
klinická onkologie

6/2007

ROČNÍK / VOLUME 20

15. prosince 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 SPOLEČNOSTI

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	SVOBODA MAREK, Brno
FORETOVÁ LENKA, Brno	VALÍK DALIBOR, Brno
HÁJEK ROMAN, Brno	VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
KOCÁK IVO, Brno	ŽALOUDÍK JAN, Brno

REDAKČNÍ RADA EDITORIAL BOARD

ADAM ZDENĚK, Brno	KOZA IVAN, Bratislava
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava	MAYER JIŘÍ, Brno
BARTOŠ JIŘÍ, Liberec	MELICHAR BOHUSLAV, Hr. Králové
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno	ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
CWIERTKA KAREL, Olomouc	PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
JURGA LUDOVIT, Trnava	PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava	VYZULA ROSTISLAV, Brno
KLENER PAVEL, Praha	WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
KOVAŘÍK JAN, Brno	

ČESTNÍ ČLENOVÉ REDAKČNÍ RADY EDITORS EMERITI

BILDER JOSEF, Brno	MECHL ZDENĚK, Brno
ECKARDT SANDOR, Budapešť	NĚMEC JAROSLAV, Brno
KLASTERSKÝ JAN, Brusel	PLEŠKO IVAN, Bratislava
KOUTECKÝ JOSEF, Praha	UJHÁZY VILIAM, Bratislava

Přehled

Petráková K., Nenutil R., Grell P., Svoboda M., Fabián P., Palácová M., Vyzula R.
Mechanismy rezistence na tamoxifen. 369

Původní práce

Brožková K., Knoflíčková D., Hernychová L., Bouchal P., Holčáková J., Michalová E., Vyzula R., Žaloudík J., Valík D.,
Nenutil R., Vojtěšek B.
Identifikace potenciálních biomarkerů karcinomu prsu metodou SELDI-TOF MS. 377

Fabrik I., Adam V., Křížková S., Kukačka J., Průša R., Trnková L., Kizek R.*
Určení hladiny termostabilních thiolů u pacientů se zhoubným nádorem 384

Fuchs O.
Nukleofosmin s aktivitou stimulující proliferaci nebo naopak potlačující růst nádoru 390

Sdělení

Dušek L., Pavlík T., Mužík J., Koptíková J., Gelnarová E., Abrahámová J., Žaloudík J., Vyzula R., Vorlíček J.
Populační standardy relativního přežití onkologických pacientů v ČR kalkulované z dat NOR –
Reakce na výsledky publikované v studii eurocare-4. 399

Žaloudík J.
Onkologický výzkum České republiky v souvislostech 405

Zprávy

Lukešová M.
Mezinárodní genetická konference „European human genetics conference 2007“ 408

Informace - Mezinárodní konference: radikální operativa v gynekologické onkologii 389

Onkologické společnosti 409

CONTENTS

Reviews

Petráková K., Nenutil R., Grell P., Svoboda M., Fabián P., Palácová M., Vyzula R.
Mechanisms of tamoxifen resistance 369

Original publications

Brožková K., Knoflíčková D., Hernychová L., Bouchal P., Holčáková J., Michalová E., Vyzula R., Žaloudík J., Valík D.,
Nenutil R., Vojtěšek B. Identification of potential breast carcinoma biomarkers with SELDI-TOF MS. 377

Fabrik I., Adam V., Křížková S., Kukačka J., Průša R., Trnková L., Kizek R.*
Level of heat-stable thiols in patients with a malignant tumor. 384

Fuchs O.
Nucleophosmin with proliferative or growth-suppressive activity. 390

Communication

Dušek L., Pavlík T., Mužík J., Koptíková J., Gelnarová E., Abrahámová J., Žaloudík J., Vyzula R., Vorlíček J.
Population standards for relative survival of cancer patients in the Czech Republic based on data
of the Czech National Cancer Registry– Reaction on results of EURO CARE-4 study 399

Žaloudík J.
Oncology research in the Czech Republic with regard to the specific conditions. 405

Report

Lukešová M.
International genetics conference „European Human Genetics Conference 2007“ 408

Information - International Video Workshop on radical Surgery in gynecological oncology 389

Oncological associations 409

MECHANIZMY REZISTENCE NA TAMOXIFEN MECHANISMS OF TAMOXIFEN RESISTANCE

**PETRÁKOVÁ K., NENUTIL R., GRELL P., SVOBODA M., FABIÁN P., PALÁCOVÁ M., VYZULA R.
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO**

Souhrn

Hormonální léčba je nejúčinnější systémovou léčbou karcinomu prsu pro pacientky s pozitivními steroidními receptory. Nejpoužívanější hormonální léčbou v dnešní době je nadále tamoxifen. Jeho účinnost je však často limitovaná rezistencí nádorových buněk. Poznatky o intracelulárních signálních drahách získané v posledních letech vysvětlují některé možné mechanismy vzniku rezistence. Patří k nim ztráta exprese nebo funkce estrogenového receptoru (ER) nebo progesteronového receptoru (PR), změny koregulačních proteinů ER, interference signálních drah receptorů růstových faktorů a ER, mutace nádorového supresoru p53, signální dráha PIK3 a změna farmakokinetiky tamoxifenu.

Klíčová slova: rezistence na tamoxifen; estrogenový receptor; progesteronový receptor; geny, HER2; geny, p53

Summary

Endocrine therapy is the most effective systematic treatment for patients with hormone-receptor positive breast cancer. Tamoxifen still represents the most commonly used endocrine treatment. Efficacy of tamoxifen may be often limited by the onset of resistance. Knowledge on intracellular signal transduction pathways gained in the last years may explain possible mechanisms of tamoxifen resistance. These mechanisms may include loss of expression and/or function of estrogen receptor (ER) or progesterone receptor (PR), alterations in co-regulatory proteins of ER, interferences in signal transduction pathways of growth factor receptors and ER, mutations in tumor suppressor gene p53, the signal transduction pathway PIK3 and alterations in pharmacokinetics of tamoxifen.

Key words: tamoxifen; drug resistance; estrogen receptors; progesterone receptors; Genes, HER2; Genes, p53

Úvod:

Karcinom prsu je nejčastější zhoubný nádor žen v České republice. Tvoří zhruba 1/4 všech zhoubných nádorů a postihuje 6% ženské populace. Incidence má stoupající tendenci, mortalita v posledních několika letech stagnuje. V roce 2003 bylo hlášeno celkem 5784 nových případů zhoubného nádoru prsu a celkem 2032 žen zemřelo v důsledku tohoto onemocnění. (ÚZIS nebo SVOD) Přibližně 70% karcinomů prsu exprimuje v době diagnózy estrogenové (ER) a/nebo progesteronové (PR) receptory (dál jenom: pozitivní estrogenové receptory), které jsou dnes nejdůležitějším a jediným standardně vyšetřovaným prediktivním faktorem pro hormonální léčbu. Výsledky klinických studií opakovaně potvrdily přínos adjuvantní léčby tamoxifenem proti placebo. 5-letá adjuvantní léčba tamoxifenem snižuje mortalitu o 28% a riziko kontralaterálního karcinomu prsu o 50% u žen s pozitivními estrogenovými receptory (1). Dosud je proto tamoxifen nejpoužívanější hormonální léčbou a je i součástí všech doporučovaných léčebných postupů pro adjuvantní léčbu karcinomu prsu, a to v souladu se závěry skupiny expertů NIH a konference v St. Gallen 2005 (2). Má však své omezení. Podle některých publikací pozorovalo nežádoucí účinky při léčbě tamoxifenem až 63% pacientek. K nejčastějším nežádoucím účinkům dlouhodobé léčby tamoxifenem patří návaly, vaginální krvácení, endometriální karcinom, nutnost hysterektomie, ischemické cerebrovaskulární příhody a venózní tromboembolie (3).

V současnosti však začínají tamoxifen v adjuvantní léčbě nahrazovat inhibitory aromatázy třetí generace, ke kterým patří anastrozol, letrozol a exemestan. Máme k dispozici výsledky několika randomizovaných studií třetí fáze, které srovnávají přínos adjuvantní léčby tamoxifenem u postmenopauzálních žen proti léčbě inhibitory aromatázy. Ve všech studiích byl prokázán přínos léčby inhibitory aromatázy a to v iniciální léčbě, v sekvenční léčbě i v prodloužené adjuvanci. Studie ATAC a BIG 1-98 srovnává iniciální léčbu tamoxifenem proti iniciální léčbě inhibitory aromatázy v době trvání pěti let. Pacientky léčené anastrozolem ve studii ATAC měly v době sledování 68 měsíců o 14 % nižší riziko vzdálené rekurence nemoci a o 42% nižší riziko kontralaterálního karcinomu prsu ($p=0.04$ a $p=0.01$) (4). Pacientky léčené letrozolem ve studii BIG 1-98 měly v době sledování 26 měsíců o 19% nižší riziko rekurence a o 27% nižší riziko vzdálené rekurence onemocnění ($p=0.003$ a $p=0.001$) (5). Navíc měly pacientky léčené inhibitory aromatázy v obou studiích méně nežádoucích účinků než pacientky léčené tamoxifenem. Dvě menší klinické studie třetí fáze Italian Tamoxifen Anastrozole (ITA) a Arimidex Nolvadex 95/Austrian Breast Cancer Study Group 8 (ARNO 95/ABCSG 8) prokázaly přínos sekvenční léčby inhibitory aromatázy po dvou až třech letech léčby tamoxifenem v prodloužení doby bez návratu nemoci (6,7). Nedávno publikované výsledky studie ARNO 95 potvrdily přínos sekvenční léčby anastrozolem. Pacientky léčené sekvenčně tamoxifenem a anastrozolem měly o 47% lepší celkové

přežívání ($p=0.045$) (8). Největší a asi nejlépe navrženou studií srovnávající sekvenční podání exemestanu po dvou až třech letech léčby tamoxifenem proti tamoxifenu samotnému je studie Intergroup Exemestane Study (IES). V době sledování 55,7 měsíců měly pacientky léčené exemestanem o 24% menší riziko recurence nemoci ($p=0,00005$), o 34% menší riziko vzdálené recurence ($p=0,0001$) (9). Karcinomy s pozitivními estrogenními receptory relabují později než karcinomy s negativními steroidními receptory nezávisle od postižení axilárních uzlin. Podle Hortobagyiho je riziko relapsů u nádorů druhého stadia 13% po dobu 10 let a 21% po dobu 15 let (10). Lze tím vysvětlit i příznivé výsledky studie MA 17, která prokázala přínos prodloužené adjuvantní léčby inhibitory aromatázy u pacientek s pozitivními estrogenovými receptory po pětileté adjuvantní léčbě tamoxifenem. V době sledování 30 měsíců měly pacientky léčené letrozolem o 42% menší riziko recurence nemoci než pacientky léčené placebem ($p<0.001$) a o 40% menší riziko vzdálené recurence ($p=0,002$) (11).

Na základě výsledků uvedených studií se na odborných sympoziích vedou diskuse o změně dosavadních léčebných postupů u karcinomu prsu a změně adjuvantní hormonální léčby u postmenopauzálních pacientek z dosud standardního tamoxifenu na inhibitor aromatázy. Je však otázkou, jestli všechny postmenopauzální pacientky s karcinomem prsu mají být léčeny v adjuvanci inhibitory aromatázy, anebo je možné identifikovat pacientky, které z důvodu existence primární nebo sekundární rezistence nebudou mít prospěch z léčby tamoxifenem.

Z klinického a biologického pohledu se dá rozlišit několik typů rezistence: a) nádory, které jsou rezistentní na jakoukoliv hormonální léčbu i když exprimují estrogenové receptory (primární panendokrinní rezistence); b) nádory, které jsou estrogen-dependentní, ale jsou rezistentní na jeden nebo více typů hormonální léčby (primární selektivní rezistence); c) nádory které nejdříve odpoví na hormonální léčbu, časem se však stanou rezistentní (získaná sekundární rezistence) (54). Problémem zůstává hlavně adjuvantní hormonální léčba, které účinnost lze měřit až s odstupem delšího času. Pokud by se podařilo pochopit molekulární podstatu tohoto fenoménu, bylo by možné pacientky léčit účinnou endokrinní léčbou a zlepšit tak léčebné výsledky.

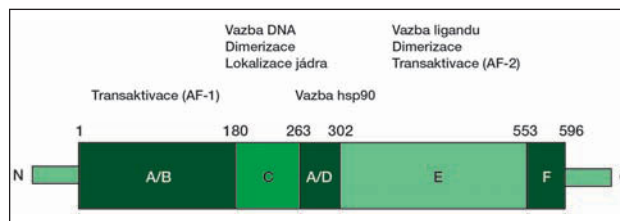
V článku se autoři snaží shrnout současné poznatky o mechanismech rezistence na endokrinní léčbu, které by mohly mít dopad na výběr adjuvantní hormonální léčby.

Estrogenový receptor – mechanismus účinku

V současné době známe dva druhy estrogenových receptorů (ER): ER α a ER β (12). I když je receptor ER β exprimován nádorovými buňkami karcinomu prsu, nebyla jeho funkce v normální i nádorové tkáni dosud přesně definována. Naopak, receptor ER α je detailně prostudován a slouží jako prediktivní marker pro hormonální léčbu. Patří do skupiny nukleárních receptorů aktivovaných ligandy. Po vstupu do buňky se estrogen naváže na ER, ten se oddělí od heat-shock proteinů, na které je vázán, prostorově se změní, fosforyluje a dimerizuje. Následně se naváže na

úseky genů, které v oblasti svých promotorů obsahují úsek závislý na estrogenu (ERE-estrogen response element). Tím dochází k transkripci genů. Tento způsob přepisu se označuje jako klasický.

Komplex estradiolu a ER může regulovat expresi genů i bez přímé interakce s DNA cestou jiných transkripčních faktorů jako je komplex aktivovaného proteinu Fos/Jun a AP-1. Tento způsob přepisu je označován za neklasický (13).



Obrázek č.1: Názorná struktura receptoru ER

ER se skládá z několika funkčních domén (obrázek č.1). Doména A/B má vnitřní schopnost aktivovat transkripci. Tato funkce je označována jako AF-1 (aktivační funkce 1). Je to aktivita, které je nezávislá na vazbě estrogenu nebo antiestrogenů (14). Pro plnou aktivaci AF-1 in vitro je nutná fosforylace serinu (Ser) na pozici 118 v ER, která je možná i cestou Ras/MAPK (mitogen-activated protein kinase) kaskády signální dráhy pro růstový faktor. Aktivací této cesty může tedy dojít k zvýšení exprese genů regulovaných ER, které jsou závislé na AF-1 i v nepřítomnosti estrogenu nebo antiestrogenů (15). Doména C je důležitá při lokalizaci jádra, dimerizaci receptorů a vazbu heat-shock proteinů. Doména D slouží k oddělení domény C a E. Doména E je důležitá pro vazbu přirozeného ligandu ER estradiolu (HBD - hormone binding domain). Kromě toho je hlavní oblastí dimerizace receptorů a aktivace transkripce závislé na ligandech (ligand binding domain). Tato funkce je označována jako AF-2 (aktivační funkce 2). AF-1 a AF-2 působí ve většině buněk synergicky. U některých genů však mohou být aktivovány nezávisle na sobě (16). Jejich funkce však může být dále modulována přítomností koregulačních proteinů. Byly popsány jak koaktivátory, které zesilují transkripci, tak korepresory, které ji tlumí.

Koaktivátory jsou skupina proteinů, které stimulují aktivitu ER cestou funkce AF-2. K nejdůležitějším patří koaktivátor nukleárního receptoru 1 (NCoA1, známý i jako SRC1-steroid receptor coactivator), NCoA2 a NCoA3 (AIB1) (17). Byly popsány i dva korepresory: NCoR1 (nuclear receptor co-repressor 1) a NCoR2 (rovněž pod názvem SMRT-silencing mediator of retinoic acid). Je nutné se zmínit, že i cyclin D1, protein, který reguluje buněčný cyklus, se může chovat jako koaktivátor a může aktivovat transkripci zprostředkovanou cestou ER.

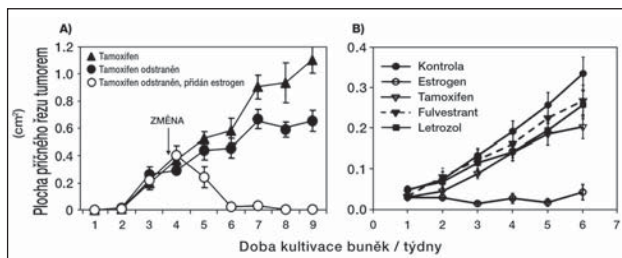
Agonistický a antagonistický profil účinku látek typu SERM (selective ER modulators), mezi které patří i tamoxifen, je částečně způsoben aktuální hladinou koaktivátorů a korepresorů v jednotlivých buňkách. Navíc se na něm může podílet i přítomnost nebo nepřítomnost úseků závislých na estrogenech (ERE) v promotorech jednotlivých genů.

Mechanismy rezistence

Ztráta exprese nebo funkce ER

Efekt tamoxifenu je primárně zprostředkován cestou ER a stupeň exprese ER je silným prediktorem odpovědi na tamoxifen. Ztráta exprese ER může vést ke ztrátě účinnosti tamoxifenu a patří k dominantním mechanismům de novo rezistence na tamoxifen. Nádory, které neexprimují ER ani PR (progesteronové receptory) neodpovídají ani na antiestrogenní léčbu (18). Ke ztrátě exprese ER však nedochází u všech patientek léčených tamoxifenem, které zpočátku odpověděly na léčbu a u kterých postupně vznikla rezistence na tamoxifen (19). Část patientek dokonce i v době progresu při léčbě tamoxifenem exprimuje ER. Asi 20% těchto patientek odpoví na jinou hormonální léčbu jako je např. inhibitor aromatázy nebo fulvestrant (20).

Častou příčinou změny funkce receptoru bývá i jeho mutace. Mutace ER, která porušuje vazbu antiestrogenu na receptor, byla detekována v některých rezistentních liniích nádorových kultur. U pacientů se však tato mutace dá prokázat zřídka (21). Kromě samotné exprese ER může být prediktorem odpovědi na hormonoterapii i stav jeho fosforylace zejména na Ser167.



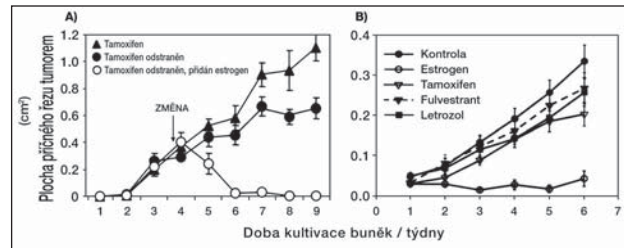
Obrázek č.2: Schématické znázornění vzniku rezistence k tamoxifenu během léčby.

Změna farmakokinetiky tamoxifenu

Snížená resorpce, změny biotransformace nebo urychlené vylučování, patří k dalším mechanismům vzniku rezistence na tamoxifen. Johnston a spolupracovníci měřili u 51 patientek s karcinomem prsu s de novo rezistencí a získanou rezistencí k tamoxifenu hladinu tamoxifenu v séru a v nádoru. Zatím co sérové koncentrace se mezi jednotlivými pacientkami výrazně nelišily, signifikantní rozdíly byly naměřeny v koncentraci tamoxifenu v nádorech u patientek se získanou rezistencí (nižší koncentrace) ve srovnání s pacientkami s rezistencí vzniklou de novo. Lze tedy předpokládat, že získaná rezistence může být spojena s nižšími hladinami tamoxifenu v nádoru při jeho normálních hladinách v séru. Jednou z příčin tohoto stavu může být zvýšená exprese P-glykoproteinu, membránové pumpy, způsobující eflux řady cytostatických léčiv (22).

Po vstupu do buňky je tamoxifen biotransformován na N-desmethyltamoxifen, který je hlavním metabolitem detekovatelným v krvi, a na 4-hydroxytamoxifen. Nově byl identifikován další aktivní metabolit tamoxifenu 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen, který má i vyšší afinitu k ER. Jeho vznik je závislý na funkci cytochromu CYP2D6, která však může být ovlivněna řadou běžně používaných léčiv. To dokazuje i práce, kterou se svými spolupracovníky publikoval Stearns. Autoři zjistili, že pacientky léčené současně tamoxifenem a paroxetinem (lék ze skupiny SSRI užívaný

ke zmírnění menopauzálních symptomů) měly signifikantně nižší sérovou hladinu 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifenu, ve srovnání s kontrolní skupinou patientek bez paroxetinu. Z jejich závěru lze postavit hypotézu, že paroxetin může snižovat efekt tamoxifenu (23).



Obrázek č.3A):

Na grafu je znázorněn dramatický efekt nízkých, fyziologických hladin estrogenu ve fázi II rezistence k tamoxifenu. Nádorové buňky MCF7, které byly kultivovány s tamoxifenem 5 let, jsou stimulovány k růstu samotným tamoxifenem. Pokud budou buňky dál kultivovány bez tamoxifenu, dochází k zastavení jejich růstu. Po přidání fyziologických hladin estrogenu dochází k dramatické regresi nádoru.

Obrázek č.3B):

Graf znázorňuje nádorové buňky MCF7s pozitivními ER v III.fázi rezistence, jejichž růst a autonomie a které nereagují na žádnou léčbu namířenou proti ER. Pouze fyziologické hladiny estrogenu mohou zastavit růst nádoru.

Změny koregulačních proteinů ER

AIB1 (SRC-3) je koaktivátor ER, nezbytný k výkonu jeho transkripční funkce. Vysoká exprese a aktivita AIB1 však může znamenat snížení antagonistického působení tamoxifenu na ER. Anzick a kol. prokázali amplifikaci a nadměrnou expresi AIB1 ve čtyřech z pěti testovaných nádorových linií karcinomu prsu, přičemž pro růst některých z nich byla esenciální (např. pro MCF-7). V případě primárních tumorů autoři detekovali jeho zvýšenou expresi u více než 60% ze 105 testovaných nádorů (24). Jednou z cest, kterou může docházet k aktivaci AIB1, je jeho fosforylace prostřednictvím signální dráhy HER-2 receptoru. Právě Osborne a spolupracovníci se snažili zjistit jaký je vztah mezi účinností tamoxifenu a expresí AIB1 a HER-2 receptoru. Ve své práci analyzovali soubor 316 karcinomů prsu od patientek, u kterých byl v adjuvanci zvolen jeden ze tří přístupů: a) adjuvantní léčba tamoxifenem, b) adjuvantní chemoterapie následovaná tamoxifenem, c) bez adjuvantní léčby. Medián přežití patientek v době analýzy souboru činil 95 měsíců. Ve srovnání s kontrolní skupinou dosahovaly pacientky s vysokou hladinou AIB1 delšího DFS pouze v případě, když nebyly léčené tamoxifenem, ($p=0,018$). V opačné situaci měla nadměrná exprese AIB1 negativní prognostický význam ($p=0,049$). Nejhorší prognózu měly pacientky léčené tamoxifenem, jejichž karcinomy nadměrně exprimovaly kofaktor AIB1 i HER-2 receptor ($p=0,004$) (16).

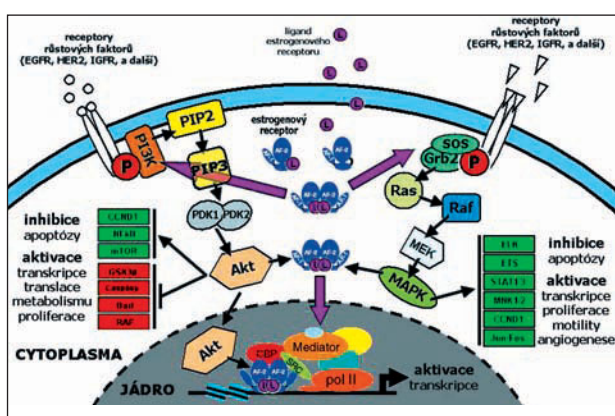
I v případě dalších koaktivátorů ER, jako např. SRC-1, potencuje jejich overexprese transkripční aktivitu ER, čímž posiluje agonistický efekt jeho ligandů (estrogenu i 4-hydroxytamoxifenu) (25). Negativní prediktivní i prognostický význam SRC-1 byl prokázán i na primárních nádorech karcinomu prsu (26).

V případě korepresorů (např. N-CoR, SMRT) je jejich význam pro realizaci agonistického efektu tamoxifenu opačný. Lavinsky a spolupracovníci prokázali na modelu

imunodeficientních myši, kterým byly injektovány buňky MCF7 nádorové linie karcinomu prsu, že pokles hladiny N-CoR koreloval se vznikem rezistence k tamoxifenu (27). Rovněž Keeton a kol. potvrdili toto zjištění a dále rozvedli jeho podstatu, když ve svých preklinických experimentech zjistili, že v případě potlačení exprese N-CoR a SMRT dochází u nádorových buněk kultivovaných s tamoxifinem ke stimulaci jejich buněčného cyklu, aniž by docházelo k aktivaci genů podléhajících transkripční aktivitě ER, zodpovědných za jeho proproliferaci funkci (např. c-myc a CCND1) (28).

Interference signálních drah receptorů růstových faktorů a ER

Nejvíce pozornosti ve výzkumu tamoxifenové rezistence je věnováno cestám vzájemné komunikace mezi receptory pro růstové faktory a ER (obrázek č. 4).



Obrázek č.4: Schématické znázornění interference signálních drah pro růstové faktory.

Benz a spolupracovníci prokázali, že nádorové buňky karcinomu prsu MCF7, které exprimují vyšší hladiny proteinu HER-2, jsou rezistentní na léčbu tamoxifinem, ale citlivé na snížení hladin estrogenů (29). Děje se tak na základě aktivace ER prostřednictvím signálních drah receptorů růstových faktorů (např. EGFR, HER-2, IGF1R a další), které mohou fosforylovat AF-1 doménu ER. Tato fosforylace může proběhnout jak cestou Ras/MEK/MAPK kinázové signální dráhy, tak i cestou PI3K/Akt kinázové signální dráhy (15).

Tímto způsobem, nezávisle na ligandu, dochází k downregulaci ER, ke zvýšení vnímavosti ER na nižší dávky estrogenů a k stimulaci jeho transkripční aktivity. Řada experimentů prokázala, že inhibice signální dráhy HER-2 a/nebo EGFR monoklonální protilátkou nebo selektivním inhibítorem tyrosin kinázové aktivity jejich domén, může zvrátit rezistenci vůči tamoxifenu (30, 31). Stejněho efektu lze dosáhnout inhibicí dalších komponent uvedených signálních drah (např. PI3K, Akt, MEK a MAPK kinázy) (31).

V preklinických modelech vede dlouhodobá expozice nádorových buněk s tamoxifinem, nebo deprivace estrogenů z jejich kultivačního prostředí, k up-regulaci HER-2 receptoru. Toto sledování potvrzuje, že uvedený adaptační mechanismus může být příčinou vzniku sekundární rezistence (32).

Je důležité, aby předpoklady, ke kterým dospěly preklinické studie, byly potvrzeny i v klinické praxi. Za tímto účelem již byly provedeny retrospektivní analýzy jak v případě adjuvantního podávání tamoxifenu, tak i jeho aplikace u metastatického onemocnění. Několik adjuvantních studií předpokládá, že pacientky s overexpresí HER-2 mohou mít relativně menší prospěch z adjuvantní léčby tamoxifinem (33, 34). Studie však mají svá slabá místa. Jedná se jednak o retrospektivní studie s malým počtem pacientů, které někdy používají nekonzistentní metody ke stanovení HER-2. De Laurentiis a spolupracovníci publikovali v roce 2005 výsledky metaanalýzy klinických studií s hormonální léčbou metastatického onemocnění karcinomu prsu, ve které hodnotili klinickou odpověď v závislosti na expresi HER-2. Hodnoceno bylo celkem 12 klinických studií. Ve většině studií byl podáván tamoxifen jako první linie pro metastatické onemocnění. Metaanalýza prokázala horší klinickou odpověď pacientek s metastatickým onemocněním a overexpresí HER-2 na hormonální léčbu. Relativní riziko pouze pro pacientky léčené tamoxifinem bylo 1.33 (95% CI, 1.20-1.48; $p < 0.00001$) (35).

Pro hledání prediktivních markerů k odpovědi na určitý léčebný postup se jeví být optimální neoadjuvantní studie. Efekt léčby je měřen přímo a sledované markery mohou být stanoveny podle požadovaných parametrů. V klinické studii vedené Ellisem bylo celkem 324 postmenopauzálních žen, jejichž nádory exprimovaly ER a /nebo PR, léčeno buď letrozolem nebo tamoxifinem v neoadjuvantním podání. U pacientek s pozitivitou ER a současně overexpresí EGFR a /nebo HER-2, které byly léčené tamoxifinem bylo dosaženo celkem 21% léčebných odpovědí a 42% léčebných odpovědí u pacientek bez overexpresí HER-2 a /nebo EGFR. Rozdíl nebyl statisticky signifikantní ($p = 0.095$), ale u pacientek s pozitivitou ER a /nebo PR a současně overexpresí HER-2 a /nebo EGFR bylo dosaženo signifikantně více léčebných odpovědí pomocí letrozolu (88% vs 21%, $p = 0.0004$). Na rozdíl od toho nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v odpovědi mezi letrozolem a tamoxifinem u pacientek s pozitivitou ER bez overexpresí HER-2 a /nebo EGFR (54% vs 42%, $p = 0.078$) (36).

Ve studii IMPACT bylo celkem 330 postmenopauzálních pacientek léčené neoadjuvantně anastrozolem, tamoxifinem nebo kombinací (37). Léčebná odpověď anastrozolu byla 58% a tamoxifenu 22% ($p = 0.09$). Rozdíl nebyl signifikantní, ale pacientky s overexpresí HER-2 měly větší benefit z anastrozolu než tamoxifenu.

Newby a spolupracovníci se snažili odpovědět na otázku, zda nově vzniklá overexpresie HER-2 znamená rezistenci na tamoxifen. U 61 pacientek, které zrelabovaly při léčbě tamoxifinem srovnali vzorky nádoru před léčbou tamoxifinem a v době relapsu. Autoři nezaznamenali signifikantní vzestup exprese HER-2 (38). Jiná studie však hypotézu vzestupu exprese HER-2 při objevení se rezistence na tamoxifen podpořila. Gutierrez a spolupracovníci srovnávali 39 vzorků pacientek, které byly odebrány před nasazením tamoxifenu a v době recidivy. U pacientek, které měly overexpresi HER 2 i před nasazením tamoxifenu, se fenotyp v době relapsu neměnil. U pacientek s negativním

HER-2 se v době relapsu objevila jeho overexprese (19). Vzhledem k rozporuplným výsledkům studií nebyla tedy prokázána jednoznačná korelace mezi vzestupem exprese HER-2 a vznikem rezistence na tamoxifen. Nově se však objevily zprávy o důležitosti kofaktoru AIB1, jehož vysoké hladiny mohou redukovat antagonistický efekt tamoxifenu. Je tedy pravděpodobné, že u nádorů s overexpresí HER2 může být AIB1 aktivovaný kaskádou signální dráhy pro HER-2 a tím může dojít k zvýšení agonistické aktivity tamoxifenu a následně redukcii jeho protinádorového účinku. V této souvislosti by tedy hladiny AIB1 mohly zvyšovat prediktivní hodnotu HER-2 (16).

Mutace nádorového supresoru p53

Předpokládaným mechanismem podpory tamoxifenové rezistence mutací p53 je zejména „gain of function“, tedy onkogenní účinek některých mutovaných forem p53, projevující se zejména zvýšením exprese EGFR, IGFR, myc a VEGF. Uplatnit se může i pozorované zvýšení exprese MDR-1 (multidrug resistance) genu, případně blokování apoptózy (39). Mutace p53 je ovšem u karcinomu prsu obecně negativním prognostickým parametrem, je sdružena s agresivnějšími nádory a častější negativitou ER. Selektivní vyhodnocení jejího významu jako prediktoru rezistence na tamoxifen je proto obtížné a je zatíženo četnými metodickými problémy jak ve výběru skupin pacientek, tak ve vlastním stanovení mutace (imunohistologie oproti sekvenování, sekvenování celého genu oproti sekvenování omezenému na DNA vazebnou doménu). Data jsou dosud rozporná, ale v metodicky poměrně konzistentní práci, užívající sekvenování celého genu ukázal Berns, že pacientky s pozitivním estrogenovým receptorem a mutací p53 prakticky neprofitovaly z terapie tamoxifenem a měly horší celkové přežívání, zejména při vyšší haldině VEGF v nádoru (40). Nádory s genovou expresí charakterizovanou jako „p53 signatura“ rovněž vykazovaly špatnou odpověď na tamoxifen podle výsledků Millera a spol., přičemž tato „signatura“ byla silnějším prediktorem než samotný status genu a je zjevné že ne všechny mutace p53 mají shodný efekt (41).

Signální dráha PIK3

Další signální dráha, která může ovlivňovat aktivitu ER, je signální dráha PIK3 (phosphatidyl-inositol-3-OH kinase). Jednou z komponent signální dráhy PI3K je serin/threonin protein kináza AKT, aktivace které má proliferační a antiapoptotický účinek. Studie in vitro předpokládají, že ER α se může vázat s p85a, která je regulační podjednotkou PI3K, což vede k aktivaci dráhy AKT (42). AKT může být cílem signálních drah i pro jiné receptory, jako IGF-1R, EGFR a HER-2. Vzájemný vztah ER a PIK3 je reciproční a tak PI3K aktivuje AKT, která fosforyluje ER a způsobuje jeho aktivaci (43). Tato hypotéza byla ověřena i v preklinických studiích. Clark a spolupracovníci měřili apoptozu indukovanou tamoxifenem v různých buněčných kulturách, a to bez a po přidání LY294002, což je inhibitor signální dráhy PIK3. Přidáním inhibitoru signální dráhy PIK3 se signifikantně zvýšil proapoptotický efekt tamoxifenu, hlavně v buněčných liniích s nejvyšší endogenní hladinou AKT aktivity (44). Kirkegaard a

spolupracovníci se ve své práci publikované v roce 2005 snažil ověřit hypotézu, že aktivace HER-2 s následnou aktivací AKT a ER vede u karcinomu prsu k vzniku rezistence na tamoxifen. Rodina serin/threonin protein kinaz má 3 isoformy: AKT1, která je exprimovaná asi u 20 % nádorů žaludku, AKT3, která je exprimovaná u buněčných linií hormonálně independentního karcinomu prsu a prostaty a AKT2. Na souboru 402 vzorků karcinomu prsu u pacientek léčených v adjuvanci tamoxifenem stanovili hladiny celkové AKT, AKT1, AKT2, AKT3 a ER. Pacientky, jejichž nádory měly vysokou expresi AKT2, měly signifikantně lepší celkové přežívání ($p=0.0115$) ve srovnání s pacientkami s nízkou expresí AKT2. Exprese AKT2 pozitivně korelovala s expresí progesteronového receptoru. Pacientky s vyšší hladinou AKT fosforylované na serinu 473 přežívaly relativně méně ($p=0,04$) a tato fosforylace pozitivně korelovala s Her-2 expresí. Podobná závislost nebyla pozorována u exprese AKT3, AKT1 a pan AKT exprese (45).

Progesteronový receptor

Za nádory s pozitivními steroidními receptory jsou označovány všechny nádory, které mají pozitivní estrogenový a/nebo progesteronový receptor (PgR). Vzhledem k tomu, že promotor genu pro PgR obsahuje úsek závislý od estrogenu (ERE), měla by exprese PgR sloužit i jako marker endokrinní závislosti. Navíc preklinické studie potvrdily, že blokadou funkce PgR lze u buněk navodit inhibici proliferace a indukci apoptozy (46). Na základě těchto poznatků byly vyvinuty inhibitory PgR k použití do klinické praxe. Dva z nich, onapristone a mifepristone, byly zkoušeny v klinických studiích II. fáze. Další fáze klinických studií však už neproběhly pro ztrátu komerční podpory. Za hlavní mechanismus účinku onapristonu se považuje indukce terminální diferenciacie, která vede ke smrti buňky (47).

Aprino a spolupracovníci publikovali v roce 2005 zajímavé výsledky retrospektivní studie. Studie měla potvrdit hypotézu, že nádory s fenotypem ER+/PgR- mají agresivnější chování a ve větším procentu exprimují HER1/HER2 než nádory fenotypu ER+/PgR+. Na souboru celkem 31 415 pacientek srovnávali klinické a biologické znaky nádorů ER+/PgR+ a ER+/PgR-. Medián hladiny ER v nádorech ER+/PgR- byl zhruba poloviční než u nádorů ER+/PgR+ (47 fmol/l vs 103 fmol/l; $p<0.001$). Nádory ER+/PgR- se vyskytovaly častěji u starších žen, byly ve větším procentu aneuploidní (54% vs 48%; $p<0.001$) a měly vyšší proliferaci podle měření počtu buněk v S-fázi (33% vs 19%; $p<0.001$) než nádory ER+/PgR+. Navíc nádory ER+/PgR- třikrát častěji exprimovaly HER1 (25% vs 8%; $p<0.001$) a dvakrát častěji HER2 (21% vs 14%; $p<0.001$). 11399 pacientek bylo léčeno v adjuvanci tamoxifenem. U pacientek ER+/PgR+ nebyla exprese HER1 ani HER2 spojena s kratším intervalem bez nemoci nebo celkovým přežíváním. Na rozdíl od toho u pacientek s nádory ER+/PgR- byla overexprese HER1 i HER2 spojena se signifikantně kratším přežíváním bez nemoci (pro HER1: HR= 2,4; 95% CI= 1.0-5.4, $p=0.036$, pro HER2: HR=2.6; 95% CI=1.1-6.0; $p=0.022$). Výsledky studie podporují hypotézu, že exprese PgR je náhradním

markerem pro měření aktivity signální dráhy HER1 a/ anebo HER2 (48).

Další prací, která potvrzuje nezávislost prediktivní hodnoty PgR v odpovědi na léčbu tamoxifenem, je práce Stendhala a spolupracovníků, kterou publikovali loni v časopise *Clinical Cancer Research*. Na souboru 500 premenopauzálních pacientek léčených tamoxifenem sledovali závislost odpovědi tamoxifenu na hladině pozitivivity PgR. Se stoupající hladinou ER nad 10% se zlepšoval i interval bez návratu nemoci u pacientek léčených tamoxifenem. Pokud však sledovali závislost účinnosti tamoxifenu na hladinách PgR, pouze u pacientek s expresí PgR nad 75% léčba tamoxifenem signifikantně zlepšila interval bez nemoci (RR=0.41, 95% CI=0.24-0.69; p=0.001) stejně jako celkové přežívání pacientek (RR=0.46; 95% CI=0.26-0.83; p=0.009) (49).

Několik klinických studií předpokládá, že vysoká signalizace růstových faktorů může být spojena s poklesem exprese PgR u karcinomu prsu (50). Nejnovější studie prokázaly, že růstové faktory, které aktivují cestu signalizace PI3K-Akt-mTOR, mohou snížit PR transkripci (51).

Tři stupně rezistence na tamoxifen

Jordan V.C., objevitel tamoxifenu, rozeznává tři fáze rezistence na tamoxifen. Tradiční model rezistence k látkám skupiny selektivních modulátorů ER (SERM), mezi které patří i tamoxifen vysvětluje jeho relativně krátkou dobu účinnosti (1-2 roky) během léčby metastatického onemocnění. (sem vložit obrázek č.2) Nádory s pozitivními estrogenovými receptory začnou být časem stimulovány buď přímo tamoxifenem nebo estrogeny, co je označované za fázi I. lékové rezistence na tamoxifen. Postupem času dochází ke vzniku II. fáze lékové rezistence na tamoxifen (cca za 5 let od začátku léčby), která je charakteristická tím, že nádorové buňky zůstávají stimulovány tamoxifenem, ale podání samotného estrogenu vede k smrti nádorových buněk. Pokud se tamoxifen v této fázi rezistence vysadí, můžeme pozorovat krátce trvající regresi nádoru. Vě finální fázi tamoxifenové rezistence, označované jako III. fáze, je růst

nádorových buněk autonomní a všechny antiestrogeny jsou neúčinné až na samotný estrogen (52). (obrázek č.3) Song a spolupracovníci předpokládají, že způsob, jakým estrogeny indukují buněčnou smrt v II. fázi rezistence, je signální dráha receptoru Fas/FasL (53).

S ohledem na výše uvedené je v současné době trend začlenit do léčebné strategie v klinických studiích po selhání II. řady hormonální léčby nádorů s pozitivními steroidními receptory i krátké období „léčby“ estradiolem (asi tři-měsíční), které má sloužit k restituci ER. Následně jsou pacientky léčeny kombinací inhibitoru aromatázy a fulvestrantu. Strategie cyklické hormonální léčby s krátkými úseky „promytí“ samotným estrogenem by tak mohla udržet pokročilé nádorové onemocnění s pozitivními steroidními receptory pod kontrolou léta.

Závěr

V průběhu posledních let byla publikována řada prací, která prokázala, že k transkripci ER dochází ne pouze na základě komplexu ER+ligand, ale i na základě interakce mezi koregulátory a ER a na základě signalizace drah pro růstové receptory. To představuje určitá možná vysvětlení vzniku rezistence k tamoxifenem a jiným lékům hormonální léčby u karcinomu prsu. V současné době je v klinickém zkoušení řada léků namířena proti jednotlivým signálním drahám. Karcinom prsu s pozitivními estrogenovými receptory není však jedna nemoc. Už dnes lze na základě genové exprese rozlišit dva typy karcinomu prsu s pozitivními ER: klinicky indolentní typ luminální A a více agresivní luminální B. Luminální B typ představuje skupinu nádorů, které mají zvýšenou expresi proliferčních genů, overexpresi HER2 a častěji mutaci p53. Zdá se přitom, že větší část buněčných regulací způsobujících rezistenci na tamoxifen se protíná v signální dráze PI3K-Akt-mTOR. Dalším krokem by tedy mohlo být rozdělení ER pozitivních nádorů a stanovení postupů hormonální léčby optimálních pro jednotlivé typy (54).

Práce byla podpořena grantem NR 8270-3/20

Literatura:

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998;351:1451-1467.
2. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ; Panel members. Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005;16:1569-1583.
3. Demissie S, Silliman RA., Lash TL. Adjuvant tamoxifen: predictors of use, side effects and discontinuation in older women. *J Clin Oncol* 2001;19:322-328.
4. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF, Hocht-Boes G, Houghton J, Locker GY, Tobias JS; ATAC Trialists' Group. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005;365:60-62.
5. Breast International Group (BIG) 1-98 Collaborative Group; Thurlimann B, Keshaviah A, Coates A, Mouridsen H, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Rabaglio M, Smith I, Wardley A, Price KN, Goldhirsch A. A comparison of letrozole and tamoxifen in postmenopausal women with early breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:2747-2757.
6. Jakesz R, Jonat W, Gnant M, Mittlboeck M, Greil R, Tausch C, Hilfrich J, Kwasny W, Menzel C, Samonigg H, Seifert M, Gademann G, Kaufmann M, Wolfgang J; ABCSG and the GABG. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005;366:455-462.
7. Boccardo F, Rubagotti A, Guglielmini P, Fini A, Paladini G, Mesiti M, Rinaldini M, Scali S, Porpiglia M, Benedetto C, Restuccia N, Buzzi F, Franchi R, Massida B, Distante V, Amadori D, Sismondi P. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer. Updated results of the Italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial. *Ann Oncol*. 2006 Jun;17 Suppl 7:vii10-vii14.
8. Kaufmann M, Jonat W, Hilfrich J, Eidtmann H, Gademann G, Zuna I, Von Minckwitz G, German Adjuvant Breast Cancer Group. Survival benefit of switching to anastrozole after 2 years' treatment with

- tamoxifen versus continued tamoxifen therapy: the ARNO 95 study. *J Clin Oncol* 2006;24(18 suppl):547.
9. Coombes RC, Kilburn LS, Snowdon CF, Paridaens R, Coleman RE, Jones SE, Jassem J, Van de Velde CJ, Delozier T, Alvarez I, Del Mastro L, Ortmann O, Diedrich K, Coates AS, Bajetta E, Holmberg SB, Dodwell D, Mickiewicz E, Andersen J, Lonning PE, Cocconi G, Forbes J, Castiglione M, Stuart N, Stewart A, Fallowfield LJ, Bertelli G, Hall E, Bogle RG, Carpentieri M, Colajori E, Subar M, Ireland E, Bliss JM; Intergroup Exemestane Study. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369(9561):559-70. Erratum in: *Lancet*. 2007;369(9565):906.
 10. Hortobagyi GN, Kau SW, Buzdar AU, Theriault RL, Booser DJ, Gwyn K, Valero V. What is the prognosis of patients with operable breast cancer (BC) five years after diagnosis? *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 23(14S) Abstract 585.
 11. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Piccart MJ, Castiglione M, Tu D, Shepherd LE, Pritchard KI, Livingston RB, Davidson NE, Norton L, Perez EA, Abrams JS, Cameron DA, Palmer MJ, Pater JL. Randomized trial of letrozole following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA 17. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1262-1271.
 12. Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Warri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M, Gustafsson JA. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002;9:1-13.
 13. Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 74:311-317.
 14. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 1987;51:941-51.
 15. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995; 270:1491-4.
 16. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, Wong J, Allred DC, Clark GM and Shiff R. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:353-361.
 17. McKenna NJ, Lanz RB and O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999;20:321-344.
 18. Lippman ME and Allegra JC. Quantitative estrogen receptor analyses: the response to endocrine and cytotoxic chemotherapy in human breast cancer and the disease-free interval. *Cancer* 1980;46:2829-2834.
 19. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK, Dowsett M. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol*. 2005;23(11):2469-76
 20. Howell A, Robertson JF, Quaresma Albano A, Aschermannova A, Mauriac L, Kleeberg UR, Vergote I, Erikstein B, Webster A, Morris C. Fulvestrant, formerly ICI 182,780 is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. *J Clin Oncol*. 2002;20:3396-3403.
 21. Karnik PS, Kulkarni S, Liu XP, Budd GT, Bukowski RM. Estrogen receptor mutation in tamoxifen-resistant breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:349-353.
 22. Johnston SR, Haynes BP, Smith IE, Jarman M, Sacks NP, Ebbs SR, Dowsett M. Acquired tamoxifen resistance in human breast cancer and reduced intra-tumoral drug concentration. *Lancet* 1993;342:1521-1522.
 23. Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, Hayes DF, Desta Z, Flockhart DA. Active tamoxifen metabolite plasma concentration after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95:1758-1764.
 24. Anzick P, Kononen J, Walker RL, Azorsa DO, Tanner MM, Guan XY, Sauter G, Kallioniemi OP, Trent JM, Meltzer PS. AIB1, a steroidal receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 1997;277:965-968.
 25. Tzukerman MT, Esty A, Santiso-Mere D, Danielian P, Parker MG, Stein RB, Pike JW, McDonnell DP. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocr* 1994;8:21-30.
 26. Myers E, Fleming FJ, Cortty TB, Kelly G, McDermott EW, O'higgins NJ, Hill AD, Young LS. Inverse relationship between ER-beta and SRC-1 predicts outcome in endocrine-resistant breast cancer. *Br J Cancer* 2004;91(9):1687-93.
 27. Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *PNAS* 1998;95:2920-2925.
 28. Keeton EK, Brown M. Cell cycle progression stimulated by tamoxifen-bound estrogen receptor-alpha and promoter-specific effects in breast cancer cells deficient in N-CoR and SMRT. *Mol Endocrinol*. 2005;19(6):1543-54.
 29. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM, Osborne CK. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;24(2):85-95.
 30. Witters LM, Kumar R, Chinchilli VM, Lipton A. Enhanced anti-proliferative activity of the combination of tamoxifen plus HER-2-neu antibody. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:1-5.
 31. Nicholson RI, Hutcheson IR, Harper ME, Knowlden JM, Barrow D, McClelland RA, Jones HE, Wakeling AE, Gee JM. Modulation of epidermal growth factor receptor in endocrine-resistant, estrogen-receptor-positive breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2002;963:104-115.
 32. Dowsett M. Overexpression of HER-2 as a resistance mechanism to hormonal therapy for breast cancer. *Endocr Related Cancer* 2001;8:191-195.
 33. De Placido S, De Laurentis M, Carlomagno C, Gallo C, Perrone F, Pepe S, Ruggiero A, Marinelli A, Pagliarulo C, Panico L, Pettinato G, Petrella G, Bianco AR. Twenty year results of the Naples GUN Randomised Trial: Predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:1039-1046.
 34. Dowsett M, Houghton J, Iden C, Salter J, Farndon J, A'Hern R, Sainsbury R, Baum M. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol*. 2006;17(5):818-26.
 35. De Laurentis M, Arpino G, Massarelli E, Ruggiero A, Carlomagno C, Ciardiello F, Tortora G, D'Agostino D, Caputo F, et al. A meta-analysis on the interaction between HER-2 expression and response to endocrine treatment in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:4741-4748.
 36. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Janicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M. Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for Erb-B-1 and/or Erb-B-2 positive, estrogen receptor positive primary breast cancer: evidence from a phase III. randomised trial. *J Clin Oncol* 2001;19:3808-3816.
 37. Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU, Ashley SE, Francis S, Boeddinghaus I, Walsh G; IMPACT Trialists Group. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol*. 2005;23(22):5108-16.
 38. Newby JC, Johnston SR, Smith IE, Dowsett M. Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:1643-1651.
 39. Van Oijen MG, Slootweg PJ. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clin Cancer Res*. 2000;6(6):2138-45.
 40. Berns EM, Klijn JG, Look MP, Grebenchtchikov N, Vossen R, Peters H, Geurts-Moespot A, Portengen H, van Staveren IL, Meijer-van Gelder ME, Bakker B, Sweep FC, Foekens JA. Combined vascular endothelial growth factor and TP53 status predicts poor response to tamoxifen therapy in estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(4):1253-8.
 41. Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A,

- Pawitan Y, Hall P, Klaar S, Liu ET, Bergh J. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(38):13550-5. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(49):17882.
42. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000 Sep 28;407(6803):538-41.
43. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 2001;276:9817-9824.
44. Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2002;1:707-717.
45. Kirkegaard T, Witton CJ, McGlynn LM, Tovey SM, Dunne B, Lyon A, Barlett MS. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol* 2005; 207:139-146.
46. Clarke CL, Feil PD, Satyaswaroop PG. Progesterone receptor regulation by 17-beta estradiol in human endometrial carcinoma grown in nude mice. *Endocrinology* 1987;121:1642-8.
47. Michna H, Schneider MR, Nishino Y, el Etreby MF. The antitumor mechanism of progesterone antagonists is a receptor mediated antiproliferative effect by induction of terminal cell death. *J Steroid Biochem* 1989;34:447-53.
48. Arpino G, Weiss H, Lee AV, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1254-61.
49. Stendahl M, Ryden L, Nordenskjold B, Jonsson PE, Landberg G, Jirstrom K. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12(15):4614-8.
50. Konecny G, Pauletti G, Pegram M, Untch M, Dandekar S, Aguilar Z, Wilson C, Rong HM, Bauerfeind I, Felber M, Wang HJ, Beryt M, Seshadri R, Hepp H, Slamon DJ. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:142-53.
51. Petz LN, Ziegler YS, Schulz JR, Nardulli AM. Fos and Jun inhibit estrogen-induced transcription of the human progesterone receptor gene through an activator protein-1 site. *Mol Endocrinol* 2004;18:521-32.
52. Jordan VC. Selective estrogen receptor modulation: Concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* 2004; 5:207-213.
53. Song RX, Mor G, Naftolin F, McPherson R A, Song J, Zhang Z, Yeu W, Wang J, Santen R. Effect of long-term estrogen deprivation on apoptotic responses of breast cancer cells to 17beta estradiol. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1714-23.
54. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8418-8423.

Korespondenční adresa:
MUDr. Katarína Petraková CSc
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7, 65653 Brno
petrakova@mou.cz

Došlo / Submitted: 22. 6. 2007
Přijato / Accepted: 30. 7. 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.

IDENTIFIKACE POTENCIÁLNÍCH BIOMARKERŮ KARCINOMU PRSU METODOU SELDI-TOF MS

IDENTIFICATION OF POTENTIAL BIOMARKERS OF BREAST CANCER BY SELDI-TOF MS

Brožková K.¹, Knoflíčková D.¹, Hernychová L.⁵, Bouchal P.¹, Holčáková J.¹, Michalová E.¹, Vyzula R.², Žaloudík J.³, Valík D.⁴, Nenutil R.¹, Vojtěšek B.¹

¹MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ KLINICKÉ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE, BRNO

²MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, BRNO

³MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ CHIRURGICKÉ ONKOLOGIE, BRNO

⁴MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, BRNO

⁵UNIVERZITA OBRANY, FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ, ÚSTAV MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE, HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn

Východisko: Včasná diagnóza a rychlé nasazení cílené terapie jsou klíčovými faktory úspěšnosti léčby nádorových onemocnění. Snaha o nalezení nových biomarkerů pro včasější diagnostiku, bližší určení subtypu nádoru, výběr optimálního léčebného protokolu a stanovení prognózy odpovědnosti na léčbu stále zůstává jedním z hlavních cílů výzkumu v této oblasti. V naší studii jsme se zaměřili na diferenciální analýzu proteinových expresních profilů nádorové a normální tkáně 105 pacientek s diagnózou karcinomu prsu. **Metody a výsledky:** Lyzáty tkání byly analyzovány metodou SELDI-TOF MS s využitím čipů s povrchem chelataujícím měďnaté kationty (IMAC 30). Intenzity signálů odpovídající jednotlivým proteinům vzorku byly statisticky hodnoceny pomocí Wilcoxonova testu na hladině významnosti $p < 0,01$. Bylo nalezeno 28 signálů se signifikantně vyšší hodnotou intenzity v nádorové tkáni a 18 signálů o vyšší intenzitě v normální tkáni prsu. Metodou peptidového mapování (PMF) byl identifikován protein specifický pro normální tkáň s charakteristickým signálem o molekulové hmotnosti 15841 Da jako β -řetězec hemoglobinu. **Závěr:** Analýza metodou SELDI-TOF MS prokázala významné rozdíly v hmotnostních spektrech proteinů exprimovaných v nádorové a normální tkáni. Na základě získaných spekter bylo možno vytipovat charakteristické píky označující proteiny, jenž lze považovat za potenciální biomarkery onemocnění a které by mohly v budoucnosti poskytnout přesnější pohled na klasifikaci nádorů a tím i na jejich diagnostiku a terapii.

Klíčová slova: SELDI-TOF-MS, biologický marker, karcinom prsu, beta-Globin

Summary

Backgrounds: Early diagnosis and immediate therapeutic interventions are crucial factors for successful cancer treatment. New biomarkers are needed for timely diagnosis, more precise histopathological classification or for prediction of treatment response. Our study was aimed at the differential analysis of protein expression profiles of cancer and non-cancer tissue from 105 patients with breast cancer. **Methods and Results:** Tissue lysates were analyzed by SELDI-TOF-MS on copper chelating chips IMAC 30. Peak intensities were statistically evaluated by Wilcoxon test with significance defined as $p < 0,01$. 28 peaks are overexpressed in tumour tissue and 18 peaks are overexpressed in normal tissue. Protein with molecular weight 15841 Da was identified as the β chain of haemoglobin by method of peptide mass fingerprint (PMF). **Conclusions:** Analysis of the protein expression profile by SELDI-TOF-MS is able to provide a new point of view on diagnostic and tumor classification. Further independent studies of new sets of samples are essential for verification of specificity and sensitivity of the presented potential biomarkers.

Key words: SELDI-TOF-MS, biological marker, breast cancer, beta-Globin

ÚVOD

Nádorové onemocnění prsu je každoročně diagnostikováno u milionů žen na celém světě a svým rozšířením se tak řadí k nejčastěji se vyskytujícím formám rakoviny u žen. Představuje také druhou nejčastější příčinu úmrtí žen na nádorové onemocnění. Jedno procento nádorů postihuje také muže. V současnosti je diagnostika karcinomu

prsu založena především na zobrazovacích technikách (mamografie, ultrazvuk), jejichž využití v preventivních programech výrazně zlepšilo záchyt časnějších stádií onemocnění. Ačkoli během několika posledních desetiletí došlo k výraznému zvýšení úspěšnosti léčby díky pokroku screeningových programů a adjuvantní terapie (hormonální terapie a chemoterapie), umírá stále mnoho pacientek na

následky metastatických komplikací. Značná heterogenita nádorů je jen částečně popsána běžně používanými klinickopatologickými parametry (věk, velikost nádoru, statut hormonálních receptorů, grade atd.), tato kritéria však neumožňují dokonale vybrat nejlepší léčebnou strategii pro jednotlivé konkrétní případy.

Znalost kompletní sekvence lidského genomu a rychlý rozvoj molekulárně-biologických metod rozšiřuje pole potenciálních biomarkerů onemocnění či jejich kombinací a tím umožňuje přesnější diagnostiku, predikci terapeutické odpovědi a rozvoj studia nových terapeutických cílů. Nesmírný pokrok genomické éry zejména díky čipovým technologiím umožňujícím analýzu expresních profilů buněk na úrovni RNA postupně odhaluje jednotlivé alterace mechanismu mamární onkogeneze a konkrétní geny účastníci se těchto procesů jako ERBB2, TP53, CCND1, BRCA1 a BRCA2. Proteomické metody mají naopak potenciál odhalit další podstatnou část informací spojenou s lokalizací vybraných proteinů v buňce, jejich vzájemnou interakcí, posttranslačními modifikacemi (fosforylace, acetylace, glykosylace aj.), jejich stabilitou a v neposlední řadě s výslednou funkcí proteinů. Nejběžnější a dříve hojně využívaná proteomická metoda, dvourozměrná gelová elektroforéza (2D-ELFO), je limitována zejména velikostí analyzovaných proteinů (vyhodnocení je možné u proteinů >7000 Da) a neumožňuje detekci proteinů s nízkou hladinou exprese [1]. Jako alternativa 2D-ELFO pro analýzu expresního profilu na úrovni proteinů u komplexních biologických vzorků (sérum, plazma, moč, lyzáty nádorových tkání atd.) byla poprvé v roce 1993 popsána metoda SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry) [2]. Při aplikaci SELDI-TOF MS jsou některé proteiny na základě svých fyzikálních či chemických vlastností zachyceny na chromatografickém povrchu čipu, nenavázané proteiny jsou naopak odmyty. Čipy s navázanými proteiny jsou následně analyzovány hmotnostní spektrometrií [3].

Pionýrskou prací v oblasti analýzy metodou SELDI-TOF MS byla detekce časného ovariálního karcinomu analýzou proteinového profilu séra [4], kdy na souboru 50 vzorků sér pacientek s ovariálním karcinomem a 66 vzorků sér od zdravých žen bylo dosaženo 100% sensitivity, 95% specifity a 94% pozitivní prediktivní hodnoty. Analýza proteinových profilů vedoucí k odhalení maligního onemocnění, popřípadě jeho odlišení od benigní choroby, již byla publikována např. pro detekci karcinomu prostaty [5], karcinomu ledvin [6] nebo adenokarcinomu slinivky [7]. Pro detekci karcinomu prsu bylo zveřejněno několik prací analyzujících rozdíly v proteinovém profilu séra zdravých a nemocných žen [8-11] a dále práce identifikující potenciální biomarkery předpovídající metastázy v axilárních mizních uzlinách z mikrodisekované tkáně [12]. Než však bude možné zavést tyto potenciální biomarkery do klinické praxe, bude nezbytné potvrdit jejich validitu a robustnost na nezávislých souborech vzorků [13]. Následná identifikace rozdílně exprimovaných proteinů a studium jejich funkce by mohlo přinést nové poznatky v oblasti karcinogeneze či

odhalit nové terapeutické cíle. Takovými příklady mohou být například ubikvitin a lehký řetězec ferritinu jako prognostické biomarkery karcinomu prsu bez zasažených mizních uzlin [14] či snížená hladina exprese skupiny kalgranulinů pozorovaná ve spinocelulárních karcinomech dutiny ústní a hrtanu. [15].

Ve většině doposud publikovaných studiích bylo využito séra jako výchozího materiálu pro analýzu proteinových expresních profilů pomocí SELDI-TOF MS. Jeho výhodou je snadná dostupnost s minimální zátěží pacienta a možná následná aplikace biomarkerů v klinických screeningových programech. Nevýhodou séra může být metodická heterogenita v preanalytické fázi [16]. Naproti tomu zpracování normální a nádorové tkáně je do určité míry omezeno horší dostupností a heterogenitou získaného vzorku, nicméně výhodou je možná detekce i velmi nízké exprimovaných proteinů s následnou studií jejich funkce. V rámci naší studie jsme se zaměřili na zavedení a otestování standardního postupu zpracování vzorků tkáně pro jejich následnou analýzu metodou SELDI-TOF MS a provedli jsme komplexní proteomickou analýzu vzorků nádorové a odpovídající normální tkáně 105 pacientek s diagnózou karcinomu prsu. Cílem naší analýzy bylo nalezení specifických proteinů typicky exprimovaných v nádorové tkáni, z nichž by některé bylo možno následně sledovat i ve vzorcích séra.

MATERIÁL A METODY

Pacientky

S využitím SELDI-TOF MS jsme studovali nádorové a paralelní normální vzorky mléčné žlázy od 105 pacientek, vybrané z konsektivní řady operovaných karcinomů prsu v letech 2004-2005, klinického stadia I a II, bez neoadjuvantní léčby. Byly vybrány větší nádory umožňující archivaci většího počtu alikvotů nádorové tkáně, aby nebyl všechn materiál spotřebován pro danou studii. V sestavě proto převažovaly nádory pT2 – 57 (54 %) nad pT1 – 43 (40 %) relativně často s metastatickým postižením jedné a více uzlin (pozorováno u 65, tj. 63 %) pacientek. Rozložení grade bylo v souboru rovnoměrné s mírnou převahou středně a špatně diferencovaných nádorů (G1 26,6 %; G2 33,3 %; G3 37,1 %). Průměr i medián věku pacientek v analyzovaném souboru byl v době diagnózy shodný, a to 59 let. Sestava zahrnovala vzorky 72 duktálních blíže neurčených karcinomů a 22 lobulárních karcinomů, dále 2 metaplastické, 2 mucinózní, 2 papilární, 2 pleiomorfni lobulární a 3 smíšené duktální a lobulární karcinomy. Exprese estrogenních receptorů byla potvrzena u 86 (= 82 %) nádorů, progesteronový receptor byl detekován u 81 (78 %) vzorků. Overexprese Her-2 receptoru byla imunohistochemicky zjištěna a FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridisation) validována u 20 (= 19 %) vzorků.

Zpracování vzorků

Operační materiál byl bezprostředně po zákroku (do 10 minut) zpracován standardním způsobem, tj. byl pořízen makroskopický popis a excidovány vzorky pro histologické vyšetření. Současně byl proveden odběr nativní nádorové tkáně: vzorky velikosti cca 3×3×8 mm

byly prudce zamrazeny v tekutém dusíku a dlouhodobě skladovány při -80°C . Reprezentativnost odebrané tkáně (minimálně 50 % materiálu tvořeno nádorovými buňkami) byla ověřena histologickým vyšetřením bezprostředně sousedící tkáně (tzv. paralelní řezy).

Lýza tkáně byla provedena ve třech rozdílných pufrech: i) NET pufr (150 mM NaCl; 1% NP-40; 50 mM Tris-Cl, pH 8,0; 50 mM NaF; 5 mM EDTA); ii) močovinový pufr (9 M urea; 2% CHAPS); iii) guanidinový pufr (100 mM fosfátový pufr, pH 6,6; 6 M guanidin-HCl; 1% Triton X-100) třepáním 1 hod při pokojové teplotě s následnou centrifugací 30 min při $14000 \times g$ (dle [15]). Celková koncentrace proteinů v lyzátu byla stanovena metodou dle Bradfordové (Bio-Rad Protein Assay, USA) a lyzáty byly skladovány v alikvotech při -80°C . Vzorky byly analyzovány s využitím čipů IMAC 30 (CIPHERGEN Biosystems, USA), pro analýzu byly zpracovány dle standardního návodu výrobce. Vzorek byl na terčík čipu nanášen v množství 20 μg celkového proteinu $16\times$ ředěného IMAC vazebným pufrem (100 mM fosfátový pufr pH 7,0; 750 mM NaCl; 0,05% Triton X-100). Čipy byly analyzovány na ProteinChip Readeru Model PBS II C (CIPHERGEN Biosystems, USA) v pozitivním lineárním módu. Každý vzorek byl nanesen a změřen ve dvou opakováních, přičemž jednotlivé vzorky byly na čipy rozmístěny náhodně.

Hodnocení naměřených spekter

Získaná spektra byla kalibrována dle externích hmotnostních standardů „all-in-one protein I molecular weight standards mix“ (CIPHERGEN Biosystems, USA) a intenzita normalizována dle celkového iontového proudu v rozmezí 2 až 100 kDa. Pomocí „Biomarker Wizard“ software verze 3.2.1 (CIPHERGEN Biosystems, USA) byly automaticky detekovány signály o poměru S/N (signál/šum) > 5 a vyskytující se alespoň u 12,5 % spekter. Celkově bylo detekováno 89 signálů reprezentujících proteiny s odlišnou molekulovou hmotností přítomné ve vzorku. Intenzity jednotlivých signálů byly statisticky hodnoceny pomocí Wilcoxonova testu a proteiny rozdílně exprimované se statistickou významností ($p < 0,01$) byly rovněž hodnoceny vizuálně.

Příprava vzorků pro identifikaci metodou PMF

Směsné vzorky s vysokým obsahem vybraného proteinu byly naředěny v poměru 1:1 $2\times$ koncentrovaným IMAC vazebným pufrem, nanesen na „IMAC HyperCel Spin Column“ (CIPHERGEN Biosystems, USA) a zpracovány dle návodu výrobce. Po selektivní vazbě a vymytí nenavázaných proteinů byla provedena eluce vazebným pufrem s imidazolovým gradientem. Získané frakce (F1: 30 mM imidazol, F2: 60 mM imidazol, F3: 90 mM imidazol, F4: 120 mM imidazol, F5: 150 mM imidazol a F6: 250 mM imidazol) byly analyzovány pomocí SELDI-TOF MS na čípech NP20 ProteinChip Array s hydrofilním povrchem (CIPHERGEN Biosystems, USA). Frakce s vysokým obsahem vybraného proteinu byly rozděleny jednorozměrnou gelovou elektroforézou (1D-ELFO) v 10-20% tricínovém gelu (Invitrogen Corporation, UK), proteiny obarveny Coomassie blue a oblasti s předpokládaným výskytem

proteinů o dané molekulové hmotnosti vyřiznuty pro následnou MS analýzu. Kousky gelu byly nejprve odbarveny a promyty v promývacím pufru (100 mM Tris-Cl, pH 8,5 v 50% acetonitrilu (AcN)), pakekvilibrovány v ekvilibračním a štěpícím pufru (50 mM NH_4HCO_3 , pH 7,8 v 5% AcN). Pufr byl odstraněn a kousky gelu byly vysušeny na Speed Vac SP110 (Savant, Minnesota), následovalo enzymatické štěpení, kdy ke každému vzorku bylo přidáno 2,5 μl roztoku složeného z 0,5 μl štěpícího enzymu (trypsin, 1 $\mu\text{g}/5 \mu\text{l}$ v rekonstitučním pufru-50 mM kyselina octová) a 2 μl ekvilibračního a štěpícího pufru. Kousky gelu byly následně převrstveny 20-30 μl štěpícího pufru a inkubovány přes noc v termomixeru (Eppendorf, Germany) při 37°C a rychlosti otáčení 1500 rpm. Štěpení bylo zastaveno přidáním 5 μl 0,5% trifluoroctové kyseliny (TFA) v 95% AcN. Na destičku s hydrofóbní maskou (Applied Biosystems, USA) byly nanášeny vždy po 1 μl vzorky obsahující směsi peptidů vzniklých štěpením proteinu/proteinů extrahovaných z gelu. Každý vzorek byl po usušení za laboratorní teploty převrstven 1 μl roztoku matrice 2,5-dihydroxybenzoové kyseliny (DHB, koncentrace 10 mg/ml, rozpuštěna ve 20% AcN, vodě a 5% TFA). Po vykrystalizování vzorků s matricí byla destička vložena do MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) hmotnostního spektrometru (Voyager-DE STR, Applied Biosystems, USA). Po kalibraci přístroje byly vzorky měřeny v pozitivním refletronovém módu a získaná hmotnostní spektra byla hodnocena metodou PMF pomocí programu PROTEIN PROSPECTOR MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>). Výsledkem identifikací jednotlivých vzorků byl seznam proteinů, jejichž teoretickému spektru s určitou pravděpodobností odpovídá naměřené spektrum. Každý nalezený protein byl charakterizován parametry: „mowse score“ (pravděpodobnost shody identifikovaného proteinu se známým proteinem), „masses matched“ (počet signálů spektra známého proteinu nalezených ve spektru identifikovaného proteinu), teoretická molekulová hmotnost a pI proteinu, název proteinu.

VÝSLEDKY

Při optimalizaci zpracování tří vzorků paralelně v různých lyzačních pufrech byl získaný počet signálů srovnatelný pro vzorky lyzované v močovinovém a guanidinovém pufru (56 resp. 57 signálů o $S/N > 5$ v rozsahu 3 – 80 kDa), při použití NET pufru jsme získali výrazně nižší počet signálů (41 signálů). U vzorků lyzovaných pomocí guanidinového pufru bylo navíc dosaženo $4\times$ vyšší intenzity signálů naměřených spekter, a proto byl vybrán jako nejvhodnější a použit pro lýzu celého souboru vzorků.

Softwarem „Biomarker Wizard“ (CIPHERGEN Biosystems, USA) bylo ve 428 naměřených spektrech detekováno 89 klastrů (= signálů splňujících podmínku intenzity $S/N > 5$ a zároveň se vyskytujících alespoň ve 12,5 % naměřených spekter) v rozsahu 2 – 100 kDa. U 46 z nich byl rozdíl intenzity (vzájemný poměr intenzit > 2) vyhodnocen jako statisticky významný na hladině pravděpodobnosti $p < 0,01$. 28 signálů (píků) s vyšší intenzitou bylo nalezeno ve vzorcích nádorové tkáně, v normální tkáni prsu pak 18 signálů (píků). K identifikaci konkrétních proteinů,

jež jednotlivé signály představují, byly vybrány signály s největším rozdílem intenzity v obou typech vzorků, a to signály s předpokládanou molekulovou hmotností proteinů 7920 Da a 15841 Da (Obr.1, 2) charakteristické pro normální tkáň a signály 5175 Da, 5195 Da (Obr. 3), 6263 Da, 8395 Da a 8541 Da typické pro nádorovou tkáň. U signálů charakteristických pro normální tkáň lze předpokládat, že mohou být odrazem stejného proteinu. Výsledky hmotnostní spektrometrie graficky znázorněné jako spektrum piků jsou vyneseny tzv. efektivní hmotnosti (poměr hmotnosti a náboje dané molekuly m/z) na ose x a relativní intenzity signálu na ose y. Pokud některé molekuly o hmotnosti 15841 Da nesou náboj 1+, poskytnou signál v oblasti 15841, pokud některé molekuly nesou náboj 2+, poskytnou signál v oblasti 7920. Tento předpoklad nelze s jistotou vyloučit ani potvrdit (ve vzorku se mohou nacházet proteiny s molekulovou hmotností 15841 Da i 7920 Da), proto jsme se pokusili identifikovat oba tyto signály nezávisle na sobě.

Při MALDI-TOF MS byla úspěšně získána spektra potenciálních proteinů o molekulové hmotnosti 5195 Da, 8541 Da a 15841 Da. Metodou peptidového mapování byl identifikován pouze protein o molekulové hmotnosti 15841 Da jako β -řetězec hemoglobinu dosahující „mowse score“ 1,76.10⁷, „masses matched“ 9 (ze 14 detekovaných) s 60% pokrytím aminokyselinové sekvence (experimentálně bylo nalezeno 9 peptidů, které představují 88 aminokyselin z celkového počtu 146). Nízká úspěšnost identifikace jednotlivých proteinů v naší i jiných studiích je dána návazností několika technik (afinitní chromatografie, 1D-ELFO, MALDI-TOF MS), které jsou limitovány kapacitou a sensitivitou (vazba proteinů o nízké koncentraci na chromatografický povrch kolony, detekce proteinů na gelu barvením apod.). V průběhu tohoto komplexního procesu může z výše uváděných důvodů docházet ke ztrátám identifikovaných proteinů.

DISKUZE

Nádory prsu jsou v celosvětovém měřítku jedním z nejčastějších onkologických onemocnění, navíc spojené s vysokou úmrtností. Přestože se doba přežívání pacientek za posledních deset let podstatně prodloužila díky prevenci a včasným screeningovým metodám a taktéž systematické adjuvantní terapii, zůstává úmrtnost stále vysoká zejména kvůli metastatickému relapsu onemocnění. Komplexní genese karcinomu prsu a heterogenita maligních buněk vytváří molekulárně odlišné podskupiny nádorů s rozdílným fenotypem i klinickým průběhem onemocnění včetně různé dispozice k metastazování do kostí, parenchymatózních orgánů, mozku, kůže, mízních uzlin atd. Detekce, diagnostika a léčba těchto nádorů závisí na integrovaných přístupech zohledňujících klinickou historii, výsledky zobrazovacích metod, histopatologii a molekulárně biologické charakteristiky nádoru. Je tedy zřejmé, že detekce a validace nových biomarkerů nepochybně pomůže klinickým pracovníkům efektivněji využívat všech doposud dostupných možností. Proteomické přístupy využívané pro hledání nových biomarkerů kombinují postupy založené na separaci, detekci a identifikaci proteinů. Klasickým příkladem je kombinace

dvourozměrné elektroforézy [17, 18] a MALDI-TOF MS, která umožňuje jak separaci proteinů (na základě poměru hmotnosti a náboje), tak jejich detekci a identifikaci.

V naší studii jsme využili metodu SELDI-TOF MS, která spojuje separaci proteinů s jejich přímou analýzou hmotnostním spektrometrem [19]. Zaměřili jsme se na identifikaci rozdílů proteinových spekter lyzátů nádorové a normální tkáně pacientek s karcinomem prsu. Fakt, že ke statisticky významným změnám dochází u více než poloviny hodnocených klastřů, naznačuje, že analyzované vzorky normální a nádorové tkáně prsu jsou zásadně a systematicky rozdílné. Zdrojem těchto rozdílů bude zejména různé zastoupení jednotlivých tkání v obou typech vzorků (zejména tukové tkáně, vaziva a epitelu), případně heterogenita souboru nádorových vzorků způsobená zastoupením různých subtypů karcinomu prsu. Tyto rozdíly expresních profilů mohou být dále způsobeny zvýšenou expresí daného proteinu, abnormálním rozpadem, fragmentací či proteolytickým štěpením proteinů, modifikací proteinů nebo jejich zvýšenou degradací. Všechny dosud publikované práce s cílem nalézt diagnostické či prognostické markery vycházely výhradně z analýzy séra, plazmy, případně tekutiny aspirované z mlékovodu [20, 21], s výjimkou Ricolleau *et al.* [14], který použil jako výchozí materiál hluboce zmraženou tkáň a Nakagawa *et al.* [12], který využil mikrodisekci ze zmražených řezů. Sensitivita proteomických aplikací hmotnostní spektrometrie pro sérové analýzy není dostatečná pro detekci proteinů s nízkou hladinou exprese, které jsou uvolňovány do krevního oběhu relativně malým množstvím nádorových buněk nebo jejich mikroprostředím [22]. Lyzáty tkání se tedy zdají být vhodnějším výchozím materiálem pro vytipování proteinů spojených s nádorovými buňkami a pro jejich následné cílené vyhledání v sérech. Práce s lyzáty nádorových tkání má rovněž výhodu pilotní studie vzhledem k minimálnímu zředovacímu efektu. Koncept naší práce vychází ze skutečnosti, že karcinomy prsu mohou uvolňovat proteiny do krevního oběhu, kde je lze následně detekovat. Použitelnost nových potenciálních biomarkerů v diagnostice a prognostice onemocnění je však limitována nejen jejich sensitivitou a specificitou, ale také dostupností výchozího materiálu a komplexností jeho přípravy pro analýzu. Jelikož sérum v současnosti představuje nejběžnější a relativně snadno dostupný výchozí materiál pro laboratorní analýzy, bude cílem navazujících studií snaha o nalezení v tkáni detekovaných rozdílných signálů i ve vzorcích sér s využitím stejného metodického přístupu. Při daných studiích bude nutné brát zřetel i na skutečnost, že proteiny uvolňované do séra mohou být degradovány prostřednictvím proteolytických systémů. Naše studie jednoznačně potvrdila nutnost analýzy proteinových expresních profilů („fingerprint“) vzorků lyzátů nádorové tkáně a jejich srovnání s klinicko-patologickými charakteristikami použitého souboru nádorů prsu. Výsledky naší analýzy rovněž ukázaly, že piky 5175 Da a 5195 Da jsou pozitivně korelovány s amplifikací genu Her-2 a pik 8395 Da s výskytem estrogenních receptorů α a β . Identifikace těchto piků a jejich následná analýza v sérech pacientek prokážou jejich možné využití jako biomarkerů.

Identifikace β -řetězce hemoglobinu v souvislosti se změnami expresního profilu karcinomu prsu již byla publikována [23] v práci analyzující tekutinu aspirovanou z mlékovodu 18 žen

s invazivním karcinomem prsu stádia I či II a 4 zdravých dobrovolnic metodou ICAT (Isotope-Coded Affinity Tag) MS umožňující kvalitativní a kvantitativní komparativní analýzu párových vzorků proteinů [24]. Práce poukázala na rozdílnou expresi 39 proteinů, z nichž α 2HS-glykoprotein byl identifikován jako protein se sníženou hladinou exprese, lipophilin B, β -řetězec hemoglobinu, hemopexin a prekurzor proteinu vázajícího vitamín D naopak jako proteiny se zvýšenou hladinou exprese ve vzorcích nádorové tkáně. Další práce identifikující β -řetězec hemoglobinu jako potenciální biomarker byly publikovány ve vztahu ke karcinomu vaječníku. Kozak *et al.* [25] identifikovali β -řetězec hemoglobinu spolu s transthyretinem, apolipoproteinem A1 a transferrinem metodou SELDI-TOF MS v kombinaci s micro-LC-MS/MS jako potenciální biomarkery časného stádia karcinomu vaječníku. Zvýšená hladina β -řetězce hemoglobinu byla jako jediná zjištěna ve vzorcích séra pacientek s nádorovým onemocněním, hladiny ostatních proteinů byly naopak zvýšeny v kontrolních sérech. Pokud jsou tyto markery použity v kombinaci s jediným běžně užívaným markerem karcinomu vaječníku CA125, je dosaženo o 8 % vyšší sensitivity v porovnání se samotným CA125 pro všechny histologické podskupiny, pro mucinózní tumory je sensitivity zvýšena dokonce o 31 %. Také Woong-Shick *et al.* [26] popsali oba řetězce hemoglobinu (α a β) jako markery karcinomu vaječníku ve studii 35 sér pacientek v porovnání s 10 kontrolními séry. V kombinaci s CA125 dosáhli téměř 99% sensitivity při detekci progresu onemocnění.

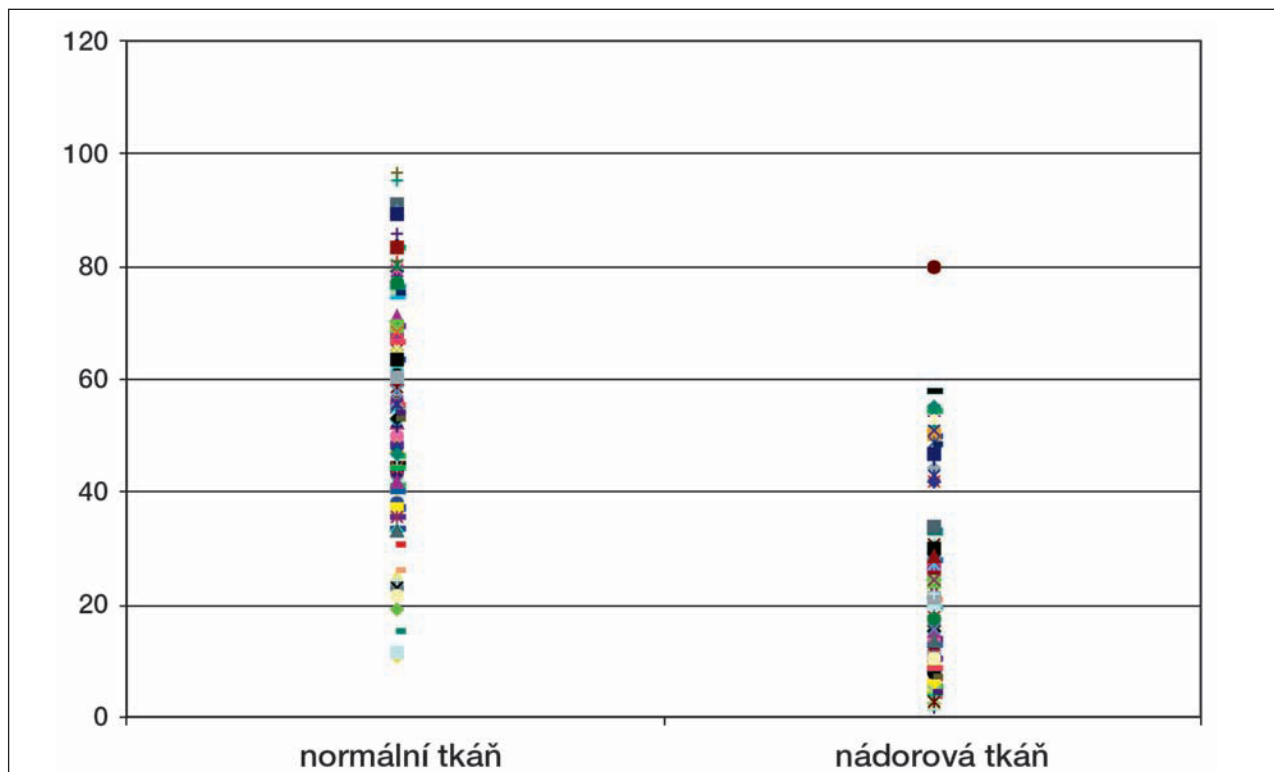
α a β řetězec hemoglobinu formují tetramer ($\alpha_2\beta_2$) primárně zodpovědný za transport kyslíku krví. Koncentraci hemoglobinu v séru již lze využít jako důležitý prediktivní faktor odpovědi na radioterapii či chemoterapii karcinomu prsu [27], dutiny ústní

a orofaryngu [28, 29]. Na druhou stranu hladina hemoglobinu v séru pacienta nesouvisí s anoxií nádoru [27].

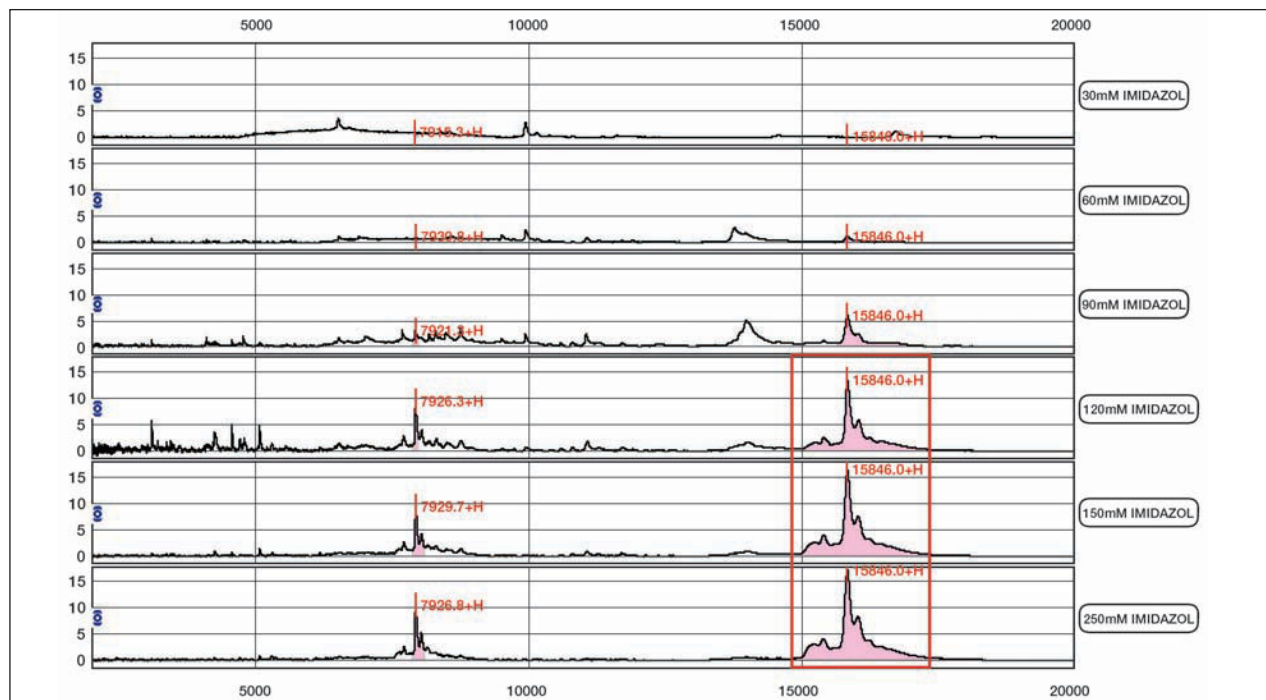
Naše výsledky ukazují na významné snížení hladiny β řetězce hemoglobinu v nádorové tkáni v porovnání s normální tkání, což je však zdánlivě v rozporu s analýzou vzorků tekutiny z mlékovodu. U pacientek s nádory vaječníku bylo pozorováno zvýšení sérové hladiny β řetězce hemoglobinu. Možným vysvětlením těchto rozporů je rozdílný podíl sérových složek na celkové extrahovatelné bílkovině v námi vyšetřených nádorových a normálních vzorcích. Stejný mechanismus (rozdílný podíl séra) se teoreticky mohl uplatnit i ve studii provedené na tekutině z mlékovodu, která byla získána po manuální masáži. Využití hemoglobinu jako prediktivního či prognostického markeru karcinomu prsu bude tedy nutné ověřit dalšími nezávislými studii. Vzhledem k poměrně nízké citlivosti metody SELDI-TOF MS se ukazuje jako nezbytné nalézt a využívat kombinace změn exprese několika proteinů u nádorových vzorků nebo sér pacientů s nádorovým onemocněním, charakterizující odlišné podskupiny onemocnění. Výsledky analýzy daného „fingerprintu“ u popisovaného souboru 105 karcinomů prsu jsou v současné době evaluovány na rozšířeném souboru karcinomů prsu ve vztahu ke klinicko-patologickým charakteristikám a k potenciálnímu využití jako biomarkerů nádorového onemocnění. Takto charakterizované proteinové expresní profily budou cenným doplňujícím zdrojem informací při histopatologické klasifikaci nádorů.

Poděkování

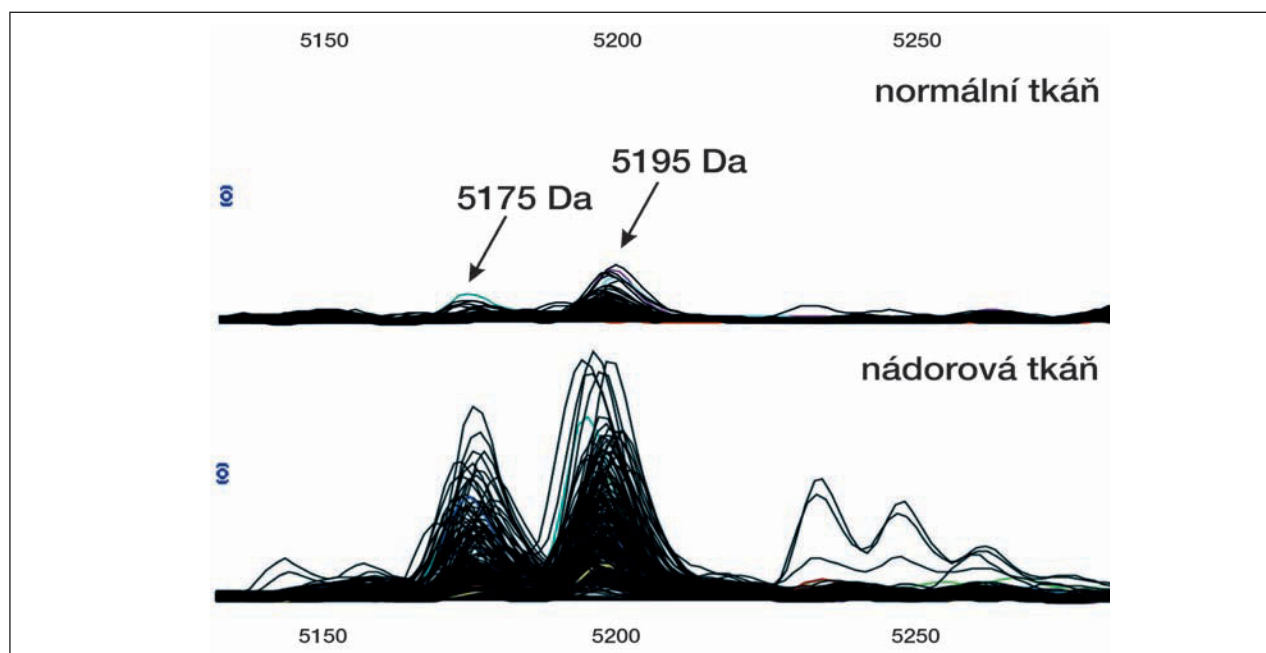
Tento projekt byl podporován z finančních zdrojů IGA MZ ČR NR 8338-3/2005.



Obr.1.: Intenzity signálu o m/z 15841 (vyjádřené jako plocha pod křivkou) pro normální a nádorovou tkáň



Obr.2.: Spektra jednotlivých frakcí v rozsahu 2 – 20 kDa po rozdělení směšného vzorku normální tkáně na IMAC koloně



Obr.3.: Překryv signálů vzorků normální a nádorové tkáně v oblasti 5175 a 5195 Da

Literatura

1. Tirumalai, R.S., et al., *Characterization of the low molecular weight human serum proteome*. Mol Cell Proteomics, 2003. **2**(10): p. 1096-103.
2. T. William Hutchens, T.-T.Y., *New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1993. **7**(7): p. 576-580.
3. Češková, P., et al., *Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limitace*. Chemické listy, 2006. **100**(11): p. 974-979.
4. Petricoin, E.F., et al., *Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer*. Lancet, 2002. **359**(9306): p. 572-7.
5. Petricoin, E.F., 3rd, et al., *Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(20): p. 1576-8.

6. Won, Y., et al., *Pattern analysis of serum proteome distinguishes renal cell carcinoma from other urologic diseases and healthy persons*. Proteomics, 2003. **3**(12): p. 2310-6.
7. Koopmann, J., et al., *Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 860-8.
8. Vlahou, A., et al., *A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2003. **4**(3): p. 203-9.
9. Becker, S., et al., *Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) differentiation of serum protein profiles of BRCA-1 and sporadic breast cancer*. Ann Surg Oncol, 2004. **11**(10): p. 907-14.
10. Laronga, C., et al., *SELDI-TOF serum profiling for prognostic and diagnostic classification of breast cancers*. Dis Markers, 2003. **19**(4-5): p. 229-38.
11. Mathelin, C., et al., *Serum biomarkers for detection of breast cancers: A prospective study*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **96**(1): p. 83-90.
12. Nakagawa, T., et al., *Proteomic profiling of primary breast cancer predicts axillary lymph node metastasis*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11825-30.
13. Gast, M.C., et al., *SELDI-TOF MS serum protein profiles in breast cancer: Assessment of robustness and validity*. Cancer Biomark, 2006. **2**(6): p. 235-48.
14. Ricolleau, G., et al., *Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors*. Proteomics, 2006. **6**(6): p. 1963-75.
15. Roesch Ely, M., et al., *Transcript and proteome analysis reveals reduced expression of calgranulins in head and neck squamous cell carcinoma*. Eur J Cell Biol, 2005. **84**(2-3): p. 431-44.
16. Pilny, R., et al., *Surface-enhanced laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry reveals significant artifacts in serum obtained from clot activator-containing collection devices*. Clin Chem, 2006. **52**(11): p. 2115-6.
17. Stein, R.C. and M.J. Zvelebil, *The application of 2D gel-based proteomics methods to the study of breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2002. **7**(4): p. 385-93.
18. Hathout, Y., et al., *Proteomic phenotyping: metastatic and invasive breast cancer*. Cancer Lett, 2004. **210**(2): p. 245-53.
19. Issaq, H.J., et al., *The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(3): p. 587-92.
20. He, J., et al., *Detection of breast cancer biomarkers in nipple aspirate fluid by SELDI-TOF and their identification by combined liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Int J Oncol, 2007. **30**(1): p. 145-54.
21. Sauter, E.R., et al., *Proteomic analysis of nipple aspirate fluid using SELDI-TOF-MS*. Int J Cancer, 2005. **114**(5): p. 791-6.
22. Diamandis, E.P., *Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(5): p. 353-6.
23. Pawlik, T.M., et al., *Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein*. BMC Cancer, 2006. **6**: p. 68.
24. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 994-9.
25. Kozak, K.R., et al., *Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer*. Proteomics, 2005. **5**(17): p. 4589-96.
26. Woong-Shick, A., et al., *Identification of hemoglobin-alpha and -beta subunits as potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of ovarian cancer*. Cancer Sci, 2005. **96**(3): p. 197-201.
27. Bottini, A., et al., *Pretreatment haemoglobin levels significantly predict the tumour response to primary chemotherapy in human breast cancer*. Br J Cancer, 2003. **89**(6): p. 977-82.
28. Glaser, C.M., et al., *Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of preoperative chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **50**(3): p. 705-15.
29. Kovacs, R., R. Wilhelm, and D. Heinrichsohn, *Survival of exclusively irradiated patients with NSCC. Significance of pretherapeutic hemoglobin levels*. Strahlenther Onkol, 1998. **174**: p. 128-32.

AUTOR PRO KORESPONDENCI:
 RNDr. Bořivoj Vojtěšek, DrSc.
 Oddělení klinické a experimentální patologie,
 Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, Brno, 656 53
 vojtesek@mou.cz

Došlo / Submitted: 23. 4. 2007
 Přijato / Accepted: 12. 9. 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.

URČENÍ HLADINY TERMOSTABILNÍCH THIOLŮ U PACIENTŮ SE ZHOUBNÝM NÁDOREM

LEVEL OF HEAT-STABLE THIOLS IN PATIENTS WITH A MALIGNANT TUMOR

FABRIK I.¹, ADAM V.¹, KRÍŽKOVÁ S.¹, KUKAČKA J.², PRŮŠA R.², TRNKOVÁ L.³, KIZEK R.^{1*}

¹LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ BIOCHEMIE A BIOELEKTROCHEMIE, ÚSTAV CHEMIE A BIOCHEMIE, MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA V BRNĚ

²ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A PATOBIOCHEMIE, UNIVERZITA KARLOVA 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PRAZE,

³ÚSTAV CHEMIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO

Souhrn

Úvod: Metallothionein (MT) je nízkomolekulární protein obsahující větší množství -SH skupin. V organismu se převážně stará o transport iontů kovů, ale byla potvrzena i jeho funkce jako zhášedce kyslíkových radikálů. V nedávné době byla prokázána jeho spojitost s nádorovým onemocněním, což jej staví do pozice možného nádorového markeru. Jeho stanovení by však nemuselo být tak složité a nákladné, jako je stanovení jiných nádorových markerů. Snažili jsme se optimalizovat elektrochemickou metodu, která by detekovala nejen metallothionein, ale i celkovou hladinu thiolů v krevním séru. **Metody:** Pro analýzu jsme použili vzorky krevních sér pacientů se zhoubným nádorem prsu z FN Motol. Analýza probíhala elektrochemickou metodou založenou na Brdičkově reakci. Bylo využito dvou různých postupů, DPV a DPV s využitím adsorptivního přenosu. **Výsledky:** Hladiny metallothioneinu byly u většiny pacientů průměrně $1,78 \pm 0,09 \mu\text{M}$, hladiny thiolů byly několikrát větší než hladiny MT, průměr ($77,92 \pm 3,90$) μM . Ukázalo se, že poměr mezi celkovým množstvím thiolů a hladinou metallothioneinu je relativně stálý, u většiny pacientů byl 37:1 (termostabilní thioly:metalothionein). **Závěr:** Podařilo se nám optimalizovat jak stanovení metallothioneinu, tak stanovení celkové hladiny celkových thiolů. Výsledky ukazují na vztah mezi hladinami MT a thiolů v krevním séru pacientů.

Klíčová slova: elektrochemie, prsy – nádory, proteiny, krev.

Summary

Backgrounds: Metallothionein (MT) is a low molecular protein rich in -SH groups. Transport of metal ions belongs to the main functions of this protein. In addition, MT can be considered a scavenger of reactive oxygen species. Recently an association of MT and malignant tumors was reported, suggesting a possible role of MT as a new potential tumor marker. Its detection could be easier and less expensive in comparison with other tumor markers. We attempted to optimize an electrochemical method detecting not only metallothionein but also the total level of thiols in human blood serum. **Methods:** We analyzed human blood serum samples from patients with malignant breast tumor from FN Motol. An analysis was performed by the electrochemical method based on the Brdicka reaction. Two different procedures were tested, DPV and DPV with AdTS technique. **Results:** The average level of metallothionein in human blood serum of patients with breast neoplasms was $1.78 \pm 0.09 \mu\text{M}$, but the total level of thiols was several times higher ($77.92 \pm 3.90 \mu\text{M}$). Based on the presented results, the obtained ratio between total level of thiols and metallothionein (37:1) is constant in most patients. **Conclusion:** We optimized the detection of both metallothionein and total thiols level in human blood serum. The level of MT was proportional to the total thiols level.

Keywords: Electrochemistry, Breast Neoplasms, Proteins, Blood.

Úvod

Biologický význam thiolových sloučenin není doposud uspokojivě prozkoumán. V této oblasti lze očekávat ještě celou řadu překvapení. Mezi intenzivně studované oblasti výzkumu thiolových sloučenin patří jejich vztah k hladině kyslíkových radikálů, iontů kovů, a regulaci transkripce a translace (1-5). Za možnost vstupu thiolových látek do zmíněných životně důležitých procesů je, kromě jiného, zodpovědná přítomnost thiolové skupiny (-SH) v jejich molekule. Jak je ukázáno na Obr. 1, přítomnost kyslíkových radikálů i narušení homeostázy těžkých kovů může negativně ovlivnit funkci nukleových kyselin. Zdá se ovšem, že mnohem důležitější

jsou pro správnou funkci nukleových kyselin regulační proteiny. A právě narušení regulace a případně struktury proteinů kyslíkovými radikály či těžkými kovy, které jsou schopny reaktivní formy kyslíku produkovat, může vést až ke vzniku zhoubných nádorů.

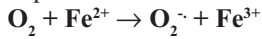
Kyslíkové radikály

V organismu se mohou vyskytnout volné kyslíkové radikály, které jsou produkovány buňkou samotnou (v dýchacím řetězci), anebo působením řady dalších enzymů jako například NADPH oxidáza: $\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_2^- + \text{NADP}^+ + \text{H}^+$

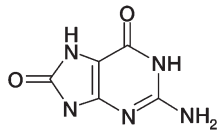
Kyslíkové radikály mohou vznikat i dalšími chemickými reakcemi katalyzovanými např. ionty těžkých kovů. Typickým příkladem vzniku reaktivních kyslíkových radikálů je reakce železnatých iontů s peroxidem vodíku (Fentonova reakce):



či přímá autoxidace železnatých iontů:



Biologická škodlivost kyslíkových radikálů je dána schopností následných oxidací základních složek buňky. Mohou tedy peroxidovat lipidy za vzniku uhlovodíkových radikálů a tak pozměnit strukturu a funkci biomembrán. V případě proteinů dochází k oxidaci aminokyselin, štěpení peptidové vazby a dalším změnám ve struktuře, funkci a protein-protein interakcích. Modifikované báze (purinové i pyrimidinové) mohou být z řetězce DNA odstraněny. Naneštěstí všechny tyto změny mohou vést ke vzniku jednořetězcových i dvouřetězcových zlomů DNA. Bylo prokázáno, že molekulou, která velmi dobře ukazuje na oxidační zatížení DNA, je modifikovaná báze 8-oxoguanin (6-8).



8-oxo guanin

Kyslíkové radikály a jejich vztah ke zdraví

Se zvýšenou hladinou kyslíkových radikálů je spojena celá řada fyziologických a patofyziologických procesů. Mezi významné patří zcela jistě *diabetes mellitus*, ateroskleróza, zánět, apoptóza, stárnutí, ischemické poškození anebo cystická fibróza. Bezpochyby do této skupiny náleží i mnoho dalších procesů, které probíhají jak ve zdraví, tak nemoci. Navíc toxického efektu kyslíkových radikálů je možné využít při terapii zhoubných nádorů. Pravděpodobně se tento efekt uplatňuje při ozařování i aplikaci léčiv. Léčiva vytvářející kyslíkové radikály následně poškozují DNA nádorových buněk (např. bleomycin, adriamycin). Podobně tomu je pokud se pro terapii používá retinová kyselina, která může vést k lipoperoxidaci biologických membrán. Na jedné straně je hledán léčebný efekt, avšak na straně druhé je potřebné chránit buňky zdravých tkání.

Protektivní efekt thiolových sloučenin

Nejnámějším ochranou molekulou ve všech buňkách je glutathion. Glutathion (GSH) byl objeven M. J. de Rey Pailhadem na konci 19. století jako substance nazvaná "hydrogénant le soufre", která byla přejmenována a charakterizována v roce 1921 F.G. Hopkinsem (9). Jeho přítomnost byla dokázána nejen u rostlin či živočichů, ale dokonce i u bakterií a kvasinek. Nejvíce jsou známy jeho antioxidační a detoxikační účinky za účasti enzymu glutathion-S-transferázy (10). Jeho role byla prokázána i při udržování homeostázy těžkých kovů v organismu. V případě ochrany buněk proti kyslíkovým radikálům je GSH oxidován za účasti enzymu glutathionperoxidázy na GSSG (Obr. 2). GSSG je následně redukován v askorbátovém

cyklu zpět na molekulu GSH. I další enzymy a molekuly jako například superoxidodismutáza, glutathionperoxidáza, kataláza, vitamín E, karotenoidy, koenzym Q, transferin či ceruloplazmin jsou schopny regulovat hladinu kyslíkových radikálů. Nicméně v experimentálních pracích bylo zjištěno, že některé další nízkomolekulární thiolové sloučeniny (např. na cystein bohatý protein metalothionein) mohou být velmi vhodnými protektivními látkami před účinkem kyslíkových radikálů (11). Byl studován ochranný efekt metalothioneinu na různých buněčných liniích. Podařilo se prokázat, že exprese a indukce metalothioneinu je asociována s oxidačním stresem a apoptózou buněk (12).

Význam metalothioneinu

Regulace hladiny iontů kovů je velmi významná a pravděpodobně klíčovým proteinem by mohl být metalothionein (13,14). Je to nízkomolekulární protein o molekulové hmotnosti 6-7 kDa, složený ze dvou domén (13,15,16). Každá z domén je schopná vázat ionty těžkých kovů. S ohledem na význam iontů kovů v regulaci buněčného dělení je hledána souvislost i mezi tímto proteinem a nádorovým onemocněním (16), jak je ukázáno na Obr. 3. Před patnácti lety byla ve světové databázi Web of Science zveřejněna první informace o vztahu metalothioneinu a zhoubného nádoru prsu (17). Později byla publikována práce na stovce pacientek, kde se autorům podařilo prokázat, že zvýšená hladina MT je asociována se špatnou prognózou onemocnění a naopak nízká hladina MT v nádorové tkáni indikovala dobrý prognostický typ (18). Podobných experimentálních výsledků dosáhli i další autoři (19-24). Zjištěná hladina MT byla v analyzovaných tkáních až třikrát vyšší proti kontrolní skupině. Na molekulární úrovni může být zvýšená exprese metalothioneinu u nádorů prsu spojena s dediferenciací nádorových buněk, jak bylo prokázáno v práci publikované v roce 1996 (25). Navíc byla pozorována vysoká korelace mezi hladinou zinku a metalothioneinu v nádorových tkáních z prsu (21). Kromě imonohistochemické detekce hladiny MT přímo v nádorové tkáni, byly navrhovány postupy využívající analýzy mRNA za použití RT-PCR (26-30). Zde se podařilo prokázat, že zvýšená hladina transkriptu MT je asociována se špatnou prognózou onemocnění a navíc hladina jedné z izoform MT zvané MT2A ukazuje na rychlý a invazivní růst nádoru (31). Podobně bylo potvrzeno, že MT zvyšuje rezistenci nádorových buněk na protinádorovou léčbu (32-34).

Cílem této práce bylo porovnat hladiny celkových thiolů a metalothioneinu v krevním séru u skupiny pacientů se zhoubným nádorem prsu.

Materiál a metody

Klinický materiál

Byla použita krevní séra od pacientů léčených pro zhoubný nádor prsu ve FN Motol, Praha. Krevní séra byla ihned zmrazena na -20 °C do doby jejich dalšího zpracování. Celkem bylo analyzováno 15 sér pacientů se zhoubným nádorem prsu. Průměrný věk pacientů činil 51 let a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení metalothioneinu

Po rozmrazení byla nejprve krevní séra naředěna ve fosfátovém pufru (pH 6,98). Poté byly vzorky umístěny

na 15 min. při 99 °C do termobloku (Eppendorf 5430, USA), následně ochlazený na 4 °C a centrifugován při 4 °C, 16 400 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA). Takto připravené vzorky byly analyzovány námi upraveným postupem diferenčně pulsní voltametrií (DPV) a diferenčně pulsní voltametrií ve spojení s adsorptivní přenosovou technikou (AdTS).

Elektroanalytické stanovení metalothioneinu pomocí Brdičkovy reakce metodou AdTS DPV

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodeovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou elektrodou ze skelného uhlíku. Základní elektrolyt (1 mmol.dm⁻³ Co(NH₃)₆Cl₃ a 1 mol.dm⁻³ a amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl, pH = 9,6) byl po každých 5 analýzách vyměněn (35). AdTS DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, E_{ads} = 0 V, teplota 4 °C (14,16).

Elektroanalytické stanovení celkového obsahu termostabilních thiolů pomocí Brdičkovy reakce metodou DPV

Vzorky byly analyzovány na přístroji 747 VA Stand ve spojení s 746 VA Trace Analyzer a 695 Autosampler (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodeovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou platinová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol.dm⁻³ Co(NH₃)₆Cl₃ a 1 mol.dm⁻³ a amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl, pH = 9,6) byl po každých 5 analýzách vyměněn (35). DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0,7 V, konečný potenciál -1,75 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 2 mV/s, modulační amplituda -250 mV, E_{ads} = 0 V, teplota základního elektrolytu 4 °C.

Výsledky a diskuse

Zhoubné nádory prsu jsou nejvíce rozšířeným zhoubným onemocněním u žen. V České republice je diagnostikováno více než 40 případů na 100 000 žen ročně (36,37). Tumorové markery obecně nejsou diagnostickou pomůckou, i když mohou poskytnout informaci, která může k diagnostickému postupu přispět. O výběru a nasazení tumorových markerů před terapií a v průběhu léčby se zpravidla rozhoduje na základě klinického a histologického nálezu. Avšak pro screening a diagnostiku onemocnění v časném stadiu je tento způsob obtížně aplikovatelný. Z tohoto důvodu jsou hledány jednoduché molekulární markery stanovitelné v snadno dostupných tělních tekutinách jako je krev, krevní sérum, moč apod. (38-41). Je tu však i jiný aspekt studia tumorových markerů a to sledování změn jejich hladin v průběhu terapie a po jejím skončení, kdy nám mohou poskytnout velmi časnou informaci o relapsu nádorového onemocnění mnohdy i měsíce před objevením klinických příznaků.

Význam thiolů

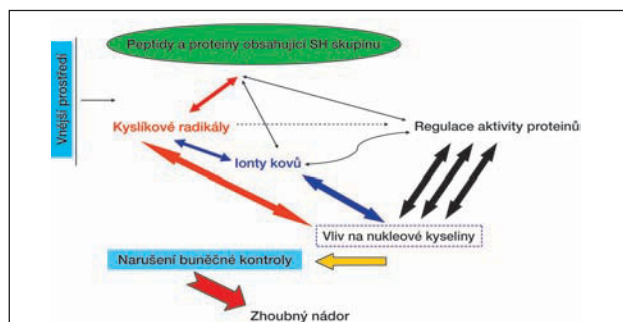
Thiolové sloučeniny hrají pravděpodobně významnou roli v regulaci buněčného dělení, i přestože je doposud o přesných mechanismech známo velmi málo. Avšak bylo prokázáno, že hladina metalothioneinu je zvýšená u pacientů s řadou nádorových onemocnění a studovat jeho hladinu má u pacientů se zhoubnými nádory význam. Doposud všechny metody pro určení množství metalothioneinu ve tkáních byly založeny na imunohistochemickém stanovení tohoto proteinu v nádorové tkáni. Takový způsob určení vyžaduje biotické odebrání tkáně a poměrně náročné zpracování vzorku. Navíc není možné získaných výsledků využívat pro monitorování hladiny proteinu. Nedávno jsme navrhli unikátní postup umožňující analýzu metalothioneinu přímo v krevním séru (16). Metoda je založena na denuraci interferujících proteinů a interakci termostabilního metalothioneinu přímo s detekčním zařízením (elektrodou).

Pro tento účel bylo v naší laboratoři vyvinuto stanovení metalothioneinu pomocí techniky adsorptivního přenosu. Technika umožňuje provádět analýzu obsahu metalothioneinu ve vzorku velmi rychle a spolehlivě (14,16). Nevýhodou je však nezbytnost kvalifikované obsluhy a zatím obtížná automatizace celého postupu. Aby bylo možné provádět sériové analýzy velkého počtu vzorků byl hledán vhodný způsob takové detekce thiolových sloučenin, který umožňuje nepřetržitý automatický provoz. Pro tento účel se zdá být velmi vhodný automatický podavač vzorků s možností nabírání malého množství vzorku (Obr. 4). Přístroj je složen ze tří částí; 747 VA Stand, elektrochemická měrná jednotka se standardním tříelektrodeovým zapojením ve spojení s potenciostatem; 746 VA Trace Analyzer, sloužící jako sekce na zpracování informací odeslaných z 747 VA Stand a 695 Autosampler, obstarávající dávkování vzorku. Dalšími součástmi zařízení jsou nádoby s promývací vodou a elektrolytem. Vzorek je umístěn na termostátovaném zásobníku vzorků (při teplotě 5 °C). Za pomoci tří mikroprocesorem řízených pístových pump je možné provést automatické promytí pracovní nádoby destilovanou vodou (v našem případě promytí probíhá 3 × 25 ml MiliQ vody). Po odsátí veškeré tekutiny je do nádoby automaticky pipetován roztok základního elektrolytu o objemu 1,920 ml při teplotě přibližně 4 °C. Poté je díky ramenu s dávkovacím zařízením odebrán vzorek (o požadovaném objemu). Dávkovací zařízení je následně omyto a vzorek přenesen do měřicí nádoby. Samotné měření je složeno z několika po sobě jdoucích dějů. První dvě minuty probíhá akumulace vzorku z elektrolytu na visící rtuťovou kapku při otevřeném okruhu potenciálu. Po uplynutí doby určené k akumulaci se již při měnicím se napětí začnou odečítat proudové hodnoty a ty jsou poté zpracovány 746 VA Trace Analyzorem, který výsledné křivky může odeslat do stolního počítače. Samotné vyhodnocování křivek je prováděno na příslušném softwaru, v našem případě GPES 4.9. Po ukončení měření je obsah nádoby odsán a celý cyklus se opakuje znovu. Veškeré měření probíhá plně automaticky pod kontrolou mikroprocesoru a měření jednoho vzorku proběhne do 5 minut. Opakovatelnost stanovení se pohybuje okolo 10 %. Voltametrické záznamy standardu MT a elektrolytu jsou ukázány na Obr. 5a. Z křivek je jasně viditelný rozdíl v průběhu elektrochemické analýzy.

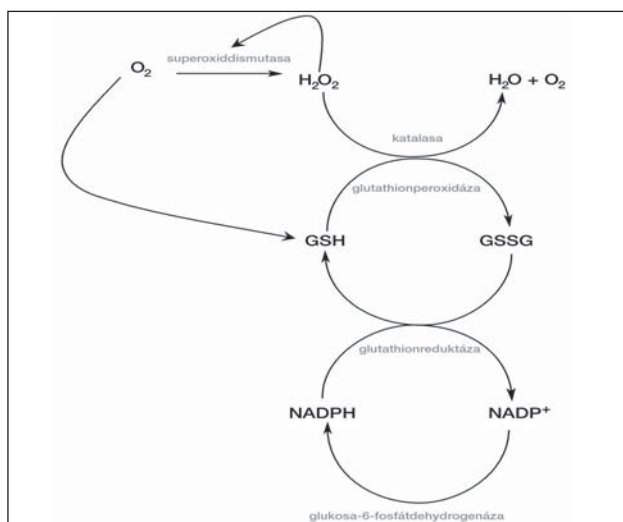
původní práce

Pro kvantifikaci je využíván signál Cat2. Získaná kalibrační křivka je zobrazena na Obr. 5b. Závislost výšky studovaného signálu MT byla v rozmezí 0 – 5 μM lineární. Technika byla dále použita pro analýzu krevních sér pacientů s nádory prsu. Získané voltmetrické křivky jsou zobrazeny na Obr. 5. V případě, že je provedena výše popsaná DPV analýza vzorku krevních sér, jsou kromě metalothioneinu stanoveny další termostabilní thiolu přítomné ve vzorku. Proto nás zajímalo, jakým způsobem se budou lišit výsledky elektrochemické detekce metalothioneinu a celkových termostabilních thiolů ve stejných vzorcích.

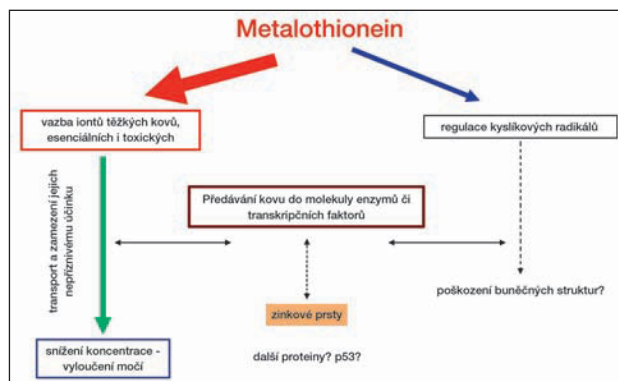
Průměrné hodnoty hladiny metalothioneinu v krevních sérech pacientů s nádorem prsu naměřené metodou DPV s využitím techniky adsorptivního přenosu byly $1,78 \pm 0,09 \mu\text{M}$ (Obr. 6a). Zjištěné koncentrace thiolů byly podle očekávání několikrát vyšší než hladina metalothioneinu. Průměrná koncentrace termostabilních thiolů byla $77,92 \pm 3,90 \mu\text{M}$ a jednotlivé hodnoty relativně dobře kopírují koncentrace metalothioneinu naměřené AdTS DPV technikou (Obr. 6b). Koncentrační poměr thiolů ku metalothioneinu byl stabilní, průměrná hodnota činila 37:1 (termostabilní thiolu:metalothionein) u dvanácti pacientů z patnácti (Obr. 6c). U tří pacientů byl tento poměr několikrát zvýšený a byl roven 197:1. Lze očekávat, že změna poměru mezi hladinou metalothioneinu a hladinou celkových thiolů se mění v období prováděné terapie a bylo by velmi zajímavé ji v dalších studiích sledovat.



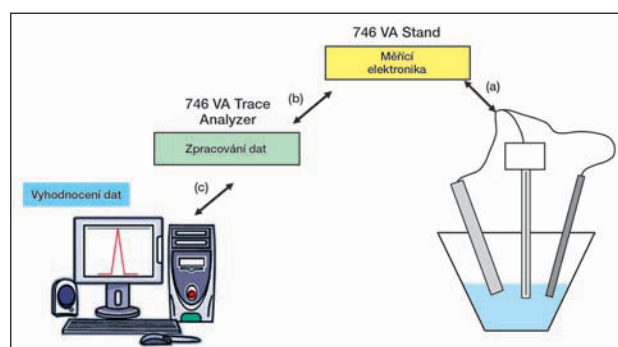
Obr. 1: Schéma významu thiolových sloučenin v regulaci hladiny iontů těžkých kovů a kyslíkových radikálů.



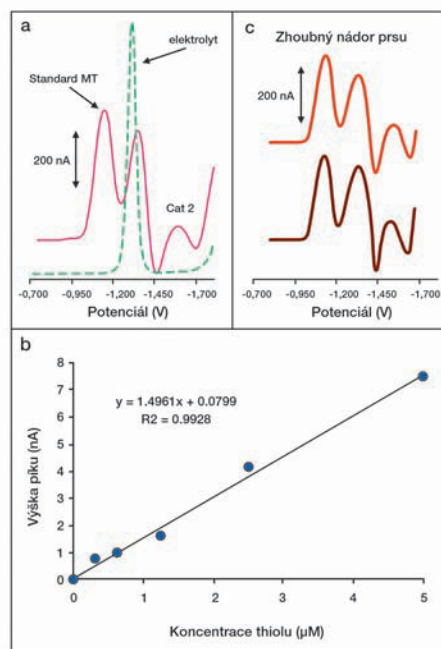
Obr. 2: Využití glutathionu v oxidačních dějích vedoucích k zneškodnění kyslíkových radikálů.



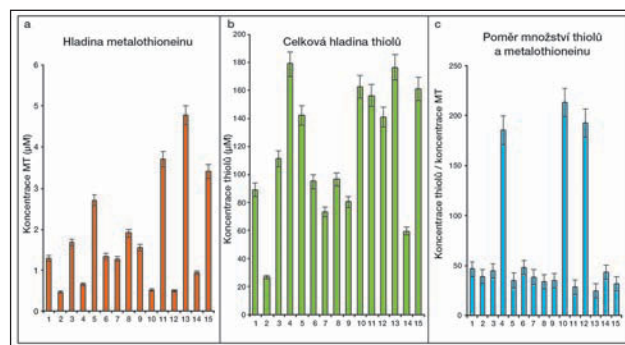
Obr. 3: Funkce metalothioneinu v organismu. Protein je ve většině případů využit dvěma způsoby – jako přenašeč těžkých kovů nebo jako antioxidant.



Obr. 4: Schéma analýzy thiolových sloučenin za využití elektrochemie. Na měřicí jednotku s potenciostatem jsou připojeny elektrody (a). Naměřené hodnoty jsou odeslány do další jednotky, kde jsou zpracovány (b). Nakonec mohou být data vyhodnocena stolním PC, které je propojeno s měřicím zařízením (c).



Obr. 5: Diferenční pulzní voltamogramy thiolových sloučenin (a) zelená čerchovaná čára je signál základního elektrolytu, červená plná čára metalothionein (100 nM). (c) Závislost výšky signálu Cat2 metalothioneinu na jeho koncentraci. (b) voltamogramy krevních sér pacientů s nádorem prsu.



Obř. 6: Naměřené hladiny thiolů a metalothioneinu v krevních séřech pacientů se zhoubným nádorem prsu. (a) hladina metalothioneinu, (b) celková hladina thiolů, (c) výsledný poměr hodnot hladin thiolů a metalothioneinu. Každá analýza byla provedena 3×.

Závěr

Naše analýzy ukázaly, že nejen hladina metalothioneinu je závislá na nádorovém onemocnění. S koncentrací metalothioneinu narůstá i koncentrace thiolů obsažených v krevním séru pacientů s nádorovým onemocněním prsu. Navíc poměr těchto hodnot je relativně konstantní. Těmito výsledky jsme ověřili, že elektrochemická detekce je vhodnou alternativou k běžnému způsobu stanovování metalothioneinu, a že jsme schopni snadno a rychle určit hodnotu thiolů v krevním séru.

Poděkování

Práce na tomto projektu byla podpořena projektem Liga proti rakovině Praha 2006 a Během Terryho Foxe 2007.

Literatura

- Kowaltowski A J, Vercesi A E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;26(3-4):463-471.
- Squadrito G L, Pryor W A. Oxidative chemistry of nitric oxide: The roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic. Biol. Med.* 1998;25(4-5):392-403.
- Sen C K, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J.* 1996;10(7):709-720.
- Gilbert H F. Molecular and Cellular Aspects of Thiol Disulfide Exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1990;63:69-172.
- Barron E S G. Thiol Groups of Biological Importance. *Adv. Enzymol. Relat. Subjects Biochem.* 1951;11(201-266).
- Helbock H J, Beckman K B, Shigenaga M K, et al. DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95(1):288-293.
- Michaels M L, Cruz C, Grollman A P, et al. Evidence That Muty and Mutm Combine to Prevent Mutations by an Oxidatively Damaged Form of Guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89(15):7022-7025.
- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, et al. 8-Oxoguanine (8-Hydroxyguanine) DNA Glycosylase and Its Substrate-Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991;88(11):4690-4694.
- Hopkins F G. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem. J.* 1921;15(2):286-305.
- Meister A, Anderson M E. Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* 1983;52:711-760.
- Humanen D, Chan H M, Kubow S. The protective effect of metallothionein against lipid peroxidation caused by retinoic acid in human breast cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997;283(3):1520-1528.
- Fan L Z, Cherian M G. Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *Br. J. Cancer* 2002;87(9):1019-1026.
- Zelena J, Potesil D, Vacek J, et al. Metallothionein jako prognostický marker nádorového onemocnění. *Klinická Onkologie* 2004; 17(6):190-195.
- Petrova J, Blastik O, Prusa R, et al. Analýza obsahu metalothioneinu u pacientů se zhoubným nádorem prsu, tlustého střeva a nebo melanomem. *Klinická Onkologie* 2006;19(2):138-142.
- Kukacka J, Vajtr D, Huska D, et al. Blood metallothionein, neuron specific enolase, and protein S100B in patients with traumatic brain injury. *Neuroendocrinol. Lett.* 2006;27(Suppl. 2):116-120.
- Petrova J, Potesil D, Mikelova R, et al. Attomole voltammetric determination of metallothionein. *Electrochim. Acta* 2006;51(24):5112-5119.
- Reid A, Pereira H, Galea M, et al. Metallothionein Expression in Human Breast-Cancer. *J. Pathol.* 1992;168(Suppl. S):A100-A100.
- Goulding H, Jasani B, Pereira H, et al. Metallothionein Expression in Human Breast-Cancer. *Br. J. Cancer* 1995;72(4):968-972.
- Nadji M, Fresno M, Herrera A, et al. Metallothionein Is a Predictor of Tumor Aggressiveness in Node-Negative Breast-Cancer. *Lab. Invest.* 1994;70(1):A19-A19.
- Ioachim E, Kamina S, Demou A, et al. Immunohistochemical localization of metallothionein in human breast cancer in comparison with cathepsin D, stromelysin-1, CD44, extracellular matrix components, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR, steroid receptor content and proliferation. *Anticancer Res.* 1999;19(3A):2133-2139.
- Florianczyk B, Grzybowska L. Metallothionein and zinc level in breast cancer. *J. Tumor Marker Oncol.* 1999;14(4):23-27.
- Ioachim E, Tsanou E, Briasoulis E, et al. Clinicopathological study of the expression of hsp27, pS2, cathepsin D and metallothionein in primary invasive breast cancer. *Breast* 2003;12(2):111-119.
- Bay B H, Jin R X, Huang J X, et al. Metallothionein as a prognostic biomarker in breast cancer. *Exp. Biol. Med.* 2006;231(9):1516-1521.
- Popiela T J, Rudnicka-Sosin L, Dutsch-Wicherek M, et al. The metallothionein and RCAS1 expression analysis in breast cancer and adjacent tissue regarding the immune cells presence and their activity. *Neuroendocrinol. Lett.* 2006;27(6):786-794.
- Oyama T, Takei H, Hikino T, et al. Immunohistochemical expression of metallothionein in invasive breast cancer in relation to proliferative activity, histology and prognosis. *Oncology* 1996;53(2):112-117.
- Jin R, Bay B H, Chow V T K, et al. Metallothionein 1E mRNA is highly expressed in oestrogen receptor-negative human invasive ductal breast cancer. *Br. J. Cancer* 2000;83(3):319-323.
- Barnes NL, Ackland ML, Cornish EJ. Metallothionein isoform expression by breast cancer cells. *Int J. Biochem. Cell Biol.* 2000;32(8):895-903.
- Sens M A, Beall C L, Sens D A. Metallothionein isoform 3 (MT-3) expression in breast cancer. *Mod. Pathol.* 2001;14(1):36A-36A.
- Sens M A, Beall C L, Sens D A. Metallothionein isoform 3 (MT-3) expression in breast cancer. *Lab. Invest.* 2001;81(1):36A-36A.
- Tai S K, Tan O J K, Chow V T K, et al. Differential expression of metallothionein 1 and 2 Isoforms in breast cancer lines with different invasive potential - Identification of a novel nonsilent metallothionein-1H mutant variant. *Am. J. Pathol.* 2003;163(5):2009-2019.
- Jin R X, Chow V T K, Tan P H, et al. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis* 2002;23(1):81-86.
- Sens M A, Gurel V, Somji S, et al. Metallothionein isoform 3 (MT-3) inhibits growth and increases chemotherapeutic drug resistance of breast cancer cells. *Mod. Pathol.* 2002;15(1):51A-51A.
- Sens M A, Gurel V, Somji S, et al. Metallothionein isoform 3 (MT-3) inhibits growth and increases chemotherapeutic drug resistance of breast cancer cells. *Lab. Invest.* 2002;82(1):51A-51A.

původní práce

34. Surowiak P, Paluchowski P, Dziegiel P, et al. Lack of relationship between metallothionein (MT) expression and proliferation exponents in cells of primary ductal breast cancer of G2 grade of differentiation. *Med. Sci. Monitor* 2004;10(8):BR300-BR305.
35. Brazdova M, Kizek R, Havran L, et al. Determination of glutathione-S-transferase traces in preparations of p53 C-terminal domain (aa320-393). *Bioelectrochemistry* 2002;55(1-2):115-118.
36. Geryk E, Kolcova V, V. M. Vývoj epidemiologických ukazatelů zhoubného nádory prsu. *Klinická Onkologie* 1994;7(1):14-22.
37. Skovajsova M, H. B, Danes J. Screening nádorů prsu v České republice. *Klinická Onkologie* 2004;17(2):46-48.
38. Janku F, Srovnal J, Korinkova G, et al. Detekce minimální residuální choroby v kostní dřeni pacientek s časným karcinomem prsu technikou kvantitativní RT-PCR v reálném čase pro karcinoembryonální antigen. *Klinická Onkologie* 2006;19(1):15-18.
39. Šimickova M, Petrakova K, Pecen L, et al. Prediktivní význam sérového HER-2/neu u nemocných s karcinomem prsu léčených Herceptinem. *Klinická Onkologie* 2005;18(1):23-26.
40. Vaclavikova R, Hubackova M, Kubala E, et al. Expres genu mnohočetné lékové rezistence 1 (mdr1) a její význam v rozvoji a terapii karcinomu prsu. *Klinická Onkologie* 2007;20(3):253-259.
41. Sopkova B. Prognostické faktory karcinomu prsu. *Klinická Onkologie* 1988;1(3):92-94.

Korespondenční adresa:
PhDr. Rene Kizek, Ústav chemie a biochemie Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemedelska 1, 613 00 Brno,
e-mail: kizek@sci.muni.cz,

Došlo / Submitted: 21. 6. 2007
Přijato / Accepted: 31. 7. 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.

informace





www.ivwesgo.cz

We would like to invite you to Prague for **IVW 2008**

**International VideoWorkshop
on radical surgery in gynecological oncology
Prague, Czech Republic, March 29 – April 1, 2008**

Dr. David Cibula – Chairman of the IVW

Invited faculty	Main Topics
Nadeem R. Abu-Rustum USA	<ul style="list-style-type: none"> • Different radicality of hysterectomy – type II; type III; nerve sparing; laterally extended parametrectomy; radical parametrectomy; nerve sparing; extrafascial; etc. • Technique of lymphadenectomy – pelvic; paraaortic; inguinofemoral; sentinel node detection, extraperitoneal; etc. • Cytoreductive surgery – diaphragm stripping/resection; peritonectomy; liver resection; pancreatic surgery; splenectomy; thoracic surgery • Advanced technology – electrosurgery; robotic surgery; laser; etc. • Avoidance and management of complications – vascular injuries; ureteral injuries; bowel injuries; pelvic bleeding; lymphocysts; etc.
Frederic Amant Belgium	
Ali Ayhan Turkey	
Uzi Beller Israel	
Pierluigi Benedetti-Panici Italy	
John F. Bogges USA	
David Cibula Czech Republic	
Gerald Gitsch Germany	
Annette Hasenburg Germany	
Eric Leblanc France	
Milos Mlyncek Slovakia	
Christophe Pomel France	
Francesco Raspagliesi Italy	
Laszlo Ungar Hungary	
Arnaud Wattiez France	

Deadline for abstract submission: December 15, 2007 - see www.ivwesgo.cz

Congress Organizer – GUARANT International spol. s.r.o.
Address: Opletalova 22, Prague, Czech Republic
Phone: +420 284 001 444, Fax: +420 284 001 448, Email: ivwesgo@guarant.cz

Meeting is endorsed by the
European Society of Gynaecological Oncology
European Society for Gynaecological Endoscopy





NUKLEOFOSMIN S AKTIVITOU STIMULUJÍCÍ PROLIFERACI NEBO NAOPAK POTLAČUJÍCÍ RŮST NÁDORU

NUKLEOPHOSMIN WITH PROLIFERATIVE OR GROWTH-SUPPRESSIVE ACTIVITY

FUCHS O.

ÚSTAV HEMATOLOGIE A KREVNÍ TRANSFUZE, PRAHA

Souhrn

Východiska: Nukleofosmin (NPM) je silně zastoupený multifunkční fosfoprotein s funkcí nádorového supresoru i onkogenu. NPM hraje klíčovou úlohu ve tvorbě ribozomů a podporuje tak růst buněk a jejich proliferaci. NPM udržuje stabilitu genomu řízením mechanismu opravy DNA a duplikace centrozomu. NPM ovlivňuje stabilitu a aktivitu nádorového supresoru p53 a účastní se i apoptotické odpovědi na stres a působení onkogenů a tím ovlivňuje dráhy nádorových supresorů. Chromozomální translokace zahrnující gen *NPM1* byly nalezeny u myeloidních i lymfoidních malignit. Fúzní proteiny inhibují aktivitu nízkých hladin divokého typu *NPM1* a to přispívá k tvorbě nádoru. NPM se však chová jako nádorový supresor v nádorech, když exprese NPM je snížena a je změněna i distribuce NPM v buňce. Ke zvýšené expresi *NPM1* dochází u solidních nádorů a lymfoidních malignit. Zvýšené množství *NPM1* stimuluje akumulaci nádorového supresoru ARF ("alternative reading frame") v inaktivním stavu v jádru buněk, inhibuje aktivaci p53 a stimuluje růst buněk. Dráha p53 je cílem protinádorové terapie. Heterozygotní mutace genu *NPM1* jsou nejčastějšími genetickými defekty u akutní myeloidní leukémie (AML) s normálním karyotypem. **Cíl:** Analýza současných znalostí o nukleofosminu a jeho úloze u maligních nádorů a pochopení jeho úlohy v ontogeneze je nezbytné pro vývoj nových cílených postupů v terapii těchto onemocnění. **Závěry:** Detekce mutací genu *NPM1* umožní rozčlenit heterogenní skupinu AML s normálním karyotypem do prognosticky rozdílných podskupin. Poznání mechanismu účinku mutovaného *NPM1* usnadní vývoj nových chemoterapeutik. Zvýšená exprese *NPM1* může být použita jako jeden z nádorových markerů u solidních nádorů a lymfoidních malignit. Metoda použití malých interferujících RNA (si RNA) je příslibem nové strategie v terapii anaplastického velkobuněčného lymfomu s chromozomální přestavbou t(2;5).

Klíčová slova: nukleofosmin, protein p (ARF), centrozom, apoptóza, fúzní proteiny, mutace

Summary:

Backgrounds: Nucleophosmin (NPM) is an abundant multifunctional phosphoprotein with both tumor-suppressor and oncogenic functions. NPM plays a key role in ribosome biogenesis, supporting cell growth and proliferation. NPM maintains genomic stability by controlling DNA repair mechanisms and centrosome duplication. NPM modulates the stability and the activity of the tumor suppressor p53 and is involved in the apoptotic response to stress and oncogenes action, thus contributing to the modulation of growth-suppressive pathways. Chromosomal translocations involving the *NPM1* gene were found in myeloid and lymphoid cancers. The fusion proteins inhibit the activity of low levels of wild type *NPM1* and this event induces tumorigenesis. However, NPM behaves as a tumor suppressor in tumors when NPM expression is reduced and its subcellular distribution altered. *NPM1* is also frequently overexpressed in both solid tumors and lymphoid cancers. The increased levels of NPM promote increased accumulation of alternative reading frame (ARF) in an inactive nucleolar state, inhibit p53 activation and stimulate growth. The p53 pathway is a target of anti-cancer therapeutics. Heterozygous mutations of *NPM1* gene are the most frequent genetic lesions in acute myeloid leukemia with normal karyotype. **Design:** The analysis of contemporary knowledge about nucleophosmin and its role in cancer and understanding of its significance in oncogenesis is necessary for the development of new target procedures in therapy of cancer. **Conclusions:** Detection of *NPM1* mutations allows to divide the heterogeneous group of AML with normal karyotype into prognostically different subgroups. Understanding of the mechanism how mutant *NPM1* effects leukemogenesis will facilitate the development of new chemotherapeutic agents. *NPM1* overexpression can be used as one of tumor markers in carcinomas and lymphoid malignancies. The method of small interfering RNA (siRNA) employment represents a promise of a new strategy in anaplastic large cell lymphoma with chromosomal translocation t(2;5) treatment.

Key words: nucleophosmin, p(ARF) protein, centrosome, apoptosis, fusion proteins, mutation

Úvod

Nukleofosmin (*NPM1*, také známý pod označeními numatrin, B23 a NO38) je multifunkční protein, který je nezbytný pro normální embryonální vývojsavců. Inaktivace genu kódujícího mRNA pro tento protein vede u embrya myši k vývojovým poruchám, především předního mozku

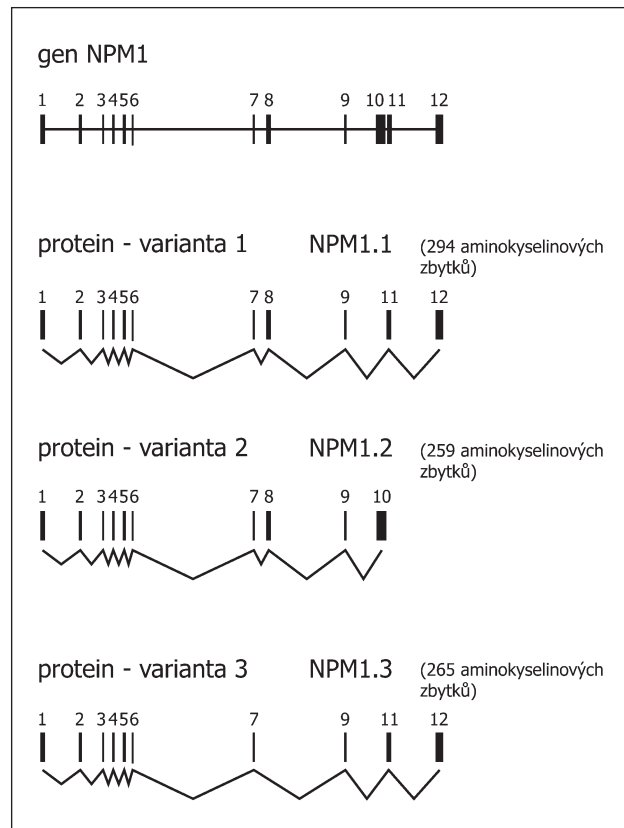
a hematopoézy (1). Uvedené poruchy v embryonálním vývoji jsou částečně způsobeny ztrátou funkce *NPM1* v regulaci duplikace centrozomu (2,3) během mitózy a tím vzniklé nestability genomu a také defekty v biogeneze ribozomů (4-6). Nukleofosmin patří do rodiny jaderných chaperonů zabraňujících agregaci proteinů a tvorbě

nespecifických nukleoproteinových komplexů (7). Řadí se sem společně s nukleoplazminem (NPM2) a proteinem NPM3 (7-9). NPM1 byl poprvé nalezen v jádru buněk jako silně zastoupený fosfoprotein (10,11). NPM1 má důležitou úlohu v již uvedené biogeneze ribozomů a to ve zpracování 47S pre-ribosomální RNA a tvorbě ribozomů (12) a účastní se i na remodelaci chromatinu, tedy změně jeho struktury z kondenzovaného do rozvolněného stavu. Tato změna struktury chromatinu silně ovlivňuje regulaci transkripce (13-15). NPM1 vykazuje často velmi zvýšenou expresi u nádorů (16), zvláště karcinomů žaludku (17), tlustého střeva a konečníku (18), vaječníků (19) a prostaty (20). Vysoká exprese NPM1 je považována za nádorový marker uvedených karcinomů. Četné mutace a translokace odpovídajícího genu *NPM1* byly nalezeny u hematologických malignit (21-29). Naopak, mutace genu *NPM1* nebyly nalezeny u karcinomů jater, plic, prsu, tlustého střeva a žaludku (30). Snížená exprese NPM1 je spojena s diferenciací buněk a s apoptozou (31,32). Inhibice exprese NPM1 pomocí uměle připravených oligonukleotidů komplementárních k určitému úseku mRNA pro NPM1 a inhibujících translaci této mRNA, ukázala, že NPM1 hraje klíčovou úlohu v rezistenci maligních buněk na indukci diferenciací a apoptozu (31,32). NPM1 se váže na řadu buněčných a virových proteinů a má vliv na jejich umístění v buňce a fyziologickou funkci. Významná je například stabilizace a zvýšení transkripční aktivity nádorového supresoru p53 pomocí interakce NPM1 s ubikvitinligázou Hdm2, která je lidským homologem myši Mdm2 (“murine double minute”) a interakce NPM1 se samotným p53 (33,34).

Gen *NPM1*, mRNA a protein

Lidský gen *NPM1* má velikost 25 kb, obsahuje 12 exonů (obr.1) a byl mapován na chromozomu 5q35 (7,35,36). Chan et al. (37) popsali sekvenci nukleotidů komplementární DNA (cDNA) pro NPM1, která odpovídala proteinu o 294 aminokyselinových zbytcích. Existují ještě další dvě izoformy tohoto proteinu, které vznikají alternativním sestřihem pre-mRNA pro NPM1. Isoforma NPM1.2 (obr.1) neobsahuje aminokyselinové zbytky kodované 11. a 12. exonem. Varianta NPM1.2 je tedy zkrácena na C-konci a obsahuje celkem 259 aminokyselinových zbytků. Zatím co izoforma NPM1 se nachází ve velké koncentraci hlavně v jádru buněk, izoforma NPM1.2 je přítomna v buňkách v malém množství a byla nalezena jak v cytoplazmě, tak v nukleoplazmě (38). Třetí izoforma NPM1.3 (obr.1) neobsahuje aminokyselinové zbytky odpovídající exonům 8 a 10 a její funkce není zatím objasněna.

Struktura proteinu NPM1 je schematicky znázorněna na obr.2. Dvě hydrofobní oblasti proteinu bohaté na leucinové zbytky umožňují transport NPM1 z jádra do cytoplazmy a jsou označeny NES (“nuclear export signal”). NPM1 divokého typu nese však slabý fyziologický NES a proto se nachází téměř výhradně v jádru. Toto umístění NPM1 je dále podpořeno fyziologickými signály NLS (“nuclear localization signal”) a NoLS (“nucleolus localization signal”) na C-konci proteinu NPM1. Mutace v oblasti NES způsobí, že NPM1 ztrácí schopnost exportu z jádra do cytoplazmy a hromadí se v jádru buněk. Tyto mutace

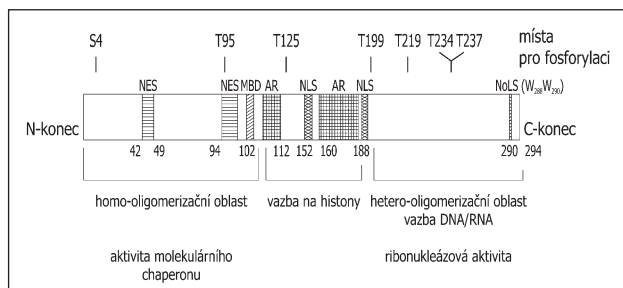


Obr.1.: Schema lidského genu *NPM1* a tří variant produktu jeho exprese.

se však nevyskytují a naopak běžné mutace NPM1 vytváří často další motiv NES na C-konci proteinu NPM1 a takto mutovaný NPM1 se vyskytuje v cytoplazmě. Pro motiv NoLS jsou charakteristické dva aromatické tryptofanové zbytky (W_{288} a W_{290}) a mutace těchto W brání umístění NPM1 v jádru buněk. N-koncová oblast NPM1 je odpovědná za oligomerizaci NPM1 a za jeho aktivitu chaperonu (7). NPM1 se vyskytuje převážně jako oligomer o hmotnosti 230-250 kDa a to odpovídá hexameru (39,40). NPM1.2 existuje také ve formě oligomeru. N-koncová hydrofobní oblast NPM1 brání agregaci proteinů v jádru buněk a umožňuje acetylaci histonů, rozvolnění chromatinu a zvýšenou transkripční aktivitu (15). Aktivita NPM1 jako chaperonu závisí také na první z dvou kyselých oblastí (AR, “acidic region”, obr.2), bohatých na zbytky kyseliny asparagové a kyseliny glutamové, které se nachází uprostřed proteinu NPM1 (37). Tato negativně nabitá oblast váže bazické ribosomální proteiny a tím brání nespecifickým interakcím mezi ribosomálními proteiny a rRNA během sestavování ribozomů v jádru buněk. Tato oblast AR také obsahuje Ser 125, hlavní cílové místo účinku kaseinkinázy II (CK2) (41). Oblast mezi oběma AR a oblast C-konce NPM1 vykazuje aktivitu ribonukleázy. Oblast na C-konci vykazuje také heterooligomerizační aktivitu a aktivitu vázat nukleové kyseliny (obr.2).

Fosforylace NPM1

Protein NPM1 obsahuje několik míst, která jsou fosforylována během buněčného cyklu. Kromě již



Obr.2: Schematické znázornění jednotlivých funkčních oblastí proteinu NPM1 a míst pro jeho fosforylaci

zmíněné fosforylace Ser 125 jsou na obr. 2 znázorněny další cílová místa fosforylace. Na cyklinech B a E závislé protein kinázy cdk1 a cdk2 se podílejí na fosforylaci těchto míst. Treoninové zbytky T199, T219, T234 a T237 v C-koncové části proteinu NPM1 jsou cílovými místy fosforylace pomocí cdk1 (42). Fosforylace NPM1 pomocí CK2 v interfázi a pomocí cdk1 v mitoze snižuje afinitu NPM1 ke složkám jadérka a zvyšuje jeho pohyblivost a umístění v nukleoplazmě (42). Fosforylace NPM1 také mění strukturu NPM1 a zvyšuje jeho negativní náboj zvláště v C-koncové oblasti a tím i afinitu k nukleovým kyselinám, tedy k pre-rRNA v jadérku. Fosforylace NPM1 pomocí cdk2 hraje úlohu v iniciaci duplikace centrozomu (43). Cdk2 v komplexu s cyklinem E fosforyluje NPM1 na Thr 199 a způsobí disociaci NPM1 od centrozomu a jeho duplikaci. NPM1 asociuje specificky s neduplikovaným centrozomem a disociuje od něho po fosforylaci Thr 199 pomocí cdk2 v pozdní fázi G1 buněčného cyklu.

Mikroinjekce protilátky proti NPM1 brání fosforylaci pomocí komplexu cdk2 s cyklinem E a tím disociaci NPM1 od centrozomu a duplikaci centrozomu. Mutovaný NPM1 postrádající Thr 199 a tedy nefosforylovatelný pomocí komplexu cdk2 s cyklinem E brání též duplikaci centrozomu.

Plk1 ("Polo-like kinase") fosforyluje specificky během mitózy Ser 4 proteinu NPM1 a tato fosforylace je důležitá pro duplikaci centrozomu, segregaci a cytokinezu a to nepřímým mechanismem (44).

Úloha NPM1 v duplikaci centrozomu

Pokud buňka vstupuje do mitózy, cytoplazmatické mikrotubuly se rozpadají a vytváří složitou strukturu, zvanou dělicí vřeténko. Dělicí vřeténko obsahuje nástroje, které slouží k rovnoměrnému rozdělení chromozomů mezi obě dceřinné buňky. Mikrotubuly v buňce vyrůstají ze specializovaného organizačního centra, centrozomu, který kontroluje jejich počet, umístění a orientaci v cytoplazmě. Před vznikem mitotického vřeténka na počátku M-fáze buněčného cyklu jsou nejprve zduplikovány centrozomy. Duplikace centrozomu začíná na hranici přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu. Během cytokineze každá dceřinná buňka zdědí jeden centrozom a tak duplikace centrozomu probíhá pouze jednou během každého buněčného cyklu (45). Dceřinné centrozomy se rozcházejí k opačným pólům jádra a dávají vznik pólům vřeténka. U maligních buněk dochází k nenormální duplikaci centrozomu a to může přispívat k nestabilitě genomu během tvorby multipolárních mitotických vřetének (46).

Mechanismus, který řídí duplikaci centrozomu nebyl zatím zcela objasněn. Jak již bylo uvedeno v předchozím odstavci o fosforylaci NPM1, komplexy cdk2 s cykliny hrají důležitou úlohu v duplikaci centrozomu (47-49). NPM1 byl nalezen na pólech mitotického vřeténka v buňkách HeLa (50). Imunofluorescenční analýza ukázala, že NPM1 je umístěn na neduplikovaných centrozomech v buňkách myších fibroblastů linie 3T3, ale nebyl nalezen na centrozomech po duplikaci. Nukleofosmin asociuje s centrozomem během mitózy a blokuje jeho duplikaci až do pozdní fáze G1 buněčného cyklu, kdy vzrůstá kinázová aktivita cdk2 v komplexu s cyklinem E na přechodu z G1 do S fáze buněčného cyklu. Specifická fosforylace NPM1 pomocí komplexu cdk2 s cyklinem E způsobí uvolnění NPM1 z centrozomu a tím umožní duplikaci centrozomu. Duplikace centrozomu je stimulována vzrůstem aktivity vápenatými ionty aktivované kinázy II závislé na kalmodulinu (CaMKII) na přechodu z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu (51).

Zatím není známo, zda cdk2 v komplexu s cyklinem A fosforyluje NPM1 na místech, kde by způsobila uvolnění NPM1 od centrozomu a tím umožnila duplikaci centrozomu. Přesto je jasné, že komplex cdk2 s cyklinem A a transkripční faktory E2F hrají důležitou úlohu v duplikaci centrozomu a v replikaci DNA (48). Oba druhy komplexů cdk2 (cdk2-cyklin A a cdk2-cyklin E) fosforylují protein retinoblastomu (pRb) a dovolují transkripčním faktorům E2F aktivně řídit expresi genů zahrnutých v duplikaci centrozomů. Maligní buňky jsou však schopné proliferovat i při inhibici cdk2 a vyřazení genu pro cdk2 u myši nebylo letální (52, 53). Cdk2 se proto nepovažuje za vhodný cíl pro terapii nádorových onemocnění.

Dvacet aminokyselinových zbytků proteinu cyklinu E tvoří signál pro umístění v centrozomu (CLS, "centrosomal localization signal") a tento signál umožňuje vstup buněk do fáze S buněčného cyklu nezávisle na cdk2. Uměle nasyntetizovaný signál CLS se váže v centrozomech a brání cyklinu A i cyklinu E ke vstupu do centrozomu (54).

Proteiny Crm1 ("chromosome region maintenance protein 1", exportin 1) a Ran ("Ras-related nuclear protein") se také podílejí na duplikaci centrozomu (55,56). Crm1 je vektor pro export proteinů bohatých na leucin a obsahujících signální sekvenci NES pro přesun proteinu z jádra do cytoplazmy (57-59). Malé množství Ran-GTP je asociováno s centrozomem během buněčného cyklu. Crm1 se váže na Ran-GTP a tato vazba je usnadněna pomocí výměného faktoru pro guanin-obsahující nukleotidy (RCC1) a naopak zeslabena proteinem s afinitou k Ran (RanBP1). Crm1 řídí přesnost duplikace centrozomu a zabraňuje neplánované duplikaci (55). Inaktivace Crm1 pomocí specifického inhibitoru, leptomycinu B nebo působením proteinu HBx viru hepatitidy B má za následek nenormální amplifikaci a multipolární dělicí vřeténka. Podobné důsledky mají změny v Ran a v RanBP1 (60). Přítomnost funkčního motivu NES v nukleofosminu umožňuje proteinům Crm1 a Ran v komplexu regulovat transport NPM1 a umístění NPM1 a tím i duplikaci centrozomu (61). NPM1 může být imunoprecipitován

společně s Crm1 využitím protilátky proti Crm1 a inhibice funkce Crm1 působením leptomycinu B nebo pomocí proteinu HBx viru hepatitidy B vede k uvolnění nukleofosminu z centrozomu a k iniciaci předčasné duplikace centrozomu. Vazba nukleofosminu k Crm1 je řízena fosforylací treoninového zbytku T95 v NPM1.

NPM1 je umístěn v jadérku buněk během přechodu buněk z fáze S do fáze G2 buněčného cyklu. NPM1 zde řídí biogenezu ribozomů a proliferaci buněk. NPM1 se váže na mitotické centrozomy po rozpadu jaderné membrány na počátku mitózy. Vazba NPM1 je zprostředkována komplexem Crm1-Ran a zajišťuje prevenci před další duplikací centrozomu. Nově rozdělené buňky v G1 fázi buněčného cyklu obsahují NPM1 navázaný na centrozom. NPM1 je potom fosforylován a uvolní se z centrozomu a umožní duplikaci centrozomu a replikaci DNA.

Úloha NPM1 v regulaci apoptózy

NPM1 je inhibitorem apoptózy a v tomto odstavci jsou popsány mechanismy, které se podílí na vlivu NPM1 na apoptózu buněk. Během apoptózy klesá množství NPM1 (32,62).

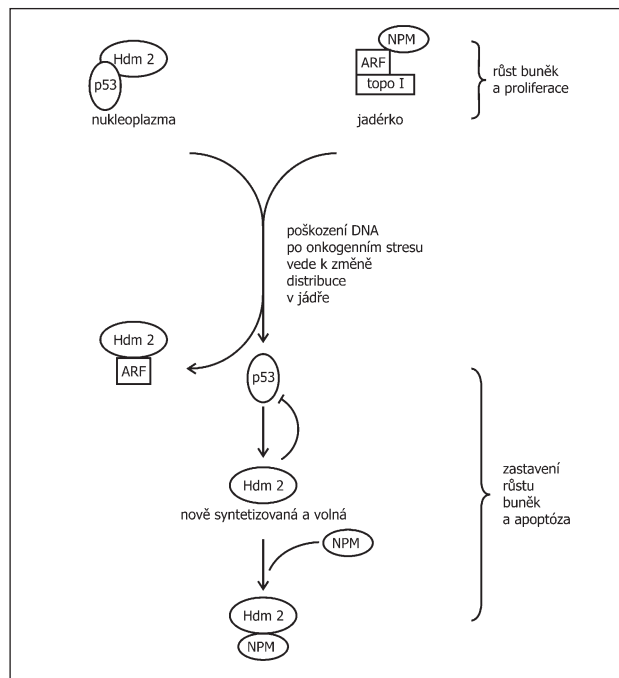
Aktivace nádorového supresoru p53 jako odpověď na poškození DNA slouží normálním buňkám jako prevence před maligním zvratem. NPM1 je důležitým regulátorem p53 a to hraje úlohu v regulaci buněčného cyklu i v regulaci apoptózy. NPM1 se váže na N-konec proteinu p53 a inhibuje jeho transkripční aktivitu. Hladina NPM1 v buňce je rozhodující pro dávku ultrafialového záření, které vede k fosforylaci Ser 15 nádorového supresoru p53. Fosforylace p53 na Ser-15 je rozhodující pro aktivaci funkce p53 během buněčného stresu. Tato fosforylace p53 umožňuje translokaci p53 do mitochondrií a interakci s antiapoptotickými proteiny Bcl-2 a Bcl-x_L a předchází uvolnění cytochromu c a snížení mitochondriálního membránového potenciálu. Předchází i aktivaci kaspáz a štěpení poly(ADP-riboza)polymerázy (PARP). NPM1 tedy rychle odpovídá na poškození DNA a brání předčasné aktivaci p53. NPM1 funguje jako přirozený represor nádorového supresoru p53 a určuje mezní hodnotu UV záření, kdy dojde k aktivaci p53 (63).

Zvýšené množství NPM1 brání apoptóze po transformaci buněk onkogeny hlavně u buněk s nestabilitou genomu (64). Primární buňky s porušeným mechanismem opravy DNA a zvýšenou expresí nukleofosminu a současnou expresí transformujících onkogenů myc a ras nepodléhají apoptóze a senescenci (64).

NPM1 inhibuje také fosforylaci p53 na Ser-15 při hypoxii. Promotor genu *NPM1* obsahuje sekvenci odpovídající na hypoxii a zvýšenou expresi HIF-1 ("hypoxia induced factor -1"). Snížení exprese NPM1 pomocí malé interferující RNA zvyšuje hypoxií indukovanou apoptózu. Naopak zvýšená exprese NPM1 brání apoptóze při hypoxii. Maligní hypoxické buňky vyžadují zvýšenou expresi NPM1 k potlačení aktivace p53 a tím i apoptózy (65). Toto však pouze platí pro buňky obsahující funkční p53.

NPM1 kromě přímé interakce s p53 (32) interaguje s proteiny, které asociují s p53 a regulují jeho stabilitu. Jedná se již o zmíněnou ubikvitinligázu Hdm2 a nádorový supresor ARF ("alternative reading frame"). Ubikvitinligá-

zy (E3) jsou heterogenní skupinou proteinů, které umožňují najít a specificky označit polyubikvitinem proteiny určené k proteolýze v proteazomech. Hdm2 takto označí polyubikvitinem p53 a podílí se na jeho proteolytickém štěpení v proteazomech. ARF je pozitivním regulátorem p53 a jeho pojmenování vychází z alternativního sestříhu odpovídajícího genu, kde druhý exon genu *ARF* je společný pro ARF a pro inhibitor cdk (p16/ink4A) (66). NPM1 v komplexu s ARF drží ARF v jadérku buněk a brání mu aktivovat p53. Poškození DNA způsobí přemístění ARF do nukleoplazmy, kde interaguje s Hdm2, podporuje rychlou degradaci Hdm2 a aktivuje p53 (obr. 3).



Obr.3: Schema distribuce ARF a Hdm2 před a po poškození DNA např. ultrafialovým zářením. Schema ukazuje úlohu proteinů NPM1 a ARF v regulaci funkce nádorového supresoru p53.

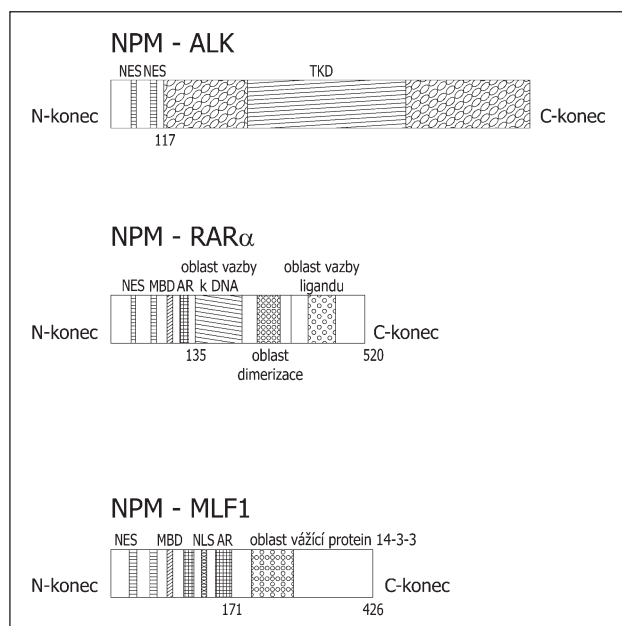
Deoxyribonukleáza, která se aktivuje kaspázou 3 (CAD, "caspase-activated deoxyribonuclease") hraje úlohu ve štěpení chromozomální DNA během apoptózy buněk. CAD je protein o 343 aminokyselinových zbytcích, který obsahuje signál pro umístění v jádře. CAD existuje v komplexu se svým inhibitorem (ICAD). Působením kaspázy 3 dochází ke štěpení ICAD a k aktivaci CAD (67). Komplex NPM1 s fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfátem se váže k aktivní CAD a inhibuje štěpení chromozomální DNA během apoptózy (68).

Chromozomální translokace a mutace genu *NPM1* u lymfomů a leukemií

Gen *NPM1* je translokován u anaplastického velkobuněčného lymfomu a v některých poměrně vzácných případech akutní myeloidní leukemie (AML) (69). Chromozomální přestavbou vznikají fuzní geny a jejich expresí fuzní proteiny NPM-ALK ("anaplastic lymphoma kinase"), NPM-RAR α ("retinoic acid receptor alpha") a NPM-MLF1 ("myelodysplasia/myeloid leukemia factor 1") (obr.4).

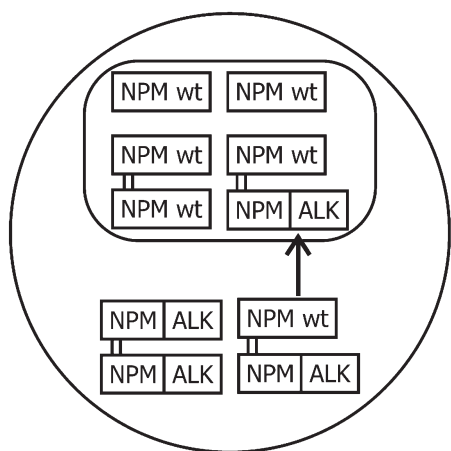
Chimerní kináza NPM-ALK u anaplastického velkobuněčného lymfomu

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) patří do skupiny ne-Hodgkinských maligních lymfomů (NHL). Ve většině případů zde dochází k chromozomální přestavbě t(2;5)(p23;q35), kde gen *ALK* na chromozomu 2 fúzuje s genem *NPM1* na chromozomu 5 (70,71). Uvedená přestavba však nestačí k vyvolání maligního onemocnění, protože byla nalezena i u nemaligních buněk i když ve velmi malé koncentraci (72). Fúzní protein obsahuje N-koncovou část NPM1 obsahující oligomerizační oblast a celou cytoplazmatickou oblast ALK s aktivitou tyrozinkinázy (obr.4). Protein ALK se normálně nachází



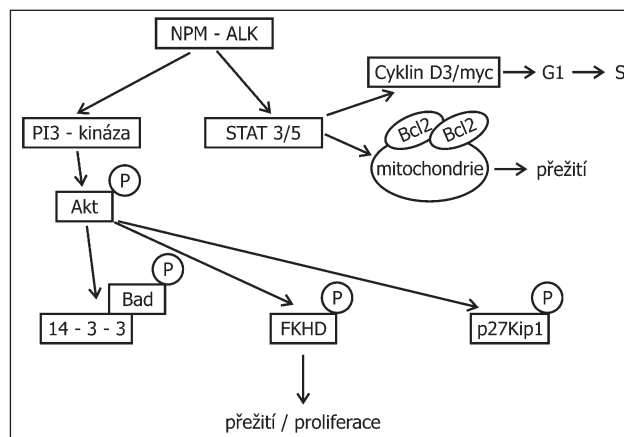
Obr.4: Schematické znázornění jednotlivých funkčních oblastí chimerních proteinů NPM-ALK, NPM-RAR α a NPM-MLF1.

v cytoplazmě buněk, ale fúzní protein NPM-ALK oligomerizuje s divokou formou NPM a putuje do jádřka buněk (obr.5). Za fyziologických podmínek dochází



Obr.5: Umístění divokého typu NPM a fúzního proteinu NPM-ALK v jádře a cytoplazmě buněk anaplastického velkobuněčného lymfomu s chromozomální přestavbou t(2;5)(p23;q35).

k expresi ALK pouze v nervovém systému a u lymfomů z T-buněk a dalších malignit dochází k její expresi právě ve formě fúzních proteinů a to nejen s NPM1. Homodimery fúzního proteinu NPM-ALK, vykazující konstitutivní tyrozinkinázovou aktivitu byly detekovány protilátkou proti N-konci NPM v cytoplazmě (obr.5). NPM1 tedy slouží hlavně pro oligomerizaci fúzního proteinu a pro určení jeho umístění v buňce. Fúzní protein NPM-ALK reguluje přežití buňky a proliferaci přes signální dráhu fosfatidylinozitol 3-kinázy (PI3K) a proteinkinázy B (AKT), která způsobí fosforylaci transkripčního faktoru FOXO3a, člena lidské rodiny “forkhead (FKHD)” transkripčních faktorů (obr.6)



Obr.6.: Regulace signálních drah fúzním proteinem NPM-ALK s tyrozinkinázovou aktivitou.

(73). Uvedená fosforylace FOXO3a znamená jeho přemístění do cytoplazmy a asociaci s proteinem 14-3-3. FOXO3a ztrácí tak schopnost indukovat expresi řady proapoptotických a buněčný cyklus inhibujících cílových genů (72). Na obr.6 je ukázáno i ovlivnění signální dráhy transkripčních faktorů STAT 3/5 (“signal transducers and activators of transcription”) pomocí fúzního proteinu NPM-ALK. Onkogenní tyrozinkinázová aktivita fúzního proteinu NPM-ALK způsobí fosforylaci proteinkináz ERK 1/2 (“extracellular signal-regulated protein kinase”) a jejich přímého aktivátoru proteinkinázy MEK (“mitogen-induced extracellular kinase”). NPM-ALK tedy aktivuje signální dráhu MEK/ERK a tato signální dráha může být cílem terapeutického zásahu u malignit na nichž se podílí fúzní protein NPM-ALK (74).

Z klinického hlediska je důležité, že stanovení exprese fúzního genu *NPM-ALK* pomocí kvantitativní polymerázové reakce v reálném čase umožňuje stanovit prognózu u pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem (75). Experimenty se snížením hladiny exprese fúzního genu *NPM-ALK* využitím mechanismu RNA interference byly již také provedeny na liniích buněk SUDHL-1 a Karpas 299 s chromozomální přestavbou t(2;5)(p23;q35) a pro srovnání i u linií buněk lymfomu bez uvedené přestavby (76). Výsledky ukázaly, že snížení exprese fúzního genu *NPM-ALK* vedlo k poklesu proliferace a ke zvýšené apoptóze u buněk s chromozomální přestavbou t(2;5). Také se zvýšila citlivost těchto buněk na chemoterapeutikum doxorubicin a tak tato metoda použití

malých interferujících RNA (siRNA) je příslibem nové strategie v terapii u těchto lymfomů.

Fúzní transkripční faktor NPM1-RAR α u akutní promyelocytární leukemie

Chromozomální přestavba genů t(5,17) u akutní promyelocytární leukemie (APL) byla u tří dětských pacientů spojena s fúzí genu *NPM1* s genem *RAR α* (77-79). Fúzní protein NPM1-RAR α (obr.4) interaguje s proteinem NPM1 divokého typu a přemístí ho z jádérka nebo mění jeho funkci v jádérku buněk. Fúzní protein NPM1-RAR α nevykazuje interakci s proteinem promyelocytární leukemie (PML) (80). Fúzní protein NPM1-RAR α vykazuje interakce s korepresory a koaktivátory a ovlivňuje tak transkripci cílových genů kyseliny retinové (81). Fúzní protein NPM1-RAR α zvyšuje u transgenních myši proliferaci myeloidních buněk a tak modeluje myeloproliferativní onemocnění a po delší době vyvolává chorobu podobnou APL s blasty citlivými na kyselinu retinovou (ATRA) (82).

Chimerní protein NPM-MLF1 u akutní myeloidní leukemie a myelodysplastického syndromu

Chromozomální přestavba genů t(3;5) (q25.1;q34) spojená s AML (nejčastěji typu FAB /French-American-British nomenclature/ M6) a MDS produkuje chimerní gen *NPM-MLF1* a po jeho expresi fúzní protein NPM-MLF1 (83). Fúzní protein NPM-MLF1 obsahuje N-koncovou část proteinu NPM a skoro celý protein MLF1 kromě 16 aminokyselinových zbytků z N-konce (obr.4). Exprese MLF-1 mRNA byla nalezena ve varlatech, vaječnicích, svalu, srdci, ledvině a tlustém střevě, ale ne v hematopoetických buňkách. Fúzní protein NPM-MLF1 zřejmě vyvolá expresi MLF1 v hematopoetických buňkách a to vede k myelodysplazii a AML (84). Funkce MLF1 zatím nebyla plně objasněna. MLF1 inhibuje erytroidní diferenciaci indukovanou erytropoetinem (85). MLF1 je umístěn v cytoplasmě buněk, zatím co fúzní protein NPM-MLF1 se vyskytuje v jádře a hlavně v jádérku buněk (86). NPM1 je naopak zčásti přemístěn do cytoplazmy a tím ztrácí normální funkci v jádérku a to též přispívá k leukemogenezi. U NPM^{+/+} heterozygotních myši dochází v souhlasu s uvedenými fakty k hematologickému onemocnění připomínajícímu MDS (16).

Mutace genu pro nukleofosmin u myelodysplastického syndromu a akutní myeloidní leukemie s normálním karyotypem

Mutace genu *NPM1* byly téměř výhradně prokázány v exonu 12 u pacientů s MDS a AML s normálním karyotypem (21-29, 87-91). Normální karyotyp je asi u 40-50% dospělých pacientů s AML. Mutace *NPM1* je příznivým prognostickým faktorem a předpovědí dobré odpovědi na indukční terapii (21-29, 87-91). Mutace *NPM1* způsobí že produkt exprese je umístěn v cytoplasmě místo v jádérku buněk. Imunohistochemická detekce cytoplazmatického NPM1 je tedy předpovědí mutací v exonu 12 genu *NPM1* (92). Přibližně 86% pacientů s cytoplazmatickým NPM1 má normální karyotyp a zbylých 14% vykazuje většinou sekundární chromozomální změny. Mutace

NPM1 jsou často nalezeny v případech AML, kde je též detekována mutace genu *FLT3* ("FMS-like tyrosine kinase 3"). Protoonkogen *c-fms* je buněčným protějškem transformujícího genu viru vyvolávajícího sarkom u koček ("Susan Mc Donough feline sarcoma virus"). Onkogenní *v-fms* je transmembránový receptor s vnitrobuněčnou tyrozinkinázovou oblastí. Nejčastější mutací genu *FLT3* je duplikace sekvencí exonu 11 a vyjíměčně intronu 11 a exonu 12 tohoto genu označovaná ITD ("internal tandem duplication") (23,27). Samotné mutace *NPM1* znamenají pro pacienty lepší prognózu než současný výskyt mutací genu *FLT3* (22). U pacientů s MDS byly mutace *NPM1* nalezeny u 2/38 (5,2%) pacientů (86) a u AML asi u třetiny pacientů. Ojedinelé případy mutací *NPM1* u pacientů s chronickou myeloidní leukemií (CML) jsou spojeny s přechodem do AML a zřejmě reprezentují časná stadia AML s FAB M4 nebo M5 se značnou monocytární diferenciací (93, 94).

Mutace *NPM1* jsou heterozygotní a alela s divokým typem je zachována. Mutace *NPM1* se vyskytují jen velmi ojedinelé mimo exon 12 a to v exonu 9 (95) a exonu 11 (96). Asi 40 různých forem mutací *NPM1* bylo zatím identifikováno u pacientů s AML a u více než 95% se týkají pozice 960 (97).

Naopak, mutace v exonu 12 genu *NPM1* nebyly nalezeny u karcinomů jater, plic, prsu, tlustého střeva a žaludku (30). Tyto údaje, získané při analýze exonu 12 genu *NPM1* u 467 karcinomů, naznačují, že mutace nukleofosminu nehrají úlohu u solidních nádorů (30).

Příčina umístění mutovaných forem proteinu NPM1 v cytoplasmě leukemických buněk

Mutace na C-konci NPM1 znamenají často ztrátu tryptofanových zbytků 288 a 290, které jsou nezbytné pro umístění NPM1 v jádérku buněk. Další častou změnou na C-konci NPM1 je vytvoření dalšího motivu NES bohatého na leucinové zbytky. Tento signál pro export NPM1 z jádérka do nukleoplazmy a z jádra do cytoplazmy buněk je další příčinou umístění takto mutovaného NPM1 v cytoplasmě leukemických buněk. Mutované formy NPM1 váží nemutovaný NPM1 a nádorový supresor ARF a způsobí jejich umístění v nukleoplasmě nebo cytoplasmě leukemických buněk (98-100).

Závěr

NPM1 se chová jako nádorový supresor a snížení množství NPM1 divokého typu může proto přispívat k tvorbě nádoru inaktivací nádorového supresoru ARF. Společný výskyt mutací genu *NPM1* a genu *FLT3*, který byl často nalezen v klinické praxi nasvědčuje mechanismu kooperace obou těchto genetických defektů v leukemogenezi. Cytoplazmatická mutovaná forma NPM1 vystupuje jako dominantně recesivní a způsobí umístění endogenního NPM1 do cytoplazmy. Zatím však nebylo prokázáno, že by se tato mutovaná forma chovala jako onkogen. Onkogenní úloha cytoplazmatické formy NPM1 byla nedávno testována v agaru na primárních myších embryonálních fibroblastech s expresí cytoplazmatické formy NPM1 nebo divokého typu NPM1 v kombinaci s onkogenem E1A adenoviru (101). Pouze cytoplazmatická mutovaná

forma NPM1, ale ne divoká forma NPM1, kooperovala s onkogenem E1A v transformaci myších embryonálních fibroblastů v agaru. Výsledek souhlasí s předpokladem, že mutovaná cytoplazmatická forma NPM1 blokuje funkci nádorového supresoru ARF, indukovaného v odpovědi na působení onkogenu E1A.

Buněčný původ cytoplazmatické mutované formy NPM1 je zatím neznámý. Expres mutované formy NPM1 byla nalezena v myeloidních buňkách, monocitech, erythroidních buňkách a megakaryocytech, ale ne v lymfoidních buňkách. Původ cytoplazmatické mutované formy NPM1 je tedy ve společném prekursoru myeloidních buněk nebo ještě mladším progenitoru bez schopnosti diferenciaci do lymfoidní řady. Toto je v souladu s expresním znakem NPMc+ AML, který se vyznačuje zvýšenou expresí genů potřebných pro sebeobnovu kmenových buněk, např. většiny homeobox obsahujících genů (HOX). NPMc+

AML se vyznačují nedetekovatelným antigenem CD34. Je to způsobeno leukemickou transformací nebo původem z CD34-/CD38- hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni (102).

Studium mutací genu *NPM1* přispěje také k lepší klasifikaci AML s normálním karyotypem, kam spadá až 50% případů AML. NPMc+ AML a NPMc+ myeloidní sarkom (103) by měly vytvořit samostatnou skupinu v klasifikaci AML.

Potlačení exprese chimerního genu *NPM-ALK* po chromozomální přestavbě t(2;5) u pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem využitím principu RNA interference se zdá na základě pokusů na odpovídajících buněčných liniích nadějnou strategií do budoucnosti při terapii tohoto onemocnění (75).

Poděkování

Práce byla podpořena VZ MZ ČR 00023736.

Literatura:

- Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 2005; 437(7055): 147-153.
- Okuwaki M, Tsujimoto M, Nagata K. The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol Biol Cell* 2002; 13(6): 2016-30.
- Itahana K, Bhat KP, Jin A, et al. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* 2003; 12(5): 1151-64.
- Yung BY, Busch H, Chan PK. Translocation of nucleolar phosphoprotein B23 (37 kDa/pI 5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1985; 826(4): 167-173.
- Savkur RS, Olson MO. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(19): 4508-4515.
- Okuda M. The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene* 2002; 21(40): 6170-74.
- Frehlick LJ, Eirín-López JM, Ausió J. New insights into the nucleophosmin/ nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *BioEssays* 2007; 29(1): 49-59.
- Shackelford GM, Ganguly A, MacArthur CA. Cloning, expression and nuclear localization of human NPM3, a member of the nucleophosmin/ nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *BMC Genomics* 2001; 2(1): 8.
- Eirín-López JM, Frehlick LJ, Ausió J. Long-term evolution and functional diversification in the members of the nucleophosmin/ nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Genetics* 2006; 173(4): 1835-50.
- Kang YJ, Olson MO, Busch H. Phosphorylation of acid-soluble proteins in isolated nucleoli of Novikoff hepatoma ascites cells. Effect of divalent cations. *J Biol Chem* 1974; 249(17): 5580-85.
- Prestayko AW, Olson MO, Busch H. Phosphorylation of proteins of ribosomes and nucleolar preribosomal particles in vivo in Novikoff hepatoma ascites cells. *FEBS Lett* 1974; 44(2): 131-135.
- Savkur RS, Olson MO. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 1998; 26(19): 4508-15.
- Weng JJ, Yung BYM. Nucleophosmin/B23 regulates PCNA promoter through YY1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 335(3): 826-831.
- Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, et al. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* 2001; 506(3): 272-276.
- Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, et al. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol* 2005; 25(17): 7534-45.
- Grisendi S, Mecucci C, Falini B, et al. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7): 493-505.
- Tanaka M, Sasaki H, Kino I, et al. Genes preferentially expressed in embryo stomach are predominantly expressed in gastric cancer. *Cancer Res* 1992; 52(12): 3372-77.
- Nozawa Y, Van Belzen N, Van der Made AC, et al. Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa. *J Pathol* 1996; 178(1): 48-52.
- Shields LB, Gercel-Taylor C, Yashar CM, et al. Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity. *J Soc Gynecol Invest* 1997; 4(6): 298-304.
- Subong EN, Shue MJ, Epstein JI, et al. Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO; 4-216) recognizes nucleophosmin/B23. *Prostate* 1999; 39(4): 298-304.
- Boissel N, Renneville A, Biggio V, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of *NPM* mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 2005; 106(10): 3618-20.
- Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (*NPM1*) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106(12): 3740-46.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352(3): 254-266.
- Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106(12): 3733-39.
- Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (*NPM1*) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 106(12): 3747-54.
- Chou W-C, Tang J-L, Lin L-I, et al. *Nucleophosmin* mutations in *de novo* acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res* 2006; 66(6): 3310-16.
- Grimwade D. *NPM1* mutation in AML: who and why? *Blood* 2006; 108(13): 3965.
- Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, et al. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: impact on WHO classification. *Blood* 2006; 108(13): 4146-55.
- Falini B, Nicoletti I, Bolli N, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (*NPM1*) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica* 2007; 92(4): 519-532.

30. Jeong EG, Lee SH, Yoo NJ, et al. Absence of nucleophosmin 1 (*NPM1*) gene mutations in common solid cancers. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (APMIS)* 2007; 115(4): 341-346.
31. Hsu CY, Yung BYM. Down-regulation of nucleophosmin/B23 during retinoic acid-induced differentiation of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Oncogene* 1998; 16(7): 915-923.
32. Liu WH, Yung BYM. Mortalization of human promyelocytic leukemia HL-60 cells to be more susceptible to sodium butyrate-induced apoptosis and inhibition of telomerase activity by down-regulation of nucleophosmin/B23. *Oncogene* 1998; 17(23): 3055-64.
33. Colombo E, Marine JC, Danovi D, et al. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 2002; 4(7): 529-533.
34. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, et al. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 2004; 5(5): 465-475.
35. Lim MJ, Wang XW. Nucleophosmin and human cancer. *Cancer Detect Prevent* 2006; 30(6): 481-490.
36. Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H, et al. Nucleophosmin: A versatile molecule associated with hematological malignancies. *Cancer Sci* 2006; 97(10): 963-969.
37. Chan WY, Liu QR, Borjigin J, et al. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry* 1989; 28(3): 1033-39.
38. Wang D, Umekawa H, Olson MO. Expression and subcellular localization of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell Mol Biol Res* 1993; 39(1): 33-42.
39. Yung BY, Chan PK. Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. *Biochim Biophys Acta* 1987; 925(1): 74-82.
40. Umekawa H, Chang JH, Correia JJ, et al. Nucleolar protein B23: bacterial expression, purification, oligomerization and secondary structures of two isoforms. *Cell Mol Biol Res* 1993; 39(7): 635-645.
41. Chan PK, Aldrich M., Cook RG, et al. Amino acid sequence of protein B23 phosphorylation site. *J Biol Chem.* 1986; 261(30): 1868-72.
42. Negi SS, Olson MOJ. Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J Cell Sci* 2006; 119(17): 3676-85.
43. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, et al. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 2000; 103(1): 127-140.
44. Zhang H, Shi X, Paddon H, et al. B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase I. *J Biol Chem* 2004; 279(34): 35726-34.
45. Tsou M-FB, Stearns T. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature* 2006; 442(7105): 947-951.
46. Lingle WL, Salisbury JL. The role of the centrosome in the development of malignant tumors. *Curr Top Dev Biol* 2000; 49: 313-329.
47. Lacey KR, Jackson PK, Stearns T. Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(6): 2817-22.
48. Meraldi P, Lukas J, Fry AM, et al. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* 1999; 1(2): 88-93.
49. Hinchcliffe EH, Sluder G. "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev* 2001; 15(10): 1167-81.
50. Zatschina OV, Rousset A, Chan PK, et al. The nucleolar phosphoprotein B23 redistributes in part to the spindle poles during mitosis. *J Cell Sci* 1999; 112(4): 455-466.
51. Matsumoto Y, Maller JL. Calcium, calmodulin, and CaMKII requirement for initiation of centrosome duplication in *Xenopus* egg extracts. *Science* 2002; 295(5554): 499-502.
52. Tetsu O, McCormick F. Proliferation of cancer cells despite cdk2 inhibition. *Cancer Cell* 2003; 3(3): 233-245.
53. Berthet C, Aleem E, Coppola V, et al. Cdk2 knockout mice are viable. *Curr Biol* 2003; 13(20): 1775-85.
54. Matsumoto Y, Maller JL. A centrosomal localization signal in cyclin E required for cdk2-independent S phase entry. *Science* 2004; 306(5697): 885-888.
55. Forgues M, Diflippantonio MJ, Linke SP, et al. Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol Cell Biol* 2003; 23(15): 5282-92.
56. Keryer G, Di Fiore B, Celati C, et al. Part of Ran is associated with AKAP450 at the centrosome: involvement in microtubule-organizing activity. *Mol Biol Cell* 2003; 14(10): 4260-71.
57. Fornerod M, Ohno M, Yoshida M, et al. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 1997; 90(6): 1051-60.
58. Stade K, Ford CS, Guthrie C, et al. Exportin (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 1997; 90(6): 1041-50.
59. Arnaoutov A, Azuma Y, Ribbeck K, et al. Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. *Nat Cell Biol* 2005; 7(6): 626-632.
60. Di Fiore B., Ciciaarello M., Lavia P. Mitotic functions of Ran GTPase network: the importance of being in the right place at the right time. *Cell Cycle* 2004; 3(3): 305-313.
61. Wang W, Budhu A, Forgues M, et al. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol* 2005; 7(8): 823-830.
62. Patterson SD, Grossman JS, D'Andrea P, et al. Reduced numatrin/B23/ nucleophosmin labeling in apoptotic Jurkat T-lymphoblasts. *J Biol Chem* 1995; 270(16): 9429-36.
63. Maignel DA, Jones L, Chakravarty D, et al. Nucleophosmin sets a threshold for p53 response to UV radiation. *Mol Cell Biol* 2004; 24(9): 3703-11.
64. Li J, Sejas DP, Burma S, et al. Nucleophosmin suppresses oncogene-induced apoptosis and senescence and enhances oncogenic cooperation in cells with genomic instability. *Carcinogenesis* 2007; 28(6): 1163-70.
65. Li J, Zhang X, Sejas DP, et al. Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem* 2004; 279(40): 41275-79.
66. Gjerset RA. DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23) and cancer. *J Mol Histol* 2006; 37(5-7): 239-251.
67. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391(6662): 96-99.
68. Ye K. Nucleophosmin/B23, a multifunctional protein that can regulate apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(9): 918-923.
69. Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 2002; 99(2): 409-426.
70. Bischof D, Pulford K, Masson DY, et al. Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the Non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis. *Mol Cell Biol* 1997; 17(4): 2312-25.
71. Drexler HG, Gignac SM, von Wasielewski R, et al. Pathobiology of *NPM-ALK* and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. *Leukemia* 2000; 14(9): 1533-59.
72. Maes B, Vanhentenrijk V, Wlodarska I, et al. The *NPM-ALK* and the *AT1C-ALK* fusion genes can be detected in non-neoplastic cells. *Am J Pathol* 2001; 158(6): 2185-93.
73. Gu T-L, Tothova Z, Scheijen B, et al. NPM-ALK fusion kinase of anaplastic large-cell lymphoma regulates survival and proliferative signaling through modulation of FOXO3a. *Blood* 2004; 103(12): 4622-29.
74. Marzec M, Kasprzycka M, Liu X, et al. Oncogenic tyrosine kinase NPM/ALK induces activation of the MEK/ERK signaling pathway independently of c-Raf. *Oncogene* 2007; 26(6): 813-821.
75. Li C, Takino H, Eimoto T, et al. Prognostic significance of NPM-ALK vision transcript overexpression in ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2007; 20(6): 648-655.
76. Hsu FY, Zhao Y, Anderson WF, et al. Downregulation of NPM-ALK by siRNA causes anaplastic large cell lymphoma growth inhibition and augments the anti cancer effects of chemotherapy in vitro. *Cancer Incest* 2007; 25(4): 240-248.
77. Redner RL, Rush EA, Faas S, et al. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* 1996; 87(3): 882-886.
78. Hummel JL, Wells RA, Dube ID, et al. Deregulation of NPM and PLZF in a variant t(5;17) case of acute promyelocytic leukemia. *Oncogene* 1999; 18(3): 633-641.
79. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci MJ, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17). Concerted action "Molecular Cytogenetic Diagnosis in Haematological Malignancies". *Blood* 2000; 96(4): 1297-308.
80. Rush EA, Schlesinger KW, Watkins SC, et al. The NPM-RAR fusion

- protein associated with the t(5;17) variant of APL does not interact with PML. *Leuk Res* 2006; 30(8): 979-986.
81. Redner RL, Chen JD, Rush EA, et al. The t(5;17) acute promyelocytic leukemia fusion protein NPM-RAR interacts with co-repressor and co-activator proteins and exhibits both positive and negative transcriptional properties. *Blood* 2000; 95(8): 2683-90.
 82. Cheng GX, Zhu XH, Men XQ, et al. Distinct leukemia phenotypes in transgenic mice and different corepressor interactions generated by promyelocytic leukemia variant fusion genes *PLZF-RARα* and *NPM-RARα*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(11): 6318-23.
 83. Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, et al. The t(3;5) (q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, *NPM-MLF1*. *Oncogene* 1996; 12(2): 265-275.
 84. Hitzler JK, Witte DP, Jenkins NA, et al. cDNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization of Mlfl, murine homologue of a gene involved in myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Am J Pathol* 1999; 155(1): 53-59.
 85. Winteringham LN, Kobelke S, Williams JH, et al. Myeloid leukemia factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene* 2004; 23(29): 5105-09.
 86. Falini B, Bigerna B, Pucciarini A, et al. Aberrant subcellular expression of nucleophosmin and NPM-MLF1 fusion protein in acute myeloid leukemia carrying t(3;5): a comparison with NPMc+ AML. *Leukemia* 2006; 20(2): 368-371.
 87. Zhang Y, Zhang M, Yang L, et al. *NPM1* mutations in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leuk Res* 2007; 31(1): 109-111.
 88. Cazzaniga G, Dell'Oro MG, Mecucci C, et al. Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype. *Blood* 2005; 106(4): 1419-22.
 89. Chen W, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, et al. Nucleophosmin gene mutations in acute myeloid leukemia. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130(11): 1687-92.
 90. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of *NPM1* mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106(8): 2854-61.
 91. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of *NPM1* mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107(10): 4011-20.
 92. Falini B, Martelli MP, Bolli N, et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 108(6): 1999-2005.
 93. Caudill JS, Sternberg AJ, Li CY et al. C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders. *Br J Haematol* 2006; 133(6): 638-641.
 94. Oki Y, Jelinek J, Beran M, et al. Mutations and promoter methylation status of *NPM1* in myeloproliferative disorders. *Haematologica* 2006; 91(8): 1147-48.
 95. Mariano AR, Colombo E, Luzi L, et al. Cytoplasmic localization of NPM in myeloid leukemias is dictated by gain-of-function mutations that create a functional nuclear export signal. *Oncogene* 2006; 25(31): 4376-80.
 96. Albiero E, Madeo D, Bolli N, et al. Identification and functional characterization of a cytoplasmic nucleophosmin leukaemic mutant generated by a novel exon-11 *NPM1* mutation. *Leukemia* 2007; 21(5): 1099-103.
 97. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, et al. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood* 2007; 109(3): 874-885.
 98. Falini B, Bolli N, Shan J, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood* 2006; 107(11): 4514-23.
 99. den Besten W, Kuo ML, Williams RT, et al. Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle* 2005; 4(11): 1593-98.
 100. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, et al. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res* 2006; 66(6): 3044-50.
 101. Cheng K, Grisendi S, Clohessy JG, et al. Elucidating the oncogenic potential of NPMc+ in vitro and in vivo. Abstract 12. ASH Annual Meeting Abstracts. *Blood* 2006; 108(11) Pt.1: 8a
 102. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997; 3(12): 1337-45.
 103. Falini B, Lenze D, Hasserijan R et al. Cytoplasmic mutated nucleophosmin (NPM) defines the molecular status of a significant fraction of myeloid sarcomas. *Leukemia* 2007; 21(7): 1566-70.

Korespondenční adresa:

Ing. Fuchs Ota
 Ústav hematologie a krevní transfuze
 U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2
 e-mail: Ota.Fuchs@uhkt.cz
 tel.: 221977313

Došlo / Submitted: 15. 5. 2007
 Přijato / Accepted: 3. 9. 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.

POPULAČNÍ STANDARDY RELATIVNÍHO PŘEŽITÍ ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ V ČR KALKULOVANÉ Z DAT NOR – REAKCE NA VÝSLEDKY PUBLIKOVANÉ V STUDII EUROCCARE-4

POPULATION STANDARDS FOR RELATIVE SURVIVAL OF CANCER PATIENTS IN THE CZECH REPUBLIC BASED ON DATA OF THE CZECH NATIONAL CANCER REGISTRY – REACTION ON RESULTS OF EUROCCARE-4 STUDY

DUŠEK L.¹, PAVLÍK T.¹, MUŽÍK J.¹, KOPTÍKOVÁ J.¹, GELNAROVÁ E.¹, ABRAHÁMOVÁ J.², ŽALOUDEK J.³, VYZULA R.³, VORLÍČEK J.¹

¹ LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY, BRNO

² FAKULTNÍ THOMAYEROVA NEMOCNICE, PRAHA

³ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn

Cílem práce je daty podložená prezentace kvality a využitelnosti Národního onkologického registru ČR a publikace validních odhadů relativního přežití onkologických pacientů pro českou populaci. V srpnu 2007 byly zveřejněny výsledky evropské populační studie EUROCCARE-4, která srovnává vybrané státy na základě pětiletého přežití onkologických pacientů diagnostikovaných v letech 1995 – 99. Tato studie publikovala pro českou populaci podprůměrné hodnoty relativního přežití, neboť jí z české strany byla dodána zcela neadekvátní data. Místo reprezentativního exportu dat NOR se 100% pokrytím populace byla poskytnuta data pouze za jeden region s cca 8% pokrytím. Vedení České onkologické společnosti tyto výstupy zásadně odmítlo. Tato práce sumarizuje výsledky auditu více než 1,3 milionu záznamů NOR ČR dostupných za období 1977 – 2003. Analýza prokázala postupně se zlepšující kvalitu dat NOR, po roce 1990 klesl podíl záznamů s neúplnou nebo chybějící diagnostickou částí pod 6 % a nadále klesá. Z dat dostupných za období 1995 – 2003 byl definován referenční soubor, který umožňuje reprezentativní analýzu pětiletého přežití. Takto zpracovaná data dokládají, že v ČR existuje kvalitní monitoring přežití onkologických pacientů a výsledky péče odpovídají výsledkům vyspělých států Evropy.

Klíčová slova: populační onkologický registr, celkové přežití, referenční standardy přežití

Summary

This work is aimed to present data-based quality and usability of the Czech National Cancer Registry (NCR) and relevant estimates of relative survival of cancer patients in the Czech population. In August 2007, an international study EUROCCARE-4 published for the Czech Republic decreased probability of 5-yr survival in comparison with average value of the other involved European countries. These findings were refused as strongly biased by leaders of the Czech Oncology Society. The bias however cannot be attributed to the EUROCCARE study itself, it was due to erroneous and non-representative export of the Czech data. Data of NCR can guarantee representative monitoring of mortality with 100% population coverage. Instead of the NCR data, the EUROCCARE study obtained only partial export of regionally based data with only 8% coverage. The situation inevitably resulted in strongly biased outcome that cannot be generalized for the whole population. Here we present an audit of more than 1.3 million of records accessible in the NCR since 1977. The analyses proved consistently growing quality of the database as well as its usability for the standardized health care assessment. Based on reference period 1995 – 2003, we estimated 5-yr relative survival in the way that methodically corresponds to the EUROCCARE-4 study. The results clearly document that survival outcomes reached by current Czech oncology are comparable to those reported in the EUROCCARE-4 study.

Key words: population register, cancer, survival, benchmarking, health care

Proč srovnávat česká data o přežití s ostatními evropskými státy ?

Odpověď na otázku otevírající tuto kapitolu je jednoduchá. Srovnávat se světem se musíme, neboť to ve věku informačních technologií patří ke standardům medicíny. Zatímco v minulém století bylo dostatečně předvojev

budování lokálních a národních databází, nyní přichází na řadu jejich vytěžování. Snaha spojovat a centralizovat evropská data je viditelnou prioritou mnoha grantů pro země EU, vznikají mezinárodní organizace zaměřující se na hodnocení kvality a výkonnosti léčebné péče a objevuje se i řada nových časopisů, které se těmito tématům

věnují. Tzv. vědecký marketing vlastních výsledků se již nyní stává podmínkou vstupu do mezinárodních projektů a spolupráce. Jednoduše řečeno, za několik málo let bude mezinárodní srovnávání výsledků nutnou podmínkou viditelné existence.

Vše výše řečené platí dvojnásob o prezentaci dosahovaného přežití onkologických pacientů. Onkologie je pacienty, jejich příbuznými i veřejností silně sledována. Prezentace výsledků péče zde vystupuje z běžného rámce odborných publikací a stává se veřejnou zprávou s velkým dopadem. Prezentace výsledků tak získává značný psychologický a etický rozměr, a o to více by měla být pod kontrolou. To samozřejmě neznamená zastírání pravdy, ale adekvátní zpravodajství, které vyzvedne pozitiva a analyzuje negativa.

Pro Českou republiku i každý jiný stát z toho vyplývají jasné závěry. Výsledky nelze prezentovat bez kvalitních dat, kdo nemá data bude čím dále tím méně vidět se všemi následnými důsledky. Zároveň ale platí, že máme-li data, musíme je pečlivě analyzovat a prezentovat. Jinak hrozí, že to někdo jiný udělá za nás a výsledek nemusí být vždy správný. Ne náhodou každá aspoň trochu významná soukromá společnost buduje své vlastní marketingové oddělení a dbá na prezentaci vlastních výsledků. Jakkoli může takové přirovnání komerčního modelu k medicíně někomu připadat neadekvátní, stává se realitou. To ostatně doloží i následující kapitola, která komentuje situaci vzniklou v důsledku mezinárodní publikace nereprezentativních českých onkologických dat.

Co se stalo v souvislosti se studií EURO CARE III a IV EURO CARE je mezinárodní aktivitou spojující data populačních onkologických registrů vybraných evropských zemí s cílem získat přehled o dosahovaném přežití. Cíl je to ambiciózní, uvážíme-li rozmanitost přístupů k registraci dat v různých zemích, z nichž mnoho ani nemá zavedený reprezentativní registrační systém. Proto také ve výsledném hodnocení studie EURO CARE-4 nefigurují všechny evropské státy, jsou prezentovány údaje vybraných 23 zemí, z toho 13 celonárodních registrů. Reprezentativnost a kvalita dat jednotlivých zemí velmi silně ovlivňují informační význam studie. Výsledky studií EURO CARE-3 i -4 jsou velmi viditelně publikovány v prestižních mezinárodních časopisech, a je tedy nutné věnovat zvýšenou pozornost jak poskytovaným datům, tak i výstupům. To se bohužel v případě České republiky opakovaně nestalo a výsledkem jsou podhodnocené odhady přežití onkologických pacientů v ČR [1].

Každý publikovaný výstup musíme posuzovat a vážit podle vstupních informací, ze kterých vzešel. Zvláště u mezinárodních srovnání různých populací a zdravotnických systémů musíme velmi dbát na to co srovnáváme a jak to srovnáváme. Pro studii EURO CARE-4 byly z ČR nahlášené 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.

Český Národní onkologický registr pokrývá reprezentativně 100% české populace a za období 1977 – 2004 obsahuje více

než 1,4 milionu záznamů. Za období analyzované ve studii EURO CARE-4 (1995-99) jde o více než 270 000 záznamů zhoubných nádorů (C00-C97). Nicméně oficiální podklady pro studii EURO CARE-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 zhoubných nádorů (Plzeňský kraj 16492 a Karlovarský kraj 7765). Obdobné nesrovnalosti lze nalézt i v datech vykázaných z ČR do pokračující mezinárodní analýzy publikované pro období 2000-2002 [2].

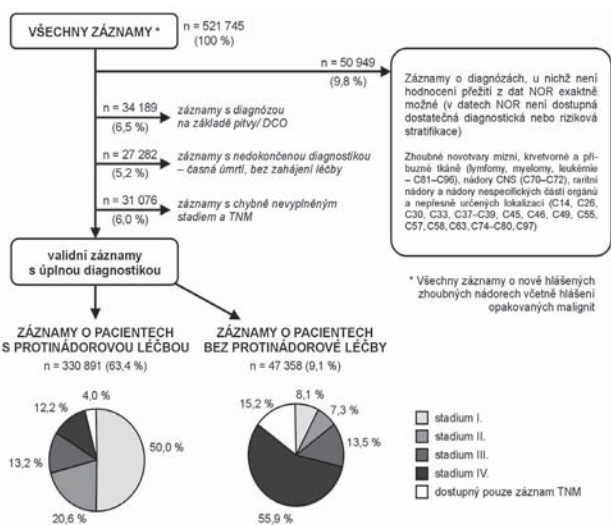
Pro Českou republiku EURO CARE-4 uvádí pouze 8% pokrytí populace. Předaná data tedy vypovídají pouze o velmi minoritní části našeho registru a státu. V žádném případě nelze tyto údaje zobecnit na celou republiku. Celorepubliková data, která máme dlouhodobě k dispozici, nebyla do studie předána. Předání dat nebylo s odbornou společností nijak konzultováno. Výsledkem je prezentace statisticky významně sníženého přežití onkologických pacientů v ČR, konkrétně pro nejvíce viditelné diagnózy zhoubných nádorů vychází srovnání pětiletého relativního přežití takto [1]:

- Tlusté střevo a konečník. EURO CARE-4: 53,5%, EURO CARE-4 pro ČR: 43,9%
- Plíce. EURO CARE-4: 10,2%, EURO CARE-4 pro ČR: 8,2%
- Melanom. EURO CARE-4: 85,4%, EURO CARE-4 pro ČR: 76,0%
- Prs. EURO CARE-4: 79,5%, EURO CARE-4 pro ČR: 69,3%
- Prostata. EURO CARE-4: 73,9%, EURO CARE-4 pro ČR: 54,4%

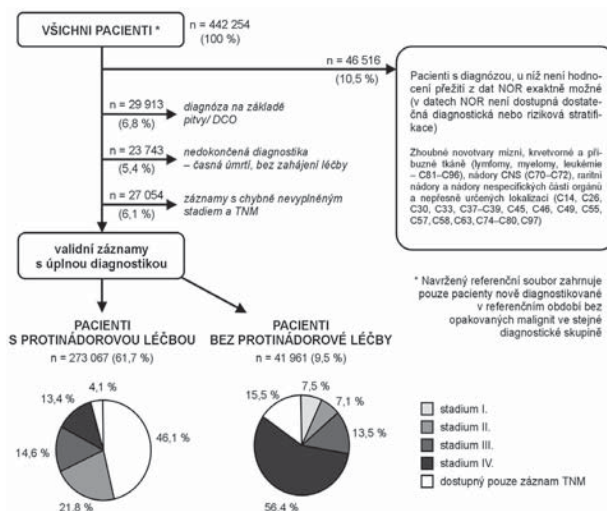
Česká republika ovšem disponuje plně reprezentativními daty a odborná společnost nadto sleduje dosahované přežití. Národní referenční standardy pětiletého přežití za období srovnatelné s EURO CARE-4 byly opakovaně prezentovány na českých konferencích a v roce 2007 byly i souhrnně publikovány [3]. Popis metodiky EURO CARE-4 je dostupný a můžeme tedy prezentovat populační data ČR v podobě srovnatelné s mezinárodními studiemi.

Stav Národního onkologického registru ČR a modelování přežití

Podrobný audit kvality dat NOR byl již publikován v časopise Klinická onkologie [3], a proto se zde omezíme pouze na shrnutí závěrů významných z hlediska modelování přežití. Databáze NOR jednoznačně představuje základnu pro nalezení smysluplného referenčního souboru, jehož kvalita umožňuje referenční analýzu přežití. Ve shodě se studií EURO CARE-4 jsme rozsah analyzovaných dat omezili na období 1995–2003, kdy můžeme pracovat s validními záznamy podle novějších verzí TNM klasifikace. Obrázek 1 znázorňuje kroky, které vedly k vymezení konečného referenčního souboru z výchozích $n = 521\ 745$ záznamů hlášených od 442 254 jedinečně identifikovaných pacientů (Obrázek 2). Stratifikace na obrázku 2 pracuje pouze s unikátními pacienty a je nezbytná, neboť opakovaně hlášené malignity u téhož člověka by zkreslovaly definici referenčního souboru.



Obr. 1



Obr. 2

Všechny úpravy (Obrázky 1 a 2) byly prováděny ve shodě s renomovanými mezinárodními publikacemi a jejich detailní zdůvodnění lze nalézt v již citované práci Dušek a kol. [3]. Jedná se zejména o následující úpravy:

- Odfiltrování diagnóz, u nichž není exaktní hodnocení výsledků léčby v databázi NOR možné. Jde o diagnózy se zcela specifickou léčbou nebo o diagnózy, kde neexistuje TNM klasifikace nebo má jen omezenou platnost jako jsou hematologické diagnózy, nádory *in situ* a nádory CNS.
- Odfiltrování záznamů s nejasným datem diagnózy, které nemohou být zahrnuty do kalkulace celkového přežití, tedy záznamů diagnostikovaných při pitvě a záznamů DCO.
- Odfiltrování záznamů s nekompletní diagnostikou v důsledku časného úmrtí nebo jiné události, která zabránila dokončení diagnostiky a zahájení léčby. Tyto záznamy by znemožňovaly analýzu přežití pro jednotlivá klinická stadia.
- Detailní analýza odhalila pouze 6% záznamů s problematickou diagnostickou částí. Tyto tzv. „unstaged“ záznamy byly z referenčních analýz vypuštěny, neboť neumožňují věrohodné určení diagnózy. Tímto nedojde k systematickému zkreslení výstupů, neboť ve shodě s mezinárodní literaturou nevybočuje typické přežití u těchto problematických záznamů z mediánových hodnot.

Z obrázků 1 a 2 tedy pro sdělení v tomto článku vyplývá:

- Česká data jsou dostatečně rozsáhlá a reprezentativní pro analýzy přežití srovnatelné s dalšími evropskými státy.
- Česká data umožňují podrobnější analýzy než uvádí studie EUROCORE-4, neboť obsahují identifikaci klinického stadia a TNM, a dále rovněž popis aplikované terapie.
- Česká populační data jsou plně pod kontrolou a je možné z nich pomocí datových filtrů definovat různé zaměřené soubory.

Metodika EUROCORE-4 a její aplikovatelnost na česká data

V této kapitole se nebudeme zabývat detailním rozбором metodik populačního hodnocení přežití, čtenáře lze odkázat na rozbor uvedený v práci Dušek a kol. [3]. Obecně lze konstatovat, že v čele studie EUROCORE-4 stojí velmi zkušení analytici dat a jejich zpracování nelze po statistické stránce nic vytknout. Také použitá metodika tzv. kohortní analýzy je standardní a je plně kompatibilní s přístupem použitým i pro česká data [4, 5]. Přesto existují jisté rozdíly, které mají vliv na konečný prezentovaný výsledek. Primárním cílem studie EUROCORE je dosáhnout srovnatelnosti různých registrů, které vypovídají o různé demograficky strukturovaných populacích. Tomu tedy musí být poplatná metodika standardizace výpočtů. Naopak standardy navržené pro česká data byly kalkulovány s cílem věrohodně popsat přežití v ČR a umožnit srovnávací analýzy uvnitř státu. Původně publikované české výsledky byly tedy váženy s ohledem na demografickou strukturu české populace pacientů, zatímco autoři EUROCORE museli vážit s ohledem na strukturu jim dostupných dat. Metodické rozdíly lze stručně komentovat takto:

- Mírný rozdíl EUROCORE-4 proti hodnotám publikovaným původně pro ČR [3] je v hodnoceném časovém období, neboť EUROCORE-4 zahrnuje všechny pacienty diagnostikované v letech 1995-1999 a sledované do konce roku 2003, zatímco při výpočtu referenčních standardů přežití v ČR byli uvažováni pacienti diagnostikovaní v letech 1995-1998, tedy s kompletním pětiletým sledováním. Tento rozdíl má však pouze marginální význam.
- Naopak významný rozdíl lze nalézt ve věkové standardizaci relativního přežití. Referenční hodnoty přežití navržené pro ČR [3] byly standardizovány dle zastoupení pohlaví a pěti věkových skupin (<50, 50-59, 60-69, 70-79 a 80 a více let) v rámci jednotlivých diagnóz. Nejprve bylo v každé definované třídě vypočteno přežití a následně pak byl dle vah tříd vypočten vážený průměr těchto hodnot. Autoři studie EUROCORE-4 použili váhy odvozené z věkové struktury

populace evropských onkologických pacientů ve studii EUROCORE-2 [6]. Zde byly diagnózy rozděleny shlukovou analýzou do tří skupin (dle podobné věkové distribuce) a pro každou byly navrženy bez ohledu na pohlaví váhy odpovídající následujícím věkovým třídám: 15-44, 45-54, 55-64, 65-74 a 75-99 let. Tyto váhy jsou uvedeny v tabulce 1 spolu s váhami, které by odpovídaly situaci v NOR při použití stejných věkových kategorií jako ve studii EUROCORE-4.

Z tabulky 1 jednoznačně vyplývá, že váhy aplikované ve studii EUROCORE-4 zesilují u většiny nejčastějších diagnóz vliv spíše starších věkových tříd, zatímco v ČR jsou tyto diagnózy poměrně silně zastoupeny i v relativně mladších věkových třídách. „Evropské vážení“ tak nutně pozici ČR mírně znevýhodňuje. Tento jev musel být ještě více patrný uvážíme-li malý objem nereprezentativních dat, která byla z ČR do EUROCORE-4 zaslána.

Použití vah odpovídajících evropské standardní populaci onkologických pacientů může výrazným způsobem ovlivnit výsledné hodnoty relativního přežití jednotlivých států. Spojené váhy logicky zesilují vliv věkových skupin dominujících ve spojené evropské populaci. Relativní zastoupení různých věkových skupin se ale může v jednotlivých zemích lišit. Z českého pohledu je také diskutabilní citovaná standardní evropská populace onkologických pacientů [6], neboť soubor, na jehož základech byly váhy stanoveny, nebyl v celoevropském měřítku zcela reprezentativní.

Srovnání reprezentativních dat ČR s daty studie EUROCORE 4

Výše uvedený komentář dokládá silný vliv použitého způsobu věkové standardizace na výsledné hodnoty přežití. Autoři EUROCORE-4 nicméně postupovali správně, neboť použili spojená data analyzovaných registrů a vytvořili tak váhy na základě dostupného souboru evropských registrů. Takto generované váhy ale znevýhodnily pozici dat ČR a přispěly k výslednému nelichotivému výsledku (Tabulka 1). Dále je logické, že čím méně dat konkrétní

stát do celku nahlásí, tím je vliv jeho populace méně viditelný v celkovém standardizujícím vážení. Minoritní export poskytnutý z české strany tak situaci ještě zhoršil.

V tuto chvíli nemáme k dispozici přesná data, která byla z ČR do EUROCORE-4 odeslána, a nemůžeme tedy výpočty rekonstruovat přímo na zasláných záznamech. Na obrázku 3 tedy nabízíme srovnání hodnot pětiletého relativního přežití studie EUROCORE-4 [1] s výsledky získanými nad úplnými českými daty stejnou metodou. Česká data přitom zpracováváme dvojím způsobem:

- výpočet vážený podle demografie české populace pacientů
- výpočet vážený podle metodiky aplikované v EUROCORE-4

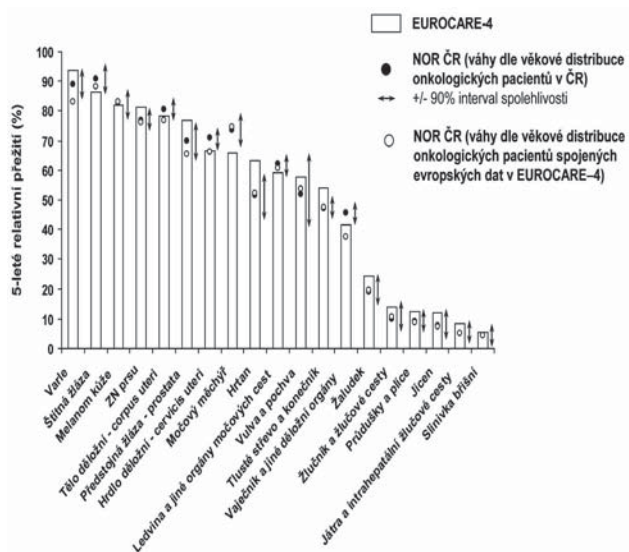
Výsledné srovnání na obrázku 3 a v tabulce 2 potvrzuje předchozí metodické úvahy. Aplikujeme-li na data NOR váhy dle evropských dat, výsledné přežití u většiny diagnóz poklesne. Pokles je více viditelný u diagnóz, kde evropské váhy zesilují vliv starších věkových tříd, kde je menší pravděpodobnost dlouhodobého přežití. I přes tyto problémy je však závěr srovnání reprezentativních českých dat a výsledků EUROCORE-4 jasný:

- Přežití dosahované v ČR se u většiny diagnóz významně neliší od průměru vyspělých zemí Evropy. U řady diagnóz tento všeobecný průměr dokonce překračujeme, nicméně většinou opět statisticky nevýznamně. Rozdíly oproti průměrným evropským datům se pohybují přibližně v rozsahu do 5%, což zaniká ve variabilitě odhadů.
- Ve shodě s Evropou máme nejvyšší přežití u diagnóz C62, C73, C50, C54, C55 a naopak nejhorší výsledky u C23-C24, C34, C15, C22 a C25.
- Statisticky významně lepší výsledky ČR byly oproti EUROCORE-4 zjištěny pouze u C67 a naopak významně snížená pravděpodobnost přežití byla zachycena u C32 a C61.

Závěr je jednoznačný. Pokud bychom do EUROCORE-4 zaslali skutečně reprezentativní a validní popu-

Tabulka 1. Váhy použité pro standardizaci odhadů relativního přežití ve studii EUROCORE-4 a jejich obraz v datech NOR

i Diagnostická skupina	Váhy použité ve studii EUROCORE-4 (Corazzari a kol., 2004)						Váhy dle NOR ČR při použití stejných věkových kategorií jako ve studii EUROCORE-4					
	15 - 44 let	45 - 54 let	55 - 64 let	65 - 74 let	75 - 99 let	Celkem	15 - 44 let	45 - 54 let	55 - 64 let	65 - 74 let	75 - 99 let	Celkem
C00-C08	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	11,9 %	29,0 %	25,0 %	20,8 %	13,4 %	100,0 %
C09-C10,C12-C14	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	12,2 %	39,1 %	28,3 %	15,2 %	5,1 %	100,0 %
C11	28,0 %	17,0 %	21,0 %	20,0 %	14,0 %	100,0 %	17,9 %	24,6 %	24,1 %	24,1 %	9,2 %	100,0 %
C15	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	6,3 %	31,8 %	29,5 %	22,3 %	10,1 %	100,0 %
C16	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	5,2 %	12,0 %	19,4 %	35,0 %	28,4 %	100,0 %
C18-C21	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	3,8 %	13,2 %	22,9 %	37,5 %	22,6 %	100,0 %
C22	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	4,5 %	16,4 %	22,4 %	36,4 %	20,3 %	100,0 %
C23-C24	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	1,9 %	9,7 %	18,4 %	39,1 %	30,9 %	100,0 %
C25	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	3,7 %	15,2 %	22,0 %	36,2 %	22,9 %	100,0 %
C32	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	7,0 %	32,5 %	32,0 %	21,2 %	7,2 %	100,0 %
C33,C34	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	2,9 %	18,8 %	31,0 %	35,4 %	11,9 %	100,0 %
C43	28,0 %	17,0 %	21,0 %	20,0 %	14,0 %	100,0 %	22,5 %	23,2 %	19,0 %	23,3 %	12,1 %	100,0 %
C50	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	11,1 %	25,0 %	22,1 %	26,6 %	15,1 %	100,0 %
C51-C52	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	4,7 %	10,4 %	17,1 %	33,9 %	33,8 %	100,0 %
C53	28,0 %	17,0 %	21,0 %	20,0 %	14,0 %	100,0 %	39,0 %	24,9 %	15,8 %	13,8 %	6,6 %	100,0 %
C54,C55	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	4,7 %	19,1 %	28,9 %	35,3 %	12,1 %	100,0 %
C56	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	14,9 %	25,8 %	22,6 %	25,3 %	11,4 %	100,0 %
C61	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	0,2 %	3,4 %	16,4 %	47,2 %	32,8 %	100,0 %
C62	60,0 %	10,0 %	10,0 %	10,0 %	10,0 %	100,0 %	84,7 %	10,4 %	2,8 %	1,3 %	0,8 %	100,0 %
C64-C66,C68	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	6,3 %	20,1 %	27,2 %	33,4 %	12,9 %	100,0 %
C67	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	3,5 %	12,2 %	22,4 %	40,6 %	21,2 %	100,0 %
C73	28,0 %	17,0 %	21,0 %	20,0 %	14,0 %	100,0 %	31,4 %	28,0 %	15,2 %	17,5 %	8,0 %	100,0 %
	7,0 %	12,0 %	23,0 %	29,0 %	29,0 %	100,0 %	20,2 %	19,6 %	20,5 %	24,4 %	15,2 %	100,0 %



Obr. 3

lační data NOR, výsledky srovnání by pro ČR nebyly negativní a v celkovém přehledu dokonce mírně nadprůměrné. A to i přesto, že nás jako populaci u řady diagnóz znevýhodňuje vážení použité v EUROCARE-4.

Výsledky studie EUROCARE 4 mají omezenou interpretaci

U populačních analýz přežití existují v zásadě následující dvě možnosti s velmi odlišnou interpretací a informačním významem:

- (1) Do analýzy zahrneme všechny pacienty, tedy i ty, kteří neprodělali protinádorovou terapii. Tento postup, který byl zvolen ve studii EUROCARE-4, poskytuje celkový epidemiologický obraz o dané populaci. Jeho informační přínos pro hodnocení zdravotnického systému je ale velmi omezený, neboť není možné separovat skutečně protinádorově

lčené pacienty a nemáme k dispozici ani údaje o přežití pro různá klinická stadia. Klinické stadium přitom často determinuje přežití významněji než samotná diagnóza.

- (2) Do analýzy vstupují pouze data pacientů, kteří skutečně prodělali protinádorovou terapii. Tedy záznamy, které vypovídají o skutečné zátěži a také výkonnosti zdravotnických zařízení. Vypuštěny jsou záznamy s nulovým přežitím (DCO, nálezy při pitvě) a také záznamy pacientů s časným úmrtím bez zahájené protinádorové terapie. Výsledné analýzy dále nezahrnují záznamy pacientů, kteří neabsolvovali léčbu z jiných objektivních důvodů jako je odmítnutí léčby, vysoký věk a pokročilost onemocnění. Takto provedená analýza reálně vypovídá o přežití léčených pacientů a může být považována za indikátor kvality léčebné péče.

Tabulka 3. Hodnoty pětiletého absolutního a relativního přežití kalkulované KOMPLETNÍ analýzou na referenčním souboru dat Národního onkologického registru ČR za období 1995 – 2003. Analýza dat pacientů s protinádorovou léčbou ze všech typů zdravotnických zařízení.

Diagnostická skupina	Stadium 1+2			Stadium 3			Stadium 4			
	N	5-leté přežití	5-leté relativní přežití	N	5-leté přežití	5-leté relativní přežití	N	5-leté přežití	5-leté relativní přežití	
C00-C08	Dutina ústní	1733	61,81	78,8	733	31,93	36,55	1388	18,81	21,49
C09-C14	Hltan a nosohltan	368	51,44	59,79	542	37,19	43,68	1618	23,79	27,32
C15	Jícen	506	16,56	19,94	422	6,99	7,94	349	2,43	2,8
C16	Žaludek	3167	40,81	52,62	1586	11,87	14,76	1488	3,66	4,81
C18-C21	Tlusté střevo a konečník	23350	57,97	75,48	9078	36,28	46,51	7643	9,97	12,79
C22	Játra a intrahepatální žlučové cesty	94	28,1	32,55	159	23,06	26,58	319	6,09	6,88
C23-C24	Žlučník a žlučové cesty	900	33,15	41,42	373	12,17	15,29	771	5,12	6,31
C25	Slinivka břišní	523	17,63	21,3	375	8,45	9,54	1050	1,64	1,88
C32	Hrtan	1567	65,2	78,44	778	44,29	51,96	1077	22,54	25,31
C34	Průdušky a plic	5539	28,47	33,2	8837	8,11	9,61	7892	2,77	3,27
C43	Melanom kůže	7956	79,75	92,64	1254	43,57	55,23	391	17,35	21,16
C50	ZN prsu	25946	80,57	91,58	4904	50,17	59,84	2808	20,45	24,75
C51-C52	Vulva a pochva	865	61,08	75,43	229	25,92	33,9	119	14,44	16,25
C53	Hrdlo děložní - cervicis uteri	5055	81,49	85,58	1489	43,09	46,39	393	13,63	14,27
C54	Tělo děložní - corpus uteri	9062	79,35	90,38	851	44,25	50,56	350	23,51	26,93
C56	Vaječník a jiné děložní orgány	2779	78,34	84,7	2021	32,72	35,45	1733	17,66	18,96
C61	Předstojná žláza - prostata	6881	66,07	97,58	1771	54,69	80,81	3559	24,84	37,0
C62	Varle	2406	94,09	96,31	418	56,46	57,31	*	*	*
C64-C66,C68	Ledvina a jiné orgány močových cest	7609	74,73	89,03	2476	53,17	64,2	2140	15,71	19,07
C67	Močový měchýř	7825	65,6	86,6	659	23,71	32,52	616	16,86	21,41
C73	Štítná žláza	2579	94,64	101,21	352	76,28	84,3	349	51,45	56,86
	Ostatní zhoubné nádory	1324	61,85	73,93	326	43,08	51,01	451	18,98	21,54

* U diagnózy C62 není stadium 4 v nové verzi klasifikace TNM definováno

Tabulka 2. Srovnání pětiletého relativního přežití u vybraných diagnóz ve studii EUROCARE-4 a výsledků reprezentativní analýzy NOR ČR (všichni pacienti s i bez protinádorové terapie; kohortní analýza)

¹ Data z NOR ČR odpovídají výsledkům referenčních analýz vážených na demografickou strukturu populace českých onkologických pacientů (Dušek a kol., 2007). Vliv vážení aplikovaného na základě evropských dat je patrný ze srovnání na obrázku 3.

* Statisticky významný rozdíl mezi výstupy EUROCARE-4 a analýzou reprezentativních dat NOR

Diagnostická skupina	5-leté relativní přežití (%)		
	EUROCARE-4	NOR ¹	
C62	Varle	93,8	88,9
C73	Štítná žláza	86,5	90,8
C43	Melanom kůže	82,0	82,7
C50	ZN prsu	81,1	76,8
C54	Tělo děložní - corpus uteri	78,3	80,6
C61	Předstojná žláza - prostata	77,0	69,9*
C53	Hrdlo děložní - cervicis uteri	66,5	70,8
C67	Močový měchýř	65,8	73,7*
C32	Hrtan	63,1	51,6*
C64-C66,C68	Ledvina a jiné orgány močových cest	59,2	62,0
C51-C52	Vulva a pochva	57,8	51,9
C18-C21	Tlusté střevo a konečník	53,9	47,1
C56	Vaječník a jiné děložní orgány	41,6	45,5
C16	Žaludek	24,1	19,2
C23-C24	Žlučník a žlučové cesty	14,1	9,9
C34	Průdušky a plic	12,6	9,2
C15	Jícen	12,3	7,7
C22	Játra a intrahepatální žlučové cesty	8,6	5,2
C25	Slinivka břišní	5,5	4,4

Česká data NOR umožňují oba zmíněné analytické přístupy a logicky bychom se tedy při hodnocení kvality péče měli držet více vypovídající analýzy protinádorově léčebných pacientů. Studie EUROCORE-4 tyto cíle naplnit nemohla, neboť různorodá a parametricky chudá evropská data takovou analýzu neumožňují. Toto konstatování není rozhodně kritikou autorů, tito naopak dosáhli možného maxima z poskytnutých dat. Musíme si ale uvědomit velmi omezenou interpretační hodnotu výsledku EUROCORE-4:

- studie EUROCORE-4 není evropsky zcela reprezentativní, nejsou do ní zařazeny všechny státy a ne všechny analyzované registry jsou celopopulační
- výsledky neanalyzují přežití dle klinických stadií a jsou tedy pouze epidemiologickým obrazem situace v jednotlivých zemích
- způsob zpracování výsledků může zkreslovat reálné hodnoty přežití dosahované v menších státech, pokud

je jejich věkově specifická incidence posunuta oproti spojeným datům ostatních zemí

Nutno zdůraznit, že autoři studie EUROCORE-4 jsou si tohoto vědomi a data v diskuzi velmi opatrně interpretují. Pro zlepšení informovanosti o skutečných výsledcích české onkologie není tedy nutné polemizovat s výsledky studie EUROCORE-4, ale je nutné publikovat skutečně relevantní standardy přežití. Tyto jsou již navrženy a zde je ve stručné verzi shrnuje tabulka 3. Detailnější rozbor lze nalézt v práci Dušek a kol. [3].

Na závěr se vši důrazností konstatujeme, že není možné z ČR odesílat pro tak závažná a viditelná mezinárodní zpracování nereprezentativní a částečná data. Česká onkologická společnost nyní bude závěry studie EUROCORE-4 korigovat mezinárodní publikací reálných českých dat. Nadále není únosné, aby se situace popisovaná v tomto článku opakovala.

Literatura

1. Berrino F., DeAngelis R., Sant M. et al.: Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCORE-4 study. *Lancet Oncology*, published online in August 21, 2007: <http://oncology.thelancet.com>
2. Verdecchia A., Francisci S., Brenner H. et al.: Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCORE-4 data. *Lancet Oncology*, published online in August 21, 2007: <http://oncology.thelancet.com>
3. Dušek L., Žaloudík J., Indrák K.: Informační zázemí pro využití onkologických populačních dat v ČR. *Klinická onkologie – Supplement*, březen 2007, 196 s.. ISSN 0862-495 X.
4. Hakulinen T.: Cancer survival corrected for heterogeneity in patient withdrawal. *Biometrics* 1982; 39:933-42.
5. Brenner H. and Hakulinen T.: On crude and age-adjusted relative survival rates. *Journal of Clinical Epidemiology*, 2003, 56: 1185 – 1191.
6. Corazziari I, Quinn M, Capocaccia R.: Standard cancer patient population for age standardising survival ratios. *Eur J Cancer* 2004; 40: 2307-16.

Korespondenční adresa:

Doc. MUDr. L. Dušek, CSc.,
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity Brno
Mobil: +420 602 758 054

ONKOLOGICKÝ VÝZKUM ČESKÉ REPUBLIKY V SOUVISLOSTECH

ONCOLOGY RESEARCH IN THE CZECH REPUBLIC WITH REGARD TO THE SPECIFIC CONDITIONS

ŽALOUĐÍK J.,

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV V BRNĚ

Kvalitou a výsledky výzkumu zhoubných nádorových onemocnění v České republice se nelze zabývat izolovaně bez kontextu a srovnání se zahraničím, především pak se zeměmi, které jsou nám tradicí a prostředky blízké nebo k nimž se v rámci mezinárodní kooperace chceme přiblížit. Vždy budeme jen součástí velkého soukolí světové vědy, avšak záleží jen na nás jak bude tento náš podíl navenek významný, a také, co si v tomto procesu odneseme pro zlepšení našich poměrů doma. Pod pojmem výzkum si u nás často velmi zúženě představujeme jen jakési tajemné snažení titulovaných vědců ukrytých v laboratořích a směřujících k novému léku proti rakovině. Na mezinárodním poli se pod pojmem „research“ skrývá kromě uvedeného také pátrání po pravém stavu věcí na úrovni celé populace, v rámci skupin nemocných na stejnou diagnózu, hodnocení stavu informovanosti laické i odborné veřejnosti, úsilí o pokrok také v prevenci, stejně jako v diagnostice či léčbě, dokonce i sledování výsledků projektů či efektivity vynakládaných prostředků.

ERCM Forum

Od roku 2002 spolupracuje Masarykův onkologický ústav na aktivitách *European Cancer Research Managers Forum* (Fórum manažerů evropského výzkumu rakoviny), které funguje při Evropském parlamentu v Bruselu. Cílem ERCM fóra bylo nejprve popsat stav výzkumu rakoviny a jeho financování v Evropě, provést srovnání uvnitř EU i s ostatním světem, především s USA, poté cíleně podpořit onkologický výzkum v evropském prostoru identifikací hlavních finančních zdrojů a v budoucnu se možná pokusit i o racionální koordinaci alokace zdrojů a evaluace výsledků podle sjednocených kritérií.

Postupně pak sekretariát ERCM navazoval podle informací účastníků fóra přímé kontakty s jednotlivými grantovými a sponzorujícími institucemi či organizacemi ve všech členských zemích a dotazoval se na prostředky věnované onkologickému výzkumu v roce 2004. K tomu byly získány další informace o vědeckém výkonu, měřeném v této fázi pouze počtem publikací, registrovaných ve světových databázích. Do hodnocení byly kromě členských zemí EU zahrnuty i Švýcarsko a Izrael, které v ERCM fóru rovněž

spolupracují. Celou práci koordinovali Britové, jmenovitě Seth Eckhouse, Grant Lewison a Richard Sullivan.

18.září 2007 byla ve spíše klubovém prostředí o 34 účastnících v budově Evropského parlamentu Richardem Sullivanem uvedena a diskutována souhrnná zpráva s názvem *Investment and Outputs of Cancer Research : from the Public Sector to Industry*. Zpráva je nyní již veřejně k dispozici na webové adrese www.ercmforum.org. Domnívám se nicméně, že si zaslouží komentář i na základě osobní zkušenosti z jednání. A to jak s ohledem na závěry, tak i na obsah diskuse, která v Bruselu proběhla, a nepochybně i v kontextu se stavem, jak ho známe z domova.

Eurokontext

V roce 2004 bylo v Evropě registrováno 2 886 800 případů rakoviny, z toho v České republice 68 641 případů. Úmrtní na rakovinu bylo v roce 2004 v Evropě zaznamenáno 1 711 000, z toho v České republice 29 168. Poměr úmrtnosti a výskytu, tedy mortality a incidence čili MI index, činil v celé Evropě 0,593, v České republice 0,425. Při určitém zjednodušení to znamená, že v České republice přežívá zhoubná nádorová onemocnění o 17% pacientů více než činí průměr celé Evropy, ať už je to časnějším zachytem, příznivější strukturou onkologických diagnóz nebo lepší léčbou než je průměr Evropy. To je dobré zjištění. Ve skutečnosti však bez detailního vhledu do struktury diagnóz a péče v jednotlivých zemích jen málo vypovídá o cílevědomé zásluze na úspěchu. Potěší však, že jsme v tomto hrubém parametru umístění dosti nad průměrem, ač nás leckdo leckde občas přesvědčuje, že jsme v onkologické péči pod průměrem. Stalo se tak třeba v hodnocení EURO CARE III i EURO CARE IV, kam data za Českou republiku zmateně, bez odborné validace a bez garance odbornou společností stále předávají úředníci.

V celkovém objemu prostředků, investovaných do onkologického výzkumu v roce 2004, se částkou 4,4 miliony euro nacházíme zhruba uprostřed tabulky evropských zemí. Tabulku vede částkou 783 milionů euro Velká Británie, následuje Německo s 324 miliony euro a Francie s 249 miliony euro. Zajímavé je hodnocení podílu státních a nestátních prostředků na této investici. V Británii, Fran-

cii, Itálii nebo Švýcarsku je tento podíl zhruba vyrovnaný. Východoevropské země, včetně České republiky, ale také třeba Portugalsko a Řecko, jsou navyklé spoléhat především na státní prostředky. V České republice činí podíl nestátních prostředků jen asi 1/16, tedy kolem 6%.

Mimořádně zajímavé jsou však absolutní částky věnované onkologickému výzkumu na jednoho obyvatele. Zde se Česká republika nachází v dolní třetině částkou 0,43 euro na obyvatele. Je skutečně zarážející a v kontrastu k tomu, za jakou hrozbu veřejnost rakovinu pokládá, že ročně na každého občan připadá jen nějakých 13 Kč, což je částka zanedbatelná i pro ty nejchudší. Ve Velké Británii, která tabulku vede, je to na jednoho občana přes 13 euro, tedy skoro 400 Kč.

V hodnocení podílu částky věnované výzkumu rakoviny na hrubém národním produktu (GDP) se pozice České republiky vylepšuje do poloviny tabulky hodnotou 0,0051%. Z východoevropských států jsou o málo před námi jen Slovensko a Slovinsko, asi dvojnásobkem naší hodnoty pak zejména Estonsko.

V publikační produkci výsledků onkologického výzkumu si Česká republika nestojí nijak špatně v kategorii států, které do EU teprve nedávno přistoupily. Naš podíl na celkovém počtu publikací onkologického výzkumu všech zemí EU a USA společně činí sice jen 0,36%, je to ale více než vykazuje třeba Portugalsko, Irsko a většina východoevropských zemí. O dvě desetiny procenta nás předstihlo pouze výrazně lidnatější Polsko. Na prvních místech jsou, jak lze očekávat, Německo (9,6%), Velká Británie (9,1%), Itálie (7,3%) a Francie (6,7%) Podíl samotných USA činí v tomto společném hodnocení Evropy a USA ovšem plných 48%.

Pozice České republiky se výrazně vylepšuje, je-li počet publikací vztažen k hrubému národnímu produktu jako jednomu z možných ukazatelů síly ekonomiky státu. Pak se Česká republika objevuje na 9. místě dokonce před státy vítězíci v absolutních počtech publikací, jako jsou již zmíněné Německo, Velká Británie či Francie, kde je poměr mezi bohatstvím státu a onkologickou vědeckou produkcí nižší. V tomto hodnocení se naopak na předních místech umístilo Švédsko, Řecko, Holandsko a Finsko. Před Českou republikou je ovšem kromě Rakouska také Slovinsko. Jak se zdá, s lidnatostí státu tedy možná relativně klesá schopnost zhodnocovat národní důchod ve vědeckém produktu. To ovšem nic neříká o schopnosti inovací, k nimž přispívá zejména soukromý sektor, který je z většiny nadnárodní.

Zajímavé je také hodnocení přesunu těžiště výzkumu od základního ke klinickému, což byl v letech 1995-2003 trend patrný v zemích EU i v USA. Zejména je tato tendence patrná ve východoevropských zemích, s výjimkou Slovenska a Rumunska. Souvisí to patrně s oslabením zájmu transformujících se států na financování základního výzkumu i s relativní absencí nestátních finančních zdrojů. Na této scéně více dominují praktické přístupy, nezřídka i pod vlivem farmaceutických a biotechnologických firem. Posilování klinického výzkumu na úkor základního může sice znamenat momentální úsilí o větší efektivitu využití omezených prostředků, z dlouhodobějšího hlediska však může podvazovat výzkumné

kapacity státu a vést k „odlivu mozků“ do zemí s lepšími podmínkami pro základní výzkum. Stojí za pozornost, že do základního výzkumu více než do klinického nyní investují třeba Rakousko, Dánsko, Norsko či Irsko. Není vyloučeno, že tak investují do budoucnosti a příští lepší konkurenceschopnosti.

Každý den umírá na rakovinu 3 200 Evropanů. Nač tedy strašit jen terorismem. Mnozí by na rakovinu umírat nemuseli. Někteří na tom ovšem vědomou konzumací rizik léta pracovali, většina je v tom nevinně. Hlavním cílem výzkumu rakoviny by mělo být, aby se na rakovinu umíralo méně, zejména pak v produktivním věku. Cílů se daří i nedaří dosáhnout. Zatím jsou měřeny a hodnoceny jen dílčí výsledky, tedy počty publikovaných prací mezinárodně uznaných za dostatečně vědecké. V bruselské diskusi jsme se shodli, že vědecké publikace jsou zatím hlavním indikátorem jen proto, že jde o parametr dostupný. Až se v evaluaci zdokonalíme a posuneme vpřed, zůstanou počty publikací jen indikátorem vedlejším (*surrogate indicator*) a hlavním ukazatelem efektivity výzkumných aktivit se stanou reálné změny a výsledky v onkologické praxi (*patient-related outcomes*). Ty je sice možné měřit již nyní, ale dosud obtížně získávat a validovat pro veřejné použití.

Nepochybně se o zájmu na výzkumu rakoviny v České republice spíše jen hovoří než by se projevovale ochota více investovat. Půl eura ročně na každého občana, respektive jedno jediné euro na občana ekonomicky produktivního, je až neuvěřitelně nízká částka, která snad ani nikoho neopravňuje očekávat výstupy lepší než ty, jichž česká věda v onkologii za daných podmínek dosahuje.

Globální kontext

EU projevuje ve většině svých činností a výsledků stále nutkání se vymezovat a srovnávat se Spojenými státy americkými. Dvojnásobně to platí v biomedicinském a tedy i onkologickém výzkumu a při hodnocení jeho efektivity. V přímých nákladech na výzkum rakoviny USA v roce 2004 zcela dominovaly částkou 5,168 miliardy euro, zatímco v Evropě to bylo jen 1,971 miliardy euro. Při kalkulaci zdrojů bibliometrickou metodou, v níž se projeví i nepřímá podpora výzkumu rakoviny na univerzitách a ve zdravotnických zařízeních, je pak celkový objem prostředků v USA 5,277 miliardy euro, tedy jen o 2% vyšší, ovšem v Evropě 3,335 miliard euro, což je o 41% více oproti přímo deklarovaným nákladům. Tyto rozdíly svědčí o nepoměrně vyšší míře transparence při alokaci prostředků na výzkum v USA než je tomu v Evropě, kde velká část investic je méně adresná a volněji interpretovatelná. V těchto srovnáních není bez zajímavosti také vysoká účast samotného Japonska částkou 1,004 miliardy euro, ovšem s ohledem na nevelký počet obyvatel také Kanady s 276 miliony euro a Austrálie se 162 miliony euro.

USA nesporně nesou hlavní tíhu investic do onkologického výzkumu. Je to patrné i z částky na obyvatele, která činí 17,6 euro ročně. Jak již bylo uvedeno, v případě Velké Británie, která je v tomto parametru na prvním místě Evropy, je to 13 euro a znovu lze jen opakovat, že v České republice pouhých 0,43 euro na obyvatele ročně.

Anglofonní země Velká Británie, USA, Kanada a Austrálie ve svém součtu v podpoře onkologickému výzkumu

ve světě absolutně a bezkonkurenčně dominují. Odrazem toho je ostatně i skutečnost, že naprostá většina renomovaných vědeckých časopisů, uveřejňujících výzkumné práce z oboru onkologie, vychází v anglickém jazyce. To opět pozitivně ovlivňuje vliv těchto zemí na investice do výzkumu, ať již ze státních, charitativních nebo komerčních prostředků.

Pro Českou republiku, ovšem i mnohé jiné evropské země, je vskutku nesnadné budovat v takto nastavené partii kompetitivní pozici. Tím více potěší, že v publikační produkci měřené v relaci k bohatství státu se v tabulce nikterak neztrácíme, a to ani za situace, kdy roční příspěvek onkologickému výzkumu na obyvatele činí oněch zanedbatelných 13 Kč. Nesporně však v České republice existuje značná rezerva v získávání prostředků od nestátních, charitativních a komerčních organizací, navíc za situace, kdy ekonomický standard obyvatel je v celosvětovém srovnání dosti vysoký.

Firemní kontext

Na onkologickém výzkumu se značnou měrou podílí také komerční sektor, především nadnárodní farmaceutické firmy. Celkový objem jimi vložených prostředků činil v roce 2004 asi 3,1 miliardy euro, což je skoro tolik jako poskytly společně v přímých i nepřímých nákladech všechny ev-

ropské státy. Na prvních třech místech dominují firmy Novartis (353 mil.euro), Aventis (342 mil.euro) a Roche (312 mil. euro). Tak významný příspěvek firem pro onkologický výzkum je jistě dobrou zprávou. Méně dobrou zprávou však je, že do popředí zájmu se tak dostává spíše jen medikamentosní léčba pokročilých nádorových onemocnění. Vliv na trendy úmrtnosti na nádory mají však naopak preventivní programy, časná diagnostika a chirurgická léčba, jejichž podpora zůstává neúměrně nízká. Státní prostředky by pro udržení proporcí a strategických cílů v onkologii měly situaci vyrovnávat a podporovat naopak více preventivní projekty a kurativní léčbu nádorů.

Závěr

Z přehledu ERCM fóra vyplývá, že ve srovnání se světovým výzkumem zhoubných nádorů nemusíme vůbec pokulhávat. Je třeba jen projevat zájem a nezdolnou ochotu zkoumat a kultivovat především stav věcí v nás a u nás. Zkoumat nejen organizaci molekul, chromosomů a buněčných organel v nádorových buňkách, nýbrž dát více pod mikroskop i organizaci vědy a financování onkologického výzkumu i praxe. A více věnovat pozornost těmto tématům také v médiích. Vždyť i za oněch 13 Kč na obyvatele ročně toho dokážeme poměrně dost.

Korespondenční adresa:

Prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.,
Masarykův onkologický ústav Brno
Žlutý kopec č. 7
656 53 Brno

MEZINÁRODNÍ GENETICKÁ KONFERENCE „EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE 2007“

INTERNATIONAL GENETIC CONFERENCE „EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE 2007“

LUKEŠOVÁ M.

**MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO,
ODDĚLENÍ EPIDEMIOLOGIE A GENETIKY
NÁDORŮ**

Ve dnech 16.-19. června 2007 se konala v Nice (Francie) konference „European Human Genetics Conference 2007“ (EHGC 2007). Jedná se o významnou genetickou konferenci, která je každoročně pořádána v některém z velkých evropských měst společností ESHG (European Society of Human Genetics). ESHG je mezinárodní odborná společnost založená v roce 1967, která podporuje výzkum a jeho aplikaci v lékařské genetice. Zároveň také usnadňuje kontakt mezi odborníky na jednotlivých pracovištích.

Konference EHGC 2007 byla již třicátá devátá v pořadí a navazovala na úspěšnou tradici konferencí, kde byly vždy prezentovány nejnovější výzkumy z oblasti lidské genetiky.

Konferenci navštívilo více než 100 vystavovatelů a 1650 účastníků, mezi kterými byli vědci, kliničtí lékaři, laboratorní pracovníci, psychologové, etičtí odborníci, biostatističtí atd.

Dějištěm konference bylo moderní konferenční centrum Acropolis, kde probíhaly přednášky souběžně v šesti sálech. Program byl velmi pestrý a zahrnoval jednotlivé oblasti genetiky, jako je klinická genetika, cytogenetika, prenatální diagnostika, onkogenetika, molekulární a biochemická podstata onemocnění, genetická analýza, populační genetika, genomika, genetické poradenství, terapie genetických onemocnění a další.

Na programu byly také různé workshopy a satelitní sympozia. V posterové sekci prezentovalo výsledky svého výzkumu asi 1400 vědeckých pracovníků. Na internetové stránce konference (<http://www.eshg.org/eshg2007/>) jsou k dispozici ke stažení všechny abstrakty ve formátu pdf.

Z velkého množství přednášek bych se zmínila alespoň o některých.

S. E. Ollila z Univerzity v Helsinkách prezentovala práci, jejímž cílem bylo zjistit pomocí funkčního testu, zdali missense mutace detekované v MSH2 genu vedou ke ztrátě schopnosti rozeznávat chybnou bázi v dvojřetězci DNA. MSH2 patří do skupiny genů, které opravují chybně spárované báze a zděděné mutace v těchto genech způsobují predispozici ke vzniku dědičného nepolypózního kolorektálního karcinomu. Velké množství mutací v těchto genech způsobuje pouze záměnu jedné aminokyseliny a jejich interpretace je proto složitá. Díky využití funkčního testu bylo možno rozlišit mutanty se ztrátou

schopnosti vázat se na chybně spárované báze, mutanty, jejichž schopnost navázat se byla oslabena a mutanty, kteří schopnost navázat se neztratili. Tato práce poskytla nové informace o patogenitě variant v MSH2 genu, což je důležité pro následné využití v klinickém poradenství.

Vědecký tým z Univerzitní nemocnice v Bonnu prezentoval výsledky studie sledování 83 pacientů s mutací v genu MUTYH. Zárodečné mutace v genu pro excizní reparaci MUTYH způsobují predispozici ke vzniku kolorektálního karcinomu. U 17% ze sledovaných pacientů byly zjištěny duodenální polypy, 49% pacientů mělo extraintestinální léze. Srovnáním s riziky pro běžnou populaci v daném věku ze studie vyplynulo, že nosiči mutace v MUTYH genu mají statisticky zvýšenou incidenci výskytu karcinomu ovaria, endometria a kožních tumorů.

Tým autorů z Portugalska shromáždil informace dostupné z literatury o souboru 99 nosičů mutace v CDH1 genu. Pacienti s mutací v tomto genu mají predispozici ke vzniku difúzního karcinomu žaludku. Věk pacientů při onemocnění byl mezi 16 a 73 lety, 75% pacientů bylo diagnostikováno před padesátým rokem věku. Poměr pohlaví pacientů byl přibližně 1:1. Mutace byly rozptýleny po celé délce genu, ale preferenčně se nacházely v exonech 2,3,7 a 11. Ze souhrnných výsledků vyplývalo, že pokud byla v rodině nalezena mutace způsobující předčasnou terminaci translace, rodina měla závažnější rodinnou anamnézu a k onemocnění pacientů docházelo v mladším věku, než když byla detekována mutace způsobující pouze záměnu aminokyseliny. Tyto nové poznatky mají velký význam pro genetické poradenství. Testování genu CDH1 u pacientů s karcinomem žaludku zvažujeme zavést také na našem pracovišti.

Vědci z Univerzity v Bruselu se zabírali otázkou zdravotního stavu dětí narozených po preimplantační genetické diagnostice. Autoři sbírali a vyhodnocovali data z 2756 cyklů prenatální genetické diagnostiky (PGD) a prenatálního genetického screeningu (PGS), které byly na pracovišti provedeny mezi rokem 1993-2005. Po transferu embryí se narodilo 567 dětí – z toho bylo 19 mrtvě narozených a 548 živě narozených, 9 dětí zemřelo neonatálně. Podíl perinatálních úmrtí 4,9% bude dále zkoumán. Procento výskytu závažnějších malformací bylo 3,6, což je srovnatelné s výsledky pozorovanými u dětí narozených po IVF/ICSI bez PGD. Na základě této studie lze tedy prohlásit, že biopsie embrya nevede ke zvýšení incidence výskytu závažných malformací.

Důležitostí externí kontroly kvality (EQA) v cytogenetických laboratořích se zabývala ve své přednášce B. Quellung-Pawley z Oxfordu. V současné době je v Evropě asi 700 cytogenetických laboratoří a méně než 50% z nich se pravidelně účastní kontroly kvality. Proběhla pilotní cytogenetická EQA, které se zúčastnilo 19 laboratoří z 18 států. Závěrečné zprávy odrážely odchylky v interpretaci výsledků mezi jednotlivými pracovišti. Tato kontrola kvality bude příští rok rozšířena a účast bude umožněna více laboratořím. Účastí v EQA dojde ke zlepšení poskytovaných genetické služby za účelem profitu pacientů.

Další přednáška kolektivu autorů se týkala pravidel uplatňovaných při genetickém poradenství ve 38 evropských zemích. V rámci studie byl zaslán elektronický dotazník předsedům národních genetických společností 29 zemí a kontaktním osobám v 9 zemích, kde tato společnost není. Výsledkem bylo zjištění, že legislativa týkající se poradenství existuje ve 13 zemích a pravidla ve 21 zemích. Témata nejčastěji zahrnutá v legislativě byla: poradenství v souvislosti s prenatálním testováním, informovaný souhlas, důvěrnost, školení osob poskytujících poradenství a nedirektivní přístup při poradenství. Zřídka byla v legislativě zahrnutá témata týkající se poradenství v souvislosti s predispozičním testováním pro multifaktoriální onemocnění a poradenství pro příslušníky etnických menšin. Celých 70% z dotázaných usuzuje, že existence pravidel týkajících se genetického poradenství jsou nezbytná a 90% si myslí, že jistá zlepšení v organizaci genetického poradenství v jejich zemi by byla potřebná. Celkovým cílem je sjednocení kvality genetického poradenství.

Na závěrečné plenární sekci přednášel o intracelulární degradaci proteinů profesor Aaron Ciechanover (Izrael), který získal v roce 2004 Nobelovu cenu za chemii za objev způsobu odbourávání proteinů iniciovaného ubiquitinem v zájmu sebeobrany proti chorobám. Poslední den konference došlo také k předání ceny ESHG 2007, kterou získal profesor Andrea Ballabio. Profesor Ballabio působí na univerzitě v Naples (Itálie), kde se zabývá mechanismy podmiňujícími vznik genetických onemocnění, strukturou a funkcí lidského genomu a také genovou terapií. Cenu mu předal předseda ESHG 2007-2008 Pier Franco Pignatti a předseda výboru pro vědecký program Han Brunner. Příští European Human Genetics Conference se bude konat v Barceloně 31.5.-3.6.2008. Internetová stránka konference bude v provozu od podzimu tohoto roku. ESHG konference bývá každoročně jedinečnou příležitostí seznámit se s novinkami z nejrůznějších oblastí lidské genetiky, dozvědět se jaké výzkumy probíhají na jednotlivých pracovištích a konzultovat genetickou problematiku s kolegy z jiných států.

onkologické společnosti

ZÁPIS ZE SCHŮZE VÝBORU ČOS KONANÉ DNE 16. ŘÍJNA 2007 V MASARYKOVĚ ONKOLOGICKÉM ÚSTAVU BRNO

Přítomni: Vorlíček, Petruželka, Feltl, Aschermannová, , Petera, Příbylová, Jelínková, Fínek, Stáhalová, Cwiertka , Žaloudík, Vyzula

Omluveni: Abrahámová ,Bartoš

Hosté : Dr.Rotterová, Dr.Horák

1. Předseda ČOS prof. Vorlíček přivítal všechny přítomné a zkontroloval plnění zápisu z minulé schůze.
2. Prof. Vyzula přivítal všechny členy výboru ČOS na MOÚ. Upozornil, že prostředky z bývalých X preparátů (z receptů) jsou dnes součástí paušálu jednotlivých ZZ a tyto prostředky je třeba „vydobít“, na pobočkách VZP.
3. Blahopřání doc. Peterovi k dopolednímu obhájení profesury před VR MU.
4. Prof. Petruželka oslovil ředitele VZP Dr. Horáka stran kódu 99991, nemá však zatím jeho odpověď.
5. Podrobná verze Národního onkologického programu. Výbor ČOS navrhuje doplnit k programu odkazy na jednotlivé aktivity onkologického programu a národní standardy v radiační onkologii (zajistí doc. Petera). Všechny odkazy budou na webové stránce NOP. Zajistí prof. Petruželka.
6. Spolupráce s Cancer United, v kontakt vstoupil prof. Petruželka. Odkaz na jejich aktivity bude na www.linkos.cz
7. Prof. Vorlíček: jednání (prof. Abrahámová, doc.Dušek) na radě NOR. MZ nebude hradit práci NOR, ministr zdravotnictví

osloví přímo řízené a neřízené organizace, aby činnost NOR podporovaly. Výbor ČOS považuje nevypsání onkologického hlášení za postup non lege artis v onkologii. Tuto povinnost mají ze zákona všechna zdravotnická zařízení. Výbor ČOS bude opakovaně na tuto skutečnost poukazovat a v případě neplnění jednotlivými ZZ informovat zdravotní pojišťovny.

8. Schválený zápis z jednání s Radou NOR zatím není k dispozici (původní verze neodsouhlasena pro věcné nedostatky).
9. Výbor ČOS si uvědomuje vážné ohrožení sběru dat NOR.
10. Prof. Vorlíček informuje výbor ČOS o projektu MZ - Fúze dat VZP a NOR. Zajišťuje IBA a doc. Dušek.
11. Doc. Hajdúch předložil Koncept referenčních laboratoří. Výbor ČOS vyjadřuje podporu této snaze a předává doporučení Sekci diagnostické prediktivní onkologie ke kultivaci sítě laboratoří a žádá o průběžné informace o stavu této aktivity.
12. Zástupci pojišťovny Aviva se nedostavili.
13. Výbor ČOS hodnotí možnost spolupráce se saskými onkology jako zajímavou. Doc. Fínek má dále vyjednávat o konkrétních možnostech spolupráce a průběžně výbor informovat.
14. Diskuzní platforma na www.linkos.cz navržená prim. Jelínkovou. Po obsáhlé diskuzi zatím výbor ČOS rozhodl, že tento způsob diskuzní platformy nebude realizován, protože je dostatek jiných možností, jak komunikovat se členy výboru.
15. Hosté - zástupci Sekce nemocničních lékárníků Dr. Rotterová a Dr. Horák. Lékárny přišly přesunem léků z receptů na žádanky o marži, za kterou mimo jiné prováděly ředění cytostatik. Zatím se jedná o ztrátovou činnost, centrální ředění je pouze na 8 centrech. Výbor ČOS chápe centrální ředění cytostatik za jediný postup lege artis. Výbor podporuje snahu o zavedení nového kódu pro centrální ředění cytostatik.
16. Výbor vzal na vědomí dopis vědeckého sekretáře ČLS JEP o právech a povinnostech výborů.

17. Pokračuje diskuze se zdravotní pojišťovnou Metall Alliance.
18. Dopis prof. Vyzuly Dr. Horákovi, řediteli VZP, o úhradě zdravotní péče. Výbor ČOS bere na vědomí a podporuje jeho obsah.
19. Dopis České urologické společnosti výboru ČOS. Výbor ČOS vítá spolupráci s urologickou společností na vzájemné fúzi jednotných léčebných postupů u urologických malignit. Zodpovídá prof. Abrahámová a doc. Fínek.
20. Výbor ČOS přebírá záštitu na BOD 2008.
21. Výbor ČOS odsouhlasil, že Zásady cytostatické léčby

maligních onkologických onemocnění budou v pravidelných intervalech aktualizovány. Návrhy do příštího výboru. Změny budou vyvěšeny na webu a zaslány do zdravotních pojišťoven platností tištěné verze.

22. Noví členové ČOS: Luboslava Krásná - VFN, Petra Panovcová - Pleš, Alexandra Ligová - FN Ostrava, Tomáš Büchler - FTN, Zuzana Lapáčková - Pleš, Lukáš Vrbenský - Neratovice, Ludmila Hynková - MOÚ.

23. Příští schůze výboru ČOS se sejde 13. listopadu 2007 ve FN Hradec Králové. Hostitelem bude doc.Petera.

PODNĚT K USTAVENÍ ODBORNÉ SEKCE ČOS ČLS JEP: SEKCE EPIDEMIOLOGIE NÁDORŮ A ZDRAVOTNICKÉ INFORMATIKY

Zdůvodnění a význam sekce. Podnět k založení této sekce je předkládán na základě rostoucího významu informatiky a analýzy dat v onkologické klinické praxi i v klinickém výzkumu. Zkušenosti poslední doby nadto dokládají význam správné a exaktní prezentace výsledků a kvality léčebné péče v ČR pod hlavičkou odborné společnosti. Jak vyplývá z níže uvedených cílů sekce, jde o iniciativu sjednocující různé již funkční projekty v koncepci umožňující vzájemnou koordinaci. Hlavním strategickým cílem sekce je vybudovat jednotnou základnu informatické, analytické a prezentační podpory, která bude rovnocenně dostupná všem onkologickým pracovištím ČR. Činnost sekce posílí všechny aktivity a projekty, které s informatikou a analýzou dat úzce souvisí, od zpracování epidemiologických dat, přes klinické studie a výzkumné registry až po projekty související s elektronickou dokumentací pacienta a analýzou reálných dat klinických pracovišť. Sekce rovněž přispěje k posílení mezioborového výzkumu environmentálních rizik ve vztahu k onkologickým onemocněním.

Stručný výpis cílů sekce:

Přispět k plnění všech bodů Národního onkologického programu ČR, které souvisí s odbornou informatikou a analýzou dat. Udržet a nadále rozvíjet hodnocení dat o epidemiologii nádorů v ČR tak, jak dosud probíhá v projektu SVOD (www.svod.cz). Přispět k modernizaci sběru dat Národního onkologického registru pomocí informačních a komunikačních technologií. Přispět k informačnímu i analytickému zázemí významných projektů onkologické prevence, především projektů celostátně garantovaného screeningu karcinomu prsu a karcinomu kolorekta, případně dalších. Usilovat o zkvalitňování zpracování dat v těchto projektech. Vyvíjet a v praxi uplatňovat metodiku prediktivního modelování epidemiologie nádorových onemocnění v ČR a souvisejících nákladů na léčbu. Datově podporovat iniciativy odborné společnosti a jejich sekcí vedoucí k racionalizaci plánování nákladů léčebné péče.

Podílet se na mezinárodní prezentaci dat o epidemiologii zhoubných nádorů a dále na prezentaci léčebných výsledků a kvality onkologické péče v ČR. Podporovat takto orientované celostátní projekty i aktivity jednotlivých onkologických pracovišť. Zajišťovat technologickou, organizační a analytickou podporu klinickým studiím, do kterých jsou zapojena česká onkologická pracoviště. Tato podpora bude prioritně orientována na klinické studie iniciované z akademického prostředí a bude zajišťována v již ustaveném centru CEBO (Centre for Evidence-Based Oncology; www.ecebo.org).

Informaticky a analyticky podporovat prezentační a výzkumné aktivity jednotlivých onkologických pracovišť ČR i jejich uskupení. Rozvíjet prezentační agendu Komplexních onkologických center na portálu www.onconet.cz.

Usilovat o celostátní zpřístupnění standardní elektronické dokumentace onkologického pacienta a o její implementaci na všech významných onkologických pracovištích. Podporovat pregraduální i postgraduální vzdělávací projekty v onkologii se zvláštním důrazem na hodnocení klinických studií, aplikovanou analýzu dat a zdravotnickou informatiku.

Navázat národní a mezinárodní spolupráci s týmy zabývajícími se hodnocením ekologických a humánních rizik. Rozvíjet mezioborové projekty zaměřené na studium environmentálních a dalších rizikových faktorů ve vztahu k nádorovým onemocněním v ČR.