví po mesiacoch príznakmi kongestívneho zlyhania srdca. Neskorá toxicita sa môže prejaviť najskôr rok po ukončení liečby. (2) Pri akútnej toxicite sa uplatňuje predovšetkým voľnoradikálový mechanizmus za účasti iónov železa (vznik železodoxorubicínového komplexu – pozor na preťaženie organizmu železom po opakovaných transfúziách). Myokard má nízku aktivitu superoxid dismutázy a katalázy; teda má nízku schopnosť eliminácie voľných reaktívnych radikálov. (3) Pri neskej toxicite sa uplatňuje pôsobenie metabolitu doxorubicinolu a zníženie expresie génov kódujúcich kontraktilné a iné proteíny. Kardiotoxicita je dávkovo závislá. (4,5,6) Zo všetkých troch foriem je najlepšie preštudovaná subakútna kardiotoxicita. (1) Je známe, že dcérske antracyklíny, t.j. epirubicín a idarubicín, sú menej kardiotoxické v ekvimolárnej dávke. (7) Lipozómový doxorubicín je menej kardiotoxický, ale nemáme k dispozícii rozsiahlejšie klinické štúdie o jeho použití v adjuvantnej liečbe. (8)

Kategória	Typ poškodenia	Čas vzniku
Akútna	arytmie, myoperikarditída, zlyhanie srdca, KMP	hodiny,dni po liečbe, väčšinou prechodná
Subakútna	myoperikarditída, arytmie, dilatčná KMP, zlyhanie srdca	počas 1. roka po ukončení liečby
Neskorá	dilatčná KMP, zlyhanie srdca, arytmie	> 1 rok po ukončení liečby

Tabuľka 2. Kategórie kardiotoxicity antracyklínov. Podľa: Giantris et al., 1998 (2), KMP-kardiomyopatia.

Pri dlhodobom prežívaní pacientiek po adjuvantnej protinádorovej liečbe je väčšia pravdepodobnosť rozvoja neskej toxicity (vrátane kardiotoxicity) terapie, ktorej incidencia narastá s dĺžkou života po liečbe. (9) Ku klinickej manifestácii neskej kardiotoxicity dochádza približne u polovice pacientov so subklinickou kardiotoxicitou, a to

najmä po vírusových infekciách, neprimeranej fyzickej (izometrickej) záťaži, v súvislosti s chirurgických zákrokom, tehotenstvom, pôrodom, ischemickou chorobou srdca, hypertenziou a obezitou. Funkcia srdca môže byť zachovaná do určitého kritického stupňa štrukturálneho postihnutia, potom však môže nastať rýchly zvrät do zlyhania srdca. (10,11) F. Pein et al., (12) popísal v súbore 226 detských pacientov významný vzostup incidence zlyhania srdca až po 12 rokoch po podaní antracyklínov, i pri nižších kumulatívnych dávkach, (Obr. č.1). **Z obr. č. 1** vyplýva niekoľko zaujímavých zistení. Bezpečná kumulatívna dávka neexistuje a pri nižších kumulatívnych dávkach sa incidencia srdcového zlyhania zvyšuje až pri dlhodobom sledovaní. J. Bonnetterre et al., (štúdia French Adjuvant Study Group - FASG) sledovali pacientky po podaní epirubicínu (FEC 50 vs. FEC 100) 10 rokov. Po 5 rokoch bola incidencia neskej kardiotoxicity 2,2%, resp. 1,5%, (13). Po 10 rokoch sledovania stúpila incidencia na 3,7% resp. 3,0% z 537 pôvodne hodnotených pacientiek, (14). Z 305 pacientiek sledovaných 10 rokov to však tvorí už 6,9% resp. 5%. Prekvapujúca je nižšia incidencia kardiotoxicity epirubicínu pri dávke 100mg/m² v porovnaní s dávkou 50mg/m²; rozdiel však nie je štatisticky významný.



Obr. 1 Závislosť rizika zlyhania srdca od času (v rokoch) a kumulatívnej dávky doxorubicínu Podľa: Pein F. et al., 2004. (12)

Taxány

Mechanizmus kardiotoxického účinku taxánov nie je známy. Niektorí autori uvádzajú, že skôr vehikulum cremophor EL a nie paclitaxel spôsobuje kardiotoxicitu. Pravdepodobný efekt cremophoru EL je masívne uvoľnenie histamínu. Pri experimentoch na zvieratách viedla stimulácia histamínových receptorov v tkanive srdca k poruchám vedenia vzruchu a arytmiám. (15) Histologický obraz poškodenia myokardu taxánmi ukazuje závažné zmeny (dilatácia sarkoplazmatického retikula, strata kontraktilných elementov, nahromadenie lipofuscinu, vakuolárna degenerácia asi 20% myocytov, intersticiálny edém). Zápalové zmeny nebývajú prítomné. Tento nález sa niekedy dával do súvislosti výhradne s kardiotoxicitou antracyklínov, ktorá nie je tak špecifická, ako sa pôvodne predpokladalo. Paclitaxel spôsobuje arytmiu (asymptomatická bradykardia) u 0,5% pacientov, zriedkavo ischemické príhody a hypotenzie. (16) Kardiotoxicita paclitaxelu nie je jednoznačná, môže však potencovať kardiotoxicitu antracyklínov a trastuzumabu. Ovplyvňuje totiž elimináciu doxorubicínu potencovaním jeho konverzie na doxorubicinol, ktorý je zodpovedný za neskorú kardiotoxicitu. V tabuľke 3. uvádzame incidenciu kardiotoxicity vybraných štúdií s taxánmi v adjuvantnej liečbe. Pri liečbe metastatického karcinómu prsníka incidencia kardiálnych nežiadúcich účinkov prudko stúpa, v prípade prekročenia kumulatívnej dávky doxorubicínu 360 mg/m². (17,18,19)

Tabuľka 3. Incidencia klinickej kardiotoxicity vybraných klinických štúdií s antracyklínmi +/- taxánmi v adjuvancii. (20-24)

Štúdia	Počet pacientov	Adjuvantná CHT	Follow-up (roky)	Incidencia klinickej kardiotoxicity
NSABP B-28 (Mamounas E et al. 2003)	3060	AC vs AC→T	5	<2% nesignif.
MDACC (Buzdar AV et al. 2002)	524	T→FAC vs FAC	5	<2% nesignif.
CALGB 9344 (Sartor CL et al. 2005)	3121	AC vs AC→T	5	<2% nesignif.
BCIRG 001 (Martín M et al. 2003)	1 491	TAC vs FAC	5	1,6% vs 0,5%
PACS 01 (Roche H et al. 2004)	1 999	FEC100x6 vs FEC100x3 →docetaxel	5	<2% nesignif.

F - 5-fluorouracil

E – epirubicín

C – cyklofosfamid

A – doxorubicín

T – paclitaxel

NSABP - National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

BCIRG – Breast Cancer International Research Group

MDACC – M. D. Anderson Cancer Center

CALGB – Cancer and Leukemia Group B

PACS – Picture Archiving and Communication Systems

CHT - chemoterapia

Trastuzumab

Trastuzumab sa viaže na HER2/neu a inhibuje signálnu cestu receptora pre epidermálny rastový faktor. Je známe, že funkčný HER2/neu chráni pred dilatálnou kardiomyopatiou. Je potrebný pre rast a prežívanie kardiomyocytov, ale tiež nádorových buniek. (25) Samotný trastuzumab zriedka spôsobuje poškodenie srdcového svalu. Je známe, že poruchy funkcie myokardu sú častejšie u pacientov súčasne liečených antracyklínmi. (26) Ewer MS et al. (32) nazvali trastuzumabovú kardiotoxicitu ako tzv. „dysfunkcia srdca typu II“ (ide o „type II chemotherapy-related cardiac dysfunction“); zdôrazňujú tak odlišnosť tejto entity od známej doxorubicínovej kardiotoxicity. Tieto dva typy kardiotoxicity sa tiež môžu vyskytnúť aj súčasne u jedného pacienta. Porovnanie kardiotoxicity doxorubicínu a trastuzumabu uvádzame v **tab. 5**. Synergický efekt antracyklínov a trastuzumabu pri vzniku kardiotoxicity viedol k ich sekvenčnému používaniu. (27) Kombinovaná analýza dvoch klinických štúdií fázy III (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project [NSABP] B-31 a N9831) ukázala, že podávanie trastuzumabu 1 rok po ukončení adjuvantnej terapie u HER2-pozitívnych pacientiek vedie k 33% relatívnej redukcii rizika úmrtia a k 12% zlepšeniu bezrelapsového prežívania počas 3 rokov (28). V oboch klinických skúšaníach bol trastuzumab podávaný súbežne s paclitaxelom; v ramenách s trastuzumabom sa zistil štatisticky významný vzostup incidencie kardiotoxicity. V štúdií Herceptin Adjuvant (HERA) bol 1 rok podávaný trastuzumab; po najmenej štyroch cykloch adjuvantnej alebo neoadjuvantnej terapie došlo k zlepšeniu 2-ročného bezrelapsového prežívania o 8.4% (absolútne riziko), ale celkové prežívanie sa signifikantne nezlepšilo. Incidencia ťažkého kongestívneho zlyhania srdca bola 0.5%. (29) Incidenciu kardiotoxicity vo vybraných štúdiách s trastuzumabom uvádzame v **tab. 4**.

Tabuľka 4. Incidencia klinickej kardiotoxicity po podávaní trastuzumabu v adjuvantnom usporiadaní. (28-31)

Štúdia	Počet pacientov	Incidencia -trastuzumab	incidencia +trastuzumab	P	Follow up
NSABP B-31 (Tan Chiu E et al. 2005)	1816	0,8(AC-T)	4,1 (AC-TH)	<0,001	4
N-9831 (Romond EH et al. 2005)	1534	0 (AC-T)	2,9(AC-TH)	<0,001	4
HERA (Piccart-Gebhart MJ et al. 2005)	5090	0,06	1,73(+H)	<0,001	2
BCIRG 006 (Slamon DJ et al. 2005)	3200	0,95(AC-T)	2,3 (AC-TH)	0,016	4
		0,95(AC-T)	1,33 (TCH)	0,54	

H - trastuzumab

HERA - Herceptin Adjuvant

Tabuľka 5. Porovnanie kardiotoxicity doxorubicínu a trastuzumabu. Podľa: Ewer et al. (32) ECHOKG-echokardiografia.

	Typ I (poškodenie srdca)	Typ II (dysfunkcia myokardu)
Cytostatikum	Doxorubicín	Trastuzumab
Klinický priebeh, odpoveď na terapiu	Môže sa stabilizovať, poškodenie je však ireverzibilné, relaps za niekoľko mesiacov alebo rokov môže súvisieť s kardiálnym stresom	Vysoká pravdepodobnosť vyliečenia do 24 mesiacov (reverzibilný proces)
Efekt dávky	Kumulatívny	Nesúvisí s veľkosťou dávky
Mechanizmus	Oxidačný stres, voľné radikály	Inhibícia HER2/neu
Ultraštruktúra	Vakuoly, vymiznutie myofibril, nekroza myocytov, fibróza	Bez zjavných ultraštruktúrnych abnormalít
Neinvazívna diagnostika	Globálna funkčná porucha srdca na ECHOKG a ventrikulografii	Globálna funkčná porucha srdca na ECHOKG a ventrikulografii

Rádioterapia

Ionizujúce žiarenie generuje voľné radikály, ktoré deštrujú nukleové kyseliny a proteíny. Ožiarenie oblasti srdca spôsobuje mikroskopické zmeny v zmysle fibrotickej preštravby kardiomyocytov, perikarditídy, drobných zjazvení a akcelerovanej aterosklerózy. Klinicky sa kardiotoxicita po rádioterapii prejavuje ako kardiomyopatia, so zhrubnutým perikardom a ischemickou chorobou srdca. (33) Rádioterapia ľavostranných karcinómov prsníka zafarčí srdce 2 až 3 -krát vyššou dávkou žiarenia ako pravostranná rádioterapia. (34) Pacientky liečené rádioterapiou pre ľavostranný karcinóm prsníka majú signifikantne vyššiu incidencia kardiotoxicity. Novšie techniky rádioterapie sú však šetrnejšie, a teda lateralita nádoru významne neovplyvňuje výskyt kardiotoxicity. (35, 36)

Diagnostika kardiotoxicity

Najčastejšie používanou metódou v monitorovaní kardiotoxicity je dvojrozmerná echokardiografia. Pred začatím liečby antracyklínmi alebo trastuzumabom by mala byť stanovená ľavokomorová ejekčná frakcia (EF LK) pacienta. Pokles EF LK o viac ako 20% v priebehu liečby môže predchádzať klinickým príznakom zlyhania srdca, a je potrebné zvážiť redukciu dávky alebo zastavenie liečby. (37) Biopsia z apexu pravej komory poskytuje veľmi presnú informáciu o mikroskopických zmenách myokardu, je invazívna a obmedzená na klinické štúdie. Z biochemických metód sledovania kardiotoxicity ide o sériové merania kardiálnych troponínov a brain natriuretic peptide - BNP. (38, 39) Ďalšou nekonvenčnou metódou je vysokorozlišovacia elektrokardiografia (high-resolution ECG, HRECG). Umožňuje získavať informácie o takých elektrických dejoch

v myokarde, ktoré nie sú detegovateľné pomocou klasickej elektrokardiografie. (40)

Prevencia a liečba kardiotoxicity

Možnosti prevencie kardiotoxicity sú zatiaľ v adjuvantnom usporiadaní obmedzené a liečba je prevažne symptomatická. V prevencii kardiotoxicity je potrebné sústrediť sa na redukciu rizikových faktorov vzniku kardiotoxicity. Odporúča sa monitorovať ejekčnú frakciu ľavej komory, a včas diagnostikovať potenciálne abnormality. Podávanie menej kardiotoxických antracyklínových cytostatík môže tiež znížiť incidencia kardiotoxicity. Pri subklinickej kardiotoxicite sa podávajú inhibítory angiotenzín-konvertujúceho enzýmu a betablokátor, v snahe zabrániť jej prechodu do klinicky manifestnej kardiotoxicity. Liečba klinickej kardiotoxicity (kardiomyopatie) je symptomatická, ide o ovplyvnenie kongestívneho zlyhania srdca a arytmií. (38) Strata myofibril vedie k poklesu kontraktility myokardu, ktorá neodpovedá na kardioglykozidy.

Záver

Do štúdií s trastuzumabom v adjuvancii autori nezahrnuli pacientky s nízkou ľavokomorovou ejekčnou frakciou, ochoreniami srdca a artériovou hypertenziou. Incidencia kardiotoxicity u pacientov s týmito rizikovými faktormi bude pravdepodobne vyššia. Je predpoklad, že pri dlhodobom sledovaní (viac ako 5 rokov) bude incidencia kardiotoxicity stúpať. (1) Určenie tolerančných dávok transkardiálnej rádioterapie a kumulatívnych dávok doxorubicínu predstavuje len hrubý odhad rizika neskorej kardiotoxicity. Ideálne by mal byť biomarker, resp. test subklinického poškodenia jednoduchý, opakovateľný, reprodukovateľný, dostatočne senzitívny a špecifický, umožňujúci lekárovi včas redukovať/vysadiť liečbu a vyhnúť sa život ohrozujúcej toxicite. Vyžaduje sa dobrá korelácia hladiny markera (hodnoty testu) s patofyziologickou príhodou zodpovednou za orgánové poškodenie. Ak sa pozitivita markeru (testu) zachytí paralelne so vznikom letálneho poškodenia, vyšetrenie je bezcenné. Často je vzostup markera (testu) skôr dôsledkom než prediktorom letálneho poškodenia. (41) Nekonenčnou metódou je vysokorozlišovacia elektrokardiografia (high-resolution ECG, HRECG). Umožňuje získavať informácie o takých elektrických dejoch v myokarde, ktoré nie sú detegovateľné pomocou klasickej elektrokardiografie. (40) Pokojová a námahová echokardiografia a rádionuklidová ventrikulografia sa systematicky používajú na detekciu skorých aj neskorých príznakov antracyklínovej toxicity; väčšinou však neboli sledované prospektívne. V súlade so smerovaním k medicíne založenej na dôkazoch boli vytvorené odporúčania na sledovanie kardiotoxicity. Ich použitie v praxi však ostáva kontroverzné.

Literatúra:

- Swain SM, Bird BR. Cardiac Toxicity in the New Breast Cancer Survivor: Review of Potential Cardiac Problems in Cured Patients. ASCO Educational book CD ROM, 2006.
- Giantris A, Abdurrahman L, Hinkle A, et al. Anthracycline-induced

kardiotoxicity in children and young adults. Crit Rev Oncol Hematol 1998;27(1):53.

- Mladosičová B. Kardiotoxicita cytostatickej liečby in Ďuriš I, Hulín I, Bernadič M. Princípy internej medicíny. SAP, Bratislava, 2001:s 1894-1899.
- Umlauf J, Horky, M. Molecular biology of doxorubicin-induced

- cardiomyopathy. *Experimental and Clinical Cardiology*. 2002; 7:35-39.
5. Minotti G, Cavaliere AF, Mordente A, et al. Secondary alcohol metabolites mediate iron delocalization in cytosolic fractions of myocardial biopsies exposed to anticancer anthracyclines. Novel linkage between anthracycline metabolism and iron-induced cardiotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95:1595-1605.
6. Von Hoff DD, Layard MW, Basa P. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med*. 1979;91:710-717.
7. Jain KK, Casper ES, Geller NL. A prospective randomized comparison of epirubicin and doxorubicin in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 1985;3:818-826.
8. Harris L, Batist G, Belt R, et al. Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2002;94:25-36.
9. Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CT, et al. Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *JAMA* 1991;266:1672.
10. Mladosičová B. Nežiadúce účinky cytostatík na srdce. *Lekárske listy* 2003;24:8-11.
11. Mladosičová B. Patofyziológia a klinika kardiotoxicity cytostatík. *Acta chemotherapeutica* 2003;5:67-76.
12. Pein F, Sakiroglu O, Dahan M et al. Cardiac abnormalities 15 years and more after adriamycin therapy in 229 childhood survivors of a solid tumor at the Institut Gustave Roussy. *Br J Cancer*. 2004;91(1):37-44.
13. French Adjuvant Study Group: Benefit of a high-dose epirubicin regimen in adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer patients with poor prognostic factors: 5-year follow-up results of French Adjuvant Study Group 05 randomized trial. *J Clin Oncol* 19(3):602-611, 2001.
14. Epirubicin increases long-term survival in adjuvant chemotherapy of patients with poor-prognosis, node-positive, early breast cancer: 10-year follow-up results of the French adjuvant study group 05 randomized trial. *J Clin Oncol* 23 (12):2005;2686-2693.
15. Schimmel KJM, Richel DJ, van den Brink RBA. Cardiotoxicity of Cytotoxic Drugs. *Cancer Treatment Reviews* 2004;30:181-191.
16. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles and Practice in Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2005:3295 s.
17. Giordano SH, Booser DJ, Murray JL, et al. A detailed evaluation of cardiac toxicity: a phase II study of doxorubicin and one- or three-hour-infusion paclitaxel in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3360.
18. Holmes FA, Madden T, Newman RA, et al. Sequence-dependent alteration of doxorubicin pharmacokinetic by paclitaxel in a phase I study of paclitaxel and doxorubicin in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 1996;14(10):2713.
19. Minotti G, Saponiero A, Licata S, et al. Paclitaxel and docetaxel enhance the metabolism of doxorubicin to toxic species in human myocardium. *Clin Cancer Research* 2001;7:1511.
20. Mamounas E, et al. Paclitaxel following doxorubicin/cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP28 (abstract). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22(1)4a.
21. Buzdar AU et al. Evaluation of paclitaxel in adjuvant chemotherapy for patients with operable breast cancer: preliminary data of prospective randomized trial. *Clin Cancer Res* 2002;8(5):1073-9.
22. Sartor CI, Peterson BL, Woolf S et al. Effect on addition of adjuvant paclitaxel on radiotherapy delivery and locoregional control of node-positive breast cancer: Cancer and Leukemia Group B 9344. *J Clin Oncol* 2005;23:30-40.
23. Martin M, Pienkowski T, Mackey J et al. TAC improves disease free survival and overall survival over FAC in node positive early breast cancer patients, BCIRG 001: 55 months follow-up. *Breast Cancer Research Treat* 2003;43a.
24. Roché H, Fumoleau P, Spielmann M et al. Five years analysis of the PACS01 trial: 6 cycles of FEC100 vs 3 cycles of FEC100 followed by 3 cycles of docetaxel for the adjuvant treatment of node positive breast cancer. *San Antonio Breast Cancer Symposium* 2004. *Breast Cancer Research Treat* 2004;88:S16.
25. Keefe DL. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer*. 2002; 95:1592-1600.
26. Ozelik C, Erdmann B, Pilz B, et al. Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8880-8885.
27. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20:719-726.
28. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1673-1684.
29. Piccart-Gebhart MJ, Proctor M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1659-1672.
30. Slamon DJ, Robert N, Pienkowski T, et al. on behalf of the BCIRG 006 Investigators. Phase III trial comparing AC-T with AC-TH and with TCH in the adjuvant treatment of HER2 positive early breast cancer patients: First interim efficacy analysis. *San Antonio Breast Cancer Conference*, 2005.
31. Tan-Chiu E, Yothers G, Romond E, et al. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol*. 2005;23:7811-7819.
32. Ewer MS, Lippman SM. Type II Chemotherapy – Related Cardiac Dysfunction: Time to recognize a New Entity.: *J Clin Oncol* 2005;23(13):2900-2902.
33. Stewart JR. Normal tissue tolerance to irradiation of the cardiovascular system. *Frontiers of Radiation Therapy and Oncology*. 1989;23:302-309.
34. Lee PJ, Mallik R. Cardiovascular effects of radiation therapy: Practical approach to radiation therapy-induced heart disease. *Cardiology in Review*. 2005;13:80-86.
35. Patt DA, Goodwin JS, Kuo YF, et al. Cardiac morbidity of adjuvant radiotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:7475-7482.
36. Vordermark D, Seufert I, Schwab F. Cardiac toxicity of mediastinal radiotherapy: Which are the critical structures? *J Clin Oncol* 2005;23:3635-3636.
37. Ganz WI, Sridhar KS, Ganz SS, et al. Review of tests for monitoring doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Oncology*. 1996;53:461-470.
38. Elbl L, et al. Poškození srdce protinádorovou léčbou. *Grada, Praha*, 2002:154 s.
39. Billingham ME. Role of endomyocardial biopsy in diagnosis and treatment of heart disease. *Cardiovascular Pathology*. 1991;1465-1486.
40. Mladosičová B. Využitie vysokorozlišovacej elektrokardiografie pri detekcii poškodenia myokardu po antracyklínových cytostatikách a vybraných antidepresívach. (Kandidátska dizertačná práca). Ústav patologicko-fyziológie LF UK, Bratislava, 1996:1-15.
41. Jurga LM. Kardiotoxicita a možnosti jej ovplyvnenia. *Acta Chemotherapeutica*, 2000;1:23-27.

Korespondenčná adresa:
MUDr. Cingelová S.
Onkologická klinika FN Trnava, A, Žarnova 11, 918 43 Trnava SR

Došlo / Submitted: 4. 5. 2007
Prijato / Accepted: 28. 5. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů. The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

ÚLOHA EXPRESE GENŮ CHINONOXIDOREDUKTÁZY 1 A 2 V ROZVOJI KARCINOMU PRSU

ROLE OF GENE EXPRESSION OF QUINONE OXIDOREDUCTASE 1 AND 2 IN PROGRESSION OF BREAST CANCER

HUBÁČKOVÁ M.^{1,2}, VÁCLAVÍKOVÁ R.¹, KUBALA E.³, KODET R.⁴, MRHALOVÁ M.⁴, NOVOTNÝ J.⁵,
VRÁNA D.⁶, GUT I.¹ A SOUČEK P.¹

¹ STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, PRAHA

² 3.LF UK, PRAHA

³ RADIOTERAPEUTICKO-ONKOLOGICKÉ ODDĚLENÍ, FN MOTOL, PRAHA

⁴ ÚSTAV PATOLOGIE A MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNY 2.LF UK A FN MOTOL, PRAHA

⁵ ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A 1.LF UK, PRAHA

⁶ KRAJSKÁ NEMOCNICE T.BATI A.S., ZLÍN A 1.LF UK, PRAHA

Souhrn

Východisko: Karcinom prsu je velmi závažné onemocnění, při kterém je včasná diagnóza nemoci kritickým předpokladem úspěšné léčby. V současné době vrcholí snaha hledat spolehlivé prognostické faktory, které by umožnily co nejlépe odhadnout vývoj nemoci. Vhodnými prognostickými markery se jeví také skupina biotransformačních enzymů chinonoxidoreduktáz (NQO1 a NQO2), u kterých již bylo prokázáno spojení s rizikem vzniku karcinomu prsu. **Metody a výsledky:** Pomocí metody real-time PCR byla detekována exprese NQO1 a NQO2 ve všech sledovaných vzorcích pacientek s karcinomem prsu (42 párových vzorků nádorové tkáně, okolní tkáně bez histologicky prokázané infiltrace nádorovými buňkami a 19 vzorků lymfocytů periferní krve). Expres u obou genů vykazovala velkou individuální variabilitu a byla rovněž charakterizována deregulací v nádorové tkáni. Statisticky byly zhodnoceny vztahy mezi expresí obou genů a klinickými a histopatologickými charakteristikami onemocnění. Významně vyšší exprese NQO1 byla nalezena v nenádorové tkáni pacientek po menopauze ($P = 0,036$), u pacientek s pN0 (tj. bez metastatického postižení axilárních lymfatických uzlin, $P = 0,044$) a u pacientek s prokázanou expresí receptorů pro estrogen ($P = 0,020$) a progesteron ($P = 0,040$). Celkově vysoká exprese NQO1 v nenádorové tkáni korelovala s příznivými prognostickými faktory. Tento trend bude ještě třeba ověřit analýzou přežívání v delším časovém horizontu. Pacientky s invazivním ductálním karcinomem mléčné žlázy měly významně nižší expresi NQO2 v nádorové tkáni ve srovnání s lobulárním typem nádoru mléčné žlázy ($P = 0,011$). **Závěr:** Expres NQO1 i NQO2 koreluje s významnými prognostickými faktory u nemocných s karcinomy prsu a jejich studiu je třeba se dále věnovat na větším souboru.

Klíčová slova: karcinom prsu, NQO1, NQO2, exprese, real-time PCR.

Summary

Background: Breast cancer is a highly serious disease in which early diagnosis presents a critical step to successful therapy. At present time, identification of reliable prognostic markers that enable more precise estimation of disease progression is a major scientific target. The group of biotransformation enzymes quinone oxidoreductases (NQO1 and NQO2) seems to be among such targets, as their association with breast cancer risk has been already published. **Methods and Results:** Expression of NQO1 and NQO2 was detected by real-time PCR in 42 paired tumor and surrounding (without morphologically verified presence of tumor cells) tissue samples and in 19 samples of lymphocytes of breast cancer patients. Large inter-individual variability in expression of both genes was found along with deregulation in tumor tissue. Statistical comparisons of expression levels of both genes with clinical and histopathology findings were performed. Postmenopausal patients had significantly higher NQO1 expression in their non-tumor samples when compared to premenopausal ones ($P = 0,036$). Higher NQO1 expression in non-tumor samples was found in patients without axillary lymph node metastasis ($P = 0,044$) and in patients with immunohistochemically detected expression of the estrogen receptor ($P = 0,020$) and progesterone receptor ($P = 0,040$). Generally, high NQO1 expression in non-tumor tissue correlated with factors of good prognosis. This trend should be further verified by survival analysis from a long-term perspective. Lower NQO2 expression was observed in tumor tissues of patients with invasive duct carcinomas of the mammary gland ($P = 0,011$). **Conclusion:** Expressions of NQO1 and NQO2 correlate with well-established prognostic factors in breast carcinoma patients and should be studied further on larger number of patients.

Key words: Breast cancer, quinone reductase 1, quinone reductase 2, gene expression, PCR.

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen a patří mezi tzv. hormonálně regulované nádory, ovlivněné expresí zejména estrogenů (1). Estrogeny i xenoestrogeny přítomné v zevním prostředí navíc indukují zvýšenou expresi některých růstových faktorů, jež ovlivňují proliferativní aktivitu buněk (1). Tyto procesy se uplatňují u většiny tzv. sporadických forem karcinomu prsu, tj. u 75–85 % nemocných. U 10–15 % vzniká karcinom prsu na základě dědičných genetických změn (tzv. hereditární formy karcinomu prsu), které jsou podmíněny především mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2. Kromě těchto majoritních predispozičních genů (angl. high penetrance) je nyní studována úloha i tzv. genů s nízkou penetrancí (angl. low penetrance), mezi které patří i biotransformační geny.

Chinonoxidoreduktázy jsou flavoproteiny účastníci se druhé fáze biotransformace. V lidském genomu se vyskytují dva geny kódující enzymy NAD(P)H:chinonoxidoreduktázu 1 (NQO1, chromosom 16q22.1, číslo OMIM 125860) a NRH:chinonoxidoreduktázu 2 (NQO2, chromosom 6p25, číslo OMIM 160998). Tyto enzymy katalyzují dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin na relativně stabilní hydrochinony. Ty mohou být dále konjugovány a vylučovány. Navíc látky s chinoidními strukturami patří mezi nepoužívanější cytostatika (antracykliny).

NQO1 je cytosolický enzym využívající jako donor elektronů kofaktory NADH nebo NAD(P)H. NQO1 se vyskytuje jako homodimer, v každém aktivním centru má jednu prosthetickou skupinu FAD (flavin adenin dinukleotid) (2). NQO1 hraje důležitou roli v ochraně buněk proti toxicitě chinonů tím, že snižuje jejich mutagenitu a karcinogenitu. Vysoká hladina NQO1 byla popsána u řady nádorů a byly nalezeny i rozdíly v hladinách exprese mezi nádorovou i nenádorovou tkání (3). V naší předchozí studii jsme zjistili, že polymorfismus NQO1, způsobující téměř absolutní redukci enzymové aktivity, je rizikovým faktorem vzniku karcinomu prsu (4). Tyto výsledky jsme potvrdili nezávislou studií rakouské populace nemocných s karcinomy mléčné žlázy (5).

Enzym NQO2 se podobně jako NQO1 vyskytuje v cytosolu a jako kofaktor využívá ribosid dihydronikotinamid (NRH) spíše než NAD(P)H. NQO2 katalyzuje nejen dvouelektronovou redukci chinonů, ale také čtyřelektronovou redukci, při které jako elektronový akceptor *in vitro* využívá methyl červen (methyl red). U NQO2 bylo nalezeno specifické místo pro vazbu kovů (angl. metal binding site), které u NQO1 není přítomno (6). Enzym NQO2, stejně jako NQO1, chrání buňky proti některým chemickým karcinogenům (7). NQO2 metabolicky aktivuje protinádorové léky, např. CB1954, čímž zvyšuje jejich cytotoxicitu a stimuluje buněčnou smrt (8). V nedávné době bylo také prokázáno, že exprese lidského NQO2 je indukována antioxidanty (9).

Tato pilotní studie se zaměřila především na kvantitativní stanovení exprese NQO1 a NQO2 v souboru pacientek s karcinomem prsu. Poprvé bylo provedeno, metodou absolutní kvantifikace, zhodnocení rozdílu v expresi jednotlivých genů mezi prsní nádorovou a nenádorovou tkání. Jako možný marker hladin expresí NQO1 a NQO2 jsme sledovali expresi těchto genů u lymfocytů periferní krve. Hlavním cílem bylo prozkoumání významu exprese NQO1 a NQO2 pro prognózu vývoje onemocnění u pacientek s karcino-

mem prsu, jež bylo provedeno korelací hladin expresí s klinickými nálezy a histopatologickými charakteristikami karcinomů.

Pacientky a metody

Do studie bylo zahrnuto 42 nemocných s histologicky potvrzenou diagnózou karcinomu prsu z období let 1998–2005. Sledované klinické a histopatologické charakteristiky pacientek jsou uvedeny v **tabulce č. 1**. Všechny pacientky podepsaly formulář informovaného souhlasu ve shodě s Helsinskou deklarací a studie byla schválena etickou komisí Státního zdravotního ústavu v Praze. U 19 sledovaných nemocných byla v průběhu operace odebrána periferní krev a ihned použita k separaci lymfocytů a izolaci RNA s využitím TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tabulka 1: Klinické a histopatologické charakteristiky sledovaných pacientek.

Charakteristika	N §
Průměrný věk v době diagnózy (66,6 ± 12,4)	42 (100)
Menopauzální stav	
premenopauzální	6 (14,3)
postmenopauzální	36 (85,7)
Histologický typ nádoru	
invasivní duktální karcinom	32 (76,2)
invasivní lobulární karcinom	7 (16,7)
jiný typ †	2 (4,8)
neurčeno	1 (2,3)
Průměrná velikost nádoru (23,8 ± 10,3 mm)	
≤ 20 mm	21 (50,0)
21–49 mm	19 (45,2)
≥ 50 mm	2 (4,8)
Histologický grade	
1	7 (16,7)
2	19 (45,2)
3	9 (21,4)
neurčeno	7 (16,7)
Klinické stadium	
I	12 (28,6)
II	20 (47,6)
III	5 (11,9)
IV	1 (2,4)
neurčeno	4 (9,5)
Receptor pro estrogen	
pozitivní	27 (64,3)
negativní	15 (35,7)
Receptor pro progesteron	
pozitivní	19 (45,2)
negativní	23 (54,8)
Postižení uzlin*	
pozitivní	15 (35,7)
negativní	23 (54,8)
neurčeno	4 (9,5)

§ N = počet pacientek (procentuelní zastoupení je uvedené v závorce)

† mucinozní a malobuněčný karcinom

* kritérium „pozitivity“ – alespoň jedna uzlina s metastatickým postižením

V průběhu operačního výkonu byl nemocným odebrán vzorek tkáně z makroskopicky suspektního ložiska nádoru (pro účely peroperační biopsie) a k nádoru přiléhající okolní tkáň. Vzorky tkání byly histologicky zpracovány a vyšetřeny podle standardních diagnostických procedur. Expres receptorek pro estrogen a pro progesteron byla stanovena imunohistochemicky na histologickém řezu z formolem fixované a do parafinu zalité tkáně. Tkáň s histologicky prokázaným karcinomem byly zařazeny jako reprezenta-

Tabulka 2: Porovnání exprese *NQO1* a *NQO2* v nádoru, nenádorové tkáni a lymfocytech periferní krve pacientek s karcinomem prsu. (A) Hladina expresí pro *NQO1* a (B) hladina expresí pro *NQO2*.

A)							
Expresce <i>NQO1</i> (vyjádřená jako poměr počtu kopií na μg RNA <i>NQO1/PPIA</i>)							
Typ vzorku	N §	Minimum	Maximum	Průměr	S.E.	Medián	Variabilita
nádor	42	0,0248	3,0821	0,5266	0,0961	0,2804	122-krát
nenádorová tkáň*	42	0,0143	3,7983	0,7815	0,1474	0,3618	265-krát
lymfocyty	19	0,0015	0,2335	0,0409	0,0153	0,0112	156-krát
B)							
Expresce <i>NQO2</i> (vyjádřená jako poměr počtu kopií na μg RNA <i>NQO2/PPIA</i>)							
Typ vzorku	N §	Minimum	Maximum	Průměr	S.E.	Medián	Variabilita
nádor	42	0,0023	1,8085	0,1681	0,0530	0,0735	786-krát
nenádorová tkáň*	42	0,0059	1,1459	0,2097	0,0433	0,0910	194-krát
lymfocyty	19	0,0112	0,2278	0,0838	0,0148	0,0731	20-krát

§ počet sledovaných vzorků

* tkáň z okolí nádoru bez morfologicky prokázaných známek přítomnosti nádorových buněk

ktivní pro izolace nukleových kyselin. Ve vzorcích okolní nenádorové tkáně použitých pro izolace nukleových kyselin nebyla morfologicky prokázána přítomnost nádorových buněk. 5 μm tenké kryostatové řezy nádorových a nenádorových tkání byly uchovávány v tekutém dusíku a následně použity pro izolaci celkové RNA s využitím TRIzol reagent. Kvalita výsledného preparátu celkové RNA bylo ověřeno agarózovou elektroforézou a koncentrace určena spektrofotometricky pomocí přístroje Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA). Pro syntézu cDNA bylo použito 0,5 μg celkové RNA a kit na syntézu cDNA (MBI Fermentas, Vilnius, Litva). Případná kontaminace genomovou DNA byla posouzena PCR amplifikací fragmentu kontrolního genu ubichitinu C za vzniku produktu z cDNA (190 bp) a z genomové DNA (1009 bp) popsanou metodou (10).

Vyšetření expresí metodou real-time PCR bylo provedeno na systému RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia) za použití TaqMan Gene Expression Assays pro sledované geny (Applied Biosystems, Foster City, CA). Současně se vzorky byly v průběhu real-time PCR měřeny i standardy obsahující cílovou sekvenci genů *NQO1* nebo *NQO2* naklonovanou do plasmidu *pDONR201* pomocí GATEWAY Cloning Kit podle instrukcí výrobce (Invitrogen, Carlsbad, CA). Jako kontrolní gen byl využit cyklofilin A (*PPIA*, chromosom 7p13, číslo OMIM 123840), který byl stanoven za stejných podmínek PCR amplifikace jako *NQO* geny.

Vyhodnocení real-time PCR reakcí bylo prováděno softwarem Rotor-Gene 6000 série verze 1.7. Expresce *NQO1* a *NQO2* byla analyzována metodou absolutní kvantifikace s využitím externí křivky příslušných standardů plasmidů o koncentracích: 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 a 10^6 kopií/vzorek. Počet kopií *NQO1* a *NQO2* v každém vzorku byl vztážen na μg celkové RNA. Podobně byl vyhodnocen i počet kopií kontrolního genu *PPIA*. Nakonec byla provedena normalizace počtu kopií *NQO1* nebo *NQO2* na počet kopií *PPIA*. Hladiny exprese *NQO1* a *NQO2* byly korelovány s klinickým průběhem onemocnění a s histopatologickými nálezy pomocí neparametrického Mann-Whitney U testu. Za statisticky významnou byla považována hodnota $P < 0,05$. Sta-

tistická analýza byla provedena programem Statistica 7 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

Výsledky

U všech sledovaných vzorků byla hladina exprese *NQO1* a *NQO2* spolehlivě detekovatelná. V nádorové i nenádorové tkáni byly nalezeny vyšší průměrné hladiny *NQO1* než *NQO2*. Expresce obou genů se vyznačovala velkou individuální variabilitou mezi jednotlivými pacientkami. Při porovnání rozdílů expresí obou sledovaných genů byly nalezeny významně vyšší průměrné exprese v nenádorové tkáni oproti nádorové tkáni (viz. **tabulka č.2**). Při hodnocení hladin ve vzorcích jednotlivých pacientek byly nalezeny vyšší hodnoty expresí *NQO1* a *NQO2* v nenádorové oproti nádorové tkáni u 20 (47,6%) resp. 26 (61,9%) z celkového počtu 42 vzorků. Na druhé straně však u některých pacientek byly nalezeny více než 3x vyšší hladiny exprese *NQO1* (u 12 pacientek ze 42, tj. 28,6%) i *NQO2* (u 6 pacientek ze 42, tj. 14,3%) v nádorové oproti nenádorové tkáni.

Klinické a patologické charakteristiky souboru pacientek jsou shrnuty v **tabulce č.1**. Věkový průměr sledovaného souboru pacientek s karcinomem prsu byl 67 let a 85,7% pacientek se nacházelo v období po menopauze. Lokálně rozvinuté nádory (klinické stádium I, IIA či IIB) mělo 76,2% pacientek. Z histologického hlediska se jednalo především o invazivní duktální karcinomy prsu (76,2%) s průměrnou velikostí všech typů nádorů $23,8 \pm 10,3$ mm. Expresce receptorů pro estrogen byla nalezena u 64,3 % a exprese receptorů pro progesteron u 45,2% pacientek.

Při hodnocení vztahů hladin *NQO1* a *NQO2* ke sledovaným klinickým a histopatologickým faktorům byla nalezena řada významných korelací, které jsou shrnuty v **tabulce č.3**. Pacientky po menopauze měly významně vyšší hladinu exprese *NQO1* v nádorové tkáni ve srovnání s pacientkami před menopauzou ($P = 0,033$; viz. **tabulka č.3A**). Obdobně tomu bylo v jejich nenádorové tkáni ($P = 0,036$, viz. **tabulka č.3B**). Vyšší expresi *NQO1* v nenádorové tkáni jsme zjistili u nemocných bez metastatického postižení lymfatických uzlin, tj. pN0 (negativní node status, $P = 0,044$) a s pozitivitou jak receptorů pro estrogen ($P = 0,020$) tak

Tabulka 3: Významné vztahy mezi expresí genů *NQO1* a *NQO2* v nádorové a nenádorové tkáni a klinickými a histopatologickými charakteristikami karcinomů vyšetřených nemocných

A. <i>NQO1</i> nádorová tkáň	N §	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Postmenopauzální stav	36	0,59 ± 0,11	0,033
Premenopauzální stav	6	0,16 ± 0,09	
B. <i>NQO1</i> nenádorová tkáň	N	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Postmenopauzální stav	36	0,88 ± 0,17	0,036
Premenopauzální stav	6	0,21 ± 0,01	
Uzliny bez metastáz (N0)	23	1,14 ± 0,24	0,044
Uzliny s metastázami (N1-N3)	15	0,38 ± 0,11	
Pozitivní ER *	27	0,91 ± 0,18	0,020
Negativní ER	15	0,56 ± 0,25	
Pozitivní PR *	19	1,07 ± 0,25	0,040
Negativní PR	23	0,55 ± 0,17	
C. <i>NQO2</i> nádorová tkáň	N	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Invasivní duktální karcinom	32	0,46 ± 0,08	0,011
Invasivní lobulární karcinom	7	0,55 ± 0,22	
D. <i>NQO2</i> nenádorová tkáň	N	Průměr ± S.E.	P (2-sided)
Klinické stádium T1	18	0,15 ± 0,06	0,048
Klinické stádium T2-T4	20	0,30 ± 0,07	

§ počet sledovaných vzorků

* ER – receptor pro estrogen, PR – receptor pro progesteron

pro progesteron ($P = 0,040$). Pacientky s invazivním duktálním karcinomem měly významně nižší expresi *NQO2* v nádorové tkáni než pacientky s lobulárním typem nádoru ($P = 0,011$, viz. **tabulka 3.C**). Expres *NQO2* v nenádorové tkáni byla ve vztahu k velikosti nádoru na hranici významnosti. Pacientky s vyšší expresí *NQO2* měly častěji nádory větší než 20 mm ($P = 0,048$, viz. **tabulka 3.D**). Další významné vztahy hladin exprese studovaných genů ke klinickým a histopatologickým faktorům nebyly nalezeny. Expres *NQO1* ani *NQO2* v lymfocytech nekorelovala s příslušnou expresí těchto genů v nádorové či nenádorové tkáni.

Diskuze

V našich předchozích studiích, které se zaměřily na sledování polymorfismu *NQO1*, se nám podařilo prokázat vztah genotypu *NQO1* k riziku vzniku karcinomu prsu u české populace (4) a v mezinárodní studii jej potvrdit na rakouské populaci (5). Proto jsme se v této pilotní studii snažili tento rizikový potenciál hlouběji prozkoumat a případně nalézt další možné informace o úloze *NQO1* a příbuzného *NQO2* na úrovni genové exprese. Tato pilotní studie za použití metody real-time PCR jednoznačně prokázala expresi genů *NQO1* a *NQO2* v nádorech, v okolní přiléhající nenádorové tkáni i v periferních lymfocytech pacientek s karcinomem prsu. Vysoká expres *NQO1* již byla nalezena v řadě lidských nádorových i nenádorových tkání (karcinom prsu, plic, tračnicku, jater atd.) (11,12,13,14,15). Pomocí Northern blotu byla hladina genové exprese *NQO2* zjištěna v srdci, mozku, plicích, játrech, ledvinách a v kosterních svalech (16). Imunohistochemickými studiemi bylo zjištěno, že *NQO1* v lidských tkání je hlavně lokalizován v endoteliálních a epiteliálních tkání v mnoha různých orgánech včetně

očí (17). Naše studie je unikátní v tom, že nabízí významně přesnější stanovení genové exprese metodou absolutní kvantifikace pomocí real-time PCR jež dosud nebylo publikováno.

V průměru byly nalezeny vyšší exprese genů *NQO1* a *NQO2* v nenádorové oproti nádorové tkáni, tzn. v nádorové tkáni během rozvoje onemocnění došlo ke snížení exprese sledovaných genů (downregulace). U některých pacientek však byly nalezeny více než 3x vyšší hladiny exprese *NQO1* i *NQO2* v nádorové oproti nenádorové tkáni (upregulace). Tento fakt naznačuje možné využití kvantitativního stanovení exprese *NQO1* a *NQO2* v budoucnu při individualizované chemoterapii cytostatiky založenými na aktivaci enzymy kódovanými *NQO1* nebo *NQO2*. V odborné literatuře již na toto téma probíhá diskuze (7,18,19).

Ve snaze zjistit zda by bylo možné, pro odhad hladin exprese ve sledované tkáni, použít lymfocyty periferní krve byly u 19 pacientek korelovány hladiny exprese *NQO1* a *NQO2* v lymfocytech s hladinami ve zkoumaných tkáních. Expres *NQO1* ani *NQO2* v periferních lymfocytech však s expresí v nádorové či nenádorové tkáni významně nekorelovala. Pravděpodobně tedy nebude možné použít pro vyšetření exprese *NQO1* a *NQO2* lymfocyty (což by umožňovalo nejen primární stanovení hladin exprese těchto genů, které je vhodnější přímo z nádorové tkáně, ale hlavně by umožnilo průběžné sledování dynamiky exprese v průběhu léčby a po jejím ukončení).

Pro posouzení významu exprese *NQO1* a *NQO2* pro prognózu vývoje karcinomu prsu jsme porovnali výsledky sledování exprese *NQO1* a *NQO2* s klinickými a histopatologickými charakteristikami nádorů jednotlivých nemocných. Studie zabývající se podobnou tematikou nebyly dosud publikovány. Naše studie našla některé velmi zajímavé vztahy. Významně vyšší expres *NQO1* zjištěn v tkáních pacientek s primární diagnózou onemocnění po menopauze naznačuje možné ovlivnění kolísáním hormonálních hladin u premenopauzálních žen. Tento předpoklad vychází z toho, že k regulaci exprese *NQO1* může docházet nejen pomocí Ah receptoru či fenolických antioxidantů a metabolitů polycyklických aromatických, ale i pomocí antiestrogenů a estrogenových receptorů (20). Nález významně nižší exprese *NQO2* v nádorové tkáni pacientek s invazivním duktálním karcinomem oproti pacientkám s invazivním lobulárním karcinomem by bylo vhodné korelovat na úrovni proteinu s imunohistochemicky zjištěnou expresí *NQO1* a *NQO2* proteinů u jednotlivých typů karcinomů. V případě potvrzení vztahu exprese na úrovni mRNA a proteinů a ověření významu tohoto stanovení na větším souboru nemocných by bylo možné gen *NQO2* začlenit do panelu markerů molekulárně-patologického profilu karcinomů prsu. K nejzajímavějším vztahům patří nález významně zvýšené exprese *NQO1* u pacientek s lepší prognózou onemocnění (postmenopauzální stav, pN0, ER+ a PR+). Tento výsledek by mohl mít význam pro zpřesnění zařazení jednotlivých nemocných do léčebných skupin. Pro ověření a lepší využití poznatků je třeba rozšířit studii na větší skupinu pacientek, porovnat vývoj onemocnění u jednotlivých pacientek s odstupem času po léčbě (korelace s přežitím, kompletní remisí, recidivami atd.) a rovněž prozkoumat vztah mezi genovou expresí a hladinami proteinu sledovaného například imunohistochemicky. Další zajímavé infor-

mace ohledně prognostického a prediktivního významu expresí obou genů může přinést analýza přežívání ve vztahu k typu použité chemoterapie, kterou plánujeme v dlouhodobější perspektivě.

Závěr

Pilotní studie sledující expresi genů 2.fáze biotransformace *NQO1* a *NQO2* prokázala na souboru pacientek s karcinomem prsu významné exprese jak v nádorové tak i v nenádorové tkáni a v lymfocytech periferní krve. Na základě dosažených výsledků je možno usuzovat, že vysoká exprese *NQO1* v nenádorové tkáni by mohla charakterizovat pacientky s lepší prognózou vývoje nemoci.

Naproti tomu nízká exprese *NQO2* by mohla naznačovat větší pravděpodobnost vývoje agresivnějšího průběhu onemocnění. Celkově se tedy exprese *NQO1* i *NQO2* jeví jako potenciální prognostický faktor vývoje karcinomu prsu. Pro možné využití výsledků v klinické praxi navrhujeme ověřit získané informace sledováním hladin *NQO1* a *NQO2* i příslušných proteinových produktů u většího souboru pacientek a s časovým odstupem od diagnózy onemocnění.

Poděkování: Projekt byl podpořen grantem IGA 9426-3, Grantem Univerzity Karlovy GAUK č. 94507 a výzkumným programem na podporu mladých vědců SZU Praha.

Literatura

- Klener P, Abrahámová J: Nádory prsu. In: Klener, P.: Klinická onkologie, Praha, Galén; 2002. s.495.
- Hosoda S, Nakamura W, Hayashi K: Properties and reaction mechanism of DT-diaphorase from rat liver. *J Biol Chem* 1974;249: 6416-23.
- Ross D: NAD(P)H:quinone oxidoreductases. In: Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine, New York, John Wiley&Sons, Inc.; 2002.
- Sarmanova J, Šusová S, Gut I et al: Breast cancer: Role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet* 2004;12:848-854.
- Menzel HJ, Sarmanova J, Soucek P et al: Association of *NQO1* polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer* 2004;90:1989-1994.
- Foster CE, Bianchetti MA, Talalay P et al: Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavoprotein. *Biochemistry* 1999;38:9881-9886.
- Iskander K, Paquet M, Brayton C, Jaiswal AK: Deficiency of NRH:oxidoreductase 2 increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res* 2004;64:5925-5928.
- Knox RJ, Jenkins TC, Hobbs SM et al: Bioactivation of 5-(anzirin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB 1954) by human NAD(P)H quinone oxidoreductase 2: a novel co-substrate-mediated antitumor prodrug therapy. *Cancer Res* 2000;60:4179-4186.
- Wang W, Jaiswal AK: Nuclear factor Nrf2 and antioxidant response element regulate NRH:quinone oxidoreductase 2 (*NQO2*) gene expression and antioxidant induction. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1119-1130.
- Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M: Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hemopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells* 2005;23:1417-1422.
- Schlager JJ, Powis G: Cytosolic NAD(P)H:quinone-acceptor oxidoreductase in human normal and tumor tissue: effects of cigarette smoking and alcohol. *Int J Cancer* 1990;45:403-409.
- Malkinson AM, Siegel D, Forrest GL et al: Elevated DT-diaphorase activity and messenger RNA content in human non-small cell lung carcinoma: relationship to the response of lung tumor xenografts to mitomycin C1. *Cancer Res* 1992;52:4752-4757.
- Mekhail-Ishak K, Hudson N, Tsao MS, Batist G: Implications for therapy of drug metabolizing enzymes in human colon cancer. *Cancer Res* 1989;49:4866-4869.
- Smitskamp-Wilms E, Giaccone G, Pinedo HM et al: DT-diaphorase activity in normal and neoplastic human tissues; an indicator for sensitivity to bioreductive agents. *Br J Cancer* 1995;72:917-921.
- Mikami K, Naito M, Ishiguro T et al: Immunological quantitation of DT-diaphorase in carcinoma cell lines and clinical colon cancers: advanced tumors express greater levels of DT-diaphorase. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:910-915.
- Jaiswal AK: Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase2 gene structure, activity, and tissue-specific expression. *J Biol Chem* 1994;269:14502-14508.
- Siegel D, Ross D: Immunodetection of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (*NQO1*) in human tissues. *Free Radic Biol Med* 2000;29:246-253.
- Celli CM, Tran N, Knox R, Jaiswal AK: NRH:quinone oxidoreductase 2 (*NQO2*) catalyzes metabolic activation of quinones and anti-tumor drugs. *Biochem Pharmacol* 2006;72(3):366-376.
- Jamieson D, Wilson K, Pridgeon S et al: NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and NRH:quinone oxidoreductase 2 activity and expression in bladder and ovarian cancer and lower NRH:quinone oxidoreductase 2 activity associated with an *NQO2* exon 3 single-nucleotide polymorphism. *Clin Cancer Res* 2007;13(5):1584-1590.
- Montano MM, Katzenellenbogen B: The quinone reductase gene: A unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by anti-estrogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2581-2586.

Korespondenční adresa:

Ing. Míluše Hubáčková,
Oddělení Biotransformací, CPL, Státní zdravotní ústav,
Šrobárova 48, 100 42 Praha 10,
Tel: +4202 6708 2681, E-mail:hubackova@szu.cz

Došlo / Submitted: 8. 6. 2007

Přijato / Accepted: 29. 6. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů. The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

DISTRIBUCE PODTYPŮ NON-HODGKINSKÉHO LYMFOMU V ČESKÉ REPUBLICE A JEJICH PŘEŽITÍ

THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA SUBTYPES DISTRIBUTION AND SURVIVAL IN CZECH REPUBLIC

¹TRNĚNÝ M., ²I. VÁŠOVÁ, ¹R. PYTLÍK, C D. BELADA, ⁴M. JANKOVSKÁ, E K. KUBÁČKOVÁ,
¹J. ŠÁLKOVÁ, ¹E. KOLEŠKOVÁ, ²Ž. HOFMANOVÁ, ⁴Š. HRABĚTOVÁ, ⁶V. KAJABA,
³A. SÝKOROVÁ, ⁷J. PIRNOS, ⁸J. PŘIBYLOVÁ, ⁹J. ŠVEC OVÁ, ¹⁰J. ČIBEROVÁ,
¹¹I. BOLOMSKÁ, ¹²E. SKÁCELÍKOVÁ, ¹³M. BREJCHA, ¹⁴D. ADAMOVÁ, ¹⁵H. FRAŇKOVÁ,
¹⁶L. BARSOVÁ, ¹⁷K. BENEŠOVÁ, ¹⁸V. ŠENIGL, ¹⁹V. CAMPR, ²⁰L. BOUDOVÁ, ²¹J. STRÍTESKÝ, ²²M. PETROVÁ,
²²H. KREJČOVÁ, ²³B. PROCHÁZKA, ¹P. KLENER

¹ I. INTERNÍ KLINIKA, VŠEOBECNÁ FAKULTNÍ NEMOCNICE A I.LF UK, PRAHA 2

² IHOK, FN BRNO – BOHUNICE

³ HOK, FN HRADEC KRÁLOVÉ

⁴ HOK, FNKV, PRAHA 10 – VINOHRADY

⁵ ORKO – DOSPĚLÍ, FN MOTOL, PRAHA 5

⁶ HOK, FN OLOMOUC

⁷ ONKOLOGICKÉ ODD., NEMOCNICE ČESKÉ BUDĚJOVICE

⁸ ONKOLOGICKÉ ODD., NEMOCNICE CHOMUTOV

⁹ ONKOLOGICKÉ ODD., NEMOCNICE TÁBOR

¹⁰ ORKO, NEMOCNICE ZNOJMO

¹¹ RTK, MN ÚSTÍ N/LABEM

¹² RTK, FNŠP OSTRAVA-PORUBA

¹³ ONKOLOGICKÉ CENTRUM J.G.MENDELA, NEMOCNICE NOVÝ JIČÍN

¹⁴ HTO, SLEZSKÁ NEMOCNICE OPAVA

¹⁵ HEMATOLOGICKÉ ODD., NEMOCNICE TŘEBÍČ

¹⁶ ONKOLOGICKÉ ODD., NEMOCNICE LIBEREC

¹⁷ ÚHK, PRAHA 2

¹⁸ HEMATOLOGICKÉ ODD., NEMOCNICE KOLÍN

¹⁹ ÚSTAV PATOLOGIE A MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNY 2LF UK PRAHA

²⁰ ŠIKLŮV PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV FN PLZEŇ

²¹ ÚSTAV PATOLOGIE VFN A I.LF UK PRAHA 2

²² DATACENTRUM I. INTERNÍ KLINIKY VFN, PRAHA 2

²³ STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, PRAHA

Souhrn

Východiska: Non-hodgkinské lymfomy (NHL) jsou tvořeny řadou jednotek s rozdílným biologickým chováním. Jejich incidence celosvětově stoupá, zastoupení jednotlivých podtypů se může výrazně lišit dle geografické lokality. Údaje o distribuci NHL v ČR zatím nejsou známy. **Metodika:** V letech 1999 až 2006 bylo v registru KLS zachyceno 3518 nových případů NHL. Pro analýzu distribuce byly použity všechny nové případy, pro analýzu přežití případy registrované do roku 2005. **Výsledky:** Nejvýraznější zastoupení má difúzní velkobuněčný lymfom (DLBCL) s 45%, na dalších místech jsou folikulární lymfom (FL) s 19%, lymfom z marginální zóny (MZL) s 6,9%, lymfom z pláštových buněk (MCL) s 6,5%. Zastoupení DLBCL je vyšší než v publikovaných studiích, zastoupení FL nevybočuje z širokého rozpětí, tak jak bylo zaznamenáno i v Evropě. Pravděpodobnost celkového přežití ve 3 letech bylo více než 80% pro FL, primární mediastinální B lymfom (PMBCL), MZL lymfom MALT typu, a splenický MZL, přežití 60-70% bylo pozorováno u DLBCL, anaplastického velkobuněčného lymfomu (ALCL) a Burkittova lymfomu. Přežití kolem 40-60 % bylo pozorováno u periferního T lymfomu, MCL a lymfoblastického lymfomu. Při podrobnější analýze nemocných s DLBCL se ukázal jako nejvýznamnější prognostický faktor mezinárodní prognostický index (IPI), dále léčba rituximabem a provedení vysokodávkované terapie s autologní transplantací. Zařazením rituximabu se pravděpodobnost celkového přežití zvýšila o 19% a přežití bez známek progresu o 27% proti skupině léčené jen chemoterapií ($p < 0,001$ resp. $< 0,001$). Přestože v letech 2004 a 2005 bylo léčeno rituximabem pouze 74% nemocných měli tito nemocní o 14% lepší pravděpodobnost celkového přežití a o 28% přežití bez progresu ve srovnání s nemocnými léčenými jen chemoterapií ($p < 0,05$ resp. $< 0,01$). **Závěr:** Předkládaná souhrnná analýza ukazuje zastoupení jednotlivých typů lymfomů v ČR, přežití jednotlivých typů, které se neliší od světových údajů. V nejpočetnější zastoupené skupině DLBCL došlo v průběhu 6 let k výraznému zlepšení přežití zavedením rituximabu.

Klíčová slova: NHL, non-hodgkinský lymfom, přežití, registr, incidence.

Summary

Background. The Non-Hodgkin's lymphoma (NHL) incidence increased significantly during last decades. Numerous NHL subtypes with different biology vary in their distribution with respect to various geographical regions. We present the analysis of the Czech Lymphoma Study Group (CLSG) registry. **Methods:** 3518 newly diagnosed NHL cases have been registered during the years 1999–2006. All cases were included into distribution analysis, only patients diagnosed until 2005 were included into survival analysis. **Results:** The diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL) represent the major subtype with 45%, followed by follicular lymphomas (FL) with 19%, marginal zone lymphomas with 7%, and mantle cell lymphomas with 6.5%. The DLBCL proportion is greater when compared with previously published data. The proportion of FL varies significantly based on geographic region, with our figures within the range of published data. Overall survival (OS) probability at 3 years exceeded 80% in FL, primary mediastinal B-cell lymphomas (PMBCL), MALT type of MZL, and splenic MZL. OS probability between 60–70% has been noticed in DLBCL, anaplastic large cell lymphomas (ALCL) and Burkitt's lymphoma (BL). The worst outcome with steadily sloping curves and 3 year OS between 40–60% was observed in peripheral T-cell lymphomas not otherwise specified (PTL NOS), MCL, and T-lymphoblastic lymphomas. More detailed analysis of DLBCL was performed and LDH, age, PS WHO, clinical stage, International prognostic index (IPI), rituximab therapy, high dose therapy with autologous stem cell transplantation, and year of diagnosis were found significant for OS as well as for progression free survival (PFS). **Conclusion:** The presented analysis describes for the first time the NHL lymphoma subtypes distribution as well as their outcome in Czech Republic. The outcome improvement has been demonstrated by the introduction of new therapeutic approaches.

Key words: Non-Hodgkin's lymphoma, registries, distribution, survival, incidence.

Úvod

Lymfoproliferativní nádorová onemocnění patří do skupiny chorob se vzrůstající incidencí pohybující se mezi 10–15 nemocnými na 100.000 obyvatel. Tento jev je pozorovatelný prakticky ve všech západních zemích^{1,2}, když nejvýraznější vzestup zaznamenaly non-hodgkinské maligní lymfomy (NHL). Zdá se, že nejvyšší incidence je v USA, kde se pohybuje mezi 15–19/100.000 obyvatel v roce 1999^{3,4}.

Česká republika na tom není jinak a přestože data shromažďovaná v Národním onkologickém registru (NOR) nelze považovat z řady důvodů za nejpřesnější ukazují, že například incidence NHL v roce 1999 byla 10,2 na 100.000 obyvatel, v roce 2003 to bylo 11,1 pro muže a 10,6 pro ženy^{5,6}. Představuje to situaci, kdy v ČR je každých 8 hodin diagnostikován nový pacient s NHL a každých 15 hodin jeden nemocný s lymfomem zemře. V současné době lze odhadnout, že v ČR žije více než 10.000 lidí, u nichž byla stanovena diagnóza lymfomu (NHL nebo Hodgkinova lymfomu) (odhad učiněn extrapolací dat podle⁷).

Diagnostika lymfomů je však náročná a zatížena řadou problémů, u většiny populačních registrů pak chybí kontrola těchto diagnostických údajů, kontrola vstupních dat obecně a celková výpověď o struktuře lymfomů je pak problematická. V roce 1994 byl publikován návrh klasifikace lymfoproliferací REAL⁸, která se stala základem pro WHO klasifikaci publikovanou v roce 2001⁹. Na základě domluvy skupiny pracovišť byla v ČR v roce 1998 ustavena Kooperativní lymfomové skupina (Czech Lymphoma Study Group – CLSG), jejímž jedním cílem bylo zřízení registru nemocných s NHL, který začal fungovat od roku 1999. Tento registr není populační a je zaměřen především na distribuci jednotlivých typů lymfomů, jejich charakteristiky a přežití. V předkládané práci podáváme přehled distribuce lymfomů a přežití hlavních typů.

Metodika:

Registr je založen na anonymizovaném sběru základních klinických dat u nemocných s nově diagnostikovaným

NHL. Ke sběru je vyžadován souhlas nemocného s tímto sběrem. Sběr probíhá ve stupňovité formě registračního formuláře, terapeutického formuláře a sledovacího formuláře. Tyto lze vyplnit buď v papírové podobě nebo elektronicky (www.lymphoma.cz). Součástí klinických údajů je identifikátor nemocného, datum narození, datum diagnózy, vlastní diagnóza (ta musí být doprovázena anonymizovanou kopií histologického vyšetření jak z prvního tak z referenčního čtení), hodnocení klinického stavu, celkového stavu (performance status – PS), laboratorních dat (KO, LDH, beta2mikroglobulin), zhodnocení rizika nemocného podle prognostických systémů (IPI¹⁰ – mezinárodního prognostického indexu pro nemocné s agresivními lymfomy, FLIPI¹¹ – mezinárodní index pro nemocné s folikulárním lymfomem – FL), rozhodnutí o terapii, vlastní léčba (typ chemoterapie, monoklonální protilátky, radioterapie, transplantační léčba, chirurgická léčba), výsledek léčby, datum progresu resp. relapsu, datum úmrtí a datum posledního sledování. Odpověď je hodnocena podle mezinárodních kritérií¹².

Tyto údaje jsou zpracovány v datacentru, je provedena formální kontrola a případné nesrovnalosti a další otázky jsou předmětem dotazu na referující centrum. Data mohou být z databáze exportována dle vybraných kritérií.

V předkládané obecné analýze bylo ze statických metod použito hodnocení přežití podle Kaplan Maiera, ke srovnání přežití podle prognostických kritérií log rank test a k vícefaktorové analýze Coxova regresní analýza.

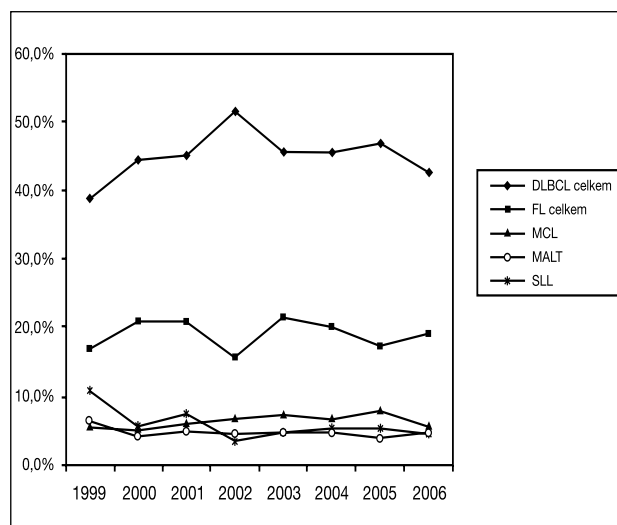
Při hodnocení osudu nemocných byla použita pravděpodobnost celkového přežití (OS), definovaného jako rozdíl mezi datem diagnózy a datem posledního sledování, událostí bylo úmrtí nemocného z jakéhokoli důvodu. Dále byla použita pravděpodobnost přežití bez progresu (PFS), kdy progres je definována jako progres či relaps či rezistentní onemocnění po indukční léčbě nebo úmrtí z jakékoli příčiny¹³. Pravděpodobnost přežití byla hodnocena ve 3 letech.

Distribuce lymfomů byla hodnocena u nemocných diagnostikovaných v letech 1999-2006, přežití bylo hodnoceno pouze u nemocných diagnostikovaných v letech 1999-2005 a to u nemocných, kteří měli alespoň jedno sledování. Do podrobnějšího hodnocení nemocných s DLBCL byli zařazeni pouze nemocní, u nichž byla zahájena léčba chemoterapií s antracyklinovým antibiotikem.

Výsledky

Distribuce NHL

Od roku 1999 do roku 2006 (data za rok 2006 nejsou úplná) bylo celkem registrováno 3518 nemocných s NHL. Počet registrací v jednotlivých letech se od roku 1999 do roku 2005 prakticky zdvojnásobil (z 333 v roce 1999 na 603 v roce 2005). Vývoj zastoupení jednotlivých diagnóz byl v průběhu let celkem stacionární (graf 1 ukazuje vývoj zastoupení DLBCL, FL, MALT, MCL a SLL). Nejčastějším typem lymfomu byl difúzní velkobuněčný lymfom (DLBCL) s 45% (n=1596), v tom je zahrnut primární mediastinální velkobuněčný lymfom B řady (PMBCL) s 2,3% (n=82). Na druhém místě je FL s 19% (n=669) a dále lymfom z marginální zóny (MZL) s 6,9% (n=243). Do MZL zahrnujeme extranodální MZL typu MALT (mucosa associated tissue) s 5,5%, nodální MZL (NMZL) s 0,5% (n=19) a splenický MZL (SMZL) s 0,7% (n=23). Lymfom z plášťových buněk (MCL) tvoří 6,5% (n=230), malobuněčný lymfom (SLL) 4,7% (n=165). Z T lymfomů byly nejčastěji zachyceny anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) s 2,3% (n=81), periferní T lymfom blíže nespecifikovaný (PTL) s 2,2% (n=79). Jako blíže neurčený B lymfom bylo hodnoceno 5,2% nemocných (n=175) a jako blíže neurčený T lymfom bylo hodnoceno 1,0% (n=35). Jednotlivé typy lymfomů přehledně zahrnuje tabulka 1 a rovněž udává srovnání distribuce u vybraných typů s mezinárodní analýzou¹⁴. Věkový medián nemocných byl 60 let (16-94), poměr mužů a žen byl vyrovnaný (1,1:1), v jednotlivých podtypech lymfomů však byly zaznamenány rozdíly. Nejmladší nemocní byli ve skupině PMBCL a Burkittova lymfomu (BL) s věkovým mediánem 33 a 42 let, nejstarší ve skupině MCL a SLL s mediánem 65 let. Nejvýraznější převaha mužů byla ve skupině MCL (2,1:1), nejvýraznější převaha žen byla ve skupině MALT (1,4:1).



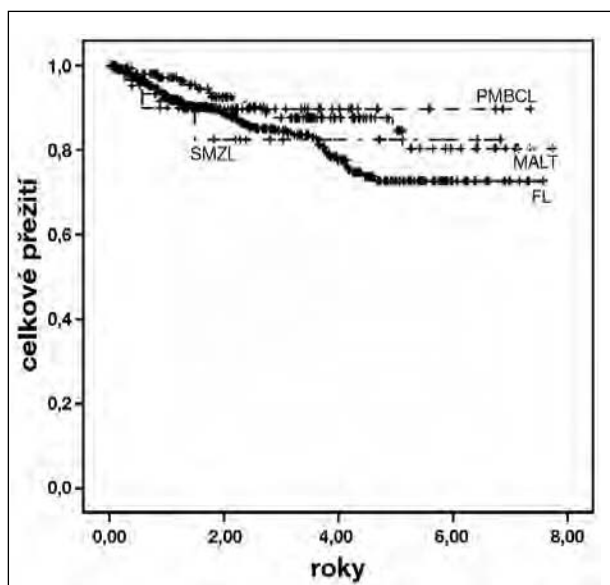
Graf 1: Podíl nejčastějších diagnóz na celkovém počtu pacientů v registru NHL v letech 1999 - 2006

Tabulka 1: Zastoupení jednotlivých typů lymfomů, věkový medián, procentuální zastoupení mužů. Srovnání s distribucí lymfomů ve studii ILSG (International Lymphoma Study Group) (podle citace 14)

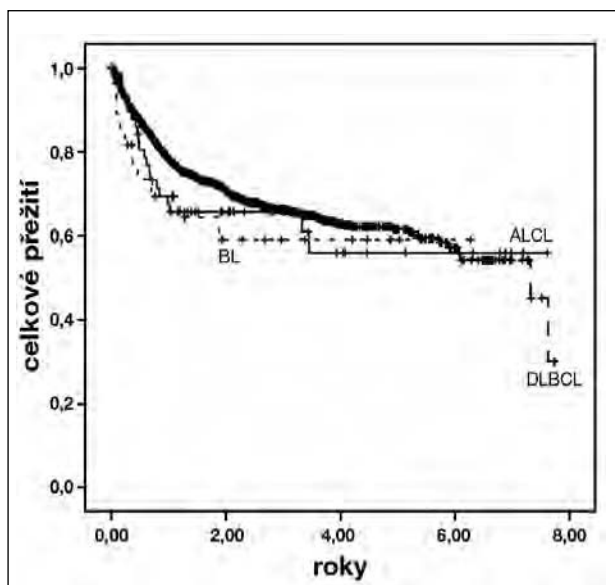
DG	n	% z celk. počtu NHL	muži (%)	medián věku	Zastoupení v analýze ILSG ¹⁴
DLBCL celkem	1596	45,4%	52,8%	61	33,0%
DLBCL	1514	43,0%	53,0%	62	30,6%
PMBCL	82	2,3%	47,6%	33	2,4%
FL celkem	669	19,0%	45,3%	56	22,1%
MCL	230	6,5%	67,4%	65	6,0%
MALT	201	5,7%	42,8%	61	7,6%
NMZL	19	0,5%	42,1%	63	1,8%
SMZL	23	0,7%	39,1%	59	<1%
SLL	165	4,7%	64,8%	65	6,7%
BL	34	1,0%	58,8%	42	<1%
LPL	20	0,6%	65,0%	60	1,2%
AITL	16	0,5%	68,8%	60	1,2%
ALCL	81	2,3%	54,3%	56	2,4%
PTL	79	2,2%	62,0%	59	3,7%
T-NHL neurč.	35	1,0%	57,1%	56	-
B-NHL neurč.	175	5,0%	50,3%	64	-
Jiné Dg.	175	5,0%	61,7%	59	-
celkem	3518	100,0%	53,0%	60	

Pravděpodobnost přežití podle typu diagnózy.

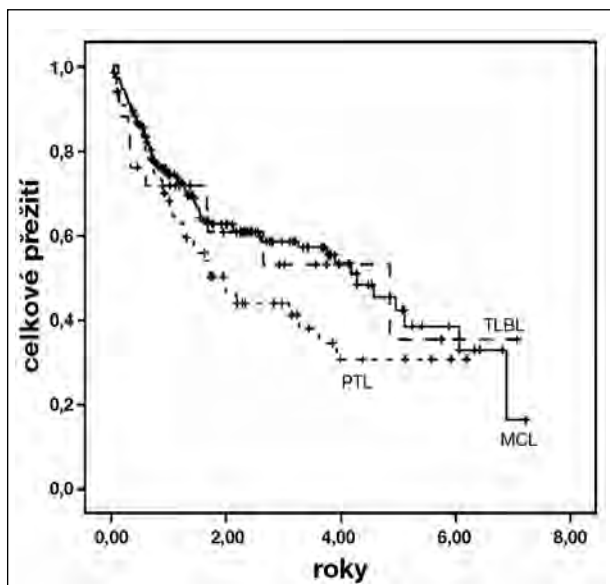
Z pohledu přežití bylo hodnoceno celkem 2546 nemocných s mediánem sledování žijících nemocných 27 měsíců. Při srovnání B a T lymfomů byla pravděpodobnost OS ve 3 letech 72% pro B-NHL a 53% pro T-NHL, pravděpodobnost PFS byla 54% proti 41%. Při srovnání přežití nemocných s nejčastějšími diagnózami bylo 3leté celkové přežití (OS) u PMBCL 89,7%, MALT 87,6%, FL 84,6%, SMZL 82,5% (graf 2A), SLL 67,9%, DLBCL 66,2%, ALCL



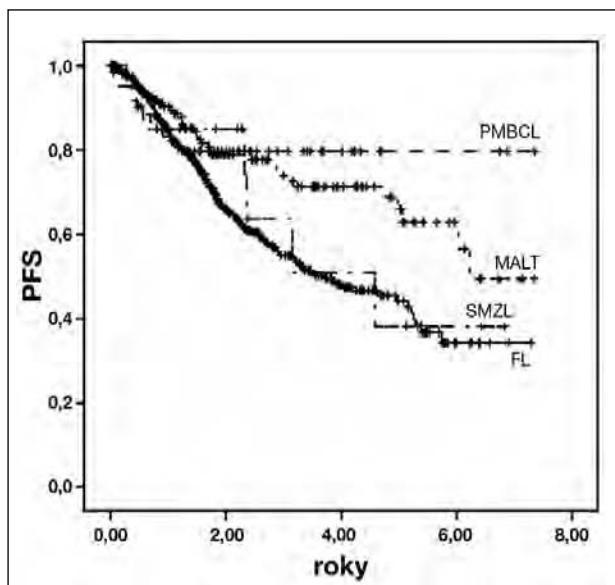
Graf 2. Celkové přežití (OS) u nemocných s MPBCL, MALT, FL a SMZL (2A), DLBCL, ALCL, BL (2B), : MCL, PTL, T-LBL (2C),
2A: MPBCL, MALT, FL a SMZL



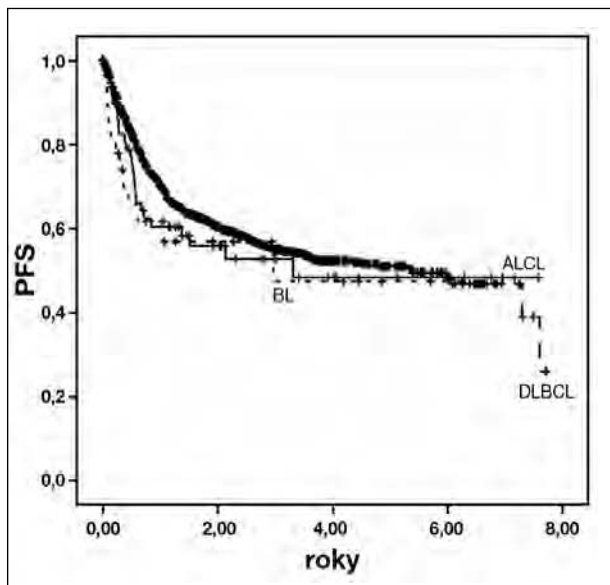
2B: DLBCL, ALCL, BL



2C: MCL, PTL, T-LBL



Graf 3: přežití bez progresu (PFS) u nemocných s MPBCL, MALT, FL a SMZL (3A), DLBCL, ALCL, BL (3B), : MCL, PTL, T-LBL (3C), 3A: MPBCL, MALT, FL a SMZL



3B: DLBCL, ALCL, BL

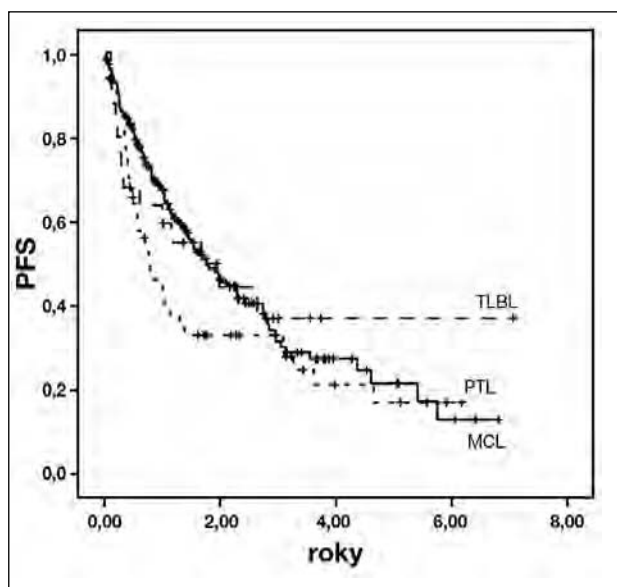
65,6%, BL 59,0% (graf 2B), MCL 58,5%, T-LB 53,1%, PTL 44,0% (graf 2C). Pravděpodobnost přežití do progresu (PFS) byla u PMBCL 79,6%, MALT 75,1%, FL 55,0%, SMZL 63,7% (graf 3A), SLL 41,9%, DLBCL 54,9%, ALCL 53,5%, BL 47,4% (graf 3B), MCL 31,5%, T-LB 37%, PTL 33,0% (graf 3C). Přehledně ukazuje celkové přežití a přežití bez známek progresu tabulka 2 a grafy 2 (OS) a 3 (PFS).

Vzhledem k velkému počtu nemocných ve skupině DLBCL a dostatečné době sledování pro tento typ lymfomu byla provedena analýza rozšířená o některé parametry.

Difúzní velkobuněčný lymfom (DLBCL).

Zařazení byli nemocní, kteří byli léčeni pro diagnózu

DLBCL v letech 1999 až 2005 režimem s antracyklinovým antibiotikem (tabulka 3). Celkem se jednalo o 1008 nemocných (949 s DLBCL a 59 s PMBCL). Věkový medián byl 57 let (16-87), poměr mužů a žen 1,2:1. V pokročilém klinickém stádiu bylo diagnostikováno 542 nemocných (53,8%), vyšší hodnotu LDH mělo 530 nemocných (53,8%), podle mezinárodního prognostického indexu (IPI) mělo nízké, středně nízké, středně vysoké a vysoké riziko 35,0%, 23,8%, 18,8% a 18,4% nemocných (grafy 4A a 4B). Nejčastějším režimem byl CHOP v 81,8% případů, jiný antracyklinový režim byl použit u 8,1% nemocných a u 10,0% byla použita intenzifikovaná indukce s eskalací dávek v režimu CHOP (mega-CHOP). V rámci primoterapie byl u 34,2% nemocných použit rituximab a u 12,1% nemocných konsolidace vysokodávkovanou chemoterapií (HDT) s autologní trans-



3C: MCL, PTL, T-LBL

plantací krvetvorných buněk. Tyto faktory byly hodnoceny i jako proměnné při jednofaktorové i vícefaktorové analýze. Medián sledování žijících nemocných byl 29 měsíců. Pro celkové přežití (zde udávané ve 3 letech) se v rámci jednofaktorové analýzy ukázaly jako významné diagnóza (71% pro DLBCL vs 91% PMBCL, $p<0,005$), věk (79% pro ≤ 60 let a 62% pro >60 let, $p<0,001$), hladina LDH (87% pro LDH v normě a 59% pro LDH nad normu, $p<0,001$), klinické stádium (81% pro časné tj. I a II vs 58% pro pokročilé tj. III a IV, $p<0,001$), PS dle WHO (pro PS 0-1 80% vs 54% pro PS ≥ 2), IPI riziko (94% pro nízké vs 79% pro středně nízké vs 60% pro středně vysoké vs 41% pro vysoké, $p<0,001$) a použití rituximabu v terapii (81% pro skupinu léčenou rituximabem proti 68% pro skupinu léčenou bez rituximabu, $p<0,001$). Pro pravděpodobnost přežití bez progresu (zde udávané ve 3 letech) se v rámci jednofaktorové analýzy se ukázaly jako významné diagnóza (65% pro DLBCL vs 82% PMBCL, $p<0,01$), věk (69% pro ≤ 60 let a 49% pro >60 let, $p<0,001$), hladina LDH (75% pro LDH v normě a 49% pro LDH nad normu, $p<0,001$), klinické stádium (73% pro časné tj. I a II vs 44% pro pokročilé tj. III a IV, $p<0,001$), PS dle WHO (pro PS 0-1 67% vs 45% pro PS ≥ 2), IPI riziko (82% pro nízké vs 67% pro středně nízké vs 40% pro středně vysoké vs 37% pro vysoké, $p<0,001$), použití rituximabu v terapii (71% pro skupinu léčenou rituximabem proti 56% pro skupinu léčenou bez rituximabu, $p<0,001$). Zařazením rituximabu se tedy pravděpodobnost celkového přežití zvýšila relativně o 19% a přežití bez známek progresu o 27% proti skupině léčené jen chemoterapií (za základ je bráno přežití nemocných léčených chemoterapií) (grafy 4C a 4D). Významným faktorem bylo rovněž období léčby, nemocní léčení v letech 2004 a 2005 (medián doby sledování = 21 měsíců) měli signifikantně lepší OS i PFS proti nemocným léčeným v letech 1999 a 2000 (grafy 4E a 4F), pro OS: 75% proti 66% ($p=0,03$) a pro PFS 68% proti 53% ($p=0,01$). Přestože v letech 2004 a 2005 bylo léčeno rituximabem pouze 74% nemocných měla skupina nemoc-

Tabulka 2: Celkové přežití (OS) a přežití bez progresu (PFS) ve 3 letech podle jednotlivých typů lymfomů

typ lymfomu	OS (%)	PFS (%)
B-NHL	72,0	54,0
T-NHL	53,0	41,0
DLBCL	66,2	54,9
PMBCL	89,7	79,6
BL	59,0	47,4
FL	84,6	55,0
MALT	87,6	75,1
MCL	58,5	31,5
SLL	67,9	41,9
SMZL	82,5	63,7
ALCL	65,6	53,5
T-LB	53,1	37,0
PTL	44,0	33,0

ných diagnostikovaných v tomto období o 14% lepší relativní pravděpodobnost celkového přežití a o 28% přežití bez progresu ve srovnání s nemocnými léčenými jen chemoterapií (za základ je bráno přežití nemocných léčených v letech 1999 a 2000). Ve vícefaktorové analýze při zařazení všech faktorů kromě IPI se pro OS i PFS ukázaly jako významné věk, LDH, KS, PS dle WHO, konsolidace HDT s ASCT a použití rituximabu ($p=0,001$), nevýznamná byla diagnóza (PMBCL vs DLBCL) a rok léčby. Při zařazení IPI a vynechání věku, LDH, KS a PS WHO se ukázaly jako významné IPI ($p=0,001$), rituximab a ASCT ($p=0,005$), a nevýznamná byla diagnóza a rok léčby.

Grafy 4 ukazují prognostický význam některých veličin a tabulka 4 shrnuje jednofaktorovou analýzu a tabulka 5 multifaktorovou analýzu.

Diskuse

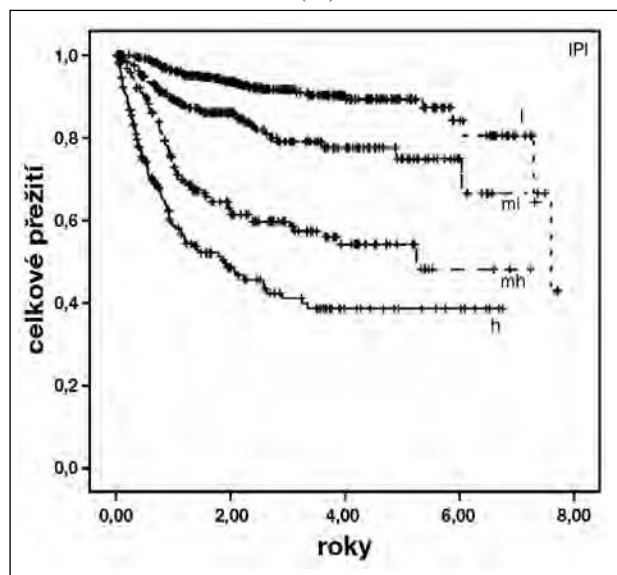
Předkládaná práce ve stručnosti shrnuje distribuci podtypů NHL a základní charakteristiky přežití. Jedná se o prvou, i když vzhledem k rozsahu souhrnné publikace stále předběžnou analýzu popisující situaci v České republice. Základním problémem dat získávaných z populačních registrů je absence byt formální kontroly shromažďovaných údajů a diskrepance mezi Mezinárodní klasifikací nemocí, užívanou Národním onkologickým registrem, a klasifikací lymfoproliferativních onemocnění dle WHO9. Z dat získaných z přehledu zpracovávaného Národním onkologickým registrem a UZIS vyplývá, že incidence NHL byla v roce 2003 11,1 na 100.000 obyvatel pro muže a 10,6 pro ženy. Při srovnání s údaji z ostatních evropských zemí za rok 2002³ vyplývá, že pro ČR je uváděna incidence 10,2 resp. 8,2 pro muže resp. pro ženy. Nejnížší incidence je v Evropě udávána v Řecku 5,5 resp. 3,9, ve srovnatelném Slovensku to je 9,2 resp. 6,8, Rakousku 14,8 resp. 9,8. Nejvyšší incidence je uváděna pro Francii (16,8 resp. 9,8) a Itálii (17,0 resp. 10,9). Pro USA je uváděna dle téhož zdroje³ souhrnná incidence v roce 2002 16,9 na 100.000 obyvatel. Je otázkou, zda tak velké rozdíly v incidenci jsou skutečným odrazem reality nebo zda se jedná o metodologické problémy.

Založení registru v rámci činnosti CLSG bylo logickým krokem, jehož hlavním cílem bylo zmapovat nikoli incidenci (nejedná se o populační registr), ale distribuci jedno-

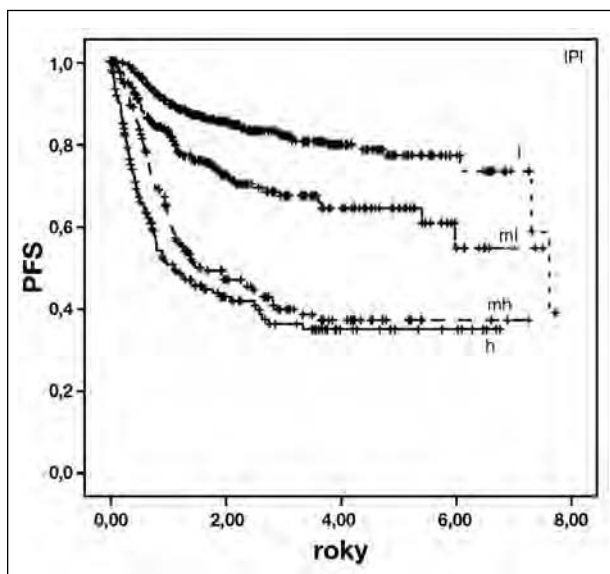
Tabulka 3: Soubor nemocných s DLBCL léčených v letech 1999 až 2005 chemoterapií s antracyklinovými antibiotiky

	DLBCL		PMBCL		celkem	
n	949	(94,1%)	59	(5,9%)	1008	
věk (median; min – max)	59	(16 - 87)	33	(18 – 74)	57	(16 – 87)
pohlaví (muži/ženy)	527 / 422	(1,25)	27 / 32	(0,84)	554 / 454	(1,22)
median sledování u žijících	2,41 roku	(879d.)	2,23 roku	(814,5d.)	2,4 roku	(875d.)
žije	701	73,9%	54	91,5%	755	74,9%
zemřelo	248	26,1%	5	8,5%	253	25,1%
klinické stadium:						
I	175	18,4%	6	10,2%	181	18%
II	260	27,4%	22	37,3%	282	28%
III	154	16,2%	6	10,2%	160	15,9%
IV	357	37,6%	25	42,4%	382	37,9%
Nevyplněno	3	0,3%	-		3	0,3%
lokalizované (I nebo II)	435	45,8%	28	47,5%	463	45,9%
pokročilé (III nebo IV)	511	53,8%	31	52,5%	542	53,8%
LDH:						
Normální hodnota	441	46,5%	10	16,9%	451	44,7%
Nadhraniční hodnota	482	50,8%	48	81,4%	530	52,6%
Neznámé	26	2,7%	1	1,7%	27	2,7%
IPI:						
Nízké riziko	328	34,6%	25	42,4%	353	35,0%
Středně nízké riziko	225	23,7%	15	25,4%	240	23,8%
Středně vysoké riziko	181	19,1%	9	15,3%	190	18,8%
Vysoké riziko	176	18,5%	9	15,3%	185	18,4%
Neznámé	38	4,0%	1	1,7%	39	3,9%
Nevyplněné	1	0,1%	-	0,0%	1	0,1%
Léčba první linie:						
antracykliny jiné	80	8,4%	2	3,4%	82	8,1%
CHOP	791	83,4%	34	57,6%	825	81,8%
megaCHOP	78	8,2%	23	39,0%	101	10,0%
Rituximab	308	32,5%	37	62,7%	345	34,2%
ASCT	102	10,7%	20	33,9%	122	12,1%

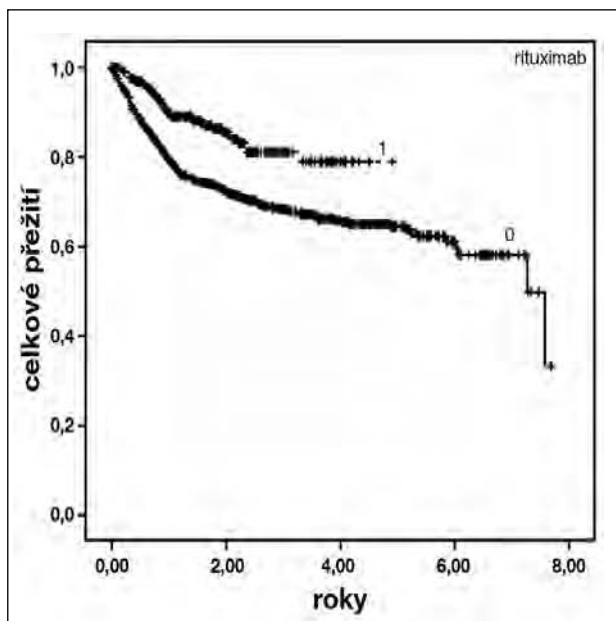
Graf 4: Prognostický význam pro celkové přežití (OS) a přežití bez známek progresu (PFS): OS dle IPI (4A), PFS dle IPI (4B), OS dle použití rituximabu (4C), PFS dle použití rituximabu (4D), OS u nemocných léčených v letech 1999-2000 vs 2004-2005 (4E), PFS u nemocných léčených v letech 1999-2000 vs 2004-2005 (4F)



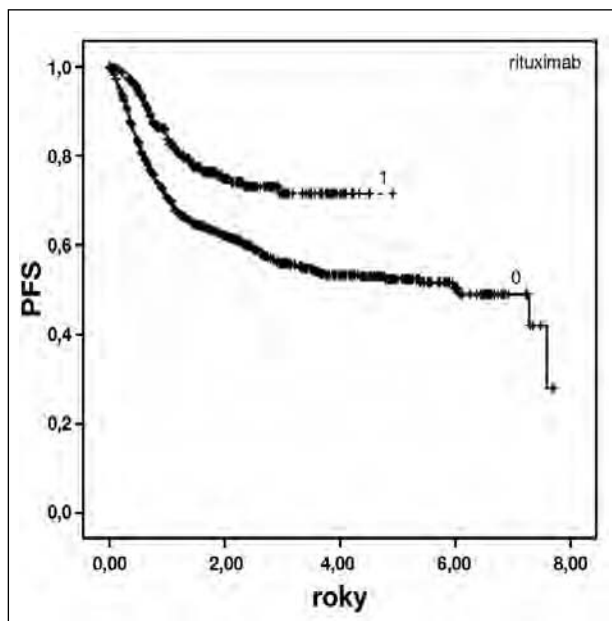
Graf 4A: Celkové přežití dle rizika podle IPI (l = nízké riziko, ml = středně nízké riziko, mh = středně vysoké riziko, h = vysoké riziko)



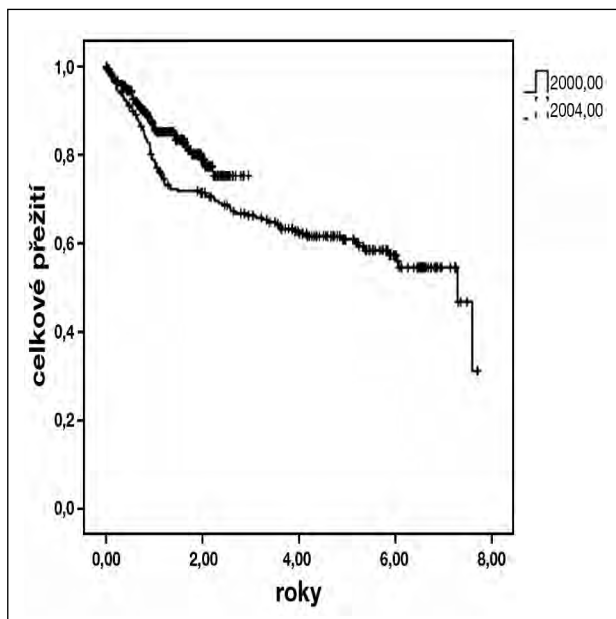
Graf 4B: Přežití bez známek progresu (PFS) dle rizika podle IPI (l = nízké riziko, ml = středně nízké riziko, mh = středně vysoké riziko, h = vysoké riziko)



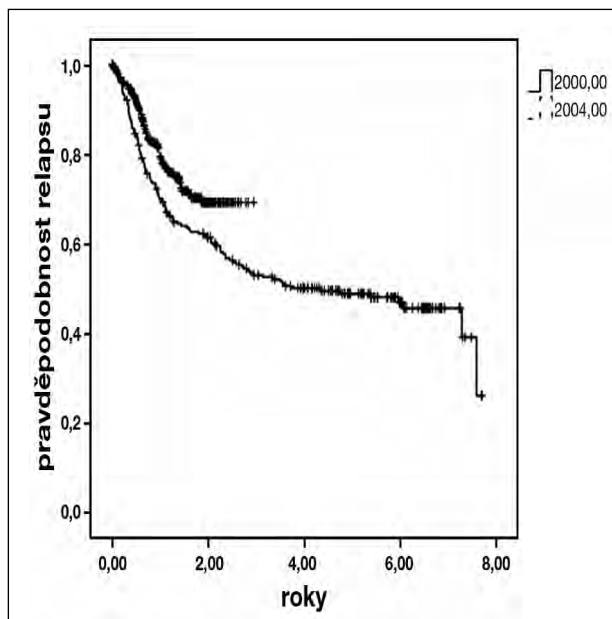
Graf 4C: Celkové přežití podle toho, zda nemocný byl léčen rituximabem (1) nebo ne (0)



Graf 4D: Přežití bez známek progresu (PFS) podle toho, zda nemocný byl léčen rituximabem (1) nebo ne (0)



Graf 4E: Celkové přežití podle roku diagnózy: 1999-2000 (2000.00) vs 2004-2005 (2004.00)



Graf 4F: Přežití bez známek progresu (PFS) podle roku diagnózy: 1999-2000 (2000.00) vs 2004-2005 (2004.00)

tlivých typů lymfomů, zjistit základní trendy v léčbě, základní prognostickou stratifikaci, přežití nemocných a také umožnit podrobněji analyzovat i některé vzácnější jednotky. Pokud bychom vzali za směrodatný odhad incidence z dat NOR lze říci, že při předpokládané incidenci v současné době mezi 11 a 12 na 100.000 obyvatel je registrováno v databázi ročně více než 50% nových případů diagnostikovaných v ČR.

Zásadním bodem pro jakoukoli analýzu je správná patologická diagnostika, vzhledem k obtížnosti této problematiky obzvláště v oblasti lymfomů je jednoznačně doporučeno, aby bylo prováděno referenční čtení. Toto bylo provedeno

u více než 70% případů. Výsledky distribuce ukázaly, stejně jako v dalších analýzách, že nejčastějším typem lymfomu je DLBCL, na dalších místech je FL, MZL, MCL, SLL a další. Srovnání s mezinárodní analýzou¹⁴, ale i dalšími analýzami¹⁵, ukazují, že v ČR je vyšší zastoupení DLBCL (45%) a nižší zastoupení FL a některých dalších lymfomů, např. T typu (PTL) (tabulka 6). Příčina tohoto pozorování není zcela jasná. Trend v zastoupení jednotlivých typů lymfomů v průběhu let je prakticky identický. Jedno možné vysvětlení může spočívat v tom, že do registru přispívají zejména větší pracoviště, kde může docházet na základě referování nemocných s agresivnějšími formami lymfomů

Tabulka 4: Analýza prognostických faktorů ovlivňujících přežití u nemocných s DLBCL

faktor	OS (% ve 3 letech)	PFS (% ve 3 letech)
Diagnóza: DLBCL	71	65
PBMCL	91	82
<i>p</i>	<0,005	<0,001
Věk: ≤ 60	79	69
> 60	62	49
<i>p</i>	<0,001	<0,001
LDH: ≤ norma	87	75
> norma	59	49
<i>p</i>	<0,001	<0,001
KS: časně (I a II)	81	73
pokročilé (III a IV)	58	44
<i>p</i>	<0,001	<0,001
PS dle WHO 0-1	80%	67%
≥ 2	54%	45%
<i>p</i>	<0,001	<0,001
IPI riziko: nízké	94	82
středně nízké	79	67
středně vysoké	60	40
vysoké	41	37
<i>p</i>	<0,001	<0,001
Rituximab: ano	81	71
ne	68	56
<i>p</i>	<0,001	<0,001
Období: 2004-2005	75	68
1999-2000	66	53
<i>p</i>	<0,03	<0,01

k jejich koncentraci ve srovnání s indolentními formami jako je např. FL. Druhou možností je nadhodnocení nějaké jednotky patologi, nicméně předběžná analýza ukazuje, že se jedná o jev společný většině patologických center a to se setrvalou tendencí, což činí tuto možnost méně pravděpodobnou. Další možností je, že tato distribuce odráží skutečný stav v ČR. Již výše bylo uvedeno pozorování vysoce rozdílné incidence NHL v rámci Evropy³. Nadto je popsán poměrně výrazný rozdíl v distribuci lymfomů v závislosti na různých geografických oblastech světa¹⁶. Pokud srovnáme zastoupení FL např. v Lyonu, Londýně, Würzburgu, Locarnu a v Omaze, pohybuje se od 11% do 32%. Zastoupení FL v našem souboru se blíží zastoupení v Lyonu a Würzburgu. Zastoupení DLBCL je však v našem souboru vyšší než ve všech zmíněných oblastech (viz tab. 6). WHO klasifikace nedělí lymfomy podle stupně malignity, nebo agresivity do několika skupin. Nicméně z praktického pohledu je jisté užitečné znát jaký průběh má křivka přežití konkrétní klinickopatologické jednotky. Z analýzy celkového přežití nemocných s jednotlivými typy lymfomů (tam, kde to bylo možné z pohledu počtu nemocných a dostupnosti dat) vyplývá, že je lze rozdělit podle pravděpodobnosti přežití do 3 skupin. Nejlepší prognózu celkového přežití mají nemocní s FL, PMBCL, MALT a SMZL (pravděpodobnost přežití ve 3 letech nad 80%), středně dobrou prognózu nemocní s DLBCL, BL, ALCL (pravděpodobnost OS kolem 60%) a nejhorší prognózu PTL, MCL a T-LBL s pravděpodobností OS od 40 do 60%, ale s trvajícím poklesem. Tato distribuce odpovídá křivkám publikovaným pro tyto skupiny^{14,15}, zdá se, že však pravděpo-

Tabulka 5: Multifaktorová analýza prognostických faktorů ovlivňujících přežití u nemocných s DLBCL

1. analýza	OS	PFS	2. analýza	OS	PFS
diagnóza	nesignifik.	nesignifik.	diagnóza	nesignifik.	nesignifik.
věk	p=0,001	p=0,001	IPI	p=0,001	p=0,001
LDH	p=0,001	p=0,001	rituximab	p=0,005	p=0,005
KS	p=0,001	p=0,001	ASCT	p=0,005	p=0,005
PS WHO	p=0,001	p=0,001	rok	nesignifik.	nesignifik.
rituximab	p=0,001	p=0,001			
ASCT	p=0,001	p=0,001			
rok	nesignifik.	nesignifik.			

Tabulka 6: Srovnání distribuce hlavních subtypů non-Hodgkinových lymfomů (NHL) ze studie ILSG (citace 16) a současné analýzy (CLSG)

	Omaha (n=200)	Vancouver (n=200)	London (n=119)	Lyon (n=192)	Locarno (n=79)	CLSG (n=3518)
Diagnóza						
SLL	7%	1%	8%	8%	5%	5%
MCL	7%	7%	7%	7%	14%	7%
FL	32%	31%	28%	17%	11%	19%
MALT	6%	7%	3%	13%	9%	6%
DLBCL	28%	29%	27%	25%	36%	43%
PMBCL	0%	2%	2%	4%	9%	2%
PTL	3%	1%	8%	4%	6%	2%
ALCL	2%	3%	2%	3%	0%	2%

dobnost OS je vyšší. Nemocní s ALCL mají v naší sestavě pravděpodobnost OS stejnou jako např. DLBCL, což je rozdíl proti ILSG (International Lymphoma Study Group). Předpokládáme, že to může být způsobeno společnou analýzou ALCL ALK negativního a ALCL ALK pozitivního podtypu, které mají jinak výrazně odlišnou prognózu¹⁷. Na druhé straně nemocní s PMBCL patřili do skupiny s velmi dobrou prognózou na rozdíl od studie ILSG¹⁴, a potvrzuje tak i další pozorování¹⁸.

Vzhledem k velkému počtu nemocných s DLBCL a relativně dostatečné době sledování jsme provedli podrobnější analýzu této skupiny. Podle očekávání jsme potvrdili významnost již standardně používaných prognostických parametrů, zejména IPI. Při srovnání OS u nemocných s jednotlivými typy rizika lze konstatovat, že námi pozorovaná pravděpodobnost přežití ve 3 letech byla ve všech skupinách vyšší než ve starších publikovaných sestavách, jak původního souboru, na němž byla založena tvorba mezinárodního prognostického indexu¹⁰, tak ještě výrazněji ve srovnání s údaji z holandského populačního registru¹⁹. Za významné pozorování lze označit rozdíl v přežití nemocných léčených imunochemoterapií (rituximab + chemoterapie) proti samotné chemoterapii. V randomizovaných studiích bylo prokázáno, že právě zařazení rituximabu do léčby DLBCL vede k signifikantnímu zlepšení jak OS tak PFS^{20,21}. Naše předběžná analýza je po analýze v Britské Kolumbii²² druhou, která potvrzuje toto zlepšení na neselektované populaci nemocných léčených rituximabem a chemoterapií. V naší sestavě nebyl nikdo v letech 1999 a 2000 léčen v rámci indukční léčby rituximabem, v roce 2004 to bylo 60% nemocných, v roce 2005 90% nemocných.

Význam registrové analýzy spočívá v několika úrovních. Za prvé se jedná o první analýzu populace nemocných

s NHL v ČR. Lze konstatovat, že distribuce odpovídá variacím přítomným v různých geografických oblastech, jediným rozdílem je vyšší výskyt DLBCL. Dále jsme pozorovali poměrně zřetelnou distribuci do několika skupin s různou prognózou. Ve skupině s DLBCL jsme demonstrovali význam zařazení rituximabu do léčby nemocných s tímto typem lymfomu, což se projevilo jednak při srovnání nemocných léčených chemoterapií a imunochemote-

rapií, ale i v signifikantním zlepšení přežití při srovnání léčby v letech, které od sebe byly vzdáleny jen tři roky. Ukazuje se tak význam budování registru a jeho analýza nejen z důvodů a vědeckých, ale při správném použití mohou takto získaná data sehrát velký význam při tvorbě zdravotnické politiky.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR: NR 8231/3.

Literatura

- Bray I, Brennan P, Boffetta P. Recent trends and future projections of lymphoid neoplasms—a Bayesian age-period-cohort analysis. *Cancer Causes Control*. 2001;12:813-820.
- Olsen JH. Epidemiology. In: Degos L, Linch D, Lowenberg B, eds. *Malignant Hematology*. London: Mark Dunitz; 1999:1-22.
- UK Non-Hodgkin lymphoma incidence statistics. <http://info.cancer-researchuk.org/cancerstats/types/nhl/incidence/>. 2007.
- Edwards BK, Howe HL, Ries LA et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1999, featuring implications of age and aging on U.S. cancer burden. *Cancer*. 2002;94:2766-2792.
- Cancer Incidence 1999 in Czech Republic. UZIS CR, NOR CR; 2001.
- Cancer Incidence 2003 in the Czech Republic. Praha: UZIS, NOR CR; 2006.
- Geryk E, Kolcova V, Zacek V. Trendy poctu onkologicky nemocnych v Ceske republice. Brno: NOR, MOU; 2000.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group [see comments]. *Blood*. 1994;84:1361-1392.
- World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. Lyon: IARC Press; 2001.
- Shipp MA, Harrington DP, Anderson JR et al. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkins Lymphoma. *N Engl J Med*. 1993;329:987-994.
- Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Blood*. 2004;104:1258-1265.
- Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol*. 1999;17:1244.
- Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME et al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007.
- Chan WC, Armitage JO, Gascoyne R et al. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;89:3909-3918.
- Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*. 1998;16:2780-2795.
- Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol*. 1998;9:717-720.
- Gascoyne RD, Aoun P, Wu D et al. Prognostic significance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) protein expression in adults with anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 1999;93:3913-3921.
- Savage KJ, Al Rajhi N, Voss N et al. Favorable outcome of primary mediastinal large B-cell lymphoma in a single institution: the British Columbia experience. *Ann Oncol*. 2006;17:123-130.
- Hermans J, Krol AD, van Groningen K et al. International Prognostic Index for aggressive non-Hodgkin's lymphoma is valid for all malignancy grades. *Blood*. 1995;86:1460-1463.
- Coiffier B, Lepage E, Briere J et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346:235-242.
- Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A et al. CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MINT) Group. *Lancet Oncol*. 2006;7:379-391.
- Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M et al. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol*. 2005;23:5027-5033.

Korespondenční adresa:

Doc. MUDr. Marek Trněný, CSc.,
I.interní klinika VFN a I.LF UK Praha,
U nemocnice 2, 128 08 Praha 2,
trneny@cesnet.cz

Došlo / Submitted: 7. 2. 2007

Přijato / Accepted: 4. 6. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů. The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

PERKUTÁNNÍ ENDOSKOPICKÁ GASTROSTOMIE U PACIENTŮ S TUMORY HLAVY A KRKU

PERCUTANEOUS ENDOSCOPIC GASTROSTOMY IN PATIENTS WITH NEOPLASM OF THE HEAD AND NECK

WASIKOVÁ, S.¹, PISKAČ, P.¹, SPURNÝ, V.², ROTNÁGLOVÁ, S.²

¹ II. CHIRURGICKÁ KLINIKA FN U SV. ANNY A LF MU BRNO,

² ODDĚLENÍ RADIAČNÍ ONKOLOGIE FN U SV. ANNY

Souhrn

Východisko: Perkutánní endoskopická gastrostomie je metoda sloužící k zajištění podmínek pro enterální výživu v situacích, kdy tato výživa není možná klasickým příjmem stravy per os. **Metody:** První PEG byl zaveden na našem pracovišti v březnu roku 1993. V naší studii pracujeme se souborem pacientů během období 1.1.2004 - 30.4.2006, kdy bylo celkem provedeno 130 pokusů o perkutánní endoskopickou gastrostomii, z nichž 124 bylo úspěšných, přičemž u 98 pacientů byl zaveden PEG před kurativní nebo paliativní dávkou záření u diagnózy tumoru v ORL oblasti. **Výsledky:** Zavedená sonda pomáhá zlepšit špatný nutriční stav těchto pacientů a protože na rozdíl od nasogastrické sondy neprochází ozařovanou oblastí, odpadá lokální dráždění sliznice ozařované oblasti spolu se všemi negativními důsledky. **Závěr:** PEG představuje relativně snadný způsob zajištění enterální výživy. Ve srovnání s ostatními metodami provedení gastrostomie je endoskopická pro pacienty nejméně zatěžující a nejbezpečnější. Omezením zůstává nutnost dostupnosti žaludku pro endoskop.

Klíčová slova: Gastrostomie, nádory.

Summary

Backgrounds: Percutaneous Endoscopic Gastrostomy is a procedure providing nutrients in patients who require long-term enteral feeding yet are unable to maintain sufficient oral intake. **Methods:** In our department the first PEG insertion was performed in 1993. The PEG procedure was attempted in a group of 130 patients during 1/2004-4/2006. The PEG was successfully established in 124 cases. In 98 cases the PEG installation preceded curative and palliative x-ray therapy in patients with neoplasms of the oropharynx, larynx and esophagus. **Results:** The installed PEG helps to improve a bad nutritive condition in these patients and in contrast with the nasogastric tube there is no local irritation as the PEG does not pass through the irradiated area. **Conclusion:** PEG is a relatively easy way to provide enteral intake. Compared to other methods of approaching enteral nutrition PEG represents a successful, safe, and effective procedure. The limitation is the stomach accessibility for the endoscope.

Keywords:

Gastrostomy, tumors.

Úvod:

Pacienti s nádory hlavy a krku představují vysoce rizikovou skupinu pacientů pro rozvoj malnutrice již v době stanovení diagnózy. Následná multimodální léčba často vede ke zhoršení již primárně špatného nutričního stavu. Ten je výsledkem kombinací polykacích potíží a nežádoucích účinků následné radiochemoterapie.

U pacientů s nádory v ORL oblasti – tumory dutiny ústní, jazyka, měkkého patra, báze dutiny ústní, hrtanu, hltanu, se v terapii uplatňuje významně konkomitantní chemoradio-terapie. Její použití však zvyšuje míru zejména slizniční toxicity.

Stupnice pro třídění mucositivity dle CTC :

- Stupeň I - slizniční erytém
- Stupeň II - ložiskové ulcerace nebo pseudomembrány – zaujímá méně než 50% slizničního povrchu na orální straně

- Stupeň III – splývající ulcerace nebo pseudomembrány - zaujímá více než 50% slizničního povrchu na orální straně
- Stupeň IV - nekróza nebo hluboká ulcerace
Slizniční toxicita zejména vyššího stupně výrazně zhoršuje již existující dysfagii a odynofagii. Vede pak ke zhoršení perorálního příjmu a zhoršení nutričního stavu pacientů. Tento nepříznivý stav se snažíme korigovat perkutánní endoskopickou gastrostomií (PEG-obr.1)
PEG je běžně indikována v případech, kdy se předpokládá nemožnost příjmu stravy per os trvající déle než 6 týdnů.(7,8) Mezi nejčastější indikace patří: neurologické poruchy spojené s vymizením polykacího reflexu / např. ALS/, dlouhodobá umělá plicní ventilace, nádory v oblasti ORL při zachovalé průchodnosti pro endoskop, tracheoesofageální píštěle, stavy po rozsáhlé chirurgické intervenci v čelistní oblasti aj. PEG může být modi-

fikována na perkutánní endoskopickou gastrojejunostomii. (1,4,6)

Kontraindikace k zavedení PEG lze rozdělit na absolutní a relativní. K těm absolutním patří nemožnost vzájemného dotyku /apozice žaludku a břišní stěny, tudíž pacienti po subtotální gastrektomii, s ascitem, nebo s významnou hepatomegálií vyžadují pečlivé rozpoznání diafanoskopického efektu. Ten může být rovněž znemožněn u pacientů s těžkou obezitou. Dále nesmí být PEG zavedena při obstrukci či afunkci gastrointestinálního traktu od žaludku aborálně. K relativním kontraindikacím řadíme píštěle tenkého střeva, neoplastické a infiltrativní procesy žaludeční stěny. (8,9) Poruchy koagulace, pokud jsou zkorigovatelné, nejsou kontraindikací k provedení PEG.

Metodika:

Na našich pracovištích indikujeme provedení PEG u pacientů s lokálně pokročilými nádory orofaciální oblasti T3-T4,N+, kteří absolvovali indukční chemoterapii cis DDP, FU, či CBDCA, paclitaxel, po které následuje konkomitantní chemoradioterapie s cis DDP v dávce 40 mg /m² 1x týdně, eventuálně i s radioprotekcí amifostinem. Aplikovaná LD 5x2,0 Gy/ týden do 60-70 Gy.

Další skupinu tvoří pacienti s lokálně pokročilým tumorem, primárně inoperabilní, kde je indikována radioterapie s kurativním záměrem. Dále pak pacienti, kde je léčba paliativní a PEG je nutná k zajištění nutrice trvale.

Nejrozšířenější technikou zavádění PEG je metoda „pull“, poprvé představena roku 1980 v Clevelandu v USA Gaudererem a Ponskym. Na II.chirurgické klinice byla první PEG zavedena v březnu roku 1993. K výkonu je potřeba běžné vybavení pro gastroskopii a gastrostomický set na jedno použití. Personální zajištění se skládá z endoskopujícího chirurga a všeobecného chirurga, endoskopické sestry a pomocnice. Vzhledem k tomu, že set je vyroben z polyuretanu, který nereaguje s tkáněmi lidského těla, může být zavedená sonda používána několik let.

Příprava k výkonu :

U neakutních výkonů, medikuje-li pacient perorální anti-koagulancia se 4-5 dní předem nahradí p.o. terapie nízkomolekulárním heparinem v terapeutické dávce. Výkon je pak proveden 12 hodin po poslední aplikaci LMWH.

Pacienti 6-8 hodin před výkonem nesmí jíst, pít a kouřit, případně je zastaven příjem enterální výživy sondou. V den výkonu je zavedena periferní žilní kanyla, dále vyšetřen krevní obraz, koagulace (INR do 1,3) a hladina trombocytů (nad 100 tisíc). Vyloučí se kontraindikace výkonu.

Výkon začíná zavedením endoskopu do žaludku, jeho insulací a následně pomocí diafanoskopie břišní stěny vytipováním místa vpichu. Po aplikaci lokálního anestetika (obr. 2) se provede punkce žaludku (obr. 3) a po vytažení mandrénu (obr.4) se protáhne vodící nit (obr.5 a 6), jež je uchopena do tripoidu endoskopu (obr. 7) a zároveň s ním vytažena (obr.8 a 9) před ústa pacienta (obr.10). Zde se zafixuje s loopem sondy (obr.11), která je druhým koncem vodící nitě před břišní stěnou tažena („pull“) dutinou ústní, jícnem až do žaludku. Ostrý konec sondy žaludeční stěnu propíchne a dostává se před břišní stěnu, zde se odstříhne a upevní ploškou. Tato fixace zamezuje úniku žaludečních šťáv do dutiny břišní. Je nutné ji po 24 hodinách uvolnit k zamezení vzniku dekubitu. V této době se také sonda ponechává

pouze k derivaci žaludečních šťáv. Poté je již možné začít s enterální výživou.

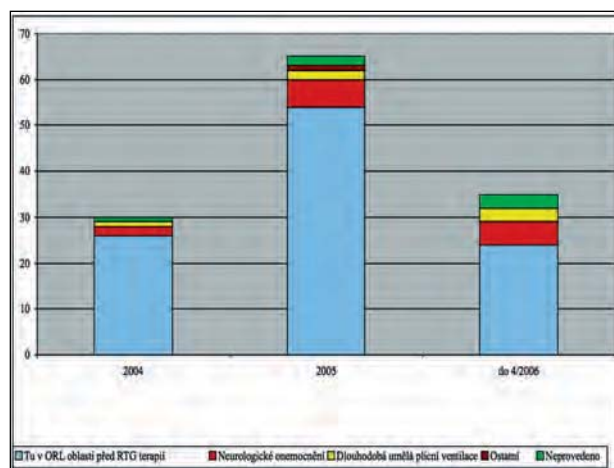
Na oddělení radiační onkologie pak observujeme pacienta, za monitorace Tk a P,v den výkonu je vyloučen perorální příjem, proto hradíme tekutiny a energii infusní terapií. Analgetika aplikujeme i.v., dle potřeby pacienta. Zavedení setu PEG může být kdykoliv zrušeno po odeznění indikační příčiny. Po odstřížení fixace vklouzne centrální část do žaludku a odchází per vias naturales nebo je vytažena endoskopicky.

Výsledky:

V naší studii jsme pracovali se souborem 130 pacientů z období 1/2004 – 4/2006, přičemž pacientů s nádory v ORL oblasti bylo celkem 104. Set PEG (obr.12) byl úspěšně zaveden ve 98 případech. U šesti pacientů nebyl PEG zaveden vzhledem k nemožnosti diafanoskopie břišní stěny, aktivnímu odporu pacienta, floridní peptické lézi žaludku, kýle v jizvě po horní střední laparotomii, jež obsahovala kličky tenkého střeva a ve dvou případech nemožnosti projít endoskopem kolem tumoru do žaludku.

Komplikace jsou zřídkačným jevem. K lehčím patří dekubity okolo sondy a infekce rány. Vyskytují se v 6-7% případů. Z těžších komplikací lze jmenovat aspiraci, laryngospasmus, perforaci střev či krvácení ze žaludku. Objevují se ve 3%, mortalita je v 0,7% případů. V naší sestavě jsme zaznamenali pouze lehčí dekubity kolem sondy a netěsnosti, které byly vyřešeny opakovanými převazy. Závažnější komplikace v této skupině pacientů jsme neměli. (grafxls)

Indikace	2004	2005	do 4/2006	celkem
Tu v ORL oblasti před RTG terapií	26	54	24	104
Neurologické onemocnění	2	6	5	13
Dlouhodobá umělá plicní ventilace	1	2	3	6
Ostatní	0	1	0	1
Neprovedeno	1	2	3	6
Celkem	30	65	35	130



Diskuze:

Zavedení setu PEG představuje relativně snadný způsob zajištění enterální výživy. Ve srovnání s ostatními metodami provedení gastrostomie je endoskopická pro pacienty nejméně zatěžující a nejbezpečnější. Omezením zůstává nutnost dostupnosti žaludku pro endoskop. Zvláš-

tě v souvislosti s tumory v ORL oblasti bývá často tato kontraindikace zveličována. Na základě vlastní zkušenosti se domníváme, že zkušený endoskopista spolu s otorinolaryngologem a onkologem poměrně snadno vytipují skupinu pacientů, u kterých je možno PEG využít k zajištění výživy. Ta podle rozsahu nádorového bujení bude definitivní, nebo dočasná po dobu ozařování dané oblasti. Tím je pacient ušetřen dlouhodobého zavedení sondy se všemi jejími důsledky (dekubity jícnu, krvácení, zvýšeného dráždění sliznice v ozařované oblasti). Vhodné je zavedení PEG před zahájením onkologické léčby s tím, že dle výsledku je následně ponechán či po obnovení polykání odstraněn.

Pro pacienty je přínosem šance, že téměř ve 100% případech, díky zavedení PEG dodrží léčebný plán a dokon

čí onkologickou léčbu, bez nutnosti přerušení pro váhový úbytek a slizniční toxicitu, která znemožňuje perorální příjem.

Výhodou pro pacienty je i možnost snadné obsluhy PEG v domácí péči, kdy používá doporučené standardní přípravky polymerní výživy s definovaným obsahem proteinů, tuků na bázi triglyceridů, polysacharidů, vitamínů a stopových prvků.

Závěr:

Na základě našich zkušeností je enterální výživa sondou PEG v průběhu onkologické léčby podstatně výhodnější než dosud užívaná výživa sondou nasogastrickou. Zavedení PEGu předchází zahájení léčby a po jejím ukončení je snadno odstraněn nebo v případě nutnosti ponechán.

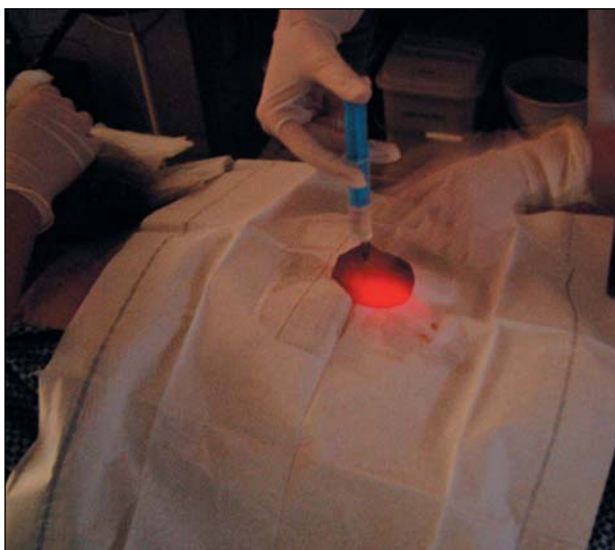
Obrazová příloha:



Obr. č. 1 – zavedení PEG



Obr. č. 3 – punkce žaludku punkční jehlou s mandrémem



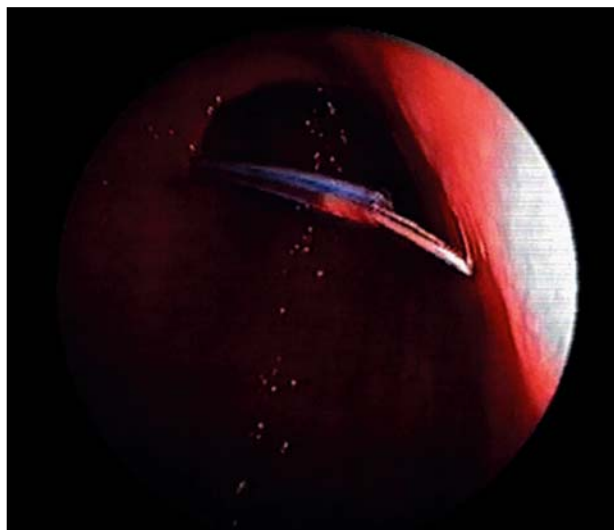
Obr. č. 2 – aplikace lokálního anestetika do místa diafanoskopického efektu



Obr. č. 4 – vytažena jehla a ponechán mandrén



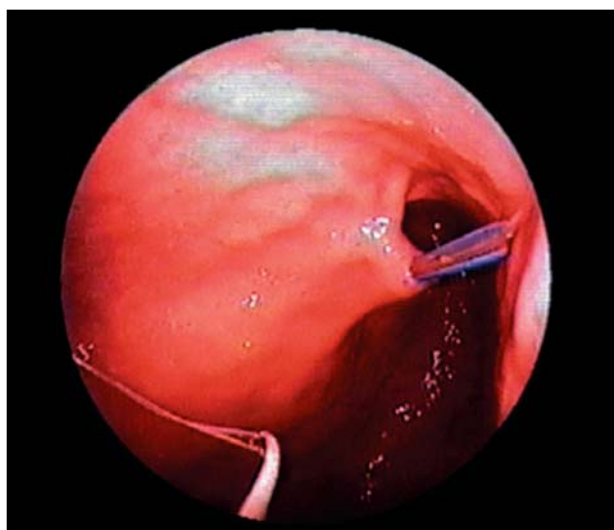
Obr. č. 5 – protažení vodící nitě do žaludku (pohled z vnějšku)



Obr. č. 6 – protažení vodící nitě do žaludku (pohled ze žaludku)



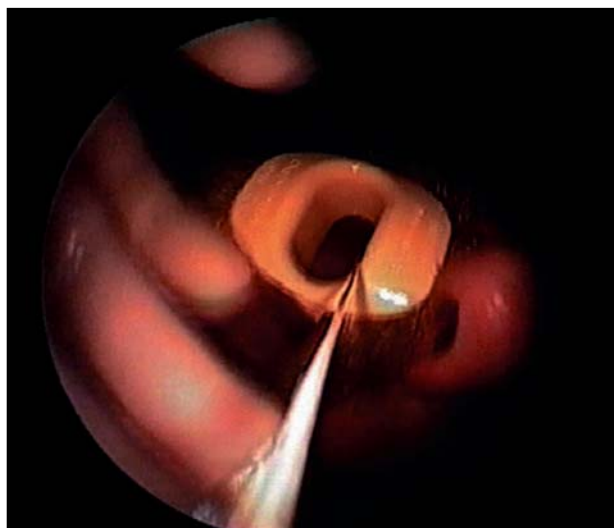
Obr. č. 7 – uchopení vodící nitě do tripoidu



Obr. č. 8 – táhnutí vodící nitě pomocí tripoidu přes žaludek



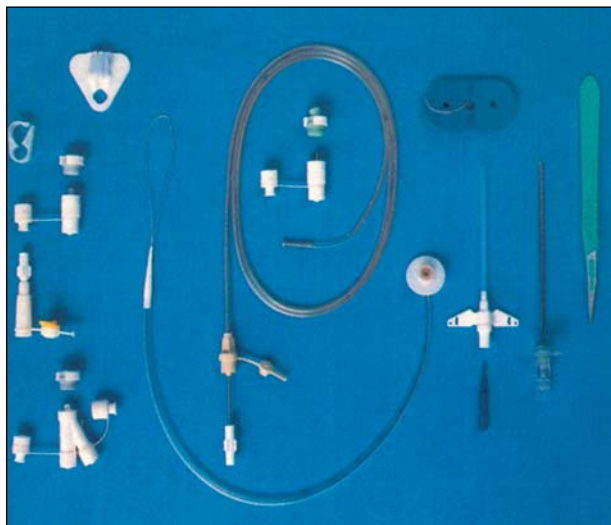
Obr. č. 9 – táhnutí vodící nitě pomocí tripoidu přes jícen



Obr. č. 10 – vodící nitě vytažena před ústa



Obr. č. 11 – fixace vodící nitě s loopem gastrické sondy před ústy pacienta



Obr. č. 12 – set PEG

Literatura:

1. Benkov, J. K.: When „Buttonig Up“ Is not Sound Advice J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., Vol. 17, 1993, No. 4 p.358-360
2. Gauderer, M. W., Ponsky, J. L., Izant, R. J.: Gastrostomy without laparotomy: a percutaneous endoscopic technique. J. Ped. Surg., 15, 1980, No. 6, p. 872-875
3. Kala, Z., Kysela, P., Hanke, I., Procházka, V., Robek, O.: Krvácení do tenkého střeva z pohledu chirurgického pracoviště Prakt. Lék., 81, 2001, No. 8, 9, 431-434
4. Kohout, P., Maňák, J., Sobotka, L., Zadák, Z. Perkutánní endoskopická gastrostomie. Sborník přednášek XI. vědeckého kongresu na téma: Interdisciplinární význam nutriční podpory, akutní metabolické stavy. Hradec Králové 1995
5. Maňák, J., Kohout, P., Sobotka, L., Zadák, Z.: Punkční endoskopická

gastrostomie. Sborník přednášek XI. vědeckého kongresu na téma: Interdisciplinární význam nutriční podpory, akutní metabolické stavy. Hradec Králové 1995

6. Mellinger, J. D., Ponsky J. L.: Percutaneous Endoscopic Gastrostomy, Endoscopy, 26, 1994, p55-59
7. Piskač, P., Leypold, J., Hnízdil, J., Petrik, J., Riebel, O. První zkušenosti chirurgického pracoviště s perkutánní endoskopickou gastrostomií Rozhl. Chir., 76, 1997, No. 1. p. 25-27
8. Staffa, R., Stupka, Z., Krpenský, A., Hušek, K., Černý, E., Jelínková I.: A rare case of malignant epitheliod gastrointestinal stromal tumour. Case report Scripta Medica (Brno)-75, (1) 7-14, February 2002
9. Vokurka, J., Wechsler, J., Kalač, J., Mašek, M., Vlček, P. Problematika recidivujícího nitrobrříšního abscesu Bratisl. lék. listy 96, 1995, No. 5., p. 265-267

Korespondenční adresa:

MUDr. Wasiková, S.
II. chirurgická klinika FN u sv. Anny a LF MU Brno,
Pekařská 53, 600 00 Brno

Došlo / Submitted: 1. 3. 2007

Přijato / Accepted: 17. 6. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů. The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

NEZVYČAJNÝ PRÍPAD DLHODOBÉHO PREŽÍVANIA PACIENTKY S CHEMOREFRAKTÉRNÝM MERKELOVYM KARCINÓMOM

UNUSUAL CASE OF LONG-TERM SURVIVAL OF THE PATIENT WITH CHEMOREFRACTORY MERKEL CELL CARCINOMA

MÁRIA REČKOVÁ¹, LAWRENCE H. EINHORN²

¹ ONKOLOGICKÁ KLINIKA, UNIVERZITA KOMENSKÉHO, NOÚ BRATISLAVA, SLOVENSKÁ REPUBLIKA

² INDIANA UNIVERSITY, 535 BARNHILL DRIVE INDIANAPOLIS, IN, USA

Súhrn

Prípad prezentuje 46-ročnú pacientku s Merkelovým karcinómom. V iniciálne lokalizovanom štádiu bola liečená chirurgickou resekciou s následnou adjuvantnou chemoterapiou. U pacientky došlo následne k opakovaným lokoregionálnym relapsom v krátkom časovom odstupe od adjuvantnej chemoterapie a nakoniec k relapsu vo vzdialenej lokalizácii. Distantný relaps bol liečený chirurgickou liečbou vzhľadom k predpokladanej chemorefrakternosti ochorenia. Pacientka je po ukončenej liečbe bez známk recidívy ochorenia v trvaní 16+ mesiacov. Prípad poukazuje na významnú úlohu chirurgickej liečby chemorefraktérneho ochorenia. Pretože vzdialený relaps ochorenia bol diagnostikovaný na základe kontrolných rádiografických vyšetrení u asymptomatickej pacientky, má okrem sledovania pacientov fyzikálnym vyšetrením význam aj rádiografické sledovanie, aspoň v určitých prípadoch.

Kľúčové slová: Merkelov karcinóm, chemorefraktérny, rádiografické sledovanie.

Summary

The case report presents a 46-year old patient with Merkel cell carcinoma. Initial treatment of localized disease consisted of surgery followed by adjuvant chemotherapy. Shortly after the adjuvant chemotherapy completion she relapsed several times locoregionally and ultimately in a distant location. The distant relapse was treated surgically as the disease was considered to be chemorefractory. Since the last treatment, the patient has been disease-free for 16+ months. The case shows the importance of surgical treatment of chemorefractory disease. Because distant relapse was diagnosed by radiographic studies at the time when no other symptoms were presented, radiographic follow-up, at least in some cases, plays a very important role in addition to follow-up with physical examination.

Key words: Merkel cell tumor, drug resistance, radiography, follow-up studies.

Introduction

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare neuroendocrine carcinoma of the skin first described by Toker.¹ The natural history of MCC varies. In some patients, the course of disease may be indolent with only localized disease that is well controlled by local excision only. However, MCC is potentially aggressive and usually warrants aggressive therapy. The combination of wide local excision (WLE), therapeutic lymph node dissection, and radiotherapy (RT) has been suggested for treatment of regional disease.² However, if the initial presentation is not cured, relapses usually occur outside the field of locoregional therapy. Although distant metastases can respond to chemotherapy, the duration of response is brief, similar to the response achieved in extensive small cell lung cancer.

The following case presents a patient with unusual long-term survival of chemorefractory MCC following distant relapse.

Case Report

This is a case of L.E., Caucasian woman diagnosed with MCC. This 46-year old female first presented at Indiana Cancer Center with a 3-week of progressive growth of a blue-reddish nodule localized in the infraorbital region of her left cheek in February 2003. The nodule was 1.5 cm in diameter and was minimally tender on palpation. Short course of antibiotics was administered without improvement. The mass rapidly increased to 3cm in size. In March 2003, excision biopsy revealed Merkel cell carcinoma with positive surgical margins. The patient was referred to plastic surgery for definitive surgical treatment with reconstruction. In April 2003, she underwent wide re-excision with 2cm margin along with left parotidectomy and modified left neck dissection. Metastatic work-up included CT of the chest, abdomen and pelvis. No distant metastases were revealed. She was then treated with 4 courses of adjuvant chemotherapy consisting of cisplatin and etoposide. In September 2003, shortly after the 4th cycle of adjuvant chemotherapy, she relapsed locoregionally and in the left

cervical lymph nodes. The Merkel cell tumor relapse was confirmed by biopsy. She was treated with a complete surgical resection. However, margins from left neck dissection were positive for malignant cells. Following resection, local radiotherapy with concurrent docetaxel was administered. She finished the treatment in November 2003. The treatment was complicated with weight loss secondary to mucositis and mouth pain, plus an episode of herpes zoster over her left upper extremity and chest.

In April 2004, she suffered a second locoregional relapse in her right supraclavicular lymph nodes that was confirmed by fine needle aspiration. Radiotherapy started in May 2004 and initially included right face and right neck. Again she showed excellent response to the radiation, nevertheless, halfway through the treatment a right tonsillar mass was noticed. Tonsillar biopsy revealed Merkel cell tumor. Radiotherapeutic fields were then adjusted to cover the right tonsillar fosse as well. Radiotherapy was completed in June 2004.

In March 2005, a distant relapse with large pelvic mass was diagnosed during her regular follow-up. CT scan revealed a large ovarian mass and an adrenal lesion. She underwent total abdominal hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy, omentectomy and laparoscopic right adrenalectomy. The ovarian mass and the right adrenal demonstrated involvement with Merkel cell carcinoma. She was asymptomatic at the time of distant relapse.

Since the abdominal operation she has remained disease free for 16+ months. PA and lateral chest X-ray and abdominal/pelvic CT scan as well as history and physical exam were all normal in July 2006.

Discussion

MCC is a rare, aggressive neuroendocrine carcinoma with male-to-female ratio of 1:0.9-1.1 and involves more whites than blacks.³ The tumor is usually localized at sun-exposed areas of head and neck (45-55%) or extremities (30-40%) but does occur in the trunk, genitalia, and perianal region with a random distribution.³ More frequent occurrence was reported in immunocompromised people. MCC stains with immunohistochemistry for neuron specific enolase, synaptophysin and chromogranin. It is felt to represent a small cell carcinoma of the skin. Unlike small cell lung cancer there is no direct correlation to cigarette smoking. MCC has a high propensity for local recurrence (20% to 75%), regional node metastases (31% to 80%), and distant metastases (26% to 75%), and approximately one-third of patients eventually die of the disease.⁴ Although MCC is a highly aggressive and potentially lethal cancer, spontaneous regression has been reported. The

disease is staged according to presence of localized disease (stage I), locoregional metastases (stage II) or distant metastases (stage III). Recommended management usually consists of wide local excision (WLE) with 1 cm to 3 cm margins. However, treatment guidelines are not well defined because of tumor rarity, which makes randomized clinical trials with sufficient power difficult. Reported recurrence rates after primary therapy for MCC with surgery alone are between 22% and 100%.⁴ Elective lymph node dissection and adjuvant radiotherapy decreases the rate of locoregional recurrence, however has no marked influence on overall survival.² Patients with involved nodes or clinically aggressive disease are usually treated with WLE, locoregional radiation therapy and chemotherapy regimens utilized in small cell lung cancer, such as cisplatin or carboplatin and etoposide.⁵⁻¹⁰ High-risk MCC was defined as having at least one of the following criteria: primary size greater than 1 cm, node involvement, recurrence following initial surgery (the recurrence has to be outside of the previous radiation field), gross residual disease after surgery, or occult primary with involved lymph nodes.⁸ Like other neuroendocrine tumors the Merkel cell tumors are highly chemosensitive. Although distant metastases can respond to chemotherapy, the duration of response is brief, similar to what is achieved in extensive small cell lung cancer.

In this report, the patient relapsed locoregionally shortly after the end of initial systemic adjuvant treatment with cisplatin and etoposide, and thus her disease was considered chemorefractory. She experienced two locoregional nodal and tonsillar relapses within 5 months of chemotherapy completion. These were successfully controlled with radiotherapy. Then she developed distant visceral relapse with a 15x20 cm ovarian mass and a 6.4 cm adrenal mass. These were resected and she remains progression free for 16+ months.

Conclusion

The case of L.E. is unusual because of the long disease free interval (16+ months) of chemorefractory disease following both locoregional and distant relapse. The case shows the important role of surgical treatment in chemorefractory disease. Because the distant relapse was diagnosed by radiographic studies (CT scans) at a time when no symptoms were presented, radiographic follow-up, at least in some cases, appears to play a very important role in addition to follow-up by physical examination.

Acknowledgement:

This work has been supported by UICC International Cancer Technology Transfer Fellowship.

References:

1. Tokar C: Trabecular carcinoma of the skin. Arch Dermatol 105:107-110, 1972
2. Allen PJ, Zhang Z-F, Coit DG: Surgical Management of Merkel Cell Carcinoma. Ann Surg 229:97-105, 1999
3. Tai PTH, Yu E, Winquist E, et al: Chemotherapy in Neuroendocrine/Merkel Cell Carcinoma of the Skin: Case Series and Review of 204 Cases. J Clin Oncol 18:2493-2499, 2000
4. Sumaira ZA, Leffell DJ: Cancer of the Skin, in DeVita TJ, Hellman S, Rosenberg SA (eds): Principles and Practice of Oncology, Lippincott Williams Wilkins, 2001, pp 1491-1518
5. Feun LG, Savaraj N, Legha SS, et al: Chemotherapy for Metastatic Merkel Cell Carcinoma. Cancer 62:683-685, 1988
6. George TK, Di Sant Agnese AP, Bennett JM: Chemotherapy for Metastatic Merkel Cell Carcinoma. Cancer 56:1034-1038, 1985
7. Grosh WW, Giannone L, Hande KR, et al: Disseminated Merkel Cell Tumor. Am J Clin Oncol 10:227-230, 1987
8. Poulsen M, Rischin D, Walpole E, et al: High-Risk Merkel Cell Carcinoma of the Skin Treated With Synchronous Carboplatin/Etoposide and Radiation: A Trans-Tasman Radiation Oncology Group Study - TROG 96:07. J Clin Oncol 21:4371-4376, 2003
9. Redmond III J, Perry J, Sowray P, et al: Chemotherapy of Disseminated Merkel-Cell Carcinoma. Am J Clin Oncol 14:305-307, 1991
10. Sharma D, Flora G, Grunberg SM: Chemotherapy of Metastatic Merkel Cell Carcinoma: Case Report and Review of the Literature. Am J Clin Oncol 14:166-169, 1991

Correspondence:

MUDr. Mária Rečková
Onkologická klinika, Univerzita Komenského, národný onkologický ústav,
Klenova 1, 833 10 Bratislava Slovenská republika
tel: +421 903544558, e-mail: maryrecka@gmail.com

Došlo / Submitted: 14. 1. 2007

Přijato / Accepted: 12. 2. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

i n f o r m a c e

Dermatoonkologická sekce Onkologické společnosti ČLS JEP

Dne 13.9. 2007, v prostorách Dermatovenerologické kliniky FNKV v Praze proběhla ustavující schůze Dermatoonkologické sekce Onkologické společnosti ČLS JEP.

Souhlas k přípravám organizace sekce byl vysloven na zasedání výboru ČOS dne 17.1. 2006. Sekce je zastřešena jak výborem České onkologické společnosti, tak i výborem České dermatovenerologické společnosti. Podkladem k jednání o vzniku samostatné sekce byl návrh mezioborové spolupráce pro management maligního melanomu.

Předsedou Dermatoonkologické sekce byl zvolen Prof. MUDr. Petr Arenberger, DrSc., MBA., místopředsedou Doc. MUDr. Vuk Fait, CSc. a vědeckým sekretářem as. MUDr. Miloslav Salavec, CSc. Ustavující setkání dále doporučilo vytvoření expertních skupin a pověřilo vedením jednotlivých sekcí členy. Prozatím doporučila vytvoření expertních skupin pro maligní melanom, pro kožní lymfomy, pro nemelanomové nádory kůže, pro histopatologii kožních nádorů a melanocytárních lézí a pro diagnostické metody kožních nádorových onemocnění.

Sekce si klade za cíl kromě jiného vypracování standardů některých kožních nádorových diagnóz, ke spolupráci vyzývá kromě dermatologů klinické onkology, hematookology, radioterapeuty, chirurgy, plastické chirurgy a další odborníky, zúčastněné v diagnostice, terapii a výzkumu kožních malignit.

Další podrobnosti včetně přihlášky ke členství lze nalézt na webových stránkách ČOS JEP <http://www.linkos.cz>.

DETEKCIA PHILADELPHIA CHROMOZÓMU U PACIENTOV S CHRONICKOU MYELOIDNOU LEUKÉMIOU V PREŠOVSKOM KRAJI (1995-2004)

DETECTION OF PHILADELPHIA CHROMOSOME IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA FROM THE PREŠOV REGION IN SLOVAKIA (1995-2004)

BOROŇOVÁ I., BERNASOVSKÝ I., BERNASOVSKÁ J.

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF HUMANITIES AND NATURAL SCIENCE, UNIVERSITY OF PREŠOV, PREŠOV, SLOVAC REPUBLIC

Súhrn

Autori analyzovali výsledky cytogenetických vyšetrení zameraných na detekciu Philadelphia chromozómu u pacientov chronickou myeloidnou leukémiou v Prešovskom kraji za obdobie rokov 1995-2004. **Súbor a metodika:** V práci boli analyzované výsledky 72 cytogenetických analýz vzoriek kostnej drene pacientov so suspektou diagnózou CML. **Výsledky:** Philadelphia chromozóm bol detegovaný u 94,4% pacientov so suspektou diagnózou CML. V jednom analyzovanom prípade bola zistená komplexná translokácia zahŕňujúca chromozómy 8, 9 a 22. U jedného pacienta boli detegované početné numerické a štrukturálne chromozómové aberácie. Mozaikový karyotyp bol detegovaný u 5,9% pacientov. **Záver:** Výsledky analýz potvrdzujú diagnostický a prognostický význam detekcie Philadelphia chromozómu u pacientov s klinickou diagnózou CML. Konvenčná cytogenetická analýza zostáva naďalej štandardnou metódou pre potvrdenie diagnózy, monitorovanie terapeutickéj odpovede a minimálnej reziduálnej choroby u pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou.

Kľúčové slová: chronická myeloidná leukémia, Philadelphia chromozóm, karyotypizácia, cytogenetická analýza.

Summary

Authors analyzed results of cytogenetic examinations with attention on detection of Philadelphia chromosome performed in patients with CML in the Prešov region in 1995-2004. **Material and methods:** Authors analyzed results of cytogenetic examinations performed in 72 samples of bone marrow cells in patients with suspected diagnosis of CML. **Results:** Philadelphia chromosome in bone marrow cells of patients with suspected diagnosis CML in the Prešov region (1995-2004) was detected in 94,4% of cases. In one patient a complex translocation involving chromosomes 8, 9 and 22 was identified. One patient has showed extra numerical and structural chromosomal aberrations. Mosaic karyotype of the Ph chromosome was found in 5,9% of cases. **Conclusion:** The results of cytogenetic analyses confirm diagnostic and prognostic significance of Philadelphia chromosome in patients with clinical diagnosis CML. Conventional cytogenetic analysis remain the standard method for purposes of diagnosis, monitoring of the therapeutic response and minimal residual disease in patients with chronic myeloid leukemia.

Key words: chronic myeloid leukemia, Philadelphia chromosome, karyotyping, cytogenetic analysis.

Úvod

Chronic myeloid leukemia (CML) is one of the commonest hematological malignancies seen in clinical practice. It was the first recognized form of cancer to have a strong association with a recurrent chromosomal abnormality, the t(9,22) translocation, which generates the so - called Philadelphia (Ph) chromosome. (Saglio and Cilloni, 2004) Philadelphia chromosome is a characteristic chromosomal marker that is associated with chronic myelogenous leukemia. 95% of patients with CML show this abnormality, a remaining 2-3% have a very similar abnormality. The Ph chromosome is also found in acute lymphoblastic leukemia (ALL, 25-30% in adult and 2-10% in pediatric cases) and occasionally in acute myelogenous leukemia (AML). (Kurzrock et al., 2003) Cytogenetically, Ph chromosome is the result of the reciprocal translocation between chromosome 9 and 22 with 9q34 and 22q11 breakpoints. On molecular level, two hybrid genes are formed by this translocation

BCR/ABL, which is in the vast majority of the cases localized on the Ph chromosome. It is generally accepted that inception of BCR/ABL hybrid gene and its product plays one of the main role in pathogenesis of CML. (Michalová et al., 2002)

The disease has a chronic phase (CP-CML) that lasted for an average of 4 years before transforming into an advanced phase (AP-CML) that degenerates into acute leukemia (mostly myeloid and approximately 20% lymphoid subtype). (Tefferi et al., 2005) It is the result of abnormal and excess cell proliferation due to deregulated bcr-abl tyrosinase kinase activity as a result of Philadelphia chromosome. (Singhal et al., 2004)

Standard or conventional cytogenetics involves light microscopic examination of chromosomes to identify either numerical or structural abnormalities. Cytogenetic characteristics of CML is the presence of the Philadelphia chromosome. Philadelphia chromosome is designated Ph (or Ph1) chromoso-

me and the translocation is termed $t(9,22)(q34,q11)$. The Ph chromosome is derived from a normal 22 chromosome that has lost part of its long arm as a result of a balanced reciprocal translocation of DNA involving one of the 22 and one of the 9 chromosomes. Thus the Ph chromosome ($22q^-$) appears somewhat shorter than its normal counterpart and the $9q^+$ somewhat longer than the normal 9. Figure 1 Standard cytogenetic studies of the bone marrow disclose the Philadelphia chromosome, $t(9,22)(q34,q11)$ in approximately 95% of patients at diagnosis of CML. (Tefferi et al., 2005) In remaining 5% the Philadelphia chromosome might be either masked (submicroscopic bcr/abl fusion) or part of a complex variant chromosomal translocation involvement of other chromosome breakpoints in addition to $9q34$ and $22q11$. These latter „Philadelphia chromosome - negative“ and Philadelphia chromosome - positive cases are readily identified by either FISH or RT-PCR, thus giving the molecular methods superior sensitivity. (Morel et al., 2003)

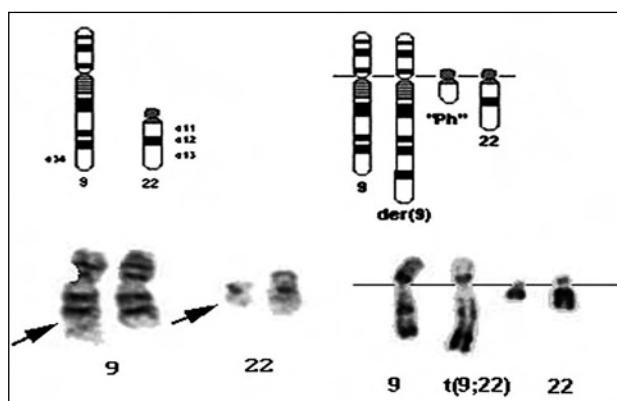


Figure 1: $t(9,22)(q34,q11)$ diagram and breakpoints, G-banding(left), R-banding(right).

In most instances, the $t(9,22)$, or a variant thereof, is the sole chromosomal anomaly during the chronic phase (CP) of the disease. (Johansson et al., 2003) The absence of Philadelphia chromosome does not exclude the possibility of CML and if the clinical scenario dictates, a more sensitive genetic test (e.g. FISH or PCR) should be performed. Additional chromosomal abnormalities of clonal evolution precede the development of the blastic or acute phase in 70% to 80% of CML cases. (Oudat et al., 2001) Most patients with CML will develop additional cytogenetic abnormalities (extra Philadelphia chromosome, trisomy 8, isochromosome 17q, trisomy 19) during blast transformation. Such clonal evolution is more frequent in myeloid compared to lymphoid blast crisis and may be associated with inferior prognosis. Furthermore the specific cytogenetic profile at the time of blast transformation may help distinguish lymphoid (chromosome 7 abnormalities) from myeloid (trisomy 8, isochromosome 17q, trisomy 19) subtype. (Tefferi et al., 2005) These secondary changes usually precede the hematologic and clinical manifestations of more malignant disease by several months and thus may serve as valuable prognostic indicator.

Material and methods

The results were obtained after a period of 10 years (1995-2004) in the Prešov region (Slovakia) in patients with suspected diagnosis of CML by conventional cyto-

genetic analysis of bone marrow cells. Bone marrow cells were cultivated 24 h in RPMI medium with 10% fetal calf serum without stimulation. In some cases, lymphocytes of peripheral blood were cultivated for 72 h and chromosomal preparations were examined, also. Mitoses were harvested after hypotonic treatment with 0,075 M KCl, and slides were prepared using conventional techniques. At least 15 G-banded cells were examined on each sample, if available. Cytogenetic examination in some patients was performed repeatedly. Cytogenetic analyses were performed on Wright's G-banded chromosomes according to ISCN nomenclature. (ISCN, 1995).

Results

The aim of our study was to confirm the presence of Philadelphia chromosome and determine their frequency in patients with CML. The number of cytogenetic examinations of bone marrow cells performed in Department of clinical genetics in the Prešov region (Slovakia) in 1995-2004 are presented in Table 1. From the overall number of 347 cytogenetic examinations, 72 samples was with suspected diagnosis CML. Philadelphia (Ph) chromosome in bone marrow cells of patients with suspected diagnosis CML in the Prešov region in 1995-2004 was detected in 68/72 (94,4%) of cases. In one patient a complex translocation involving chromosomes 8, 9 and 22(karyotype 46, XY, $t(8,9,22)(q13,q34,q11)$ was identified. One patient has showed extra numerical and structural chromosomal aberrations. Mosaic karyotype of the Ph chromosome was found in 5,9% of cases. In analyzed complete the age of patients varied from 19-74 years old (median age 46,4 years).

Cytogenetic studies were helpful in diagnosis of the disease. Karyotyping provided additional information for the differential diagnosis. Our results suggest that standard cytogenetic studies have significance at the time of CML diagnosis. On basis of these observations, it is reasonable to perform bone marrow cytogenetics at the time of diagnosis in patients with clinical diagnosis CML.

Table 1 : Chromosomal analysis of bone marrow cells of patients with CML in the Prešov region (Slovakia)

Year	The overall number of cytogenetic examinations	The number of cytogenetic examinations with susp. dg.CML	Normal karyotype	Pathological karyotype
1995	9	2	0	2
1996	30	11	1	10
1997	43	14	1	13
1998	48	8	1	7
1999	53	3	0	3
2000	47	10	1	9
2001	28	6	0	6
2002	30	9	0	9
2003	31	3	0	3
2004	28	6	0	6
All	347	72	4	68

Discussion

Chronic myeloid leukemia is a clonal stem cell disease caused by an acquired somatic mutation that fuses, through chromosomal translocation, the abl and bcr genes on chro-

mosome 9 and 22, respectively.(Tefferi et al., 2005) The Philadelphia (Ph) chromosome, resulting from the balanced translocation, t(9,22)(q34,q11.2) is the diagnostic hallmark of chronic myeloid leukaemia.(Wan et al., 2003) CML is the first disease that was associated with a consistent cytogenetic abnormality, the Philadelphia chromosome which is a shortened chromosome 22 and represents a reciprocal translocation between chromosomes 9 and 22, t(9,22)(q34,q11).(Tefferi et al., 2005) The t(9,22) fuse the c-ABL gene on chromosome 9 with the BCR gene on chromosome 22, resulting in the production of chimeric oncoproteins.(Giugliano et al., 2003)

Presentation may be at any age, but the peak incidence is at age 40-60 years, with a slight male predominance. In analyzed complete of patients with clinical diagnosis CML in Prešov region (1995-2004) the age of patients varied from 19-74 years old (median age 46,4 years) that confirm this affirmation. Philadelphia chromosome was detected in 27 men and 41 women. In our survey a male predominance was not confirmed. Other authors found, that the median age of patients with Ph+ CML is 67 years age, it can occasionally occur in children (2-3% of all childhood leukaemia).(Faderl et al., 1999) Goldman et al. also postulated that this leukemia is very rare in children.(Goldman, 1997)

Most cases of chronic myeloid leukaemia occur sporadically. The only known predisposing factor is irradiation.(Goldman, 1997)

The Ph1 chromosome in the bone marrow cells of patients with suspected diagnosis of CML in the Prešov region in 1995-2004 was detected in 68/72 (94,4%) of cases. In one patient a complex translocation involving chromosomes 8, 9 and 22 (karyotype 46, XY,t(8,9,22) (q13,q34,q11) was identified. One patient has showed extra numerical and structural chromosomal aberrations. Mosaic karyotype of the Ph chromosome was found in 5,9% of cases. Our findings are similar to the data from literature concerning standard cytogenetic analysis in CML. Werner et al. detected the Ph1 chromosome in 120/128 (93%) cases with histopathologic diagnosis of chronic myeloid leukemia (CML).(Werner et al., 1995)

A prognostic value of cytogenetic analysis was demonstrated in a number of studies.The diagnosis of chronic myeloid leukemia in chronic phase can be made from study of the peripheral blood film, but the marrow is usually examined for confirmation. Detection of Ph chromosome, BCR/ABL rearrangements and expression of its aberrant transcript in now utilized as the definitive diagnosis of CML.

The complete absence of Philadelphia chromosome actually indicates a poor prognosis.(Kurzrock et al., 2003) Significant associations have been reported between cytogenetic responses of Ph-positive CML and remission duration or survival.(Oudat et al., 2000) Basal karyotype information is important in interpreting subsequent clonal evolution, emergence of new cytogenetically abnormal Philadelphia chromosome-negative clones, and cytogenetic monitoring of treatment effect.(Tefferi et al., 2005) During the transformation the additional chromosomal abnormalities to the Ph chromosome could be seen in some patients and are consider as unfavorable prognostic sign.(Michalová et al., 2002)

Rapid developments have occurred both in laboratory medicine and in therapeutic interventions for the management of patients with chronic myelogenous leukemia. With a wide array of laboratory tests available, selecting the appropriate test for a specific diagnostic or therapeutic setting has become increasingly difficult. A several commonly used laboratory assays, including cytogenetics, molecular cytogenetics (FISH), and polymerase chain reaction (PCR) have its advantages and disadvantages. Minimal residual disease (MRD) in leukaemia might be detected and variably quantified by various laboratory techniques. In general, the sensitivity of MRD testing is influenced by the type of assay used, sample source and size, and prevalence of cancer cells in the test sample.(Butturini et al., 2003) Testing for MRD in CML has been shown to predict relapse.(Hughes et al., 2003)

Tefferi et al. do not recommend replacing bone marrow cytogenetics with FISH-based methods in assessing treatment effect in CML. FISH plays a complementary role in providing information on patients in whom cytogenetic studies are inadequate because of poor metaphase yield.(Tefferi et al., 2005)

New molecular cytogenetic techniques are increasingly applied as a routine investigative tool in haematological malignancies, both at diagnosis and subsequent monitoring.(Wan et al., 2003) Su et al. found that combined use of CGH, chromosome painting, and classic cytogenetic analysis allows better evaluation of the genomic aberration involved in CML blastic transformation, and offers new directions for its further molecular investigations.(Su et al., 1999) Vin Sheth et al. observed that advanced molecular techniques like FISH and PCR cannot replace the conventional cytogenetic study but are useful as supportive and confirmative diagnostic tools.(Vin Sheth et al., 2002)

In conclusion, new molecular techniques improved specificity in minimal residual disease detection and allow the identification of variant or atypical patterns, in clinical practice results should not be taken in isolation. They should be interpreted in the light of information gathered through conventional cytogenetics, FISH and molecular genetic studies.(Wan et al., 2003)

Conclusion

Chronic myeloid leukemia represents a unique model to understand the molecular mechanisms underlying the onset and progression of a leukemic process. Philadelphia chromosome is a specific cytogenetic marker, which detection is necessary for differential diagnosis and clinical management of patients with clinical diagnosis CML. It is important, that Ph chromosome occurs in preleukaemic phase and have important diagnostic and prognostic significance. Bone marrow karyotyping is useful for specific identification of cytogenetic profile. Standard cytogenetics for CML is indicated at the time of diagnosis and hematologic relaps, and is reasonable to consider during follow-up bone marrow examination for any indication. Conventional cytogenetic analysis remain the standard method for purposes of diagnosis, monitoring of the therapeutic response and minimal residual disease in patients with chronic myeloid leukemia.

References

- Butturini A, Klein J, Gale RP. Modeling minimal residual disease (MRD) testing. *Leuk. Res* 2003; 27:293-300.
- Faderl S. et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. Med* 1999; Jul, 15, 341(3):164-172.
- Giugliano E, Scaravaglio P, Rege-Cambrin G, Fimognari M, Mancini M et al. Deletion of derivative chromosome 9 in the Ph-positive acute myeloid leukemias. 4th European Cytogenetics Conference, Bologna, Italy 2003; Sept 6-9.
- Goldman J. ABC of clinical haematology. Chronic myeloid leukaemia. *BMJ* 1997; 1 March, 314-65.
- Hughes TP, Kaeda J, Brandford S. et al. International randomised Study of Interferon versus STI571 (IRIS) study group. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003; 349:1423-1432.
- ISCN : An International System for Human Cytogenetics Nomenclature (Mitelman, F., eds, Karger, S.) 1995; Basel, Switzerland.
- Johansson B, Fioretto T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia. *Chronic myeloproliferative disorder* 2003; Basel, Karger, 44-46.
- Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann. Intern. Med* 2003; 138:819 - 830.
- Michalová K, Zemanová Z, Březinová J, Moravcová J, Oltová A et al. Location of the BCR/ABL fusion genes on both chromosomes 9q34 in Ph negative chronic myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 2002; Vol. 43 (8), 1695-1700.
- Morel F, Herry A, Le Bris MJ. et al. Contribution of fluorescence in situ hybridization analyses to the characterization of masked and complex Philadelphia chromosome translocations in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 147:115-120.
- Oudat R, Khan Z, Glassman A. A unique, complex variant Philadelphia chromosome translocation in patient with atypical chronic myelogenous leukemia. *Archives of pathology and laboratory medicine* 2000; Vol.125, No.3, 437-43.
- Saglio G, Cilloni D. Abl: the prototype of oncogenic fusion proteins. *Cell Mol Life Sci* 2004; Dec, 61(23):2897-2911.
- Singhal N, Bapsy PP, Babu KG, George J. Chronic myeloid leukemia. *J. Assoc. Physicians* 2004; India, May, 52:410-416.
- Su XY, Wong N, Cao Q, Yu LZ, Niu C et al. Chromosomal aberrations during progression of chronic myeloid leukemia identified by cytogenetic and molecular cytogenetic tools: implication of 1q12-21. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; Jan 1, 108(1): 6-12.
- Tefferi A, Dewald GW, Litzow ML, Cortes J. et al. Chronic myeloid leukemia : Current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. Rochester 2005; Mar, Vol. 80, Iss. 3, 390-403.
- Vin Sheth FJ, Sheth JJ, Patel AI, Shah AD, Verhest A. Usefulness of cytogenetics in leukemias. *Indian J. Cancer* 2002; Oct-Dec, 39(4):139-142.
- Wan T, Ma SK, Au WY and Chan LC. Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukaemia : interpretation of atypical D- FISH pattern. *Journal of clinical pathology* 2003; 56, 471-474.
- Wang YL, Bagg A, Pear W, Nowell PC, Hess JL. Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes chromosomes Cancer* 2001; Oct, 32(2): 97-11.
- Werner M, Nolte M, Kaloutsi V, Buhr T, Kausche F. Karyotype findings and molecular analysis of the bcr gene rearrangement supplementing the histologic classification of chronic myeloproliferative disorders. *Laboratory investigation, a Journal of technical methods and pathology* 1995; Apr. Vol. 72(4), 405-410.

Korespondenční adresa:

MUDr. Broňova I.

Humanitní fakulta University Prešov

ul. 17. novembra, 081 16 Presov SR

e-mail:boronova@unipo.sk

Došlo / Submitted: 19. 1. 2007

Přijato / Accepted: 20. 6. 2007

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicinských časopisů
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

ZPRÁVA Z 1. SVĚTOVÉHO KONGRESU INTERNATIONAL ACADEMY OF ORAL ONCOLOGY

REPORT FROM THE 1ST WORLD CONGRESS OF THE INTERNATIONAL ACADEMY OF ORAL ONCOLOGY

NOVÁKOVÁ V.

STOMATOLOGICKÁ KLINIKA LF UK A FN
HRADEC KRÁLOVÉ

Ve dnech 17. – 20. května 2007 proběhl v amsterdamském konferenčním centru RAI 1. světový kongres International Academy of Oral Oncology (IAOO). Společnost vznikla v roce 2005 na Krétě. Skupina předních světových odborníků v problematice nádorových onemocnění v oblasti hlavy a krku, angažujících se v mezinárodní organizaci International Congress on Oral Cancer (ICOOC), cítila silnou potřebu vytvořit multidisciplinární fórum, na kterém by se setkávali jak kliničtí, tak výzkumní pracovníci, maxilofaciální a orální chirurgové, plastičtí a rekonstrukční chirurgové, zubní lékaři, onkologové, radioterapeuti, orální patologové, odborníci z oblasti orální medicíny i další zdravotnický personál (zdravotní sestry, rehabilitační pracovníci). Zakládajícími členy, kteří také tvoří představenstvo akademie, jsou C. Scully, A. Rapidis, J. P. Shah, J. Langdon a J.-L. Lefebvre. Snahy o spojení s ICOOC v jednu organizaci na kongresu ICOOC v italském Gradu v roce 2006 sice generální tajemník ICOOC A. Varma zamítl, mladá odborná společnost však roste velmi rychle a jejího prvního kongresu se zúčastnilo přes 750 účastníků z celého světa.

Program probíhal ve čtyřech paralelních sekcích (panelové diskuse a debaty, symposia odborných společností zabývajících se problematikou malignit v oblasti hlavy a krku, dvě sekce pro krátká ústní sdělení), samozřejmě byla i posterová sekce. Témata zahrnovala genetiku, epidemiologii, diagnostiku, staging, terapii a prognózu zhoubných onemocnění v oblasti hlavy a krku včetně dutiny ústní, rehabilitaci a kvalitu života pacientů s těmito onemocněními. Mnoho času a prostoru bylo věnováno rekonstrukční chirurgii, ve které je asi největším „hitem“ posledních let rekonstrukce defektů v dutině ústní pomocí volných laloků z předloktí, které se v dutině ústní po granulační fázi dokážou „remukozalizovat“. Umožňují tedy dosáhnout výborných výsledků i po velmi rozsáhlých operacích. Vcelku však bylo seznáno, že i přes velké pokroky v diagnostice i terapeutických metodách v posledních desetiletích se nepodařilo nijak výrazně zvýšit procento přežívajících pacientů. Jediné pokroky, kterých obor dosáhl, jsou právě v možnostech rekonstrukce a tím snad i ve zvýšení kvality života těchto onkologických pacientů. Možnosti v rehabilitaci žvýkacích a polykacích funkcí, řeči a estetického výsledku jsou ohromující, jiné funkce, např. funkci slinných žláz a čítí v ope- rované oblasti však stále obnovit nedokážeme.

Zajímavé byly také prezentace z oblasti výzkumu molekulárně-genetické terapie nádorových onemocnění v oblasti hlavy a krku. Možné léčebné přípravky jsou však zatím jen v časných stádiích klinického výzkumu. Zařazení těchto léků do běžné praxe nelze ještě v nejbližších letech očekávat.

Velmi zajímavá a vzrušující byla polemika na věčné téma, jaký terapeutický postup zvolit u tzv. klinicky negativního krku (tj. maligních onemocnění v oblasti hlavy a krku bez klinického postižení lymfatického systému a bez metastáz, dle TNM klasifikace ve stadiu T+ cN0 M0) a užití techniky biopsie sentinelové mizní uzliny (BSMU) v těchto případech. Obhájcem této techniky byl S. Stoeckli z Curychu, na jehož pracovišti je BSMU standardem péče. Skupinu oponentů v debatě vedl A. Shaha z Memorial Sloan-Kettering Cancer Center v New Yorku. Za klasické indikace BSMU považuje Stoeckli staging ipsilaterálních krčních uzlin u jednostranného nádoru ve stadiu T+ cN0 M0 a staging bilaterálních krčních uzlin u nádorů ve střední čáře ve stadiu T+ cN0 M0. Přidal však i staging kontralaterálních krčních uzlin u nádorů s ipsilaterálně postiženými krčními uzlinami a dosud neužívanou indikaci pro mapování lymfatické drenáže lokálních recidiv, těžko předvídatelné po předchozích chirurgických, chemo- nebo radioterapeutických zákrocích. Zastánci techniky BSMU, kteří mají dostatek technických zkušeností, se shodli, že BSMU je málo vhodná pro použití u nádorového postižení spodiny dutiny ústní, kde se sentinelovou uzlinu vzhledem k blízkosti a síle radioaktivity primárního tumoru podaří identifikovat jen o něco více než v 80 % případů (u ostatních oblastí dutiny ústní jsou schopni dosáhnout více než 95% úspěšnosti). BSMU zde tedy tito autoři nedoporučují, aspoň ne jako jediný stagingový nástroj, a shodují se spíše na bilaterální elektivní krční disekci. Techniku také odmítají pro vyšší procento nesprávných výsledků u nádorů ve stadiu T3/T4 a nedoporučují ji v dutině ústní aplikovat ani v oblasti jizvy po primárním tumoru, byť by byla excize provedena v nedávné minulosti. V tom se velmi liší od BSMU u kožních malignit, kde se lymfotropní látka aplikuje ve většině případů (zejm. u maligního melanomu) do okolí jizvy již excidovaného útvaru.

Oponenti i obecnost však byli pro jiný postup terapie v případě stadia cN0 – pro tumory ve stadiu T1 by většina přítomných zvolila ostražitě sledování pacienta a pro tumory ve stadiu T2 elektivní krční disekci. Na čem se oba tábory shodly bylo konstatování, že u každého primárního dlaždicobuněčného karcinomu dutiny ústní překračujícího hloubku 4 mm a tumoru orofaryngu překračujícího hloubku 2 mm je nutné krční mizní uzliny vyšetřit, ať už pomocí BSMU nebo elektivní krční disekce.

Další kontroverzní otázkou zůstává, zda je efektivní užívat BSMU i u dlaždicobuněčných karcinomů rtu, kterážto lokalizace tvoří 40 % případů malignit v oblasti hlavy a krku a pravěpodobnost jejich metastazování je mnohem nižší než u karcinomů v dutině ústní a v orofaryngu.

Své zkušenosti s BSMU v oblasti hlavy a krku prezentovali formou krátkých ústních sdělení i další přední odborníci z oboru.

Abstrakta z konference byla publikována v supplementu květnového čísla Oral Oncology, který je oficiálním periodikem IAOO. Více informací o IAOO je možné získat na webových stránkách <http://www.eastman.ucl.ac.uk/iaoo/> a <http://www.iaoo2007.com>.

Další kongres IAOO je plánován v roce 2009 v kanadském Torontu.

ZPRÁVA Z KONFERENCE ASCO 2007 CHICAGO, IL, 3.-6. ČERVNA 2007

PETRÁKOVÁ K.

Letos se konala už 43. konference ASCO, kde se rok od roku účastní více návštěvníků. V důsledku velkého počtu účastníků roste i náročnost na organizaci a prostory. To je hlavním důvodem, proč se několik dalších ročníků konference bude konat opět v Chicagu, které nárokům vyhovuje. S dobou se mění i stěžejní témata konference. Hlavními očekávanými tématy ještě před pár lety byly výsledky velkých klinických studií buď s novými cytostatiky nebo s novou indikací cytostatik. Letošní konference se nesla hlavně v duchu biologické léčby a prediktivních a prognostických faktorů. Dále bych zabývala novinkami z konference podle jednotlivých témat:

Karcinom prsu.

Výsledky velkých randomizovaných studií, zabývajících se otázkou, **jaká je optimální adjuvantní hormonální léčba** postmenopauzálních pacientek s pozitivními steroidními receptory, byly prezentovány na posledních konferencích ASCO. Všechny zatím prokázaly lepší léčebné výsledky inhibitorů aromatázy (IA) proti tamoxifenu (TX) samotnému. Otázkou zůstává ale optimální použití IA. Profesor Cuzick (abstr. 541) s kolegy vytvořili matematický model na základě dosavadních výsledků klinických studií s použitím IA (ATAC, BIG 1-98, IES), který by mohl predikovat přínos léčby IA při době sledování 10 a 20 let. Podle modelu je iniciální léčba IA (up-front) dominantní strategie proti léčbě samotným TX (riziko rekurence v 10 a 20 letech je 17,9% a 35,4%), iniciální léčba IA je jenom mírně lepší než sekvenční léčba IA (riziko rekurence v 10 a 20 letech je 18% a 35,5%) a 5-letá léčba TX je spojená s největším rizikem rekurence (v 10 letech 22,9% a v 20 letech 39,3%). V podobném duchu vyzněla i práce Ciccarese (abstr. 539), který provedl metaanalýzu 10 randomizovaných adjuvantních studií srovnávajících IA a TX. Podle výsledků metaanalýzy má největší přínos sekvenční léčba IA (absolutní benefit 3,5%), potom prodloužená adjuvance (absolutní benefit 2,5%) a nakonec iniciální léčba IA (absolutní benefit 2,3%). Celkové přežívání bylo signifikantně lepší u celé populace pacientek léčených IA ($p=0,037$) a u pacientek léčených IA v sekvenčním podání ($p=0,003$). Navíc metaanalýza potvrdila, že parametr přežívání bez známek nemoci (DFS - disease free survival) je silným prediktorem celkového přežívání pacientek (OS - overall survival).

Přesto však **TX nadále zůstává standardním léčebným postupem** pro určitou skupinu pacientek, jak potvrdil Osbourne ve své edukační lekci o hormonální léčbě.

Jedním z možných prediktivních faktorů **rezistence na TX** se podle posledních prací jeví cyclin D1, jak prokázala i práce Filipitise (abstr. 521). Na souboru pacientek ze studií ABSCG 5 a 6 potvrdil, že pacientky, které měly nádory s prokázanou pozitivitou cyclinu D1, který byl vyšetřen imunohistochemicky (IHC), měly signifikantně kratší OS ($p=0,003$) a dobu do relapsu (RFS-relaps free survival) ($p=0,0001$). V úvahu je však nutné vzít i změnu imunofenotypu nádoru v době metastazování.

Zajímavou práci přednesl Broom (abstr.1021), ve které

srovnal 62 vzorků primárních nádorů karcinomu prsu a jejich metastáz. Až v 17,7% případů došlo ke změně stavu receptoru ER v době metastazování a až v 37,3% případů ke změně stavu receptoru PR, přičemž nedocházelo k podstatnějším změnám receptoru HER2.

Přínos **adjuvantní léčby Herceptinem** u pacientek s prokázanou overexpresí HER2 byl doložen výsledky několika klinických studií a je nesporný. Na konferenci byly letos prezentovány výsledky nové kombinované analýzy studií NSABP B-31 a Intergroup N9831 u 3711 pacientek s mediánem sledování 2,9 roku. Hlášeno bylo celkem 619 událostí (rekurence, duplicitní primární karcinom nebo úmrtí bez rekurence) 397 bylo v kontrolní větvi a 222 ve větvi s trastuzumabem. Čtyřleté přežívání pacientek bez známek nemoci (DFS - disease free survival) bylo 85,9% (95% interval bezpečnosti [CI], 84,0-87,8%) a 92,6% (95% CI; 91,2-94,2%) u pacientek léčených trastuzumabem a čtyřleté celkové přežívání (OS - overall survival) bylo 73,1 % (95% CI; 70,6-75,8%) a 89,4% (95% CI; 87,6-91,2%) u pacientek bez trastuzumabu. Hazard ratio (HR) pro DFS byl 0,48 ($p< 0,00001$; 95% CI, 0,41-0,57) a pro OS 0,65 ($p=0,0007$; 95% CI, 0,51-0,84). Nová analýza tedy prokázala přetrvávající **přínos léčby trastuzumabem v adjuvanci** i s delší dobou sledování, přičemž nebyla nalezena podskupina pacientek, která by měla větší prospěch z léčby. Přínos léčby byl přitom nezávislý na dávkovacím schématu paclitaxelu, přičemž trastuzumab snížil riziko lokální i vzdálené rekurence. Léčba trastuzumabem je vesměs velice dobře tolerována a nejvýznamnějším nežádoucím účinkem zůstává kardiotoxicita.

Proto byly očekávané výsledky nové analýzy **kardiotoxicity trastuzumabu** ve studii NSABP B-31. Podle posledních publikovaných výsledků, byla v mediánu sledování 3 let kumulativní incidence kardiotoxicity u pacientek v kontrolní skupině 0,8% a ve skupině s trastuzumabem 4,1%. Podle výsledků prezentovaných profesorkou kardiologie Rastogi (abstr. LBA513) na ASCO 2007 se kardiotoxicita v mediánu sledování 5 let výrazně nezměnila (0,9% vs 3,9%). Za rizikový faktor lze na základě analýzy považovat věk pacientek nad 49 let, hypertenzi vyžadující léčbu a snížení LVEF po léčbě s antracykliny pod 54%.

V poslední době se opakovaně řešila otázka, kolik kopií chromozomu 17, na kterém je lokalizován gen pro HER2, lze označit za overexpresi HER2.

Na základě výsledku studie CALGB 9840, prezentované letos Kaufmanem (abstr.1009) byl prokázán přínos léčby trastuzumabem u pacientek s metastatickým karcinomem prsu i při pouhé polyzomii chromozomu 17 ($p=0,045$). A co víc, podle analýzy ve studii NSABP B-31 prezentované Paikem (abstr.511) byl prokázán přínos léčby dokonce i pro pacientek s negativitou HER 2 (pro IHC negativní $p=0,0017$ a pro FISH negativní $p=0,026$).

Jednou z otázek, kterou sebou léčba trastuzumabem přinesla, je incidence **mozkových metastáz**. Podle retrospektivní studie z MD Andersonu na souboru 750 pacientek, kterou prezentoval Pinder (abstr.1018), mají pacientky s overexpresí HER2 léčené trastuzumabem 2,8 krát vyšší riziko vzniku mozkových metastáz proti pacientkám, které trastuzumabem léčeny nebyly. Paradoxně, přežívání pacientek po objevení se mozkových metastáz bylo signifikantně lepší u skupiny léčené trastuzumabem. (33,5 měsíce vs 29,4 měsíce). Zajímavé bylo i zjištění Sawriena, kte-

rý na soboru pacientek prokázal, že pacientky s mozkovými metastázami a současně overexpresí HER2 žijí déle než pacientky s mozkovými metastázami bez overexprese HER2 (65 týdnů vs 33 týdnů; $p=0,025$).

Slibným preparátem v biologické léčbě karcinomu prsu u pacientek s overexpresí HER2 se jeví být lapatinib, orální inhibitor tyrosin kinázy receptoru HER2. Ve studii II. fáze EGF105084 prezentované Li Nu (abstr. 1012) prokázal až u 28% pacientek signifikantní zmenšení objemu mozkových metastáz a prodloužení doby do progresu (PFS-progression free survival).

Gastrointestinální trakt.

Ani zařazení nových cytostatik nezlepšilo léčebné výsledky u karcinomu pancreatu. Další snahou, jak zlepšit prognózu tohoto onemocnění, je přidání biologické léčby k standardní cytostatické. Kindler (abstr.4508) prezentoval výsledky klinické studie III.fáze GALGB 80303, které cílem bylo zjistit přínos přidání bevacizumabu k gemcitabinu proti gemcitabinu samotnému. Nebyl nalezen rozdíl v léčebných větvích ani v parametru léčebné odpovědi (RR-response rate) ani v parametru DFS nebo OS. Výsledky kontrastují s nedávno prezentovanými výsledky studie II. fáze. Rozdíl mezi studii byl hlavně ve výběru pacientů. Ve studii III. fáze byli zařazeni pacienti s horší prognózou. Ve stejném duchu vyzněly i závěry studie SWOG S025 prezentované Philipem (abstr. LBA4509). Léčebné výsledky kombinací cetuximab a gemcitabin byly stejné jako gemcitabin samotný. Léčebné větve se nelišily ani v parametru OS. Jediným přínosem bylo prodloužení doby do selhání léčby (TTF- time to treatment failure).

Hepatocelulární karcinom je další relativně chemorezistentní onemocnění. Podle výsledků klinické studie SHARP prezentované Llovetem (abstr. LBA1) by mohla jeho prognózu výrazně zlepšit **biologická léčba sorafenibem**. Podle studie sorafenib zlepšuje OS o 44% a prodloužuje TTP o 73%. Na základě výsledků této studie byl sorafenib na konferenci doporučen jako standardní léčba hepatocelulárního karcinomu.

Neoadjuvantní chemoterapie u primárně operabilního karcinomu žaludku a gastroesophageální junkce nebyl dosud standardním postupem. Studie FFOCD 9703 prezentovaná Puntem (abstr.4510) je další studií, která potvrdila přínos neoadjuvantní chemoterapie v této indikaci. Pacienti léčení neoadjuvantní chemoterapií kombinací cisplatina a fluorouracil měli signifikantně vyšší podíl resekce R0, DFS (34% vs 21%; $p=0,0033$) a OS (38% vs 24%; $p=0,021$). Onkologové často řeší ve své denní praxi otázku, zda pacienta s **metastatickým kolorektálním karcinomem** léčit kombinovanou chemoterapií nebo sekvenční monoterapií. Na tuto otázku dává částečně odpověď nizozemská klinická studie CAIRO prezentovaná Puntem (abstr. 4012). Pacienti byli léčení buď kombinací capecitabin a irinotecan v první linii a capecitabin a oxaliplatin v druhé linii nebo capecitabinem v první linii, irinotecanem v druhé linii a capecitabinem s oxaliplatinou v třetí linii. Nebyl rozdíl v OS mezi jednotlivými skupinami pacientů.

Bevacizumab se stal součástí standardní léčby první linie kolorektálního karcinomu. Potvrzují to i výsledky klinické studie III.fáze N016966 (XELOX-1) prezentované Saltzem (abstr.4028). Přidání bevacizumabu do kombinace s režimem XELOX nebo FOLFOX prodloužilo dobu do progresu

se onemocnění (PFS- progression free survival) (9,4 vs 8,0 měsíce; $p=0,00223$). V parametru OS byl pouze trend ke zlepšení (19,9 vs 21,3 měsíce; $p=0,0769$). Otázkou zůstává jak dlouho léčit pacienty bevacizumabem. V observační studii BRIT (Grothey, abstr.4036) žili pacienti, kteří byli léčení kombinací s bevacizumabem i po selhání první linie léčby v kombinaci s bevacizumabem déle než pacienti léčení režimem bez bevacizumabu (19,9 vs 31,8 měsíce). De Gramont prezentoval výsledky studie MOSAIC v mediánu sledování 6 let. (abstr.4007) S prodlužující dobou sledování se přínos oxaliplatiny v adjuvantním podání nemění a zlepšuje DFS celé populace pacientů (67,4 vs 73,3%) a OS u pacientů v III. klinickém stadiu (HR 0,78; $p=0,05$). Nebylo prokázáno zlepšení OS pro skupinu pacientů v II. klinickém stadiu.

V poslední době je opakovaně diskutovaný **prognostický význam cirkulujících nádorových buněk** u pacientů s různými malignitami, hlavně karcinomem prsu a kolorektálním karcinomem. Meropol (abstr.4010) prezentoval výsledky mezinárodní klinické studie, ve které na souboru 400 pacientů prokázal, že počet cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi, odebraných před léčbou je silným prediktorem PFS i OS. Při zavádění pořadí nových biologických léků do léčby solidních nádorů je snahou určit aspoň prediktivní faktory odpovědi na biologickou léčbu. Podle retrospektivní analýzy Finocchiar (abstr.4021) byl vyšší počet kopií EGFR genu a wild-type K-ras spojený se signifikantně lepší odpovědí na léčbu cetuximabem. Vyšší počet kopií HER2 genu predikoval časně selhání léčby cetuximabem.

Karcinom plic.

Biologická léčba proniká v současné době do léčby všech solidních nádorů. Je tomu tak i u karcinomu plic. Podle výsledků klinické studie II. fáze (Butts, abstr. 7539) přidání cetuximabu k léčbě metastatického karcinomu plic kombinovaným režimem cisplatina a gemcitabin signifikantně prodloužilo PFS (4,21 vs 5,09 měsíce) a OS (49,9 vs 37,5 týdnů). Japonská klinická studie III.fáze (NiHo, abstr. LBA7509) srovnává léčebný efekt gefitinibu proti docetaxelu v monoterapii u pacientů s nemalobuněčným metastatickým karcinomem plic, kteří byli léčení jednou nebo dvěma chemoterapeutickými režimy na bázi cisplatiny. Nebyl prokázán rozdíl v OS mezi léčebnými větvemi. Lepší odpověď na léčbu gefitinibem měli: ženy, pacienti PS2, nekuřáci, pacienti léčení za méně než 6 měsíců od počátku diagnózy a dobrá odpověď na předchozí chemoterapii.

Mozek je jedním z nejčastějších míst metastazování malobuněčného karcinomu plic. Proto byla zásadní výsledky klinické studie EORTC 08993-22993 prezentované Slotmanem (abstr. 4). Podle jejich výsledků **profylaktické ozáření krania** u extenzivního onemocnění signifikantně zlepšilo OS (HR 0,68; $p=0,003$) a TTF (HR 0,76; $p=0,02$).

Urogenitální trakt

Sorafenib je v současné době schválen k léčbě metastatického renálního karcinomu po selhání imunoterapie. Na ASCO konferenci byly Bukowskim (abstr. 5023) prezentovány výsledky konečné analýzy klinické studie III. fáze. Léčba sorafenibem signifikantně prodloužila přežívání pacientů proti placebu (HR 0,78; $p=0,028$). Navíc byly u pacientů měřeny plasmatické hladiny VEGF

a sVEGFR2 pomocí Elisy. Výchozí plazmatická hladina VEGF je podle výsledků studie nezávislým prognostickým faktorem a predikuje větší přínos léčby sorafenibem. Szczylik (abstr. 5025) prezentoval výsledky klinické studie II.fáze, která srovnává sorafenib v první linii pro metastatický renální karcinom proti léčbě interferonem. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v parametru PFS. Jediný přínos léčby sorafenibem byl v kontrole onemocnění.

Sunitinib je další biologickou léčbou, která se v dnešní době stala standardní léčbou metastatického renálního karcinomu po selhání imunoterapie. Podle nejnovějších výsledků známé Motzerovy klinické studie III.fáze dosahuje léčba sunitinibem v první linii až 44 % RR zatímco léčba interferonem pouze 11%. Medián PFS je 11 měsíců proti 4 měsí-

cům. Prediktivními faktory lepší odpovědi na sunitinib jsou podle studie výchozí hodnoty hemoglobinu, hladina korigovaného kalcia, celkový stav pacienta a počet lokalit metastáz.

Hlava a krk

Podle slov J.Vermorkena z Belgie je EXTREME je první klinická studie za posledních 25 let, která prokázala zlepšení přežívání pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým karcinomem hlavy a krku proti chemoterapii na bázi platiny. Studie srovnává léčbu režimem cisplatina nebo karboplatina plus fluorouracil proti stejné kombinaci s přidáním cetuximabu. Medián OS byl 10,1 měsíce pro pacienty léčené cetuximabem a 7,4 měsíce pro pacienty bez cetuximabu (HR 0,797; p=0,036)

i n f o r m a c e

Vážení kolegové,

srdečně Vás zveme na onkogynekologický seminář

Pokroky v diagnostice a léčbě karcinomu ovária

pořádaný Onkogynekologickým centrem
Gynekologicko-porodnické kliniky I. LF UK a VFN v Praze,
1. lékařskou fakultou UK
a Nadačním fondem Vita et futura

v sobotu dne 10. listopadu 2007 od 9.00 hodin
v posluchárně **Gynekologicko-porodnické kliniky, Apolinářská 18, Praha 2.**

Program:

- Epidemiologie a prognóza
- Testování na hereditární syndromy, profylaktická adnexektomie, sledování žen s mutací BRCA
- Rizikové faktory, možnosti prevence
- Zhoubné a border-line nádory v UZ obraze
- Nové biomarkery (proteomika, tumorové markery)
- Management border-line nádorů ovaria
- Základy ambulantní chemoterapie a podpůrné léčby
- Management časných stádií
- Management pokročilých stádií

As. MUDr. D. Pavlišta

MUDr. M. Zikán, PhD

Doc. MUDr. P. Freitag, CSc

As. MUDr. D. Fischerová

MUDr. J. Lacheta

Doc. MUDr. D. Cibula, CSc

MUDr. N. Jančárková

MUDr. J. Sláma

Doc. MUDr. D. Cibula, CSc

Registrace je platná po uhrazení poplatku.

Přihlášení účastníci kurzu obdrží pozvánku se složenkou (na pozvánce bude uvedeno bankovní spojení pro bezhotovostní převod). Poplatek činí 750,- Kč, na místě v hotovosti 950,- Kč. Organizátor není plátcem DPH.

Absolventi kurzu obdrží certifikát podle Stavovského předpisu č. 16 ČLK.

Vaše přihlášky prosím pošlete na adresu: Děkanát 1. LF UK - odd. doškolování lékařů, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2, e-mail: eva.svobodova@lf1.cuni.cz, nebo vzdelavani.lekaru@lf1.cuni.cz, tel. + fax: 224965675, mobil: 732146799.

Prohlášení České onkologické společnosti J. E. Purkyně ke zveřejněným údajům evropské populační studie EUROCORE-4.

The Statement of the Czech Oncology Society on the Data published in Eurocare-4 - the European Population Study.

Dne 22.8. 2007 byla česká veřejnost informována o údajích špatných léčebných výsledcích české onkologie, které byly publikovány ve studii EUROCORE-4 v zahraničním časopise Lancet Oncology. Tato studie srovnává data o pětiletém přežití onkologických pacientů diagnostikovaných v letech 1995 - 99, s následným sledováním do roku 2003, ve vybraných evropských státech (1). Navazující studie potom přináší i aktualizovaná data o přežití v letech 2000-2002 (2). Pro Českou republiku je zde u řady onkologických diagnóz skutečně publikováno relativně nízké dosahované přežití ve srovnání s nejvyspělejšími evropskými státy.

Vedení České onkologické společnosti se proti těmto výstupům zcela zásadně ohrazuje a odmítá je. Každý publikovaný výstup musíme posuzovat a vážit podle vstupních informací, ze kterých vzešel. Pro studii EUROCORE-4 byly z ČR nahlášeny zcela nerelevantní a nereprezentativní údaje, jak dále doložíme. Zahraniční autoři studie ovšem nejsou na vině, neboť pracovali s oficiálně předanými daty našeho státu a neměli důvod je zpochybňovat. Vinnu nese správce národních onkologických dat, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS ČR), resp. Ministerstvo zdravotnictví ČR, pod jehož hlavičkou musela být data oficiálně předána. Na oficiálních publikacích studie EUROCORE-4 je jako odpovědná předávající osoba uveden Mgr. J. Holub, pracovník ÚZIS ČR. Z časových údajů vyplývá, že toto proběhlo ještě za bývalého vedení ministerstva před volbami v roce 2006. Velmi smutné je, že se tak stalo opakovaně, podobné problémy totiž byly s českými

daty již při publikování studie EUROCORE-3 v roce 2003. Ani přes velmi silné protesty odborné onkologické společnosti nedošlo bohužel k nápravě.

Česká republika vede dlouhodobě (od roku 1977) Národní onkologický registr, který patří mezi největší a nejkvalitnější databáze Evropy. Nadto jde o databázi reprezentativní a úplnou, neboť jsou v ní zadána data o všech pacientech za celé sledované období. Vedení této databáze vyplývá ze zákona a je tedy povinné. Za celé období sledování registr obsahuje více než 1,4 milionu záznamů, za období týkající se studie EUROCORE-4 (1995-99) jde o více než 270 000 záznamů. Nicméně oficiální podklady pro studii EUROCORE-4 byly předány pouze ze západních Čech a to zřejmě opět nereprezentativně. Zmíněná zahraniční publikace uvádí 19 423 předaných záznamů z této oblasti, nicméně v Národním onkologickém registru máme za období 1995-99 vedeno pro Plzeňský a Karlovarský kraj 24 257 záznamů. Obdobné nesrovnalosti lze nalézt i v datech vykázaných z ČR do pokračující analýzy pro období 2000-2002. Většina států zahrnutých do EUROCORE-4 přitom poskytla úplná, tedy reprezentativní data za celou populaci a uvedla 100% pokrytí své populace. Pro Českou republiku EUROCORE-4 uvádí pouze 8% pokrytí populace. Předaná data tedy vypovídají pouze o velmi minoritní části našeho registru a státu. V žádném případě nelze tyto údaje zobecnit na celou republiku. Celorepubliková data, která máme dlouhodobě k dispozici, nebyla do studie předána. Předání dat nebylo s odbornou společností nijak konzultováno.

Odborná onkologická společnost nyní podnikne nutné kroky k nápravě situace. Čeští onkologové výsledky léčby dlouhodobě sledují a mají k dispozici údaje vypovídající o celé české populaci. Tyto relevantní hodnoty převyšují u řady onkologických diagnóz evropský průměr a obhajují tak i velké investice, které ve prospěch onkologické léčby český stát vynakládá. V příložené tabulce uvádíme hodnoty přežití pro některé onkologické diagnózy, kalkulované

Tabulka: *Určité procento nádorů je diagnostikováno ve velmi pokročilém stavu, který již neumožňuje protinádorovou terapii, případně je tato terapie znemožněna zdravotním stavem pacienta nebo i jeho vlastním odmítnutím léčby. Analýza provedená na skupině „všichni pacienti“ tak sice přináší celková populační data, o skutečném výkonu zdravotnických zařízení ale vypovídá hodnota zjištěná u pacientů, kteří prošli protinádorovou léčbou.

Vybrané diagnózy	Pětileté relativní přežití dosahované v ČR		Pětileté relativní přežití uváděné pro Evropu ve studii EUROCORE-4 (pacienti diagnostikovaní v období 1995-99)
	Pacienti s protinádorovou léčbou	Všichni pacienti *	
C50: Prs (ženy)	80,3 %	78,8 %	79,5 %
C18-C21: Tlusté střevo a konečník	57,1 %	49,5 %	53,5 %
C43: Melanom kůže	84,1 %	83,3 %	85,4 %
C34: Průdušky a plíce	13,1 %	9,9 %	10,2 %

stejnou metodou, jaká byla použita ve studii EUROCORE-4. Úplný přehled výsledků léčby pro všechny onkologické diagnózy byl v březnu 2007 publikován v časopise Klinická onkologie a v brzké době jej dáme k dispozici veřejnosti na webových stránkách onkologické společnosti (www.linkos.cz; www.svod.cz). */Poznámka redakce: podrobná analýza vzniklé situace bude publikována v příštím čísle časopisu Klinická onkologie/.*

Výsledky pětiletého relativního přežití onkologických pacientů dosahované v ČR

(data pro vybrané diagnózy za období 1995 - 2003, zahrnuté jsou validní záznamy ze všech typů zdravotnických zařízení, věkově standardizováno, odk. č. 3, tab. *).

V tomto prohlášení se snažíme především zastavit šíření dezinformací o špatné léčbě onkologických pacientů v ČR. Jde o velmi závažnou skutečnost, jak z profesionálního, tak i z lidského hlediska. V našem státě žije několik set tisíc onkologických pacientů a tito lidé, ani jejich příbuzní, nesmí být psychicky poškozováni šířením takto poplašných zpráv. Prohlašujeme tedy, že česká onkologie za posledních 15 let výrazně zlepšuje své výsledky, které jsou nyní na evropské

úrovni a v řadě diagnóz mírně překračují evropský průměr. Samozřejmě to neznamena, že neexistují problémy. Stále je vysoké procento nádorových onemocnění zachytáváno ve velmi pokročilém stavu, kde je již naděje na dlouhodobé přežití významně snížena. Tyto problémy ale odpovídají situaci v kterékoli jiné evropské zemi. Odborná onkologická společnost učiní ve spolupráci se stávajícím vedením Ministerstva zdravotnictví ČR všechna potřebná opatření, aby o tomto věrohodně informovala českou veřejnost a aby se závažná a chybná interpretace národních dat již neopakovala.

V Brně dne 24. 8. 2007

Odkazy:

1. Berrino F, De Angelis R, Sant M, et al. The EUROCORE Working group. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCORE-4 study. *Lancet Oncol.* 2007;8(9):773-783.
2. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, et al. The EUROCORE-4 Working Group. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCORE-4 data. *Lancet Oncol.* 2007;8(9):784-796.
3. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, et al. Český národní webový portál epidemiologie nádorů [online]. Masarykova univerzita, [2005], 12. 9. 2007 [cit. 2007-9-12]. Dostupný z [www http://www.svod.cz](http://www.svod.cz).

prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.
předseda České onkologické společnosti ČLS JEP

prof. MUDr. Jitka Abrahámová, DrSc.
předsedkyně Rady Národního onkologického registru ČR

doc. RNDr. Ladislav Dušek, Ph.D.
ředitel Institutu biostatistiky a analýz
Masarykovy univerzity v Brně

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

Výbor České onkologické společnosti si Vám dovoluje oznámit smutnou zprávu, po dlouhé nemoci zemřel prim. MUDr. Jan Fischer.

Primář Fischer byl dlouholetým vedoucím onkologického pracoviště Krajské nemocnice v Českých Budějovicích. Byl nejenom vynikajícím onkologem a radioterapeutem, ale také neúnavným bojovníkem a lepší postavení české onkologie a onkologů. Pod jeho vedením vzniklo v Českých Budějovicích významné onkologické a radioterapeutické pracoviště vybavené moderní technikou.

Odchodem primáře Fischera ztrácí česká onkologie jednoho z předních odborníků a ti co ho znali, dobrého přítele.

Čest jeho památce

prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.
předseda České onkologické společnosti ČLS JEP
V Brně 18. července 2007