

VYDÁVÁ
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ
IČO 444359

V NAKLADATELSTVÍ
ApS BRNO, spol. s r. o.
IČO 543535

REDAKCE:
Masarykův onkologický ústav Brno
Žlutý kopec č. 7
656 53 Brno

Sekretář redakce:
ing. Zdeněk Bouša
tel., fax: 543 134 226
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
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

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

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO

REDAKTORA: KOZA IVAN

VÝKONNÝ REDAKTOR: FAIT VUK

REDAKTORŮ:

ČOUPEK PETR
HÁJEK ROMAN
KOCÁK IVO

VALÍK DALIBOR
VORLÍČEK JIŘÍ
ŽALOUdÍK JAN

REDAKČNÍ RADA:

ADAM ZDENĚK, Brno
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno
BILDER JOSEF, Brno
ČOUPEK PETR, Brno
DRBAL JOSEF, Brno
ECKHARDT SANDOR, Budapešť
FAIT VUK, Brno
HÁJEK ROMAN, Brno
JURGA LUDOVIT, Trnava
KALLAY JOZEF, Bratislava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava
KLASTERSKÝ JAN, Brusel
KLENER PAVEL, Praha
KOCÁK IVO, Brno
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

KOVAŘÍK JAN, Brno
KOZA IVAN, Bratislava
MAYER JIŘÍ, Brno
MECHL ZDENĚK, Brno
NĚMEC JAROSLAV, Brno
ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
PLEŠKO IVAN, Bratislava
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
REJTHAR ALEŠ, Brno
SPURNÝ VLADIMÍR, Brno
UJHÁZY VILIAM, Bratislava
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
VYZULA ROSTISLAV, Brno
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
ŽALOUdÍK JAN, Brno

Přehled

Daum O. , Vaněček T. , Šíma R, Michal M. Gastrointestinální Stromální Tumor: Současný Pohled	203
---	-----

Šimíčková M., Dubská L., Kocáková I., Nekulová Angiogeneze a anti-angiogenní terapie u nádorových onemocnění se zaměřením na cirkulující vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF)	212
--	-----

Původní práce

Brychta M., Dvořák J., Neumanová R. Možnosti ovlivnění neurotoxicity chemoterapie gabapentinem	217
---	-----

Odrážka K., Vaculíková M., Doležel M., Zouhar M., Petera J., Morávek P., Vošmik M., Zoul Z., Brodák M., Šimáková E. Chronická toxicita trojrozměrné konformní radioterapie (3D-CRT) karcinomu prostaty	222
--	-----

Zitterbart K., Kadlecová J., Zavřelová I., Kratochvílová A., Spěšná R., Křen L., Pavelka Z., Štěrba J. Pilotní studie exprese izoforem proteinu p73 u meduloblastomu: možný podíl p53-homologního proteinu s potenciálním prognostickým významem v tumorigenezi embryonálních nádorů CNS	228
--	-----

Kmoníčková E., Pavlovičová H. Zhodnocení léčby pacientek s diagnózou karcinomu čípku děložního léčených samostatnou radioterapií versus konkomitantní chemoradioterapií	234
---	-----

Informace - knihy	221, 240
--------------------------------	----------

Onkologické společnosti	241
--------------------------------------	-----

CONTENTS**Reviews**

Daum O. , Vaněček T. , Šíma R, Michal M. Gastrointestinal stromal tumor: update	203
--	-----

Šimíčková M., Dubská L., Kocáková I., Nekulová Angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant diseases with respect to circulating vascular endothelial growth factor (VEGF)	212
--	-----

Original publications

Brychta M., Dvořák J., Neumanová R. Possibilities of treatment of neurotoxicity induced by cytotoxic therapy with gabapentin	217
---	-----

Odrážka K., Vaculíková M., Doležel M., Zouhar M., Petera J., Morávek P., Vošmik M., Zoul Z., Brodák M., Šimáková E. Chronic toxicity of the three-dimensional conformal radiotherapy (3D-CRT) for prostate cancer	222
--	-----

Zitterbart K., Kadlecová J., Zavřelová I., Kratochvílová A., Spěšná R., Křen L., Pavelka Z., Štěrba J. p73 isoforms expression in medulloblastoma: a possible involvement of p53 homologue protein with potential prognostic impact in development of embryonal brain tumors	228
--	-----

Kmoníčková E., Pavlovičová H. Evaluation of treatment of patients with cervical cancer treated by radiotherapy alone versus concurrent chemoradiotherapy	234
---	-----

Information - books	221, 240
----------------------------------	----------

Oncological associations	241
---------------------------------------	-----

GASTROINTESTINÁLNÍ STROMÁLNÍ TUMOR: SOUČASNÝ POHLED GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOR: UPDATE

DAUM O.¹, VANĚČEK T.², ŠÍMA R.², MICHAL M.²

¹ ŠIKLŮV PATOLOGICKO ANATOMICKÝ ÚSTAV FN A LF UK PLZEŇ,

² ŠIKLŮV PATOLOGICKO ANATOMICKÝ ÚSTAV FN A LF UK PLZEŇ, LABORATOŘ
SPECIÁLNÍ DIAGNOSTIKY

Souhrn

Gastrointestinální stromální tumor je nejčastější mesenchymální nádor trávicího traktu. V současné době je definován jako nádor tvořený vřetenitými a/nebo epiteloidními buňkami, jejichž fenotyp odpovídá diferenciaci v Cajalovy interstitiální buňky. Většinou jsou tyto nádorové buňky pozitivní v imunohistochemickém průkazu KIT proteinu a u téměř všech těchto tumorů lze prokázat mutaci genu *c-kit* nebo *PDGFRA* kódující transmembránové proteiny zařazené do III. třídy receptorových tyrosinkináz. Nejčastěji se gastrointestinální stromální tumor vyskytuje v žaludku, méně často v ostatních částech trávicí trubice, vzácně i v extragastrointestinální lokalizaci, a to v mesenteriu, omentu, retroperitoneu, žlučníku, močovém měchýři, pankreatu a ve vagině. Ve většině případů je možná poměrně spolehlivá diagnóza z konvenčního barvení hematoxylinem a eosinem ve světelné mikroskopii. Pomocnými diagnostickými metodami je imunohistochemický průkaz KIT proteinu (CD117) a průkaz mutace genu *c-kit* nebo *PDGFRA*. Negativita těchto vyšetření však diagnózu nevylučuje. Každý gastrointestinální stromální tumor je třeba považovat za potenciálně maligní. Riziko agresivního chování se v současné době stanovuje na základě mitotického indexu a maximálního rozměru nádoru. Mutační analýza umožňuje predikovat odpověď tumoru na terapii imatinib mesylátem.

Klíčová slova: gastrointestinální stromální tumor, GIST, KIT, PDGFRA, diagnóza, prognóza, predikce

Summary

Gastrointestinal stromal tumor is the most frequent mesenchymal tumor of the alimentary tract, currently being defined as a tumor composed of spindle and/or epithelioid cells presumably differentiating towards interstitial cells of Cajal. The majority of these tumors are KIT-immunoreactive and almost all carry mutated *c-kit* or *PDGFRA* gene encoding two transmembrane class III tyrosin kinases. The most frequent location of gastrointestinal stromal tumor is the stomach followed by other sites of gastrointestinal tract. Occasional sites of occurrence are mesentery, omentum, retroperitoneum, gallbladder, urinary bladder, pancreas and vagina. Light microscopic examination of slides stained with hematoxylin and eosin is highly reliable in most cases. Useful ancillary diagnostic techniques are immunohistochemical investigation with antibodies against KIT protein (CD117), and detection of mutations of either *c-kit* or *PDGFRA* genes. Nevertheless, negative results do not exclude histologically proven diagnosis. All gastrointestinal stromal tumors should be regarded as potentially malignant with risk of aggressive behavior being determined on the basis of mitotic count and the largest diameter of the tumor. Mutational status of the neoplasm serves as a predictor of therapeutic response to imatinib mesylate.

Key words: gastrointestinal stromal tumor, GIST, KIT, PDGFRA, diagnosis, prognosis, prediction

Současná definice a historie gastrointestinálního stromálního tumoru

Současná definice GISTu (gastrointestinálního stromálního tumoru) je, ve své nejméně kontroverzní formě, poněkud široká. Jedná se o skupinu neepitelových nádorů trávicího traktu tvořených vřetenitými a/nebo epiteloidními buňkami, u nichž většina autorů předpokládá původ v progenitorové buňce diferencující se směrem ke Cajalovým interstitiálním buňkám. V současné době již není za nezbytnou podmínku diagnózy GISTu považována exprese KIT proteinu a většina autorů nepokládá za zcela vylučující ani absenci mutace *c-kit* (a případně *PDGFRA*) genu při odpovídající morfologii. U těchto nádorů se potom GIST stává diagnózou per exclusionem po vyloučení ostatních mesenchymálních lézí trávicího traktu (1 - 6).

Historicky byl gastrointestinální stromální tumor zpočátku

řazen mezi leiomyocelulární nádory (7, 8) a označován jako leiomyom, bizarní leiomyom, leiomyoblastom nebo leiomyosarkom. Protože však původní Stoutovu tezi o tomto původu GISTu nepotvrdily následné ultrastrukturální (9) a imunohistochemické studie (10), byl v roce 1983 Mazurem a Clarkem vyčleněn jako samostatná jednotka pod názvem „stromální tumor“ (11) zahrnující mesenchymální tumory trávicího traktu nevykazující známky neurogení ani hladkosvalové diferenciaci. Tento termín se však bohužel začal některými autory používat také v obecnější formě, jako zastřešující označení pro všechny mesenchymální (nebo přesněji neepitelové) nádory trávicího traktu, což opět znepřehlednilo literární údaje týkající se gastrointestinálního stromálního tumoru.

Nová éra GISTu začala v roce 1998, kdy byla zjištěna pozitivita nádorových buněk v imunohistochemickém průkazu KIT

proteinu (CD117) (12), a jejich podobnost s interstitiálními (pacemakerovými) Cajalovými buňkami (ICC), což vedlo k hypotézám o histogenetickém původu GISTů z těchto buněk (13, 14) a dokonce k návrhu alternativního termínu GIPACT (gastrointestinal pacemaker cell tumor) (15), který se však v literatuře příliš neujal. Tentýž rok bylo také publikováno pozorování aktivačních („gain of function“) mutací genu *c-kit* v gastrointestinálním stromálním tumoru (16), což z dnešního pohledu hovoří spíše proti teorii jeho histogeneze z Cajalových buněk, u nichž je, narozdíl od GISTu, exprese KIT proteinu znakem nezávislým na mutaci příslušného genu, a hovoří spíše ve prospěch progenitorových mesenchymálních buněk schopných diferenciace ve fenotyp neurální, leiomyosarkom, fibroblastický a ICC (6).

V následujících letech někteří autoři vymezili termín „GIST“ pouze pro ty tumory, které (kromě obvyklých morfologických znaků) vykazovaly pozitivitu v imunohistochemickém průkazu KIT, zatímco jiní toto označení používali i pro tu malou část morfologicky přesvědčivých nádorů, které byly KIT-negativní. Pozdější průkaz mutací *c-kit* i u některých KIT-negativních GISTů, jejich pozitivní odpověď na specifickou terapii imatinibem (17), a průkaz mutace genu *PDGFRA* („platelet derived growth factor receptor alpha“) jako alternativní možnosti onkogeneze stromálního tumoru (18, 19) jim dal za pravdu. Takto definované GISTy se nacházejí v mnoha lokalizacích. Souhrnné studie udávají největší výskyt těchto nádorů v žaludku (60-70%), dále následuje tenké střevo (20-25%), tlusté střevo (5%) a jícen (<5%) (20, 21). Méně často se stromální tumory nacházejí mimo trávicí trubici (někteří autoři je nazývají EGISTy, tedy extragastrointestinální stromální tumory), a to v mesenteriu, omentu a retroperitoneu (22 - 25), vzácně v pankreatu (26, 27) a žlučnici (28, 29), a ojedinělé práce popisují primární (E)GIST i v seróze močového měchýře (30) a ve vagíně (31).

Ve světle dnešních poznatků se jako historická slepá ulička jeví tzv. **GANT** („gastrointestinal autonomic nerve tumor“). Vývoj této jednotky začal v roce 1984 Herrerovým popisem tumoru tenkého střeva s ultrastrukturálními znaky buněk enterálního nervového plexu, který nazval plexosarkom (32). Samotný termín GANT použili o dva roky později Walker a Dvorak při popisu tří dalších nádorů obdobné ultrastruktury (33). Elektronmikroskopické znaky, které definují tuto lézi, jsou neurosekretorická granula a synaptické struktury (34, 35). I přes pokusy definovat GANT imunohistochemicky zůstala jeho diagnostika ultrastrukturální záležitostí (36, 37). Mezi důvody, proč opustit jednotku GANT (nebo plexosarkom) patří identita s GISTem ve světelné mikroskopii a imunoprofilu, s nutností elektronmikroskopického vyšetření pro diagnózu GANT (34, 36 - 38), průkaz imunoexpresí KIT proteinu a mutací *c-kit* v GANTech (39, 40), stejné biologické chování GISTu a GANTu při stanovení risk-score podle consensus conference NIH 2001 (39) a terapeutická ovlivnitelnost imatinibem (41). Za těchto okolností, kdy se tedy GANT jeví jen jako ultrastrukturální varianta GISTu bez prognosticko-terapeutického významu, je jeho specifická diagnóza nadbytečná a zbytečně nákladná.

Morfologie gastrointestinálního stromálního tumoru

Při své nejčastější lokalizaci v trávicí trubici vychází z některé vrstvy pod sliznicí gastrointestinální stěny (nejčastěji z *mucularis propria*) a vyklenuje se většinou do lumina, případně na serózní povrch žaludku či střeva. Často dochází k ulceraci přilehlé sliznice. Tumory bývají dobře ohraničené, někdy s tenkou pseudokapsulou, z níž mohou do nádoru vybíhat septa rozdělující jej na pseudolobuly. Jejich konzistence je elastická, pokud není změněna regresivními změnami. Struktura na řezu bývá (hlavně u malých tumorů) homogenní až naznačeně vláknitá, barva bílá. Sekundárně však může být tento obraz změněn regresivními změnami jako nekrózou, prokrvácením, kalcifikací nebo pseudocystickou přeměnou (2, 8).

Histologické vyšetření provedené zkušeným patologem ve většině případů umožňuje s vysokou mírou jistoty diagnózu gastrointestinálního stromálního tumoru již z konvenčního barvení hematoxylinem a eosinem, ještě před konfirmačním imunohistochemickým vyšetřením.

Klasicky se GISTy rozdělují na dvě hlavní skupiny: vřetenobuněčné a epiteloidní. Tyto dva druhy buněk mohou být uspořádány fascikulárně, storiformně, difúzně, alveolárně nebo vytvářet organoidní struktury.

Dalšími diagnosticky přínosnými znaky jsou: perinukleární vakuolizace, skeinoidní vlákna (globulární eosinofilní, PAS-pozitivní hmoty, jejichž ultrastruktura je tvořena 30-48 nm silnými fibrilami paralelně uspořádanými a propojenými 7-15 nm silnými „tenkými filamenti“, přičemž místa spojení těchto dvou typů fibril vytvářejí žháná skeinoidních vláken o periodicitě 41-48 nm) (42, 43), a v neposlední řadě myxoidní vzhled, který je v kombinaci s predominancí epiteloidních buněk, přítomností buněk vícejaderných a případnou infiltrací mastocytů, signifikantním znakem GISTů s mutací genu *PDGFRA* (2, 44 - 47).

Imunohistochemický průkaz KIT proteinu (**CD117**) představuje zlatý standard v konfirmaci diagnózy GIST, negativita však tuto diagnózu nevylučuje. Naopak bývá pozitivní i v některých lézích spadajících do diferenciální diagnózy GISTu. Reakce s protilátkou proti *PDGFRA* je pozitivní v GISTech s mutací v *PDGFRA* genu. Může však též být pozitivní v intraabdominálním desmoidu (fibromatóze) (48). Dalším slibným markerem je **DOG1** (discovered on GIST-1), protein s neznámou funkcí, jehož gen se nachází v lokusu *CCND1-EMS1* na 11. chromozomu, exprimovaný téměř ve všech GISTech (mutovaných jak v *KIT* tak *PDGFRA*), negativní v desmoidu, ale pozitivní v malé části synoviálních sarkomů, leiomyosarkomů, fibrosarkomů, ES/PNET, a v maligním melanomu. Komerční protilátka k rutinní diagnostice zatím není k dispozici (49). Jako specifitější se zatím jeví **PKC-theta** (proteinkináza C - theta). Tato isoforma proteinkinázy C z rodiny serin/threoninových kináz je imunopozitivní ve většině GISTů. Navzdory původním zprávám o její úplné specifitě v diferenciální diagnostice mesenchymálních nádorů trávicího traktu byla však později zjištěna její přítomnost také v části schwannomů (50 - 52). Vzhledem ke své nízké specifitě má dnes velmi omezený význam jen v rámci rozsáhlejšího imunohistochemického vyšetření protilátka proti antigenu **CD34**, před érou KIT používaná k odlišení GISTu od hladkosvalových nádorů. **Hladkosvalové markery**, v souladu s možnou parciální leiomyocelulární diferenciací GISTu, mohou být imunoreaktivní, zejména hladkosvalový aktin, většinou však fokálně a slabě. Desmin bývá v GISTech pozitivní jen vzácně, naopak h-caldesmon je typicky exprimován navzdory proklamované specifitě pro hladkou svalovinu (53). **S100 protein** bývá pozitivní až v 10% GISTů, podobně nespecifické jsou i **neurální markery**, které jsou exprimovány zejména u tumorů dříve diagnostikovaných jako GANT, hlavně neuron specifická enoláza, tau protein a synaptofyzin (37, 38).

Elektronmikroskopické vyšetření nemá v současné době, při dostupnosti imunohistochemického a molekulárně genetického vyšetření, a po zavržení GANTu jako samostatné jednotky, žádný diagnostický, prognostický ani prediktivní význam (39 - 41).

Molekulární biologie gastrointestinálního stromálního tumoru

Receptorové tyrosinkinázy

Receptorové tyrosinkinázy (RTK) jsou transmembránové proteiny skládající se z části extracelulární, transmembránové a intracelulární, přičemž extracelulární část vytváří receptor pro specifický ligand a část intracelulární je nositelem tyrosinkinázové domény, která je aktivována konformačními změnami proteinu po vazbě ligandu. Tato aktivace vede k dimeri-

zaci příslušné RTK a autofosforylaci tyrosinových zbytků v tyrosinkinázové doméně, čímž se stabilizuje vazné místo pro intracelulární signální molekuly.

Na základě strukturální homologie se RTK rozdělují do 20 rodin, z nichž pro problematiku GIST má největší význam rodina PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) označovaná též pořadovým číslem III. Tato je charakterizována přítomností pěti extracelulárních „imunoglobulinu podobných“ domén ve své extracelulární části a dvoudílnou intracelulární tyrosinkinázovou doménou. Zatím nejlépe popsanou recepto- rů je kaskáda ras-raf-MAPK-fos, na přenosu signálu se však pravděpodobně podílí i aktivace src vedoucí k transkripci cmyc, fosforylace p85 a STAT proteinů, a aktivace fosfolipázy C (54, 55).

Do této III. třídy (PDGFR rodiny) RTK patří tyto proteiny: PDGFRA, PDGFRB, CSF1, KIT a Flt3. Gastrointestinální stromální tumor je zatím spojován s mutacemi dvou těchto RTK: KIT a PDGFRA.

KIT

KIT byl poprvé izolován jako onkogen v-kit z Hardyho-Zuckermanova akutně transformujícího retroviru kočičího sarkomu 4 (56). Samotný název „kit“ byl odvozen od slova „kit“ - kotěte, z jehož sarkomu byl virus izolován. Protoonkogen ckit byl poté prokázán i u člověka a jeho produkt byl zařazen do rodiny RTK (57). Ligand KIT byl identifikován jako SCF (stem cell factor, dříve též mast cell growth factor) u myši známý jako Steel factor (58, 59).

Lidský c-kit je lokalizován na dlouhém raménku 4. chromozomu (57) a sestává z 21 exonů. Exony 2-9 kódují extracelulární domény, exon 10 transmembránovou, exon 11 juxtamembránovou a exony 13-21 dvoudílnou tyrosinkinázovou doménu (60, 61).

Buněčné linie dependentní na KIT-signalizaci byly identifikovány na základě studia morfologického postižení myši s germinální „loss-of-function“ mutací myšiho analogu c-kit, které bylo charakterizováno anémií, albinismem, sterilitou, deplecí mastocytů a poruchami intestinální motility při depleci interstiálních Cajalových buněk (62, 63).

Aktivační („gain-of-function“) mutace c-kit vedoucí k ligand-independentní aktivaci tyrosinkinázy KIT byly poté zjištěny v korespondujících nádorech z těchto buněk. Z hematologických nádorů byly tyto mutace zjištěny především u AML (64), ojediněle i u chronických myeloproliferativních onemocnění (65) a sinonasálního NK/T lymfomu (66). U maligního melanomu jsou zřejmě pouze ojediněle přítomné (67), zatímco u seminomu/dysgerminomu se vyskytují až ve třetině případů, přičemž výrazně převažují mutace exonu 17 rezistentní vůči terapii imatinibem (67, 68). Mutace v tomto exonu také převažují u mastocytózy (69).

V gastrointestinálním stromálním tumoru (GIST) byly poprvé popsány mutace exonu 11 juxtamembránové (JM) domény v roce 1998 (16). V několika následných studiích analyzujících většinou jen tento exon byly mutace přítomny v poměrně malé části GISTů (cca 20-50%) a byly asociovány s horší prognózou těchto tumorů (70 - 73). Avšak pozdější práce Rubina et al. (74), v níž byly vyšetřeny všechny exony c-kit, prokázala mutace téměř ve všech GISTech (92%) s akumulací mutací v „hot spots“ odpovídajících exonům 9, 11, 13 a 17, navíc bez ohledu na „grade“ tumoru. Dále, Corless et al. (75) prokázal mutaci c-kit téměř ve všech incidentálních GISTech menších než 1 cm, čímž potvrdil, že se jedná o časnou onkogenní událost (76, 77). Falešná negativita při průkazu mutací KIT genu může být, kromě vyšetření omezeného počtu exonů, způsobena také lokalizací mutace v intronu, která může dát vznik alternativnímu splicingu a tak i abnormálnímu proteinu i při normální struktuře jeho kódující sekvence (78). Navíc, proti původní tezi o asociaci mutací exonu 11 se špatnou prognózou svědčí pozorování predominantní prevalence benigní

ních žaludečních GISTů mezi tumory s interními tandemovými duplikacemi v 3' konci JM domény (79) stejně jako průkaz mutace 1530ins6 v exonu 9 maligních GISTů intestinální lokalizace (80) a maligního chování gastrointestinálních stromálních tumorů s mutací v exonu 13 (81). Recentní práce kladou důraz na lepší prognózu nádorů se substituční mutací v exonu 11 vzhledem k ostatním typům mutací (82) a na delecii kodonů 557 a 558 jako markeru maligního chování (83, 84).

Nicméně, bez ohledu na spornou prognostickou hodnotu mutační analýzy c-kit je nesporný její prediktivní význam vyplývající z primární rezistence nádorů mutovaných v tyrosinkinázových (TK) doménách k léčbě imatinibem (85). Přestože exprese KIT-proteinu byla zjištěna v řadě dalších nádorů (86), není v těchto asociována s mutací c-kit. Předpokládá se, že v těchto případech je CD117 pozitivita způsobena amplifikací „wild type“ c-kit, která je spíše pozdní událostí v onkogenezi daného nádoru (87).

PDGFRA

Gen kódující „platelet-derived growth factor receptor alpha“ je lokalizován na dlouhém raménku 4. chromozomu v těsné blízkosti KIT genu a má s ním velmi podobnou strukturu. Tvorbí jej 23 exonů, přičemž extracelulární domény zde kódují exony 2-10, transmembránovou exon 11, juxtamembránovní exon 12, a zbývající exony kódují intracelulární dvoudílnou tyrosinkinázovou doménu (88).

Aktivační mutace tohoto genu v gastrointestinálním stromálním tumoru byly poprvé zjištěny v roce 2003 dvěma nezávislými skupinami (18, 19). „Hot spots“ v PDGFRA u GISTu je exon 12 (homologní s exonem 11 u c-kit), exon 14 (homologní se exonem 13 c-kit) a exon 18 (homologní s c-kit exonem 17). Následné větší studie potvrdily přítomnost těchto mutací PDGFRA ve 30- 60% KIT-imunonegativních a/nebo c-kit „wild type“ tumorů splňujících histologická kritéria gastrointestinálního stromálního tumoru, přičemž mutace exonu 18 pravděpodobně rezistentní na terapii imatinibem převažovaly asi šestkrát nad mutacemi exonu 12. Navíc byla prokázána predominantní žaludeční lokalizace PDGFRA-mutovaných GISTů (45, 47, 89, 90), převážně epiteloidní morfologie těchto tumorů (44 - 47, 89 - 92), a přítomnost mnohоядерných obrovských buněk (46) a myxoidního stromatu spolu s mastocytární infiltrací (44) jako soubor znaků vysoce specifických pro diagnózu GISTu s mutací PDGFRA již ze světelně-mikroskopického vyšetření v konvenčním barvení. Zatím všechny studie prokázaly vzájemnou vylučnost mutací c-kit a PDGFRA genu. Imunoexprese KIT proteinu v některých GISTech s mutací PDGFRA není dosud zcela uspokojivě vysvětlena. Předpokládá se, že mutovaný konstitutivně aktivovaný PDGFRA může vytvářet heterodimery s „wild type“ KIT proteinem, s následnou aktivací KIT-signalní kaskády a také s KIT-imunoexpresí (19, 89).

Klinické varianty gastrointestinálního stromálního tumoru

Odlišení GISTů, které jsou součástí některých klinických syndromů, od běžných sporadických adultních gastrointestinálních stromálních tumorů může mít diagnostickoterapeutický význam.

Carneyho trias

Carneyho trias byla v roce 1977 definována jako nefamiliární syndrom neznámé etiologie zahrnující přítomnost GISTu (většinou žaludečního), plicního chondromu a extraadrenálního paragangliomu (93).

Většina pacientů (78%) však nemá tuto trias plně vyvinutou, přičemž nejčastější kombinací je GIST a plicní chondrom (37, 94 - 98). Další odchylkou od původní definice je výskyt adenomu kůry nadledviny a pravděpodobně i leiomyomu jícnu jako součástí této „trias“ (97).

Důvodem pro syndromologické spojení těchto tumorů, i při absenci familiárního výskytu, je preferenční výskyt u mladých

žen, multiplicitní výskyt tumorů, a nízká pravděpodobnost náhodné koincidence těchto málo častých až vzácných nádorů (95).

Gastrointestinální stromální tumory u Carneyho trias se morfologicky neliší od sporadických GISTů, odlišují se však klinickým průběhem i molekulárně genetickým profilem. Pravidlem je multicentrický výskyt těchto tumorů, indolentní průběh ve srovnání se sporadickými GISTy (a to i v případě metastáz) a neúčinnost terapie imatinibem. V histologickém obraze většinou převažuje epiteloidní komponenta, která může vykazovat ultrastrukturální znaky neurální či neuroendokrinní diferenciace (37, 95, 97 - 100). Přestože imunohistochemický průkaz KIT proteinu bývá pozitivní (a dokonce sdílený i paragangliomem v rámci této trias) (101), nebyla dosud prokázána mutace v exonech 9, 11, 13 a 17 c-kit ani v exonech 12 a 18 *PDGFRA* (102). Vysvětlením tohoto faktu může být mutace nevyšetřovaných exonů těchto genů, genů jiných příbuzných tyrosinkináz, nebo mutace genů zúčastněných v signální kaskádě regulované KIT proteinem. Zajímavou teorií, která navíc vysvětluje koincenci paragangliomu a GISTu v rámci Carneyho trias, je možnost mutace genu pro regulační faktor účastnící se konvergence signálů od receptorových tyrosinkináz a signálů z mitochondriálních enzymů citlivých na hypoxii. Možným kandidátem je např. transkripční faktor HIF-1 α (hypoxia-induced factor-1 α), který je jednak pod vlivem mitochondriální sukinát-ubichinon oxidoreduktázy, jednak je zapojen do PI3K-Akt i RAS-MEK-MAPK signálních cest řízených receptorovými tyrosinkinázami (103).

Plicní chondromy v rámci Carneyho trias jsou asymptomatické tumory objevené většinou náhodně při RTG hrudníku, kdy vzbudí podezření na metastatický proces, zejména tehdy, má-li už pacient diagnostikován žlučední GIST. Podle Carneyho se tyto tumory jednoznačně odlišují od chondromatózních hamartomů (chondrohamartomů) nepřítomností šterbinovitých prostor vystlaných bronchiálním epitelem (97). S tímto diagnostickým znakem však nesouhlasí Ngadiman et al., přičemž se opírá o předpoklad, že obě léze jsou pravděpodobně chondromatózním nádorem, pouze s odlišným vztahem k preexistujícím epitelovým strukturám. Na druhou stranu, jeho kolektivem publikovaná kazuistika koincidence duodenálního GISTu, plicního chondromatózního hamartomu a pankreatického endokrinního tumoru pouze navrhuje, nikoli dokazuje souvislost těchto tumorů s Carneyho triádou (104).

Paragangliomy jsou nejméně častou komponentou Carneyho trias, přítomnou u 47% pacientů v největším dosud publikovaném souboru (97). Přestože v původní práci byly tyto paragangliomy definovány jako extraadrenální, byl již popsán případ, u něhož tato komponenta triády byla zastoupena adrenálním feochromocytomem (105). Asi u jedné pětiny pacientů se paragangliomy vyskytují vícečetně. Zhruba třetina těchto tumorů se projevuje sekrecí katecholaminů, třetina vytváří symptomatickou nádorovou masu, třetinu tvoří asymptomatické nádory. Většina paragangliomů se u pacientů s Carneyho trias chová benigně, byly však zaznamenány i maligní varianty vedoucí ke smrti pacienta (97).

Syndrom Carney - Stratakis

Syndrom Carney - Stratakis (syndrom familiární paragangliom - GIST) byl popsán teprve nedávno. Původně byli dva pacienti s tímto syndromem zahrnuti do souboru 79 pacientů s Carneyho trias, později ale byli vyčleněni a spolu s dalšími popsáni v souboru dvanácti pacientů z pěti rodin, u nichž se koincidence GISTu a paragangliomu od Carneyho triády lišila familiárním výskytem, nepřítomností převahy postižení mladých žen a vyšším zastoupením paragangliomu ve vyšetřovaném souboru (106). Syndromologické spojení familiárního paragangliomu s GISTem dále podporuje práce Boccon-Giboda et al., popisující separátní výskyt extraadrenálního paragangliomu a GISTu u jednovaječných dvojčat (107).

Morfologicky se nádory u tohoto syndromu neliší od tumorů

sporadických, včetně KIT-positivity GISTu. Bohužel dosud nebyl stanoven molekulárně-genetický podklad tohoto syndromu, stejně jako dosud nebyl publikován výsledek vyšetření mutací c-kit ani *PDGFRA* příslušného gastrointestinálního stromálního tumoru.

Neurofibromatóza 1. typu

Neurofibromatóza 1. typu (von Recklinghausenova choroba) je autosomálně dominantně dědičná choroba způsobená germinální mutací genu *NF1* na 17. chromozomu. Proteinový produkt tohoto genu, neurofibromin, patří do rodiny GTPázy aktivujících proteinů (GAP) a jeho hlavní význam spočívá v negativní regulaci aktivity RAS proteinu. Hlavními znaky jsou kožní skvrny barvy bílé kávy, pigmentované hamartomy duhovky (Lischovy noduly) a mnohočetné neurofibromy na různých místech těla. U pacientů se dále může vyskytovat řada dalších lézí, jako kostní cysty, meningiomy, gliomy optiku, zvýšen je také výskyt feochromocytomu, rhabdomyosarkomu, Wilmsova tumoru a dalších nádorů.

GISTy se, podle různých studií, vyskytují u 5 - 25% pacientů s NF1. Odhaduje se, že tato choroba zvyšuje riziko vzniku gastrointestinálního stromálního tumoru 100 - 200x. Tyto nádory bývají u těchto pacientů typicky mnohočetné, většinou vřetenobuněčné, s nízkou mitotickou aktivitou a nízkým maligním potenciálem, přičemž nejčastěji postiženou částí trávicího traktu je tenké střevo (108 - 111). Ojediněle je pozorována koincidence s neuroendokrinním tumorem trávicího traktu (112, 113). Převážná většina těchto GISTů je imunohistochemicky KIT-positivní, navíc často bývá patrná difúzní nebo fokální hyperplazie CD117-positivních interstitiálních Cajalových buněk. Přestože se zpočátku zdůrazňovala absence mutací v gastrointestinálních stromálních tumorech spojených s von Recklinghausenovou chorobou (114 - 116), byla později prokázána přítomnost mutací jak c-kit, tak *PDGFRA* v několika ojedinělých tumorech (117, 118).

Familiární GIST

Familiární GIST je poměrně vzácné, autosomálně dominantně dědičné onemocnění, které je charakterizované abnormální proliferací buněčných řad regulovaných SCF - KIT signální cestou. Postiženými buněčnými populacemi jsou kromě Cajalových buněk melanocyty a mastocyty, z čehož vyplývají různé kombinace hyperplastických změn a nádorových proliferací u nemocných s germinální mutací c-kit nebo *PDGFRA*.

Většina dosud publikovaných případů familiárního GISTu měla mutaci JM domény (exon 11) (119 - 126), přičemž multicentrický výskyt gastrointestinálního stromálního tumoru asociovaného s hyperplazií interstitiálních Cajalových buněk myenterického plexu se často kombinoval s kožními hyperpigmentacemi (119, 122 - 125), zejména v perianální oblasti, ale i na kůži obličeje, trupu, končetin, a na sliznicích, v jedné rodině i s výskytem maligního melanomu (124). V jedné rodině byla navíc popsána i urticaria pigmentosa (123).

Jedna práce (127) podává jen morfologický popis bez mutační analýzy, ve zbývajících případech byla prokázána mutace v exonu 13 (doméně TK I) (128), exonu 17 (doméně TK II) (129, 130) c-kit, a v 18. exonu *PDGFRA* (131). Tyto minoritní mutace byly charakterizovány absencí hyperpigmentací při mutaci v TK I doméně c-kit, dysfagií (bez zmínky o hyperpigmentaci) při jedné mutaci v TK II doméně c-kit, a abnormálně velkýma rukama považovanými za kongenitální malformaci (bez dysfagie a proliferací mastocytárních a melanocytárních) při mutaci v *PDGFRA*.

Pouze v jednom případě byla zjištěna ztráta heterozygosity s mutací V559A na obou chromozomech nádorových buněk (126). Vyšetření exprese dalších signálních molekul v KIT (nebo *PDGFRA*) - regulované kaskádě (AKT, MAPK) dále potvrdilo srovnatelnost familiárních GISTů se sporadickými (124).

Sporadický pediatrický GIST

Gastrointestinální stromální tumory vyskytující se u mladých lidí, dětí, nebo dokonce již u novorozenců, tvoří zvláštní klinickou a pravděpodobně i biologickou skupinu nádorů morfoloicky neodlišitelných od sporadických adultních GISTů. Jde o vzácné léze, které jsou jen málo literárně dokumentovány, navíc jsou ve starší literatuře pravděpodobně hojně zaměňovány s leiomyocelulárními nádory. Většinou jde o predominantně epitelioidní nádory vyskytující se převážně v dívce v žaludečním antru.

Literární údaje o imunoprofilu pediatrických GISTů jsou značně nesourodé. Zatímco některé léze byly pozitivní pouze v průkazu vimentinu a antigenu CD34 (132), většina prací prokázala imunohistochemicky nebo ultrastrukturálně parciální neurální či neuroendokrinní diferenciaci v těchto tumorech (133 - 135). Průkaz exprese KIT proteinu byl negativní v jednom publikovaném případě kongenitálního GISTu (136), zatímco dosud nejrozsáhlejší studie infantilních a juvenilních gastrointestinálních stromálních tumorů prokázala KIT protein téměř ve všech případech (tato sestava ovšem nezahrnovala žádné GISTy kongenitální) (137, 138).

Mutační analýzou bylo prokázáno, že mutace genů kódujících proteiny KIT a PDGFRA jsou výjimečnou událostí, což odlišuje sporadické pediatrické gastrointestinální stromální tumory od adultních forem a umožňuje předpokládat odlišnou patogenetickou cestu vzniku těchto nádorů (135, 137, 138).

Biologické chování je charakterizováno sklonem k metastazování do jater, ale poměrně dlouhou dobou přežívání (více než deset let) i při jaterním postižení (133, 137, 138).

Diferenciální diagnóza

V diferenciální diagnostice je nutné odlišit jak benigní tumory pro jejich odlišné biologické chování, tak nádory maligní pro jejich terapeutickou neovlivnitelnost imatinibem.

V první řadě přicházejí v úvahu leiomyom a leiomyosarkom, dále karcinom, protože GIST jej může napodobovat nejen svým způsobem růstu (139) a případnou epitelioidní morfoloží, ale i imunoexpresí cytokokeratinů (140, 141). Vzácným nálezem je výskyt kolizního tumoru vzhledu adenosarkomu (142). Naopak karcinom, zejména vřetenobuněčný (sarkomatoidní karcinom, karcinosarkom) může imitovat gastrointestinální stromální tumor, zvláště když exprimuje KIT (143).

Mezi méně časté nádory vstupující do diferenciální diagnózy patří schwannom, maligní nádor pochvy periferního nervu (MPNST), neurofibrom, smíšené glioneurální tumory, perineuriom, inflammatorní myofibroblastický tumor (IMT), tumor z folikulárních dendritických buněk (FDC), solitární fibrózní tumor (SFT), glomus tumor, hemangiopericytom, dediferencovaný liposarkom, synoviální sarkom, maligní fibrózní histiocytom, myxofibrosarkom, fibrosarkom, myofibroblastom a myofibrosarkom, maligní melanom, světlouněčný sarkom měkkých tkání (šlach a aponeuróz), PEComy, angiosarkom, rhabdomyosarkom, alveolární sarkom měkkých tkání, extraskeletální Ewingův sarkom a primitivní neuroektodermální tumor (ES/PNET), desmoplastický tumor z malých kulatých buněk (desmoplastic small round cell tumor, DSRCT), leiomyomatosis peritonealis disseminata, mesenchymom, a extrauterinní endometriální stromální sarkom (ESS).

Jako GIST mohou také imponovat pseudotumorózní afekce jako Vaňkův tumor (inflammatorní fibroidní polyp, IFP), benigní fibroblastický polyp colon, reaktivní nodulární fibrózní pseudotumor (RNFP), kalcifikující fibrózní pseudotumor (CFP), intraabdominální fibromatóza (desmoid), nodulární fasciitida, proliferativní fasciitida a proliferativní myositida, intraabdominální myositis ossificans (heterotopická ossifikace mesenteria), retroperitoneální fibróza a sklerozující mesenteritida (retraktilní mesenteritida, mesenteriální lipodystrofie a mesenteriální pannikulitida).

Morfologické prognostické faktory

V současné době není známo kritérium, které by umožňovalo vyloučit možnost maligního chování u GISTu, je tedy nutné každý tento nádor považovat za potenciálně maligní. Na consensus konferenci NIH v roce 2001 byla stanovena morfoloická kritéria, na jejichž základě se stanovuje riziko agresivního chování gastrointestinálního stromálního tumoru (144). Tato kritéria považujeme za závazná a používáme je u všech GISTů vyšetřovaných v naší laboratoři

Stanovení rizika agresivního chování gastrointestinálního stromálního tumoru

Riziko agresivního chování	Maximální rozměr tumoru	Mitotický index
velmi nízké	<2 cm	<5/50
nízké	2-5 cm	<5/50
střední	<5 cm	6-10/50
	5-10 cm	<5/50
vysoké	>5 cm	>5/50
	>10 cm	jakýkoliv
	jakýkoliv	>10/50

Mitotický index: počet mitóz v padesáti zorných polích velkého zvětšení (objektiv 40x)

Mezi další markery malignity v současné době studované a/nebo některými autory používané, ale dosud obecně nepřijaté, patří zejména lokalizace nádoru, přičemž žaludeční tumory mívají nejlepší prognózu, naopak mezi GISTy se špatnou prognózou patří extragastrointestinálně lokalizované tumory a GISTy tenkého střeva (21, 23, 145, 146). Vysoká celularita, vysoký proliferativní index (Ki-67), infiltrativní růst a nekrózy jsou považovány také za markery agresivního chování GISTu, někdy i výrazně signifikantní, avšak ne zcela jednoznačně, proto do obecně přijímaných kritérií dosud začleněny nebyly, doporučujeme ale jejich zmínění v diagnostickém textu (2, 21, 23, 146 - 152). Přestože některé studie prokázaly negativní prognostický význam exprese p53 (146, 153 - 155), zdá se, že vyšetřování tohoto markeru nepřináší další zpřesnění prognózy stanovené na základě velikosti tumoru a mitotického indexu (152, 154, 156). Exprese MYC proteinu byla shledána jako prognostický faktor maligního chování v jedné studii prováděné na souboru 32 případů (157), amplifikace genu však na základě analýzy souboru 94 tumorů nekorelovala významně s agresivním chováním (158, 159). Vyšetřování exprese bcl-2 pravděpodobně nemá žádný prognostický význam (152, 154, 157). Snížená nebo žádná exprese PTEN je signifikantním markerem maligního chování podle jedné studie prováděné na souboru 21 GISTů (160). Ztráta exprese adhezivní molekuly CD44 korelovala s maligním chováním v jedné studii 33 žaludečních stromálních tumorů (161), v jiné studii nebyla exprese tohoto markeru shledána významným prognostickým faktorem (156). Ztráta exprese p16/INK4A, aj již na podkladě delece 9p anebo methylace promotoru genu *CDKN2A*, byla v nedávné době opakovaně asociována s maligním chováním (155, 158, 159, 162 - 166). Dalšími onkogeny, jejichž amplifikace a/nebo overexprese u maligních GISTů je v současné době studována jsou *MDM2*, *CCND1*, *CDK4*, *E2F1*, *MCM-2* (155, 158, 159, 165). TRAP analýza 36 případů prokázala asociaci vysoké telomerázové aktivity s maligním potenciálem (167). Overexprese hypoxii inducibilního faktoru 1alpha (HIF-1alpha) korelovala s rizikem maligního chování (168, 169). Ztráta chromozomů 14 a 22 není v současné době vnímána jako signifikantní prognostický znak (77, 170). Imunoexprese CD34, v pre-KIT éře používaného k diagnóze GISTu, je v různých studiích interpretována jak jako znak agresivního, tak benigního chování, pravděpodobně tedy nemá žádný význam jako prognostický faktor (171, 172). Pokud jde o prognostický význam mutační analýzy c-kit a *PDGFRA*, počáteční před-

poklady o vymezení GISTů s mutací c-kit, zejména v exonu 11, jako maligních (70 - 73) byly vyvráceny pozorováním mutací téměř ve všech GISTech, i menších než 1 cm (74, 75, 77). Navíc, proti původní tezi o asociaci mutací exonu 11 se špatnou prognózou svědčí pozorování predominantní prevalence benigních žaludečních GISTů mezi tumory s interními tandemovými duplikacemi v 3' konci JM domény (79), stejně jako průkaz mutace 1530ins6 v exonu 9 maligních GISTů intestinální lokalizace (80) a maligního chování gastrointestinálních stromálních tumorů s mutací v exonu 13 (81). Recentní práce kládou důraz na lepší prognózu nádorů se substituční mutací v exonu 11 vzhledem k ostatním typům mutací (82) a na delecí kodonů 557 a 558 jako markeru maligního chování (83, 84).

Morfologické prediktivní faktory

Narozdíl od sporného prognostického významu mutací c-kit a *PDGFRA* je všeobecně přijímána jejich úloha v predikci terapeutické odpovědi na imatinib mesylát. Z obecného hlediska jsou považovány tumory s „regulačním typem“ mutace (e.g. exon 11 c-kit nebo exon 12 *PDGFRA*) za responzivní, zatímco nádory s „enzymatickým typem“ mutace (e.g. exon 17 c-kit a exon 18 *PDGFRA*) za primárně rezistentní, přičemž mutace

v dané doméně nemusí vždy postihovat přesně oblast vazby imatinibu, protože i vzdálenější změna struktury proteinu může vést ke konformačním změnám zamezujícím vazbě molekuly (85). Dosavadní studie prokázaly největší účinnost imatinibu u GISTů s mutací v exonu 11 c-kit, na druhém místě v responzivitě je exon 9 téhož genu. U ostatních studovaných mutací (exon 13 a 17 c-kit, exon 18 *PDGFRA*) většinou nebylo dosaženo parciální odpovědi, ale pouze stabilizace onemocnění (173 - 176). Nicméně, vzhledem k pozorování progresu onemocnění po vysazení imatinibu i v GISTech s primární rezistencí, by ani přítomnost těchto rezistentních mutací neměla být považována za kontraindikaci léčby imatinibem. Navíc se jako slibné jeví probíhající studie s nově vyvíjenými léky (SU11248, SDX-102, AMG 706, PKC 412, BMS-354825), a to nejen v případech s primární rezistencí k imatinibu, ale i při rezistenci sekundární vznikající na podkladě nových mutací v TK doméně (177 - 180).

Addendum

Zájemcům o detailnější informace, zejména z oblasti diferenciální diagnostiky, je určen volně přístupný web na rozcestníku nádorů na adrese www.nadory.cz, obsahující průběžně aktualizované informace včetně obrazové dokumentace.

Literatura

1. D'Amato G., Steinert D.M., McAuliffe J.C., Trent J.C. (2005): Update on the biology and therapy of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Control* 12, 44-56.
2. Miettinen M., Sobin L.H., Lasota J. (2005): Gastrointestinal stromal tumors of the stomach. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am. J. Surg. Pathol.* 29, 52-68.
3. Mechtersheimer G., Egerer G., Hensel M., et al. (2004): Gastrointestinal stromal tumours and their response to treatment with tyrosine kinase inhibitor imatinib. *Virchows Arch.* 44 4, 108-118.
4. Hornick J.L., Fletcher C.D.M. (2004): The significance of KIT (CD117) in gastrointestinal stromal tumors. *Int. J. Surg. Pathol.* 12, 93-97.
5. Dei Tos A.P. (2003): The reappraisal of gastrointestinal stromal tumors: from Stout to the KIT revolution. *Virchows Arch.* 442, 421-428.
6. Rosai J. (2003): GIST: An update. *Int. J. Surg. Pathol.* 11, 177-186.
7. Golden T., Stout A.P. (1941): Smooth muscle tumours of the gastrointestinal tract and retroperitoneal tissues. *Surg. Gynecol. Obstet.* 73, 784-790.
8. Stout A.P. (1962): Bizarre smooth muscle tumors of the stomach. *Cancer* 15, 400-409.
9. Welsh R.A., Meyer T. (1969): Ultrastructure of gastric leiomyomas. *Arch. Pathol.* 87, 71-81.
10. Ricci A., Ciccirelli O., Cartun R.W., Newcombe P. (1987): A clinicopathologic and immunohistochemical study of 16 patients with small intestinal leiomyosarcomas. Limited utility of phenotyping. *Cancer* 60, 1790-1799.
11. Mazur M.T., Clark H.B. (1983): Gastric stromal tumors: reappraisal of histogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* 7, 507-519.
12. Sarlomo-Rikala M., Kovatich A.J., Barusevicius A., Miettinen M. (1998): CD117: a sensitive marker for a gastrointestinal stromal tumor that is more specific than CD34. *Mod. Pathol.* 11, 728-734.
13. Sircar K., Hewlett B., Riddell R.H. (1998): Most gastrointestinal stromal tumors arise from interstitial cells of Cajal (ICC). *Mod. Pathol.* 11, 71A.
14. Sircar K., Hewlett B., Riddell R.H. (1999): Interstitial cells of Cajal as precursors of gastrointestinal stromal tumor. *Am. J. Surg. Pathol.* 23, 377-389.
15. Kindblom L.G., Remotti C.E., Aldenborg F., Meis-Kindblom J.M. (1998): Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am. J. Pathol.* 152, 1259-1269.
16. Hirota S., Isozaki K., Moriyama Y., et al. (1998): Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 279, 577-580.
17. Medeiros F., Corless C.L., Duensing A., et al. (2004): KIT-negative gastrointestinal stromal tumors. Proof of concept and therapeutic implications. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 889-894.
18. Heinrich M.C., Corless C.L., Duensing A., et al. (2003): *PDGFRA* activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 299, 708-710.
19. Hirota S., Ohashi A., Nishida T., et al. (2003): Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor α gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 125, 660-667.
20. Miettinen M., Sarlomo-Rikala M., Lasota J. (1999): Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum. Pathol.* 30, 1213-1220.
21. Miettinen M., Lasota J. (2001): Gastrointestinal stromal tumors - definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch.* 438, 1-12.
22. Miettinen M., Monihan J.M., Sarlomo-Rikala M., et al. (1999): Gastrointestinal stromal tumors/smooth muscle tumors (GISTs) primary in the omentum and mesentery. Clinicopathologic and immunohistochemical study of 26 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 23, 1109-1118.
23. Reith J.D., Goldblum J.R., Lyles R.H., Weiss S.W. (2000): Extragastric gastrointestinal (soft tissue) stromal tumors: an analysis of 48 cases with emphasis on histologic predictors of outcome. *Mod. Pathol.* 13, 577-585.
24. Sakurai S., Hishima T., Takazawa Y., et al. (2001): Gastrointestinal stromal tumors and KIT-positive mesenchymal cells in the omentum. *Pathol. Int.* 51, 524-531.
25. Clary B.M., DeMatteo R.P., Lewis J.J., et al. (2001): Gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcoma of the abdomen and retroperitoneum: a clinical comparison. *Ann. Surg. Oncol.* 8, 290-299.
26. Neto M.R.M., Machuca T.N., Pinho R.V., et al. (2004): Gastrointestinal stromal tumor: report of two unusual cases. *Virchows Arch.* 444, 594-596.
27. Daum O., Klecka J., Ferda J., et al. (2005): Gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report with documentation of KIT gene mutation. *Virchows Arch.* 446, 470-472.
28. Ortiz-Hidalgo C., Bojorge B.L., Albores-Saavedra J. (2000): Stromal tumor of the gallbladder with phenotype of interstitial cells of Cajal. A previously unrecognized neoplasm. *Am. J. Surg. Pathol.* 24, 1420-1423.
29. Mendoza-Marin M., Hoang M.P., Albores-Saavedra J. (2002): Malignant stromal tumor of the gallbladder with interstitial cells of Cajal phenotype. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 126, 481-483.
30. Lasota J., Carlsson J.A., Miettinen M. (2000): Spindle cell tumor of urinary bladder serosa with phenotypic and genotypic features of gastrointestinal stromal tumor. A clinical report with documentation of KIT expression and mutation. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 124, 894-897.
31. Ceballos K.M., Francis J.A., Mazurka J.L. (2004): Gastrointestinal stromal tumor presenting as a recurrent vaginal mass. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128, 1442-1444.
32. Herrera G.A., Pinto de Moraes H., Grizzle W.E., Han S.G. (1984): Malignant small bowel neoplasm of enteric plexus derivation (plexosarcoma). Light and electron microscopic study confirming the origin of the neoplasm. *Dig. Dis. Sci.* 29, 275-284.
33. Walker P., Dvorak A.M. (1986): Gastrointestinal autonomic nerve (GAN) tumor. Ultrastructural evidence for a newly recognized entity. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110, 309-316.
34. Tsang W.Y.W. (1994): Gastrointestinal autonomic nerve (GAN) tumors: an underrecognized group of gastrointestinal stromal neoplasms. *Adv. Anat. Pathol.* 1, 21-28.

35. Eyden B., Chorneyko K.A., Shanks J.H., et al. (2002): Contribution of electron microscopy to understanding cellular differentiation in mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract: a study of 82 tumors. *Ultrastruct. Pathol.* 26, 269-285.
36. Matsumoto K., Min W., Yamada N., Asano G. (1997): Gastrointestinal autonomic nerve tumors: immunohistochemical and ultrastructural studies in cases of gastrointestinal stromal tumor. *Pathol. Int.* 47, 308-314.
37. Segal A., Carello S., Caterina P., et al. (1994): Gastrointestinal autonomic nerve tumors: a clinicopathological, immunohistochemical and ultrastructural study of 10 cases. *Pathology* 26, 439-447.
38. Chambonniere M.L., Mosnier-Damet M., Mosnier J.F. (2001): Expression of microtubule-associated protein tau by gastrointestinal stromal tumors. *Hum. Pathol.* 32, 1166-1173.
39. Lee J.R., Joshi V., Griffin J.W., et al. (2001): Gastrointestinal autonomic nerve tumor. Immunohistochemical and molecular identity with gastrointestinal stromal tumor. *Am. J. Surg. Pathol.* 25, 979-987.
40. Debiec-Rychter M., Pauwels P., Lasota J., et al. (2002): Complex genetic alterations in gastrointestinal stromal tumors with autonomic nerve differentiation. *Mod. Pathol.* 15, 692-698.
41. Lee J.R., Lasota J. (2002): Gastrointestinal autonomic nerve tumor. Author's reply. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 397-398.
42. Min K.W. (1992): Small intestinal stromal tumors with skeinoid fibers. Clinicopathological, immunohistochemical, and ultrastructural investigations. *Am. J. Surg. Pathol.* 16, 145-155.
43. Hemmi A., Inaniwa Y., Ohno S., et al. (2001): Relationship between skeinoid fibers and stromal matrix in gastrointestinal stromal tumors: morphometric analysis with quick-freezing and deep-etching method. *Pathol. Int.* 51, 338-348.
44. Sakurai S., Hasegawa T., Sakuma Y., et al. (2004): Myxoid epithelioid gastrointestinal stromal tumor (GIST) with mast cell infiltrations: a subtype of GIST with mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene. *Hum. Pathol.* 35, 1223-1230.
45. Wardelmann E., Hrychuk A., Merkelbach-Bruse S., et al. (2004): Association of platelet-derived growth factor receptor mutations with gastric primary site and epithelioid or mixed cell morphology in gastrointestinal stromal tumors. *J. Mol. Diagn.* 6, 197-204.
46. Pauls K., Merkelbach-Bruse S., Thal D., et al. (2005): PDGFRA- and c-kit mutated gastrointestinal stromal tumours (GISTs) are characterized by distinctive histological and immunohistochemical features. *Histopathology* 46, 166-175.
47. Penzel R., Aulmann S., Moock M., et al. (2005): The location of KIT and PDGFRA gene mutations in gastrointestinal stromal tumours is site and phenotype associated. *J. Clin. Pathol.* 58, 634-639.
48. Rossi G., Valli R., Bertolini F., et al. (2005): PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue tumours of the gastrointestinal tract. *Histopathology* 46, 522-531.
49. West R.B., Corless C.L., Chen X., et al. (2004): The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am. J. Pathol.* 165, 107-113.
50. Blay P., Austudillo A., Buesa J.M., et al. (2004): Protein kinase C δ is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors but not in other mesenchymal neoplasias. *Clin. Cancer Res.* 10, 4089-4095.
51. Motegi A., Sakurai S., Nakayama H., et al. (2005): PKC θ , a novel immunohistochemical marker for gastrointestinal stromal tumors (GIST), especially useful for identifying KIT-negative tumors. *Pathol. Int.* 55, 106-112.
52. Miquel R., Gaspa A., Perez N., et al. (2005): Protein kinase C θ (PKC- θ) selective expression in gastrointestinal stromal tumors. *Abstract. Mod. Pathol.* 18 suppl. 1, 113A.
53. Miettinen M.M., Sarlomo-Rikala M., Kovatich A.J., Lasota J. (1999): Calponin and h-caldesmon in soft tissue tumors: consistent h-caldesmon immunoreactivity in gastrointestinal stromal tumors indicates traits of smooth muscle differentiation. *Mod. Pathol.* 12, 756-762.
54. Robertson S.C., Tynan J.A., Donoghue D.J. (2000): RTK mutations and human syndromes when good receptors turn bad. *Trends Genet.* 16, 265-271.
55. Yarden Y., Escobedo J.A., Kuang W.J., et al. (1986): Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 323, 226-232.
56. Besmer P., Murphy J.E., George P.C., et al. (1986): A new acute transforming feline retrovirus and relationship of its oncogene v-kit with the protein kinase family. *Nature* 320, 415-421.
57. Yarden Y., Kuang W., Yang-Feng T., et al. (1987): Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J.* 6, 3341-3351.
58. Williams D.E., Eisenman J., Baird A., et al. (1990): Identification of a ligand for the c-kit protooncogene. *Cell* 63, 167-174.
59. Zsebo K.M., Williams D.A., Geissler E.N., et al. (1990): Stem cell factor is encoded at the S1 locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. *Cell* 63, 213-224.
60. Vandenbark G.R., deCastro C.M., Taylor H., et al. (1992): Cloning and structural analysis of the human c-kit gene. *Oncogene* 7, 1259-1266.
61. Giebel L.B., Strunk K.M., Holmes S.A., Spritz R.A. (1992): Organization and nucleotide sequence of the human KIT mast/stem cell growth factor receptor protooncogene. *Oncogene* 7, 2207-2217.
62. Kitamura Y., Go S. (1978): Decreased production of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* 52, 447-452.
63. Maeda H., Yamagata A., Nishikawa S., et al. (1992): Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 116, 369-375.
64. Beghini A., Ripamonti C.B., Cairoli R. (2004): KIT activating mutations: incidence in adult and pediatric acute myeloid leukemia, and identification of internal tandem duplication. *Haematologica* 89, 920-925.
65. Kimura A., Nakata Y., Katoh O., Hyodo H. (1997): c-kit point mutation in patients with myeloproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma* 25, 281-287.
66. Hongyo T., Li T., Syaifudin M., et al. (2000): Specific c-kit mutations in sinonasal natural killer/T-cell lymphoma in China and Japan. *Cancer Res.* 60, 2345-2347.
67. Went P.T., Dirnhofer S., Bondi M., et al. (2004): Prevalence of KIT expression in human tumors. *J. Clin. Oncol.* 22, 4514-4522.
68. Kemmer K., Corless C.L., Fletcher J.A., et al. (2004): KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am. J. Pathol.* 164, 305-313.
69. Longley B.J., Metcalfe D.D. (2000): A proposed classification of mastocytosis incorporating molecular genetics. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 14, 697-701.
70. Ernst S.I., Hubbs A.E., Przygodzki R.M., et al. (1998): KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab. Invest.* 78, 1633-1636.
71. Moskaluk C.A., Tian Q., Marshall C.R., et al. (1999): Mutations of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 18, 1897-1902.
72. Lasota J., Jasinski M., Sarlomo-Rikala M., Miettinen M. (1999): Mutations in exon 11 of c-kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am. J. Pathol.* 154, 53-60.
73. Taniguchi M., Nishida T., Hirota S., et al. (1999): Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 59, 4297-4300.
74. Rubin B.P., Singer S., Tsao C., et al. (2001): KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 61, 8118-8121.
75. Corless C.L., McGreevey L., Haley A., et al. (2002): KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am. J. Pathol.* 160, 1567-1572.
76. Heinrich M.C., Rubin B.P., Longley B.J., Fletcher J.A. (2002): Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum. Pathol.* 33, 484-495.
77. Andersson J., Sjögren H., Meis-Kindblom J.M., et al. (2002): The complexity of KIT gene mutations and chromosome rearrangements and their clinical correlation in gastrointestinal stromal (pacemaker cell) tumors. *Am. J. Pathol.* 160, 15-22.
78. Corless C.L., McGreevey L., Town A., et al. (2004): KIT gene deletions at the intron 10-exon 11 boundary in GI stromal tumors. *J. Mol. Diagn.* 6, 366-370.
79. Lasota J., Dansonka-Mieszkowska A., Stachura T., et al. (2003): Gastrointestinal stromal tumors with internal tandem duplications in 3' end of KIT juxtamembrane domain occur predominantly in stomach and generally seem to have a favorable course. *Mod. Pathol.* 16, 1257-1264.
80. Lasota J., Kopczynski J., Sarlomo-Rikala M., et al. (2003): KIT 1530ins6 mutation defines a subset of predominantly malignant gastrointestinal stromal tumors of intestinal origin. *Hum. Pathol.* 34, 1306-1312.
81. Lasota J., Wozniak A., Sarlomo-Rikala M., et al. (2000): Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. A study of 200 cases. *Am. J. Pathol.* 157, 1091-1095.
82. Singer S., Rubin B.P., Lux M.L., et al. (2002): Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* 20, 3898-3905.
83. Wardelmann E., Losen I., Hans V., et al. (2003): Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. *Int. J. Cancer* 106, 887-895.
84. Martin J., Poveda A., Llombart-Bosch A., et al. (2005): Deletions affecting codons 557-558 of the c-kit gene indicate a poor prognosis in patients with completely resected gastrointestinal stromal tumors: a study by the Spanish Group for Sarcoma Research (GEIS). *J. Clin. Oncol.* 23, 6190-6198.
85. Longley B.J., Reguera M.J., Ma Y. (2001): Classes of c-kit activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk. Res.* 25, 571-576.
86. Miettinen M., Lasota J. (2005): KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 13, 205-220.
87. Sihto H., Sarlomo-Rikala M., Tynnenen O., et al. (2005): KIT and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase gene mutations and KIT amplifications in human solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 23, 49-57.
88. Kawagishi J., Kumabe T., Yoshimoto T., Yamamoto T. (1995): Structure, organization, and transcription units of the human alpha-platelet-derived growth factor receptor gene, PDGFRA. *Genomics* 30, 224-232.
89. Lasota J., Dansonka-Mieszkowska A., Sobin L.H., Miettinen M. (2004): A great majority of GISTs with PDGFRA mutations represent gastric tumors of low or no malignant potential. *Lab. Invest.* 84, 874-883.
90. Debiec-Rychter M., Wasag B., Stul M., et al. (2004): Gastrointestinal stromal tumours (GISTs) negative for KIT (CD117 antigen) immunoreactivity. *J. Pathol.* 202, 430-438.
91. Yamamoto H., Oda Y., Kawaguchi K.I., et al. (2004): c-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastro-

- intestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 479-488.
92. Yi E.S., Strong C.R., Piao Z., et al. (2005): Epithelioid gastrointestinal stromal tumor with PDGFRA activating mutation and immunoreactivity. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 13, 157-161.
93. Carney J.A., Sheps S.G., Go V.L.W., Gordon H. (1977): The triad of gastric leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *N. Engl. J. Med.* 296, 15 17-1518.
94. Carney J.A. (1979): The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, functioning extra-adrenal paraganglioma and pulmonary chondroma. *Cancer* 43, 374-382.
95. Carney J.A. (1983): The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma: a five year review. *Medicine* 62, 159-169.
96. Carney J.A. (1994): The triad of gastric epithelioid leiomyosarcoma, pulmonary chondroma, and functioning extra-adrenal paraganglioma. *Abstract. Mod Pathol* 7, 58A.
97. Carney J.A. (1999): Gastric stromal sarcoma, pulmonary chondroma, and extra-adrenal paraganglioma (Carney triad): natural history, adrenocortical component, and possible familial occurrence. *Mayo Clin. Proc.* 74, 543-552.
98. Candanedo-González F.A., Krause-Sentís L., Bencosme-Vina S.C.M., Santiago-Payán H. (2000): Incomplete form of Carney's triad: clinical and morphologic analysis of a case in Mexico. *Endocr. Pathol.* 11, 287-294.
99. Perez-Atayade A.R., Shamberger R.C., Kozakewich H.W.P. (1993): Neuroectodermal differentiation of the gastrointestinal tumors in the Carney triad. An ultrastructural and immunohistochemical study. *Am. J. Surg. Pathol.* 17, 706-714.
100. Blei E., Gonzalez-Crussi F. (1992): The intriguing nature of gastric tumors in Carney's triad. Ultrastructural and immunohistochemical observations. *Cancer* 69, 292-300.
101. Horenstein M.G., Hitchcock T.A., Tucker J.A. (2005): Dual CD117 expression in gastrointestinal stromal tumor (GIST) and paraganglioma of Carney triad: a case report. *Int. J. Surg. Pathol.* 13, 87-92.
102. Diment J., Tamborini E., Casali P., et al. (2005): Carney triad: case report and molecular analysis of gastric tumor. *Hum. Pathol.* 36, 112-116.
103. Amieux P.S. (2004): Getting the GIST of the Carney triad: growth factors, rare tumors, and cellular respiration. *Pediatr. Dev. Pathol.* 7, 306-308.
104. Ngadiman S., Horenstein M.G., Campbell W.G. Jr. (1994): The concurrence of duodenal epithelioid stromal sarcoma, pulmonary chondromatous hamartoma, and nonfunctioning pancreatic islet cell tumor. A possible analogue of Carney's triad? *Arch. Pathol. Lab. Med.* 118, 840-843.
105. Lamovec J., Frkovic-Grazio S., Bracko M. (1998): Nonsporadic cases and unusual morphological features in pheochromocytoma and paraganglioma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 122, 63-68.
106. Carney J.A., Stratakis C.A. (2002): Familial paraganglioma and gastric stromal sarcoma. A new syndrome distinct from the Carney triad. *Am. J. Med. Genet.* 108, 132-139.
107. Boccon-Gibod L., Boman F., Boudjemaa S., et al. (2004): Separate occurrence of extra-adrenal paraganglioma and gastrointestinal stromal tumor in monozygotic twins: probable familial Carney syndrome. *Pediatr. Dev. Pathol.* 7, 380-384.
108. Levy A.D., Patel N., Abbott R.M., et al. (2004): Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis: imaging features with clinicopathologic correlation. *AJR* 183, 1629-1636.
109. Miettinen M., Kopczynski J., Makhlof H.R., et al. (2003): Gastrointestinal stromal tumors, intramural leiomyomas, and leiomyosarcomas in the duodenum. A clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 167 cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 27, 625-641.
110. Boldorini R., Tosoni A., Leutner M., et al. (2001): Multiple small intestinal stromal tumors in a patient with previously unrecognized neurofibromatosis type 1: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Pathology* 33, 390-395.
111. Giulj J.A., Picard R., Giulj D., et al. (2003): Von Recklinghausen disease and gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Surg.* 185, 86-87.
112. Kramer K., Siech M., Sträter J., et al. (2005): GI hemorrhage with fulminant shock induced by jejunal gastrointestinal stromal tumor (GIST) coincident with duodenal neuroendocrine carcinoma (NET) + neurofibromatosis (NF) - case report and review of the literature. *Z. Gastroenterol.* 43, 281-288.
113. Usui M., Matsuda S., Suzuki H., et al. (2002): Somatostatinoma of the papilla of Vater with multiple gastrointestinal stromal tumors in a patient with von Recklinghausen's disease. *J. Gastroenterol.* 37, 947-953.
114. Kinoshita K., Hirota S., Isozaki K., et al. (2004): Absence of c-kit gene mutations in gastrointestinal stromal tumors from neurofibromatosis type 1 patients. *J. Pathol.* 202, 80-85.
115. Kindblom L.G., Anderson J., Sihto H., et al. (2005): NF1 associated gastrointestinal stromal tumors (GIST) have unique clinical and phenotypic and genotypic characteristics. *Abstract. Mod. Pathol.* 18 suppl. 1, 109A.
116. Andersson J., Sihto H., Meis-Kindblom J.M., et al. (2005): NF1-associated gastrointestinal stromal tumors have unique clinical, phenotypic, and genotypic characteristics. *Am. J. Surg. Pathol.* 29, 1170-1176.
117. Yantiss R.K., Rosenberg A.E., Sarran L., et al. (2005): Multiple gastrointestinal stromal tumors in type I neurofibromatosis: a pathologic and molecular study. *Mod. Pathol.* 18, 475-484.
118. Takazawa Y., Sakurai S., Sakuma Y., et al. (2005): Gastrointestinal stromal tumors of neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease). *Am. J. Surg. Pathol.* 29, 755-763.
119. Nishida T., Hirota S., Taniguchi M., et al. (1998): Familial gastrointestinal stromal tumors with germline mutation of the KIT gene. *Nat. Genet.* 19, 323-324.
120. O'Brien P., Kapusta L., Dardick I., et al. (1999): Multiple familial gastrointestinal autonomic nerve tumors and small intestinal neuronal dysplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 23, 198-204.
121. Hirota S., Okazaki T., Kitamura Y., et al. (2000): Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of the c-kit gene. *Am. J. Surg. Pathol.* 24, 326-327.
122. Maeyama H., Hidaka E., Ota H., et al. (2001): Familial gastrointestinal stromal tumor with hyperpigmentation: association with a germline mutation of the c-kit gene. *Gastroenterology* 120, 210-215.
123. Beghini A., Tibiletti M.G., Roversi G., et al. (2001): Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer* 92, 657-662.
124. Li F.P., Fletcher J.A., Heinrich M.C., et al. (2005): Familial gastrointestinal stromal tumor syndrome: phenotypic and molecular features in a kindred. *J. Clin. Oncol.* 23, 2735-2743.
125. Carballo M., Roig I., Aguilar F., et al. (2005): Novel c-KIT germline mutation in a family with gastrointestinal stromal tumors and cutaneous hyperpigmentation. *Am. J. Med. Genet.* 132A, 361-364.
126. Kim H.J., Lim S.J., Park K., et al. (2005): Multiple gastrointestinal stromal tumors with a germline c-kit mutation. *Pathol. Int.* 55, 655-659.
127. Handra-Luca A., Fléjou J.F., Molas G., et al. (2001): Familial multiple gastrointestinal stromal tumors with associated abnormalities of the myenteric plexus layer and skeinoid fibres. *Histopathology* 39, 359-363.
128. Isozaki K., Terris B., Belghiti J., et al. (2000): Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am. J. Pathol.* 157, 1581-1585.
129. Hirota S., Nishida T., Isozaki K., et al. (2002): Familial gastrointestinal stromal tumors associated with dysphagia and novel type germline mutation of KIT gene. *Gastroenterology* 122, 1493-1499.
130. O'Riain C.O., Corless C., Heinrich M., et al. (2005): Characteristic and unusual pathological features of a new familial GIST kindred. *Abstract. Mod. Pathol.* 18 suppl. 1, 113A.
131. Chompret A., Kannengiesser C., Barrois M., et al. (2004): PDGFRA germline mutation in a family with multiple cases of gastrointestinal stromal tumor. *Gastroenterology* 126, 318-321.
132. Terada R., Ito S., Akama F., et al. (2000): Clinical and histopathological features of colonic stromal tumor in a child. *J. Gastroenterol.* 35, 456-459.
133. Kerr J.Z., Hicks M.J., Nuchtern J.G., et al. (1999): Gastrointestinal autonomic nerve tumors in the pediatric population. A report of four cases and a review of the literature. *Cancer* 85, 220-230.
134. Kodet R., Snajdauf J., Smelhaus V. (1994): Gastrointestinal autonomic nerve tumor: a case report with electron microscopic and immunohistochemical analysis and review of the literature. *Pediatr. Pathol.* 14, 1005-1016.
135. Li P., Wei J., West A.B., et al. (2002): Epithelioid gastrointestinal stromal tumor of the stomach with liver metastases in a 12-year-old girl: aspiration cytology and molecular study. *Pediatr. Dev. Pathol.* 5, 386-394.
136. Bates A.W., Feakins R.M., Scheimberg I. (2000): Congenital gastrointestinal stromal tumour is morphologically indistinguishable from the adult form, but does not express CD117 and carries a favourable prognosis. *Histopathology* 37, 316-322.
137. Miettinen M., Lasota J., Sobin L.H. (2005): Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) of stomach in children and young adults - a study of 46 cases. *Abstract. Mod. Pathol.* 18 suppl. 1, 18A.
138. Miettinen M., Lasota J., Sobin L.H. (2005): Gastrointestinal stromal tumors of the stomach in children and young adults: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 44 cases with long-term follow-up and review of the literature. *Am. J. Surg. Pathol.* 29, 1373-1381.
139. Wheeler J.M.D., Warren B.F., Sica G., Maynard N.D. (2004): Gastrointestinal stromal tumour (GIST) masquerading as leiomyosarcoma. *Histopathology* 44, 88-89.
140. Nga M.E., Wong A.S.C., Wee A., Salto-Tellez M. (2002): Cytokeratin expression in gastrointestinal stromal tumours: a word of caution. *Histopathology* 40, 480-481.
141. Rossi G., Sartori G., Valli R., et al. (2005): The value of c-kit mutational analysis in a cytokeratin positive gastrointestinal stromal tumour. *J. Clin. Pathol.* 58, 991-993.
142. Zamecnik M., Sosna B., Chlumska A. (2005): Gastrointestinal stromal tumor (GIST) with glandular component. A report of an unusual tumor resembling adenocarcinoma. *Cesk. Patol.* 41, 150-156.
143. Martland G.T., Goodman A.J., Shepherd N.A. (2004): CD117 expression in oesophageal carcinosarcoma: a potential diagnostic pitfall. *Histopathology* 44, 77-80.
144. Fletcher C.D.M., Berman J.J., Corless C., et al. (2002): Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum. Pathol.* 33, 459-465.
145. Emory T.S., Sobin L.H., Lukes L., et al. (1999): Prognosis of gastrointestinal smooth-muscle (stromal) tumors: dependence on anatomic site. *Am. J. Surg. Pathol.* 23, 82-87.
146. Wang X., Mori I., Tang W., et al. (2001): Gastrointestinal stromal tumors: clinicopathological study of Chinese cases. *Pathol. Int.* 51, 701-706.
147. Yokoi K., Tanaka N., Shoji K., et al. (2005): A study of histopathological assessment criteria for assessing malignancy of gastrointestinal stromal tumor, from a clinical standpoint. *J. Gastroenterol.* 40, 467-473.
148. Trupiano J.K., Stewart R.E., Misick C., et al. (2002): Gastric stromal tumors. A clinicopathologic study of 77 cases with correlation of fea-

- tures with nonaggressive and aggressive behaviors. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 705-714.
149. Nakamura N., Yamamoto H., Yao T., et al. (2005): Prognostic significance of expressions of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and the relevance of the risk grade. *Hum. Pathol.* 36, 828-837.
 150. Nilsson B., Bümming P., Meis-Kindblom J.M., et al. (2005): Gastrointestinal stromal tumors: the incidence, prevalence, clinical course, and prognostication in the preimatinib mesylate era. A population-based study in western Sweden. *Cancer* 103, 821-829.
 151. Seidal T., Edvardsson H. (1999): Expression of c-kit (CD117) and Ki67 provides information about the possible cell of origin and clinical course of gastrointestinal stromal tumors. *Histopathology* 34, 416-424.
 152. Wong N.A.C.S., Young R., Malcomson R.D.G., et al. (2003): Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumors: a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* 43, 118-126.
 153. Al-Bozom I.A. (2001): p53 expression in gastrointestinal stromal tumors. *Pathol. Int.* 51, 519-523.
 154. Feakins R.M. (2005): The expression of p53 and bcl-2 in gastrointestinal stromal tumors is associated with anatomical site, and p53 expression is associated with grade and clinical outcome. *Histopathology* 46, 270-279.
 155. Haller F., Gunawan B., von Heydebreck A., et al. (2005): Prognostic role of E2F1 and members of the CDKN2A network in gastrointestinal stromal tumors. *Clin. Cancer Res.* 11, 6589-6597.
 156. Changchien C.R., Wu M.C., Tasi W.S., et al. (2004): Evaluation of prognosis for malignant rectal gastrointestinal stromal tumor by clinical parameters and immunohistochemical staining. *Dis. Colon Rectum* 47, 1922-1929.
 157. Panizo-Santos A., Sola I., Vega F., et al. (2000): Predicting metastatic risk of gastrointestinal stromal tumors: role of cell proliferation and cell cycle regulatory proteins. *Int. J. Surg. Pathol.* 8, 133-144.
 158. Tornillo L., Duchini G., Carafa V., et al. (2005): Patterns of gene amplification in gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Lab. Invest.* 85, 921-931.
 159. Simonetti S., Tornillo L., Mascolo M., et al. (2005): Morphological, immunohistochemical and gene expression of gastrointestinal stromal tumors (GIST). (High-throughput analysis). Abstract. *Virchows Arch.* 447, 534-535.
 160. Ricci R., Maggiano N., Castri F., et al. (2004): Role of PTEN in gastrointestinal stromal tumor progression. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128, 421-425.
 161. Montgomery E., Abraham S.C., Fisher C., et al. (2004): CD44 loss in gastric stromal tumors as a prognostic marker. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 168-177.
 162. Schneider-Stock R., Boltze C., Lasota J., et al. (2003): High prognostic value of p16INK4 alterations in gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* 21, 1688-1697.
 163. Ricci R., Arena V., Castri F., et al. (2004): Role of p16/INK4a in gastrointestinal stromal tumor progression. *Am. J. Clin. Pathol.* 122, 35-43.
 164. Sabah M., Cummins R., Leader M., Kay E. (2004): Loss of heterozygosity of chromosome 9p and loss of p16^{INK4a} expression are associated with malignant gastrointestinal stromal tumors. *Mod. Pathol.* 17, 1364-1371.
 165. Li C.F., Lin C.N., Huang W.W., Huang H.Y. (2005): Immunohistochemical evaluation of p16, MCM-2, and Ki-67 expression in GISTs by tissue microarray and correlation with the risk classification of the NIH conference consensus. Abstract. *Virchows Arch.* 447, 683.
 166. Schneider-Stock R., Boltze C., Lasota J., et al. (2005): Loss of p16 protein defines high-risk patients with gastrointestinal stromal tumors: a tissue microarray study. *Clin. Cancer Res.* 11, 638-645.
 167. Kawai J., Kidera Y., Fujiwara M., et al. (2005): Telomerase activity as a prognostic factor in gastrointestinal stromal tumors of the stomach. *Hepatogastroenterology* 52, 959-964.
 168. Chen W.T., Huang C.J., Wu M.T., et al. (2005): Hypoxia-inducible factor-1 [alpha] is associated with risk of aggressive behavior and tumor angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 35, 207-213.
 169. Takahashi R., Tanaka S., Hiyama T., et al. (2003): Hypoxia-inducible factor-1alpha expression and angiogenesis in gastrointestinal stromal tumor of the stomach. *Oncol. Rep.* 10, 797-802.
 170. Gunawan B., Bergmann F., Höer J., et al. (2002): Biological and clinical significance of cytogenetic abnormalities in low-risk and high-risk gastrointestinal stromal tumors. *Hum. Pathol.* 33, 316-321.
 171. Tazawa K., Tsukada K., Makuuchi H., Tsutsumi Y. (1999): Juxtamembrane mutant V560GKit is more sensitive to Imatinib (STI571) compared with wild-type c-kit whereas the kinase domain mutant D816VKit is resistant. *Mol. Cancer Ther.* 1, 1115-1124.
 174. Chen H., Isozaki K., Kinoshita K., et al. (2003): Imatinib inhibits various types of activating mutant kit found in gastrointestinal stromal tumors. *Int. J. Cancer* 105, 130-135.
 175. Heinrich M.C., Corless C.L., Demetri G.D., et al. (2003): Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J. Clin. Oncol.* 21, 4342-4349.
 176. Debiec-Rychter M., Dumez H., Judson I., et al. (2004): Use of cKIT/PDGFRA mutational analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors entered on phase I and II studies of the EORTC soft tissue and bone sarcoma group. *Eur. J. Cancer* 40, 689-695.
 177. Chen L.L., Trent J.C., Wu E.F., et al. (2004): A missense mutation in KIT kinase domain 1 correlates with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 64, 5913-5919.
 178. Debiec-Rychter M., Cools J., Dumez H., et al. (2005): Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in gastrointestinal stromal tumors and activity of the PKC412 inhibitor against imatinib-resistant mutants. *Gastroenterology* 128, 270-279.
 179. Sakamoto K.M. (2004): Su-11248 Sugen. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5, 1329-1339.
 180. Sanborn R.E., Blanke C.D. (2005): Gastrointestinal stromal tumors and the evolution of targeted therapy. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 3, 647-657.

Došlo: 8. 12. 2006
Prijato: 20. 1. 2006

ANGIOGENEZE A ANTI-ANGIOGENNÍ TERAPIE U NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ SE ZAMĚŘENÍM NA CÍRKULUJÍCÍ VASKULÁRNÍ ENDOTELIÁLNÍ RŮSTOVÝ FAKTOR (VEGF)

ANGIOGENESIS AND ANTI-ANGIOGENIC THERAPY IN MALIGNANT DISEASES WITH RESPECT TO CIRCULATING VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

ŠIMÍČKOVÁ M., DUBSKÁ L., KOCÁKOVÁ I., NEKULOVÁ M., NENUTIL R., DEMLOVÁ R., VALÍK D.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

Souhrn

Po desetiletích, kdy je známo, že angiogeneze je zásadním krokem pro progresi růstu nádorů, se inhibitory angiogeneze stávají součástí léčby maligních onemocnění. Jedním z prvních testovaných angiostatik je bevacizumab (Avastin), protilátka proti VEGF, tj. vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru. VEGF, jeden z hlavních iniciátorů angiogeneze, který je produkován nádorovými buňkami, indukuje vaskularizaci tumoru endoteliemi okolní tkáně nádoru a prekuzory endoteliálních buněk z kostní dřeně. Snaha nalézt vhodný prediktivní parametr pro ověření účinnosti anti-angiogenní terapie vedla k otázce, zda by tímto faktorem mohla být hladina VEGF v cirkulaci nebo nádorové tkáni, ev. výskyt endoteliálních buněk v periferní krvi. V této práci jsou shrnuty současné poznatky o angiogenezi při maligním procesu se zaměřením na VEGF, jeho vlastnosti a možnosti stanovení především v cirkulaci ve vztahu k efektu anti-angiogenní terapie.

Klíčová slova: angiogeneze, VEGF, stanovení VEGF v cirkulaci, anti-angiogenní terapie

Summary

After decades of observation that angiogenesis plays a key role in tumor progression, inhibitors of angiogenesis are becoming a part of therapy of malignant diseases. One of the first tested angiostatic substances is bevacizumab (Avastin), an antibody against VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). VEGF, one of the most important initiators of angiogenesis, is produced by tumor cells, and induces vascularization of the tumor via endothelial cells of the tumor tissue and endothelial precursor cells from the bone marrow. An effort to find suitable prognostic and predictive markers for the anti-angiogenic therapy monitoring is focusing also on VEGF in circulation, or on presence of circulating endothelial cells in peripheral blood. In this study we summarize recent knowledge on angiogenesis in the malignant process, with special regard to VEGF, its characteristics, and possibilities of its determination predominantly in blood in connection with anti-angiogenic therapy.

Key words: angiogenesis, VEGF, determination in circulation, anti-angiogenic therapy.

ANGIOGENEZE A VEGF.

Angiogeneze, tvorba nového cévního zásobení, je klíčovým krokem v mnoha fyziologických a patologických procesech (review 1-4). Prvním stupněm procesu tvorby krevního řečiště během ontogeneze je vaskulogeneze, tj. in situ diferenciace endoteliálních prekuzorových buněk a tvorba primitivní cévní sítě (1). Normální vaskulatura v dospělosti je pak tvořena z této sítě expanzí a remodelováním, tj. větvením a vzájemným propojováním. Tvorba cévního zásobení je nutná především v embryogenezi, kdy se vytváří primární vaskulatura nutná k růstu a vývoji orgánů. Angiogeneze jako proces se vyskytuje i v některých krocích postnatálního fyziologického vývoje, jako v ovariálním reprodukčním cyklu, v procesech spojených s vývojem retiny, ev. při hojení ran. Jedním z hlavních iniciátorů tohoto procesu je VEGF (review 4-6).

Vlastní angiogeneze je řízena celým souborem regulátorů,

z nichž mnohé vykazují *proangiogenní efekt*, jiné zase *anti-angiogenní působení* (tab.1) (4, 7). Za fyziologického stavu jsou obě skupiny faktorů v rovnováze.

Poznání molekulárních mechanismů angiogeneze umožnilo rozlišit dvě třídy chorob spojených s těmito procesy (4, 5). Do první skupiny patří poruchy, kdy terapeutické *navození angiogeneze* může opravit původní poškození tkáně (arterioskleróza, infarkt myokardu, ischemie dolních končetin). Druhou skupinu představují choroby, kdy potlačení *patologicky zvýšené angiogeneze* může vést k léčbě choroby či zpomalení jejího progressu (retinopatie, benigní a maligní choroby a progress maligních nádorů).

Nádorem indukovaná angiogeneze je proces, který umožňuje dostatečný přísun kyslíku a živin nádorovým buňkám (1, 5). Je známo, že růst nádoru zásobovaném prostou difúzí nepřekročí velikost 1-2 mm v průměru, další vývoj je možný pouze

po vytvoření nového cévního zásobení. Nádory mohou vytvořit svou vlastní vaskulaturu buď z již existujících kapilár, nebo se na tomto procesu mohou podílet cirkulující prekurzorové endoteliální buňky odvozené z kostní dřeně. Nádorem indukované cévní sítě slouží k přísunu metabolitů nutných pro růst nádorů a ultrastrukturálně vykazují výrazné abnormality (5). Mezi nejdéle studované proangiogenní faktory patří VEGF, na jehož roli při aktivaci endoteliálních buněk se zaměřil vývoj anti-angiogenní protinádorové terapie (1, 8-12).

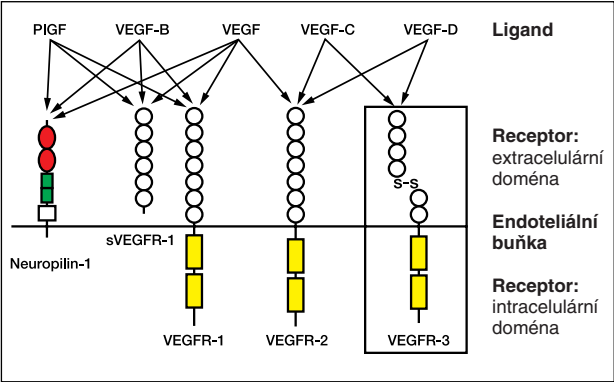
Tabulka č.1.: Nejdůležitější pro-angiogenní a anti-angiogenní látky (podle 4, 7)

A. Pro-angiogenní				
Růstové faktory *)	Cytokiny	Chemokiny	Hormony	Matrix proteiny
Ang-1	IL-1b	PBSF	androgen	fibrin
EGF	IL-6		estrogen	trombin
FGF1-9	IL-8		leptin	CYR61
IGF-1,2	TNF-alfa			CTGF
PDGF				
PIGF				
VEGF				

B. Anti-angiogenní			
Růstové faktory	Cytokiny	Proteinázy	Inhibitory proteináz
Ang-2	IFN alfa, beta	antitrombin-III	TIMP-1
TGF-beta	PF-4	endostatin	maspin
	IL-12	angiotatin	PAI-1
	IL-18	protrombin F1-2	

*) Ang-1,2: angiopoietin, EGF: epidermal growth factor, FGF: fibroblast growth factor, IGF-1,2: insulin-like growth factor, PDGF: platelet-derived growth factor, PIGF: placental growth factor, TNF-alfa: tumor necrosis factor, PBSF: pre B-cell stimulating growth factor, CYR61: Cystein-rich, angiogenic inducer 61, CTGF: connective tissue growth factor, TGF-beta: transforming growth factor, IFN: interferon, PF-4: platelet factor 4, TIMP-1: inhibitor matrixmetalo-proteináz, PAI-1: inhibitor plazminogenového aktivátoru

VEGF - STRUKTURA, VLASTNOSTI, FUNKCE.
VEGF - struktura. VEGF patří mezi specifické cytokiny (*třída cytokinů č.XI*), které mají silné angiogenní účinky a projevují se in vitro i in vivo mnoha efekty. U savců byly prokázány VEGF-A (nazývaný rovněž pouze VEGF), dále VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D a VEGF-E (tzv. virální faktor) (1, 10). Dále do této skupiny patří placental growth factor (PIGF) a platelet-derived growth factor (PDGF) (10). Jednotlivé molekuly se liší molekulovou hmotností a typem dimerizace (homo-, heterodimery). Homologické oblasti uvedených molekul jsou zachovány obzvláště v centrální doméně. Rozpuštěná izoforma VEGF-A je dimerický glykoprotein o velikosti 36-46 kDa, který váže heparin. Nejčastější formou ve tkáni je VEGF₁₆₅, 183, 189, 206, zatímco v cirkulaci nacházíme jak VEGF₁₂₁ tak i VEGF₁₆₅. Lidský gen pro VEGF-A je organizován v 8 exonech oddělených 7 introny a je lokalizován na chromozomu 6p21.3. Je známo alespoň 6 izoform proteinů, které vznikají alternativním sestřihem z VEGF genu s rozdílným počtem obsahem aminokyselin v každém monomeru.



Obr. 1.: Typy receptorů VEGF a jejich ligandů (podle 10)

Receptory VEGF: VEGF se mohou vázat na tři specifické tyrozinkinázo-receptory: VEGF-R1 (flt-1), VEGF-R2 (KDR/flk1) a VEGF-R3 (flt-4) (1, 8), lokalizované především na endoteliálních buňkách (obr.1). Receptory R1 a R2 jsou tvořeny sedmi Ig-podobnými doménami lokalizovanými extracelulárně, mají jednoduchou transmembránovou oblast, uvnitř buňky je tyrozinkinázo-vá doména. Exprese receptorů je zvýšena u migrujících nebo proliferujících endoteliálních buněk. Receptor typu VEGF-R1 váže přednostně VEGF-A a B, zatímco receptor VEGF-R2 váže především VEGF-C a D, vyskytující se převážně v endoteliu lymfatických cév (1) (obr.1). Dále se mohou VEGF vázat rovněž na koreceptory ne-utropiliny (1). Rozpuštěná varianta VEGF-R1 (sVEGFR-1), která nemá transmembránovou a tyrozinkinázo-vou doménu, může sice vázat ligandy, ale nespouští proces signalizace (obr.1). Přestože původní studie svědčily o přítomnosti těchto receptorů pouze na endoteliálních buňkách, byla v poslední době prokázána exprese VEGF-R1 přímo na nádorových buňkách, např. na buněčných liniích odvozených z karcinomu pankreatu, plic, ovaria a kolorekta (12). Aktivace těchto buněk prostřednictvím VEGF vede k procesům spojeným s fenotypovými změnami asociovanými s nádorovou progresí a metastazováním (12). Je tedy možné, že anti-angiogenní terapie, která blokuje účinek VEGF, má nejen vliv na endoteliální buňky, ale i přímý efekt na potlačení proliferativního potenciálu nádorových buněk. Naskytla se otázka, zda exprese receptorů VEGF v primární nádorové tkáni by nebyla vhodným prediktivním faktorem pro sledování efektu anti-VEGF-terapie (12).

Regulace exprese VEGF. Tvorba VEGF je indukována různými mechanismy, z nich nejdůležitější a experimentálně potvrzené jsou hypoxie, vliv různých růstových faktorů (TGF-alfa, beta, IGF-1, PDGF) a cytokinů (IL-1 a IL-6). K dalším regulátorům syntézy patří i některé hormony. K indukci exprese dochází i onkogenními mutacemi či amplifikacími různými onkogeny (H-ras, HER-2/neu) (1).

Vlastní molekulární mechanismus účinku VEGF spočívá v jeho vazbě na receptor (obvykle na endoteliální buňce), čímž se spouští signalizační VEGF kaskáda. Ta začíná autofosforylací tyrozinkinázy, pak následuje aktivace dalších proteinů této řady. Receptor VEGF-R2 je odpovědný za udržení mikrovaskulární permeability, za rychlý vzrůst koncentrace kalciových iontů a za následnou *proliferaci endoteliálních buněk* a migraci. Signalizační cesty VEGF-R1 jsou dosud méně prostudovány (1, 10). VEGF se tedy podílí na udržení *viability endoteliálních buněk* prostřednictvím *proliferace a inhibice jejich apoptózy*. Dále má přímý vliv na *vaskulární permeabilitu* - jeho působením dochází k jejímu zvýšení (dříve byl VEGF nazýván vaskulární permeabilní faktor) (1). VEGF *stimuluje tvorbu vaskulární sítě*, umožňující zásobení tumoru kyslíkem a živinami nutnými pro jeho růst. VEGF se rovněž podílí na *tvorbě lymfatických cév* nutných k metastazování. Jistou roli hraje v *potlačení imunitní odpovědi na nádorový proces*: VEGF má vliv na maturaci dendritických buněk, nutnou pro buněčnou imunitní odpověď a zřejmě se podílí i na chemotaxi monocyty (13).

Další molekuly této skupiny, tj. VEGF-B, C, D, E a PIGF, jsou dosud předmětem studia. Předpokládá se, že PIGF působí na podobné úrovni jako VEGF-A. VEGF-B není zřejmě bezpodmínečně nutný pro embryonální vývoj obecně, hraje však roli v kardiovaskulárním vývoji. VEGF-C a VEGF-D se spolupodílejí na tvorbě endotelia lymfatických cév (1).

PROTINÁDOROVÁ TERAPIE ZAMĚŘENÁ NA ANGIOGENEZU.
Hypotéza o možném zablokování růstu nádorů inhibicí angiogeneze byla vyslovena již před více než 30 lety (Folkman 14, Weidner 15, viz review 1). Anti-angiogenní terapie studovaná na experimentálních modelech různých nádorových linií se projevuje několika základními mechanismy: indukuje apoptózu endoteliálních buněk, inhibuje růst nádorových buněk a indukuje jejich nekrózu. Použití tohoto typu terapie u nemocných s maligními nádory (16) se jeví být velice nadějně.

Jeden z prvních testovaných inhibitorů angiogeneze, protilátka proti VEGF-A (A.4.6.1), byla následně humanizována a užitá pro klinické účely (bevacizumab, Avastin) (17-24). Bylo prokázáno, že je účinná u metastatických kolorektálních karcinomů i dalších typů solidních tumorů. Principem jejího účinku je zabránění interakce ligandu s povrchovými doménami receptorů (18). Mechanismus potenciace účinku souběžně užitých cytotoxických chemoterapeutik při podání anti-VEGF protilátky není dosud detailně objasněn. Lze předpokládat, že anti-VEGF terapie se může podílet na „normalizaci“ původně chaotické vaskulatury nádorů, čímž se sníží intratumorální tlak a především zlepší přísun terapeutických cytostatik do nádoru (18- 22). Klinické výsledky prokazují významný posun v mediánu celkového přežití tam, kde je anti-VEGF terapie bevacizumabem použita, a to obvykle v kombinaci s jiným chemoterapeutikem (24) . Aktuální snahy o blokádu angiogeneze jsou však vedeny i dalšími směry (na takto orientovaný výzkum je zaměřeno přes sto firem!) (tab.2). Jsou testovány procesy inhibice angiogeneze prostřednictvím modifikace receptoru i inhibicí katalytického místa tyrozinkinázové domény VEGF receptorů. Ve fázi II a III klinického testování jsou inhibitory ZD6474, PTK787 a SU11248, které specificky blokují VEGF-R1 a VEGF-R2. Přímou inhibicí proliferace endoteliálních buněk mohou působit i další látky, jako např. thalidomid, angiostatin; studovány jsou i inhibitory aktivity integrinu (19, 21, 22, 23).

Tabulka č.2.: Inhibitory angiogeneze v experimentálním i klinickém testování (podle 21)

Třída inhibitoru	Typ	Látka	Cíl působení
A. působící na VEGF	Protilátky	Bevacizumab	VEGF-A
		HuMV833 2C3	VEGF
	Rozpustný receptor	VEGF- Trap	VEGF a PlGF
B. působící na VEGFR	Protilátky	IMC-1121b	VEGFR-2
		Sunitib (SU11248)	VEGFR-2, PDGFR, c-kit
	Inhibitory -malé molekuly	Vatalanib (PTK787 /ZK222584)	VEGFR-1/2/3, PDGFR, c-kit
		ZD6474	VEGFR-2, EGFR, FGFR-1
		CP574, CP632	VEGFR-2, FGFR
		AZD 2171	VEGFR-1/2/3
		GW 786034	VEGFR-1/2/3
		Sorafenib (BAY 43-9006)	VEGFR-2/3, RAF kináza
		Angiozym	VEGFR
	Ribozymy	Angiozym	VEGFR
C. jiné	Inhibitory proliferace endotelií	ABT-510	endoteliální CD36
		Angiostatin	různý
		Thalidomid	TNF-alfa
	Inhibitory aktivity integrinů	Medi-522	integriny
		Cilengitide (EMD12194)	integriny
	Inhibitory vaskulární	Combretastatin A	endoteliální tubulin
		AVE8062A	endoteliální tubulin
		ZD6126	endoteliální tubulin
		AS1404 (DMXAA)	indukce TNF-alfa

MOŽNOSTI MONITOROVÁNÍ ANTI-ANGIOGENNÍ TERAPIE SE ZAMĚŘENÍM NA VEGF

Jako standardní prognostický ukazatel pro predikci vzniku metastáz i bezpříznakového a celkového přežití nadále patří zhodnocení nádorové angiogeneze prostřednictvím vyšetření mikrovaskulární denzity (15, 25). Snaha najít vhodný *prediktivní kvantitativní marker vázaný k angiogenezi pro sledování účinku anti-angiogenní terapie* nepřinesla dosud jednoznačné výsledky. Mnoho navržených metod má stále určitá omezení a nejsou tedy hodnoceny jako optimální: byla testována exprese různých angiogenních faktorů ve tkáni primárních nádorů, ev. jejich sérových, plazmatických či močových hladin, jako VEGF, bFGF, Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) a matrix metaloproteináz. Dále byly pro tyto účely navrženy různé bioptické postupy, radiologické metody nebo metody průkazu a kvantifikace cirkulujících endoteliálních buněk apod.

VEGF V CÍRKULACI.

Stanovení cirkulujícího VEGF. Optimalizace stanovení cirkulujícího VEGF je stále diskutovaným problémem ve vztahu k různým frakcím krve. Je totiž známo, že sérum obsahuje vyšší koncentraci VEGF než EDTA či citrátová plazma. Je to způsobeno tím, že VEGF se uvolňuje při aktivaci destiček, do

určité míry i z leukocytů (26-33). Ve srovnání s plazmou jsou sérové hladiny až pětinasobně vyšší o množství VEGF získané aktivací koagulační kaskády, s následným uvolněním VEGF během agregace destiček (33-35).

Je známo, že nádorové buňky se podílejí na aktivaci koagulačního systému, a to především produkcí prokoagulačních a fibrinolytických faktorů a cytokinů (35). Neméně důležité jsou však interakce mezi cirkulujícími nádorovými buňkami a trombocyty, endoteliálními buňkami a monocyty-makrofágy (35). Tyto interakce byly prokázány i in vivo experimenty, kdy aplikace nádorových buněk pokusným zvířatům vedla k agregaci trombocytů. Z dosavadních experimentů je vyvozováno, že trombocyty jako rezervoár VEGF mohou hrát významnou roli při tumorigenezi a jejich aktivace při adhezi nádorových buněk se může projevit zvýšenou permeabilitou nádorových buněk (33, 34).

Nemocní s pokročilým nádorovým onemocněním mají často abnormality v procesu koagulace a zvýšený metabolický obrat trombocytů (27, 32, 35). Trombocyty vyskytující se po chemoterapii či jako důsledek hematopoetické regenerace jsou obvykle větší velikosti než ty, které jsou produkovány během myelopoese v normálním stavu, zároveň obsahují i vyšší množství VEGF. Korelace mezi sérovým VEGF a počtem trombocytů nebyla vždy jednoznačně prokázána (30, 34).

Optimální krevní frakce pro vyšetřování cirkulujícího VEGF při rozlišení skupiny zdravých a nemocných s kolorektálním karcinomem byla testována na přesně definovaných frakcích krve. Bylo analyzováno sérum, plazma (citrátová nebo heparinová), plazma chudá na trombocyty (P-PP), tj. odebraná v přítomnosti inhibitorů degranulace trombocytů (CTAD plazma = citát sodný, theofyllin, adenosin a dipyridamol), a dále plazma obohacená aktivovanými trombocyty (P-APR). Vysoce signifikantní difference mezi zdravými kontrolami a nemocnými s kolorektálním karcinomem vykazoval model odběru plazmy obohacené o trombocyty (P-APR) (26, 36, 37). Dosavadní výsledky dosud nejsou uzavřeny: stanovení v plazmě je v nízkých hladinách zatíženo vyšší analytickou chybou (36), pro vyšetření VEGF v séru je třeba zabezpečit maximální koagulaci a hodnotu VEGF je doporučeno vztáhnout na počet trombocytů.

Metody stanovení VEGF v cirkulaci, falešná pozitivita v cirkulaci. Pro kvantitativní detekci solubilní formy VEGF existují komerční ELISA techniky, detekující izoformu typu VEGF₁₂₁ a VEGF₁₆₅; mezi oběma systémy nebyly nalezeny signifikantní difference v hladině cirkulujícího VEGF. V poslední době se objevila technika zvaná RELIDA - **RE**ceptor **L**igand **D**etection **A**ssay, která je založena na kvantifikaci biologicky aktivní formy VEGF vazbou na solubilní VEGFR1. Hladiny cirkulujícího VEGF nekolísají během menstruačního cyklu (31). Falešná pozitivita VEGF v cirkulaci může být způsobena interferencí léčiv, např. acylpyrimin, nesteroidními protizánětlivými látkami, dále chronickým zánětem, diabetem, ischemickou chorobou atd.

VEGF - VYUŽITÍ V ONKOLOGICKÉ PRAXI.

Lokalizace VEGF ve tkáni: VEGF je slabě exprimován v mnoha lidských i zvířecích normálních tkáních, vysoká produkce je charakteristická pro lokality, kde je angiogeneze nutnou podporou vývoje tkáně (fetální tkáň, placenta). Zvýšená exprese VEGF byla prokázána rovněž v mnoha maligních nádorech (tab.3) (38). Zvýšený výskyt koreluje obvykle s prognózou onemocnění, definovanou jak agresivitou růstu, tak i metastazováním a kratším přežitím. V metastatických ložiscích kolorektálního karcinomu byla imunohistochemicky prokázána výrazná exprese VEGF jako negativní prognostický faktor, která rovněž korelovala se stupněm mikrovaskulární denzity především pro nemocné stadia Dukes B (39-41). Prognostický význam VEGF však nebyl prokázán v některých studiích pro karcinomy prsu, ať už při vyšetřování imunohistochemicky či kvantitativně z cytozolu (42), podobně i pro thyroideální léze (43). Vzájemná korelace byla nalezena i mezi koncentrací VEGF v plazmě a jeho průkazem ve tkáni (39). Bylo zjištěno, že koncentrace VEGF

stanovená v mezenterických nádorových vénách u metastazujících kolorektálních nádorů je výrazně zvýšena proti nemetastazujícím nádorům s nižším gradingem (44).

Tabulka č. 3.: Expres VEGF v maligních nádorech a jeho prognostický význam (podle 38)

Typ tumoru	Expres VEGF % nádorů	Prognostický význam prokázán pro:
kolorektální ca	45-60	návrat choroby, přežití
mammární ca	30-60	přežití
nemalobuněčný ca plic	45-90	návrat choroby, přežití
ca ledvin	30-100	staging, grading
ca pankreatu	75-90	přežití
ca prostaty	30-80	bezpříznakové přežití
glioblastom	65-85	přežití

Na in vitro modelu bylo ověřeno, že expres VEGF v nádoru může způsobovat biologicky agresivní fenotyp nádorů exprimujících vyšší HER-2/neu (45, 46). Her-2/neu signalizace může působit ve smyslu produkce VEGF a tedy neovaskularizace. Prognostický význam VEGF i HER-2/neu v cytozolu primárního nádoru byl potvrzen: Kaplan-Meierovy křivky přežití byly významně horší pro nádory, kde byly silně exprimovány oba parametry. Naskýtá se tedy otázka, zda by nebylo vhodné kombinovat specificky cílenou terapii protilátkami proti oběma antigenům.

Prognostický význam cirkulujícího VEGF nemocných s maligními nádory byl zhodnocen ve skupině nemocných s kolorektálním karcinomem (26, 47-49), u karcinomu prsu (50, 51), u karcinomu plic (52-54), u karcinomu cervixu (55), u melanomu (56), karcinomu ledvin (57), u dětských malignit - osteosarkomů, neuroblastomů a Ewingova sarkomu (58) a u lymfoproliferativních onemocnění (59, 60).

Mezi stupněm nádorové vaskularizace, prognózou onemocnění a hladinou cirkulujícího VEGF byla prokázána korelace u většiny prací. Preoperativní zvýšené koncentrace korelovaly obvykle s kratším intervalem bezpříznakového období a kratším celkovým přežitím. Hladina VEGF byla nezávislým prognostickým ukazatelem i podle hodnocení multivariační analýzou, obvykle korelovala se stadiem onemocnění. Dosud však otázka optimální frakce krve jako materiálu pro hodnocení prognózy pomocí vyšetření VEGF nebyla rozřešena (47-58).

Přestože byl prognostický charakter VEGF v cirkulaci nemocných s různými lokalizacemi zhoubných nádorů prokázán, zůstává stále otázkou, zda je VEGF vhodný prediktivní marker pro sledování účinku terapie protilátkou proti VEGF, bevacizumabem (61). I když je koncentrace cirkulujícího VEGF zvýšena u velkého procenta nemocných s metastatickým postižením, studie analyzující jejich význam pro monitorování tera-

pie dosud nebyly publikovány. Vyšetření VEGF v průběhu terapie protilátkou proti VEGF není technicky jednoduché - při analýze dostupnou komerční ELISA technikou interferuje protilátka bevacizumab s vlastním stanovením VEGF. Význam jeho předterapeutických hladin, které by se mohly na predikci úspěšnosti terapie podílet, nebyl dosud testován.

CIRKULUJÍCÍ ENDOTELIÁLNÍ BUŇKY.

Na neovaskularizaci se podílejí nejen již existující kapiláry v okolí nádoru, ale také prekursor endoteliálních buněk, které se působením angiogenních faktorů exprimovaných ischemickým nádorem uvolňují z kostní dřeně. V krevním oběhu se tedy vyskytují různé typy endoteliálních buněk (EC); jako **CEC (cirkulující endoteliální buňky)** se zpravidla označují diferencované endoteliální buňky bez proliferčního potenciálu, které se do cirkulace dostaly odloučením z místa aktivované nebo narušené vaskularizace (62), zatímco **CEP (progenitory endoteliálních buněk)** jsou nediferencované prekursor s vysokou proliferční aktivitou mobilizované působením pro-angiogenních cytokinů z kostní dřeně (63, 64). Zvýšená hladina obou typů endoteliálních buněk v periferní krvi tedy nejenže koreluje s výskytem nádorového onemocnění a jeho progresí (65, 66), ale zdá se, že může sloužit také jako prediktivní marker úspěšnosti anti-angiogenní terapie (67). První studie ukazují, že anti-VEGF protilátka snižuje počet CEC v periferní krvi (68) a že míra snížení hladiny CEC u pacientů s metastatickým karcinomem prsu po prvních třech týdnech anti-angiogenní léčby (bevacizumab a erlotinib) je významným prediktorem odpovědi na terapii (69).

Nicméně než bude možné využít míru zastoupení endoteliálních buněk v cirkulaci jako faktor monitorující úspěšnost anti-angiogenní terapie, popř. jako jeden z faktorů limitující přínos této terapie pro pacienta, je třeba vyvinout spolehlivou a reprodukovatelnou metodu pro detekci těchto buněk. Zastoupení CEC a CEP v periferní krvi je hodnoceno pomocí průtokové cytometrie, ale prozatím neexistuje žádná obecně používaná technika k jejich detekci.

ZÁVĚREM je možno shrnout: VEGF rodina růstových faktorů hraje důležitou roli ve fyziologické i patologické angiogenezi. Pro účely ovlivnění tohoto procesu je vyvíjeno několik skupin inhibitorů, z nichž některé, např. monoklonální protilátka bevacizumab (Avastin), jsou zaváděny do klinické praxe. Roli cirkulujícího VEGF i dalších potenciálních markerů pro monitorování této terapie, jako např. cirkulujících endoteliálních buněk, je třeba ověřit dalšími experimenty.

Práce byla podpořena VZ MZd č 00020980501-5.

Literatura.

1. Ferrara N.: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Nat Rev.Drug Discov. 2004, 3, 391-400.
2. Folkman J.: Fundamental concepts of angiogenic process. Curr. Mol. Med. 2003, 3, 643-651.
3. Hurwitz H.: Angiogenic strategies in advanced colorectal cancer. Cancer biology: Tumor angiogenesis and use of vascular endothelial growth factors. In: www.medscape.com/viewarticle/461038_42
4. Timar J., Dome B., Fazekas K., Janovics A., Paku S.: Angiogenesis-dependent disease and angiogenesis therapy. Pathol.Oncol.Res. 2004, 7, 85-95.
5. Papetti M., Herman I.M.: Mechanism of normal and tumor-derived angiogenesis. Am.J.Cell Physiol. 2002, 282, C947-C970.
6. Jain R.K.: Molecular regulation of vessel formation. Nature Medicine 2001, 6, 685-694.
7. Masopust J.: Patobiochemie buňky. UK Praha, 2003, 102-104.
8. Nicotia R.F.: What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? Am.J.Pathol.1998, 153, 11-16.
9. Veikkola T., Karkainen M., Claesson-Welsh L., Alitalo K.: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factors. Cancer Res. 2000, 60, 203-212
10. Charnock-Jones D.S.: Vascular endothelial growth factors (VEGFs), their receptors and their inhibitors. Celltransmission 2005, 21, 1-5.

11. Motl S.: Bevacizumab in combination chemotherapy for colorectal and other cancers. Am. J. Health-Syst.Pharm. 2005, 62, 1021-1031.
12. Fan F., Wey J.S., McCarty M.F., Belcheva A., Liu W., Bauer T.W., Somcio R.J., Wu J., Hooper A., Hicklin D.J., Ellis L.M.: Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cells. Oncogene 2005, 24, 2647-2653.
13. www.anti-vegf.com
14. Folkman J., Shing J.: Angiogenesis. J.Biol.Chem. 1992, 267, 10931-10934.
15. Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J.: Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. N.Engl.J.med. 1991, 324, 1-8.
16. Ellis L.M.: Understanding the mode of action of anti-angiogenic therapy. In: http://www.anti-vegf.com/portal/eipt/pb/avastin/Anti-VEGF/vegfre-source/library
17. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. New Engl.J.Med. 2004, 350, 2335-2342.
18. Gerber H.P., Ferrara N.: Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. Cancer Res. 2005, 65, 671-680.

19. Klenner P.: Proti nádorová chemoterapie pro 21. století. *Klin.onkol.* 2003, 16, 243-247.
20. Jain R.K.: Normalization of tumor vasculature.: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005, 307, 58-62.
21. Iqbal S., Lenz H.-J.: Angiogenesis inhibitors and treatment of colorectal cancer. *Semin. in Oncology* 2004, 31 (supl.17), 10-16.
22. Wiedmann M.W., Caca K.: Molecularly targeted therapy for gastrointestinal cancer. *Curr.Cancer Drug Targets* 2005, 5, 171-193.
23. Venook A.: Critical evaluation of current treatment in metastatic colorectal cancer. *The Oncologist*, 2005, 10, 250-261.
24. Kocáková I., Demlová R., Blažková S., Kocák I., Šefr R., Pacal M.: Bevacizumab v kombinaci s chemoterapií FOLFOX4 v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu. *Klin.onkol.*, 2006, 19, 30-32.
25. Ryska A., Hovorkova E., Skrabkova Z.: Angiogeneze v karcinomu prsu. *Imunohistochemická studie 142 případů.* *Česk.patol.* 2001, 37, 91-98.
26. Ranieri G., Coviello M., Chiriati A., Stea B., Montemurro S., Quaranta M., Dittadi R., Paradiso A.: Vascular endothelial growth factor assessment in different blood fractions of gastrointestinal cancer patients and healthy controls. *Oncology Rep.* 2004, 11, 435-439.
27. Salven P., Orpana A., Joensuu H.: Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin.Cancer Res.*, 1999, 5, 487-491.
28. Gunsilius E., Petzer A.L., Gastl G.: Correspondence re: P.Salven et al., Leukocytes and platelets of patients with cancer contain high levels of vascular endothelial growth factor. *Clin.Cancer Res.*, 1999, 5, 2978-2979.
29. Lee J.K., Hong Y.J., Han C.J.: Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients. Which is the optimal specimen? *Int.J.Oncol.* 2000, 17, 149-152.
30. George M.L., Eccles S.A., Tutton M.G.: Correlation of plasma and serum vascular endothelial growth factor levels with platelets count in colorectal cancer. Clinical evidence of platelet scavenging? *Clin.Cancer Res.*, 2000, 6, 3147-3152.
31. Kusumanto Z.H., Hospers G.A.P., Sluiter W.J., Dam W.A., Meier C., Mulder N.H.: Circulating vascular endothelial growth factor during the normal menstrual cycle. *Anticancer Res.*, 2004, 24, 4237-4242.
32. Hornbrey E., Gillespie P., Turner K., Han C., Roberts A., McGrouther D., Harris A.L.: A critical review of vascular endothelial growth factor (VEGF) analysis in peripheral blood: Is current literature meaningful? *Clin.Exp.Metastasis* 2002, 19, 654-663.
33. Maloney J.P., Silliman C.C., Ambruso D.R., Wang J., Tuder R.M., Voelkel N.F.: In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *Am.J.Physiol.* 1998, 44, H1054-H1061.
34. Banks R.E., Forbes M.A., Kinsey S.E., Stanley A., Ingham E., Walters C., Selby P.J.: Release of angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br.J.Cancer* 1998, 77, 956-964.
35. Caine G.J., Stonelake P.S., Lip G.Y.H., Kehoe S.T.: The hypercoagulable state of malignancy: Pathogenesis and current debate. *Neoplasia* 2002, 4, 465-473.
36. Adams J., Carder P.J., Downey S., Forbes M.A., MacLennan K., Allgar V., Kaufman S., Hallam S., Bicknell R., Walker J.J., Cairnduff F., Selby P., Perren T.J., Lansdown M., Banks R.E.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: Comparison of plasma, serum, and tissue VEGF and microvessel density and effect of tamoxifen. *Cancer Res.*, 2000, 60, 2898-2905.
37. Ranieri G., Coviello M., Patruno R., Valerio P., Martino D., Milella P., Catalano V., Scotto F., De Ceglie A., Quaranta M., Ribatti D., Pecchia A.: Vascular endothelial growth factor concentrations in the plasma-activated platelets rich (P-APR) of healthy control and colorectal cancer. *Oncology Rep.* 2004, 12, 817-820.
38. <http://www.anti-vegf.com/portal/eipf/pb/avastin/Anti-VEGF/vegfcancerprognosis>
39. Minagawa N., Nakayama Y., Hirata K., Onitsuka K., Inoue Y., Nagata N., Itoh H.: Correlation of plasma level and immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in patients with advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2002, 22, 2957-2963.
40. Cascinu S., Staccioli M.P., Gasparini G., Giordani P., Catalano V., Ghiselli R., Rossi C., Baldelli A.M., Graziano F., Saba V., Muretto P., Catalano G.: Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2000, 6, 2803-2807.
41. Boxer G.M., Tsiompanou E., Levine T., Watson R., Begent R.H.: Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and microvessel counting as prognostic indicators in node-negative colorectal cancer. *Tumour Biol.* 2005, 26, 1-8.
42. Meo S., Dittadi R., Pelosos L., Gion M.: The prognostic value of vascular endothelial growth factor, urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in node negative breast cancer. *Int.J.Biol.Markers* 2004, 19, 282-288.
43. Pikner R., Ludvikova M., Ryska A., Kholova I., Holubec L. Jr., Topolcan O., Pecen L., Finek J.: TPS, Thymidine kinase, VEGF and endostatin in cytosol of thyroid samples. *Anticancer Res.* 2005, 25, 1517-1521.
44. Gunsilius E., Tschmelitsch J., Eberwein M., Schwebelberger H., Spizzo G., Kahler C.M., Stockhammer G., Lang A., Petzer A.L., Gastl G.: In vivo release of vascular endothelial growth factor from colorectal carcinomas. *Oncology* 2002, 62, 313-317.
45. Konecny G.E., Meng Y.G., Untch M., Wang H.-J., Bauerfind I., Epstein M., Stieber P., Vernes J.-M., Gutierrez J., Hong K., Beryt M., Hepp H., Slamon D.J., Pegram M.D.: Association between HER-2/neu and vascular endothelial growth factor expression predicts clinical outcome in primary breast cancer patients. *Clin.Cancer Res.*, 2004, 10, 1706-1716.
46. Pegram M.D., Reese D.M.: Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/neu protein and vascular endothelial growth factor. *Seminars in Oncol.* 2002, 29, 29-37.
47. Werther K., Christensen H., Nielsen H., and Danish RANX05 Colorectal Cancer Study Group: Prognostic impact of matched preoperative plasma and serum VEGF in patients with colorectal cancer. *Br.J.Cancer* 2002, 86, 417-432.
48. Celen O., Kahraman I., Yildirim E., Berberoglu U.: Correlation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and CEA with clinicopathological variables in colorectal cancer patients. *Neoplasma* 2004, 51, 293-299.
49. DeVita F., Orditura M., Lieto E., Infusino S., Morgillo F., Martinielli E., Castellano P., Romano C., Ciardiello F., Catalano G., Pignatelli P., Galizia G.: Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer*, 2004, 100, 270-278.
50. Granato A.M., Nanni O., Falcini F., Folli S., Mosconi G., DePaola F., Medri L., Amadori D., Volpi A.: Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients and healthy women: useful as diagnostic tools? *Breast Cancer*, 2004, 6, R38-R45.
51. Labropoulos S.V., Fountzilas G., Papadopoulos S., Karina M., Xylouri M., Doudoulakakis A., Chalkidou S., Razis E.D.: Study of serum EGFR, HER-2/neu, VEGF in metastatic breast cancer treated with taxanes. *J.Clin.Oncol.*, 2004, 22, 757-762.
52. Hagesawa Y., Takanashi S., Okudera K., Kumagi M., Hayashi A., Morimoto T., Okumura K.: Vascular endothelial growth factor level as a prognostic determinant of small cell lung cancer in Japanese patients. *Int.Med.* 2005, 44, 26-34.
53. Matsuyama V., Hashiguchi T., Mizoguchi A., Iwami F., Kawabata M., Arimura K., Osame M.: Serum level of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer. *Chest* 2000, 118, 948-951.
54. Shimanuki Y., Takahashi K., Cui R., Hori S., Takahashi F., Miyamoto H., Fukuchi Y.: Role of serum vascular endothelial growth factor in the prediction of angiogenesis and prognosis for non-small cell lung cancer. *Lung* 2005, 183, 29-42.
55. Mitsuhashi A., Suzuka K., Yamazawa K., Matsui H., Katsuyoshi S., Sekiya S.: Serum vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C levels as tumor markers in patients with cervical carcinoma. *Cancer* 2005, 103, 724-730.
56. Ascierto P.A., Leonardi E., Ottaviano A., Napolitano M., Scala S., Castello G.: Prognostic value of serum VEGF in melanoma patients: A pilot study. *Anticancer Res.* 2004, 24, 4255-4258.
57. Jacobsen J., Rasmussen T., Grankvist K., Ljunberg B.: Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J.Urol.* 2000, 163, 347-347.
58. El-Housseini M.E., Abdel-Fatah-Abdel-Azim S., El-Desouky G.I., Abdel-Hady S., El-Hamad M.F., Kamel A.M.: Clinical significance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in sera of patients with pediatric malignancies. *J. Eg.Nat.Cancer Inst.*, 2004, 16, 57-61.
59. Smolej L., Andrys C., Maisnar V., Pour L., Maly J.: Plasma concentrations of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in lymphoproliferative disorders. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005, 48, 57-58.
60. Smolej L., Andrys C., Žák P., Belada D., Široký O., Hrudková M., Novosyad L., Krejssek J., Malý J.: Angiogenní cytokiny u chronické B-lymfocytární leukémie: Souvislost s moderními prognostickými faktory. 2.konference Spol.rad. onkol., biol. a fyziky. Hradec Králové 3.-4.3.2006, 249-250.
61. Schneider M., Tjwa M., Carmeliet M.: A surrogate marker to monitor angiogenesis at last. *Cancer Cell* 2005, 7, 3-4.
62. Chang Y. S., di Tomaso E., Mc Donald D. m., Jones R., Jain R. K. Munn L.L.: Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 14608-14613.
63. Lyden D., Hattori K., Dias S., Costa C., Blaikie P., Butros L., Chaturban A., Heissig B., Marks W., Witte L., Wu Y., Hicklin D., Zhu Z., Hackett N.R., Crystal R. g., Moore M.A., Hajjar K.A., Manova K., Benezra R., Rafii S.: Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 2001, 7, 1194-1201.
64. Rafii S., Heissig B., Hattori K.: Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther.* 2002, 9, 631-641.
65. Beerepoot L.V., Mehra N., Vermaat J.S., Zonnenberg B.A., Gebbink M.F., Voest E.E.: Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann. Oncol.* 2004, 15, 139-145.
66. Mancuso P., Burlini A., Pruneri G., Goldhirsch A., Martinelli G., Bertolini F.: Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001, 97, 3658-3661.
67. Mancuso P., Calleri A., Cassi C., Gobbi A., Capillo M., Pruneri G., Martinelli G., Bertolini F.: Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003, 552, 83-97.
68. Willett C. G., Boucher Y., Di Tomaso E., Duda D.G., Munn L.L., Tong R.T., Chung D.C., Sahani D.V., Kalva S.P., Kozin S.V., Mino M., Cohen K.S., Scadden D.T., Hartford A.C., Fischman A.J., Clark J.W., Ryan D.P., Zhu A.X., Blaszkowsky L.S., Chen H.X., Shellito P.C., Lauwers G.Y., Jain R.K.: Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antitumor effects in human rectal cancer. *Nat. Med.* 2004, 10, 145-147.
69. Rugo H. S., Dickler M. N., Moore D. H., Melisko M., Yeh B. M., Caravelli J., Brogi E., Hudis C., Park J. W.: Change in Circulating endothelial cells (CEC) and tumor cells (CTC) in patients (pts) receiving bevacizumab and erlotinib for metastatic breast cancer (MBC) predicts stable disease at first evaluation. 2005 ASCO Annual Meeting abstract No. 525. www.asco.org/ac/1,1003,12-002629,00asp.

Došlo: 28. 2. 2006
Přijato: 10. 4. 2006

MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ NEUROTOXICITY CHEMOTERAPIE GABAPENTINEM

POSSIBILITIES OF TREATMENT OF NEUROTOXICITY INDUCED BY CYTOTOXIC THERAPY WITH GABAPENTIN

BRYCHTA M.¹, DVOŘÁK J.², NEUMANOVÁ R.³

¹ RADIOTERAPEUTICKÁ A ONKOLOGICKÁ KLINIKA 3.LF UK A FNKV PRAHA,

² KLINIKA ONKOLOGIE A RADIOTERAPIE FN HRADEC KRÁLOVÉ

³ ODDĚLENÍ RADIAČNÍ ONKOLOGIE, FN BRNO PRM,

Souhrn

Neurotoxická cytostatická chemoterapie může negativně ovlivnit průběh léčby a snížit její celkovou efektivitu. Možnosti ovlivnění neurotoxicity jsou minimální. Ve svém klinickém sledování popisují autoři výsledky ovlivnění neurotoxických projevů preparátem gabapentin (Neurontin®). Gabapentin významně snížil intenzitu a frekvenci neurotoxických projevů chemoterapie. Léčba byla dobře tolerována s minimem nežádoucích vedlejších účinků a vedla ke zlepšení kvality života nemocných. Tuto léčbu lze doporučit jako možnost snížení nežádoucích neurotoxických projevů chemoterapie.

Klíčová slova: bolest, neurotoxická, chemoterapie, gabapentin, kvalita života

Summary

Neurotoxicity induced by cytotoxic therapy can negatively influence the course of treatment and reduce the treatment efficacy. Possibilities to influence such neurotoxicity are limited. In this clinical observation the authors describe the results of treatment of neurotoxicity induced by cytotoxic therapy with gabapentin (Neurontin®). Gabapentin reduced intensity and frequency of neurotoxicity induced by cytotoxic therapy. The treatment was well tolerated with minimum adverse effects and contributed to better quality of life of the patients. This treatment can be recommended as a possibility in reduction of neurotoxicity induced by cytotoxic therapy.

Key words: pain, neurotoxicity, chemotherapy, gabapentin, quality of life

Úvod

Bolest je častým doprovodným projevem zhoubných nádorových onemocnění. Přes výrazné pokroky paliativní medicíny - včetně léčby bolesti - je bolest stále velice obávaným symptomem, který je s existencí onkologického onemocnění spojován.

Jedním z typů bolestí, dle patofyziologického členění, je i neuropatická bolest. Podobně jako ostatní typy bolestí i tato se vyskytuje většinou v důsledku projevů vlastního nádorového onemocnění. Nutno ale přiznat, že až v 25 procentech případů se bolest u nádorových onemocnění vyskytuje pod vlivem diagnostických a zejména terapeutických postupů.

Jedním z klasických příkladů je neuropatická bolest v důsledku aplikované cytostatické chemoterapie [1-3].

Neuropatická bolest vzniká při poškození periferních či centrálních částí nervového systému.

Projevu se klidovými, palčivými, pálivými, bodavými, vystřelujícími nebo trvalými bolestmi. Někdy se jedná o nesnesitelné brnění, mravenčení až krouživé křeče. Jindy má formu krutých šlehavých bolestí. Méně často se jedná o bolest tupou. Tyto potíže velmi často negativně narušují jakékoli fyzické či psychické aktivity pacienta a kromě toho

ruší i spánek. Výsledkem jsou utrápení, unavení a depresivní pacienti, kteří přestávají spolupracovat a někdy i odmítají další terapii.

Řada cytostatik vyvolává různě intenzivní neuropatické projevy. Jedná se zejména o léky ze skupiny platinových derivátů (cis platina a oxaliplatin) [4,5] a ze skupiny taxanů (docetaxel a zejména paklitaxel) [6]. Tyto potíže mohou být v některých případech tak intenzivní, že mohou vést ke snížení dávek chemoterapie, k jejímu odložení, předčasnému ukončení nebo záměně za jiný, většinou méně efektivní režim. V každém případě vedou tyto nežádoucí projevy léčby ke zhoršení komfortu pacientů a snížení kvality jejich života.

Protože tato cytostatika již dávno nepatří jenom do linií paliativní chemoterapie a stále častěji se objevují v kombinacích adjuvantní - tedy potenciálně kurativní chemoterapie, hraje v takovýchto případech dávková intenzita, dodržení intervalů podání a bezpečnost léčby zásadní roli.

Pomineme-li redukcí dávky a frekvence podávání léčby a velmi nejistou efektivitu podávání vitaminů skupiny B, nemá onkolog k ovlivnění těchto projevů žádné účinné prostředky.

Jednou z možností, jak redukovat intenzitu neuropatické bolesti vzniklé po chemoterapii, je nasazení gabapentinu. [7,8]. Cílem klinického sledování bylo posouzení a zhodnocení této možnosti.

Materiál a metoda

Cílem klinického sledování bylo vyhodnocení efektivity gabapentinu a jeho vliv na nežádoucí neurotoxické projevy cytostatické chemoterapie.

Do klinického vyhodnocení efektivity gabapentinu na ovlivnění nežádoucích neurotoxických projevů cytostatické chemoterapie byli zařazeni pacienti z Radioterapeutické a onkologické kliniky FNKV Praha, Kliniky onkologie a radioterapie FN Hradec Králové a Oddělení radiační onkologie, FN Brno- Obilní trh. Jednalo se o pacienty, kteří byli léčeni chemoterapií a kteří v důsledku provedené, nebo prováděné cytostatické léčby měli, v době zařazení do klinického sledování, vyznačené neurotoxické projevy.

Věkové rozložení pacientů v souboru ukazuje tabulka číslo 1. Dle charakteristiky bolesti převažovala bolest vystřelující, šlehavá (68%), méně často se jednalo o bolest tupou, svíravou (20%), ve 12% nebyla charakteristika bolesti specifikována. V hodnoceném souboru padesáti pacientů převažoval karcinom prsu (68%) a karcinomy kolorekta (26%). U 62% pacientů byly léčeny neurotoxické projevy při současně probíhající chemoterapii, u 38% pacientů bylo snahou zmírnit nežádoucí neurologické projevy po skončené cytostatické léčbě.

Chemoterapie byla podávána v adjuvanci u 38% pacientů, s paliativním záměrem - u pacientů s lokální recidivou či diseminací - ji absolvovalo 58% pacientů.

Tabulka č. 1.: věk pacientů ve sledovaném souboru

Věk pacientů	Procentuální zastoupení
31-40	8
41-50	16
51-60	44
61-70	18
71-80	10
neuvedeno	4

Pacienti byli léčeni gabapentinem (NeurontinR) v základní dávce 900 mg denně ve třech denních dávkách. První týden léčby byla dávka postupně zvyšována. Algoritmus zvyšování dávky byl: 300mg první tři dny, 600mg další tři dny a poté plná dávka 900mg. Při menší efektivitě bylo možno denní dávku zvýšit. Dávkování gabapentinu v celém souboru ukazuje obrázek číslo 5. Celková plánovaná doba léčebného sledování byla tři měsíce. Po uplynutí této doby pokračovala léčba gabapentinem dle klinického průběhu nemoci, obtíží pacienta, zhodnocení efektu terapie neurologem a ošetřujícím onkologem a též v závislosti na přání pacienta. Nejvyšší denní dávka ve sledovaném souboru pacientů byla 1.500 mg gabapentinu. Při neefektivitě léčby nebo při výskytu nežádoucích vedlejších účinků byla léčba ukončena.

Hodnocení efektivity léčby bylo prováděno dle kritérií neurotoxicity WHO ošetřujícím lékařem (klinické a neurologické vyšetření při zahájení léčby gabapentinem po jednom a po třech měsících léčby) a pacientem (formou dotazníku pro pacienty, ve kterém zodpovídali pacienti sedm stejných otázek vždy v době zahájení léčby, po 1. a 2. týdnů léčby a po 1. a 3. měsíci od zahájení léčby gabapentinem). Hodnocení kritérií neurotoxicity WHO a detailní pohled na protokol pro lékaře ukazuje tabulka číslo 2, část dotazníku pro pacienty (v době zahájení terapie) ukazuje tabulka číslo 3.

Statistické zpracování výsledků provedl Ad- hoc divize Cege-dim

Tabulka č. 2.: dotazník - část pro lékaře

GABAPENTIN – KLINICKÉ SLEDOVÁNÍ
(část pro lékaře)

Jméno lékaře : Pracoviště :

Iniciály pacienta : Datum narození : Identifikace pacienta (dle pracoviště):

Diagnóza: Histologie : Stádium onemocnění :

Předchozí onkologická léčba : operace ☐ radioterapie ☐ chemoterapie ☐ jiná ☐

Současný stav onemocnění : bez známek aktivity onemocnění ☐
lokální recidiva ☐ diseminace ☐ skelet ☐ plíce ☐ játra ☐ CNS ☐ ostatní ☐

Současná léčba : žádná ☐ chemoterapie ☐ radioterapie ☐ hormonoterapie ☐
farmakoterapie bolesti ☐ adjuvantia ☐ neopioidy ☐ slabé opioidy ☐ silné opioidy ☐

Aktuální farmakoterapie
bolesti

LÉK	Dávka při zahájení terapie GBP	Dávka po 1 měsíci terapie GBP	Dávka po 3 měsících terapie GBP

Hodnocení kritérií toxicity onkologické léčby dle WHO

Zahájení
terapie GBP

po 1 měsíci
terapie

po 3 měsících
terapie

Periferní nervový systém

Stupeň 0: normální ☐ ☐ ☐

Stupeň 1: parestesie a/nebo snížené šlachové reflexy ☐ ☐ ☐

Stupeň 2: těžké parestesie a/nebo mírná slabost ☐ ☐ ☐

Stupeň 3: nesnesitelné parestesie a/nebo výrazná slabost ☐ ☐ ☐

Stupeň 4: paralýza ☐ ☐ ☐

Hodnocení INTENZITY neuropatických symptomů

Vizuální Analogová Škála – ráno, poledne, večer

Hodnocení FREKVENCE neuropatických symptomů

0 – téměř nikdy, 1-občas (hlavně v noci), 2- občas (hlavně ve dne), 3-často (ve dne i v noci), 4 – trvale

Tabulka č. 3.: dotazník - část pro pacienty (v době zahájení léčby gabapentinem, otázky v dalších časových intervalech byly identické, strana 2=doplňková otázka v průběhu sledovaného období léčby gabapentinem týden 1 a 2, měsíce 1 a 3)

Možnosti ovlivnění neurotoxicity chemoterapie gabapentinem

Tabulka č.3

GABAPENTIN – KLINICKÉ SLEDOVÁNÍ
(část pro pacienty)

Iniciály pacienta : Identifikace pacienta(dle pracoviště) :

Hodnocení při zahájení léčby gabapentinem :

1. vyberte na stupnici hodnotu nejlépe odpovídající intenzitě bolesti a označte ji svislou čarou.
(1- žádná bolest – 10 nesnesitelná bolest). Hodnotěte prosím ráno, v poledne a večer

ráno

poledne

večer

0

10

2. Jak často máte bolesti ? (vyznačte vybranou možnost)
Téměř nikdy☐ občas-hlavně v noci☐ občas-hlavně ve dne☐ často-ve dne i v noci☐ trvale☐

3. Jaký charakter má Vaše bolest ? (vyznačte vybranou možnost)
tupá,svíravá ☐ vystřelující,šlehavá ☐

4. Jak silně vnímáte brnění nebo mravenčení ? (vyberte na stupnici hodnotu nejlépe odpovídající intenzitě
brnění či mravenčení a označte ji svislou čarou. 1- Žádné brnění, mravenčení – 10 nesnesitelné brnění,
mravenčení)

0

10

5. Jak je citlivá Vaše pokožka na chlad ? (vyberte na stupnici hodnotu nejlépe odpovídající intenzitě
nepříjemného vnímání chladu a označte ji svislou čarou. 1- Žádné vnímání chladu – 10 nesnesitelné
vnímání chladu)

0

10

6. Jak často Vás bolest budí ze spánku ? (vyberte na stupnici hodnotu nejlépe odpovídající intenzitě
vedoucí k probuzení a označte ji svislou čarou. 1 - téměř nikdy – 10 nesnesitelné často)

0

10

7. Jak ovlivnila bolest kvalitu Vašeho života ? (vyberte na stupnici hodnotu nejlépe odpovídající míře
ovlivnění kvality Vašeho života a označte ji svislou čarou. 1 - téměř neovlivnila – 10 nesnesitelné
ovlivnila)

0

10

Nežádoucí účinky v průběhu terapie:

Uveďte prosím, případné nežádoucí účinky, které se objevily v průběhu terapie Neurontinem

.....

Hodnocení léčby pacientem

	Výrazně zlepšen	Částečně zlepšen	Nezlepšen	Zhoršen
Po 1 týdnu				
Po 2 týdnech				
Po 4 týdnech				
Po 3 měsících				

Léčba GABAPENTINEM

Datum zahájení:

Denní dávka (mg/den)	Po 1 týdnu terapie	
	Po 2 týdnech terapie	
	Po 4 týdnech terapie	
	Po 3 měsících terapie	
	Po 6 měsících terapie	

**BOLEST – intenzita (VAS) frekvence
BRNĚNÍ, MRAVENČENÍ**

Bolest, brnění, mravenčení	Intenzita R	P	V	Frekvence
Po 1 týdnu				
Po 2 týdnech				
Po 4 týdnech				
Po 3 měsících				
Po 6 měsících				

Nežádoucí účinky v průběhu léčby

	Typ nežádoucího účinku	Důvod k přerušení terapie GBP
Po 1 týdnu		Ano Ne
Po 2 týdnech		Ano Ne
Po 4 týdnech		Ano Ne
Po 3 měsících		Ano Ne
Po 6 měsících		Ano Ne

Hodnocení léčby pacientem

	Výrazně zlepšen	Částečně zlepšen	Nezlepšen	Zhoršen
Po 1 týdnu				
Po 2 týdnech				
Po 4 týdnech				
Po 3 měsících				
Po 6 měsících				

Vztah pacienta k léčbě gabapentinem na konci sledování:

Chce pokračovat v léčbě: Neví Nemá chuť pokračovat v léčbě

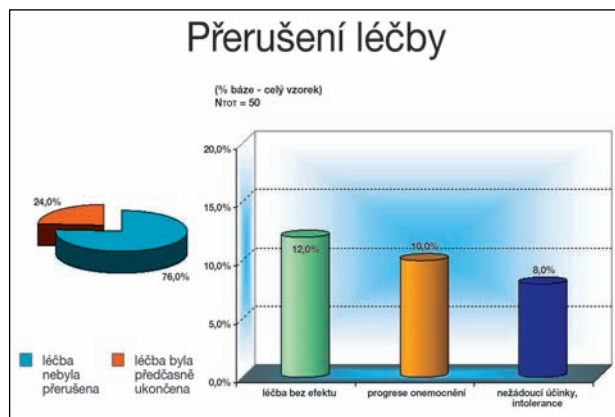
Léčba přerušena v průběhu sledování v týdnu

Důvod přerušení léčby:

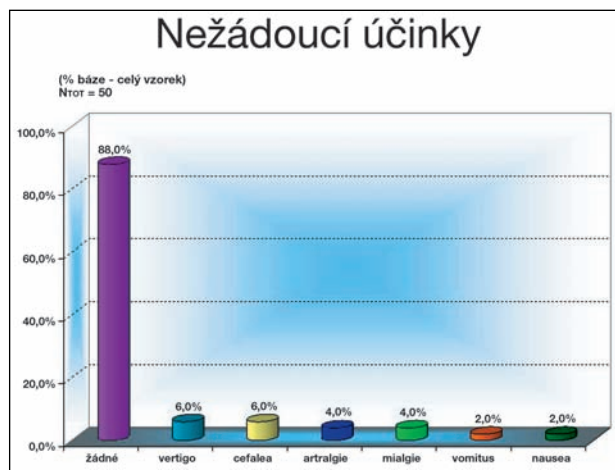
Datum ukončení protokolu: **Jméno a podpis lékaře:**

Tabulka č. 2
Bayerlin, Dvořák, Neumannová
Možnosti ovlivnění neurotoxicity chemoterapie gabapentinem

Obr. č. 2.: přerušení léčby gabapentinem a důvody přerušení



Obr. č. 3.: výskyt nežádoucích účinků

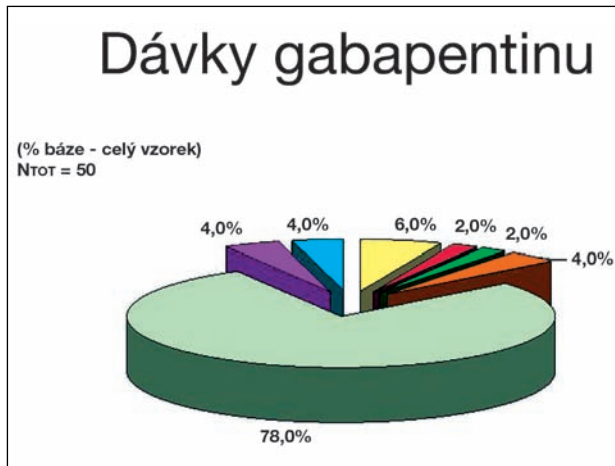


Výsledky

Léčba gabapentinem prokázala dobrou efektivitu při přijatelné toleranci léčby.

Terapie byla předčasně ukončena u 24 % pacientů. V několika případech byla léčba přerušena z více příčin.

Obr. č. 1.: dávkování gabapentinu v souboru

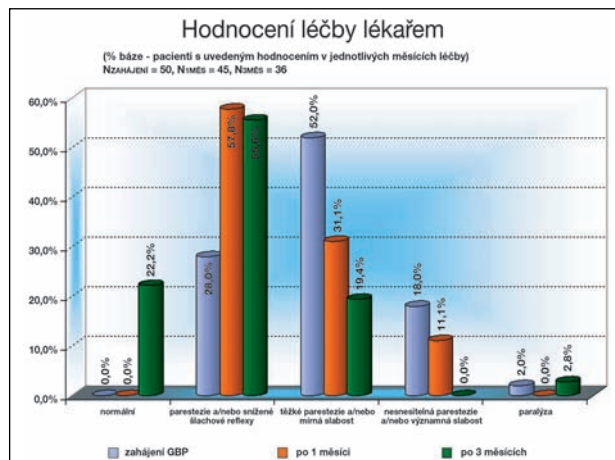


Z celkového počtu padesáti pacientů byla léčba ve 12% případech ukončena předčasně z důvodu progrese onemocnění, zhoršení celkového stavu pacienta, případně exitus. Pouze u 8% (4 pacienti) byla léčba ukončena pro intoleranci a u 10% (5 pacientů) pro malou efektivitu terapie. Přerušení léčby a důvody k tomuto přerušení ukazuje obrázek číslo 2.

Nežádoucí účinky byly zaznamenány u celkem 12% pacientů, převažovalo vertigo v 6% a cefalea v 6%, dále nausea ve 2% a zvracení ve 2%. Výskyt myalgie ve 4% a artralgie ve 4% případů spíše souvisel s probíhající chemoterapií - tyto potíže navíc nejsou známými vedlejšími účinky gabapentinu. V několika případech se u jednoho pacienta vyskytlo několik nežádoucích účinků. Výskyt nežádoucích účinků ukazuje obrázek číslo 3.

Hodnocením kritérií neurotoxicity dle WHO došlo k posunu neurotoxických projevů od nálezů vyššího stupně postižení k nižším stupňům. Tento posun zprava doleva - se zvyšující se četností nižších stupňů toxicity dle WHO - ukazuje obrázek číslo 4.

Obr. č. 4.: hodnocení periferního nervového systému - hodnocení lékařem



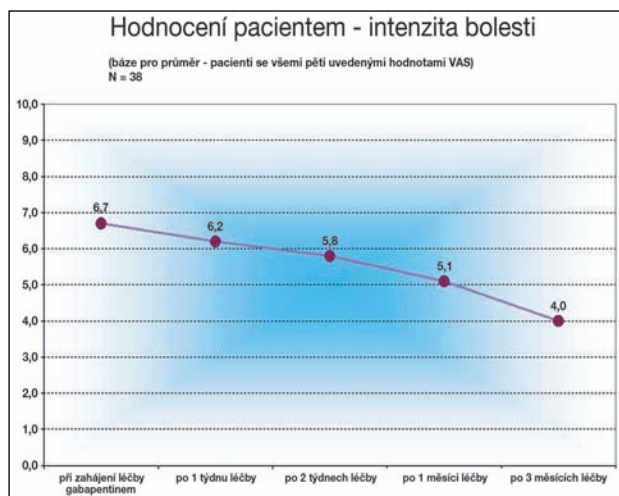
Při hodnocení intenzity bolesti (VAS - vizuální analogová škála dle dotazníku pacienta) došlo po třech měsících k poklesu VAS z 6,7 na 4,0 (obrázek číslo 5).

Při hodnocení intenzity parestezií (VAS - vizuální analogová škála dle dotazníku pacienta) došlo po třech měsících k poklesu VAS ze 7,2 na 4,1 (obrázek číslo 6).

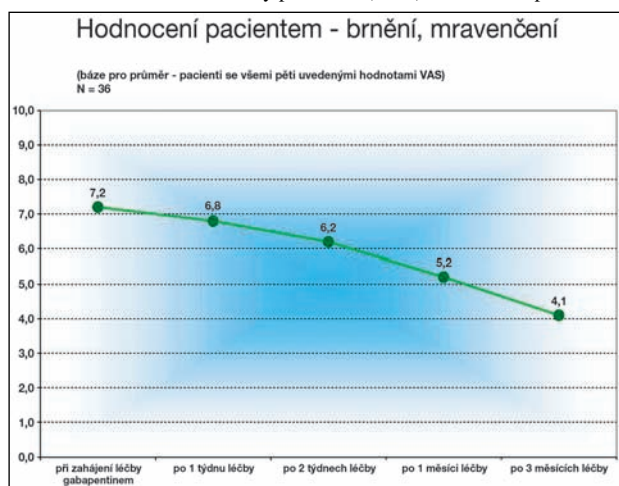
Při hodnocení citlivosti pokožky na chlad došlo po třech měsících k poklesu VAS (VAS dle dotazníku) z 3,7 na 2,5 (obrázek číslo 7).

Při hodnocení narušení spánku došlo po třech měsících k poklesu VAS (VAS dle dotazníku) z 4,8 na 2,7 (obrázek číslo 8). Při hodnocení celkové kvality života došlo ke zlepšení hodnocení. Dle VAS dotazníku došlo po třech měsících k poklesu z 6,8 na 4,1 (obrázek číslo 9).

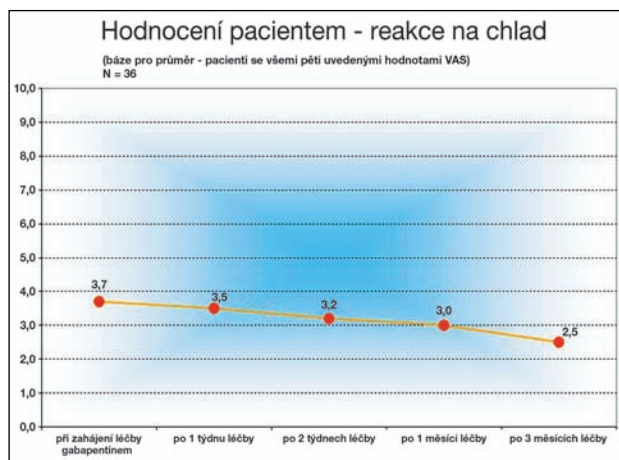
Obr. č. 5.: hodnocení intenzity bolesti (VAS) - hodnocení pacientem



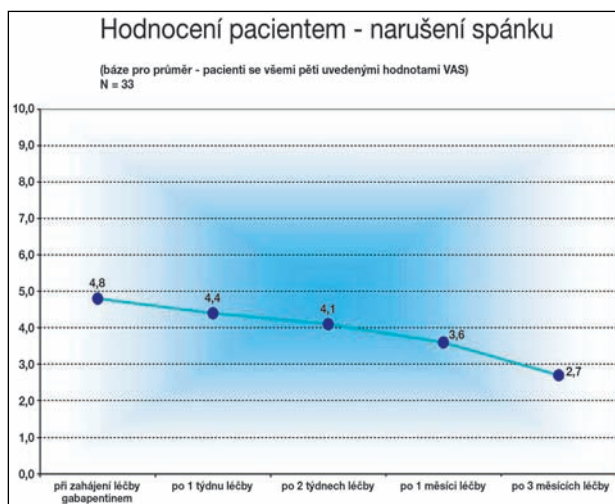
Obr. č. 6.: hodnocení intenzity parestezií (VAS) - hodnocení pacientem



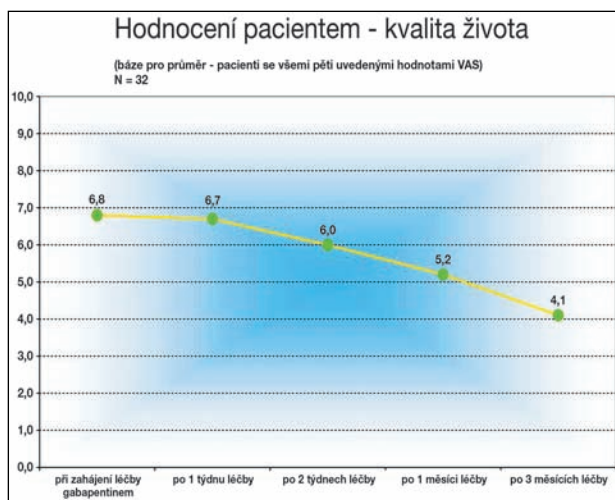
Obr. č. 7.: hodnocení intenzity vnímavosti na chlad (VAS) - hodnocení pacientem



Obr.č. 8.: hodnocení narušení spánku (VAS) - hodnocení pacientem



Obr. č. 9.: hodnocení celkové kvality života (VAS) - hodnocení pacientem



Diskuze a závěr

V každodenní běžné praxi se stále častěji setkáváme s užíváním cytostatik, která jsou schopna vést k projevům periferní neurotoxicity. Častou indikací jsou zejména karcinomy prsu, kolorektální karcinomy, ale též karcinomy ovaria, ORL oblastí, bronchogenní karcinomy aj.

Vzhledem k tomu, že se tato cytostatika stále častěji používají v léčbě časných stadií onkologických diagnóz, vzrůstá i význam dodržování dávkové density a časové intenzity chemoterapeutických režimů při současné snaze o bezpečnou aplikaci s minimalizací nežádoucích účinků.

Nehematologické neurotoxické vedlejší nežádoucí účinky chemoterapie mohou narušit dodržení celkového plánu chemoterapie. Gabapentin vede ve velkém procentu případů ke snížení těchto vedlejších nežádoucích projevů chemoterapie a tudíž zvyšuje pravděpodobnost provedení léčby dle plánu. Zmírnění neuropatické bolesti pak bezesporu velice výrazně zlepšuje kvalitu života pacientů a usnadňuje průběh celé léčby. [9,10].

Léčba gabapentinem (NeurontinR) je bezpečná a efektivní léčba neurotoxických projevů cytostatické chemoterapie u onkologických malignit.

Literatura:

1. Klener P. Nežádoucí účinky chemoterapie. s.262-278. V: Klener P. Klinická onkologie, Praha, Galén 2002. 686 s.
2. Klener P., Penka M., Dufek V., Vyzula R., Elbl L., Skříčková J., Tesař V. Nežádoucí účinky chemoterapie. s.119- 147. V: Klener P., Vorlíček J., et al. Podpůrná léčba v onkologii. Galén 1998. 231 s.
3. Kadaňka Z. Nervové komplikace extracerebrálních a extramedulárních maligních nádorů. 277-296 s. V: Vorlíček J., Adam Z. a kol.Građa Publishing 1998. Paliativní medicína. 480 s.
4. Cersosimo RJ. Oxaliplatin-associated neuropathy: a review. Ann Pharmacother. 2005; 39(1): 128-35.
5. Grothey A. Clinical management of oxaliplatin-associated neurotoxicity. Clin Colorectal Cancer. 2005; 5 Suppl 1: S38- 46.
6. Nguyen VH., Lawrence HJ. Use of gabapentin in the prevention of taxane-induced arthralgias and myalgias. J Clin Oncol. 2004; 22(9):1767-9.
7. Bosnjak S., Jelic S., Susnjak S., Luki V. Gabapentin for relief of neuropathic pain related to anticancer treatment: a preliminary study. J Chemother. 2002; 14(2): 214-9.
8. Chandler A., Williams JE. Gabapentin, an adjuvant treatment for neuropathic pain in a cancer hospital. J Pain Symptom Manage. 2000; 20(2): 82-6.
9. Caraceni A., Zecca E., Bonezzi C. et al.: Gabapentin for neuropathic cancer pain: a randomized controlled trial from the Gabapentin Cancer Pain Study Group. J Clin Oncol. 2004; 22(14): 2909-17.
10. Bennett MI. Gabapentin significantly improves analgesia in people receiving opioids for neuropathic cancer pain. Cancer Treat Rev. 2005; 31(1): 58-62.

Došlo: 7. 1. 2006
Přijato: 27. 3. 2006

informace - knihy

EARLY BREAST CANCER - FROM SCREENING TO MULTIDISCIPLINARY MANAGEMENT, SECOND EDITION QUERCI DELLA ROVERE, G., WARREN, R., BENSON, J. R. (EDS.)

London - New York, Taylor and Francis 2006
492 str., 377 obr., 63 tab., cena 195,- GBP,
ISBN 1-84184-384- 9

Kniha sestává ze 42 kapitol rozdělených do následujících sekcí: hodnocení rizika a prevence zhoubných nádorů prsu, screening, zobrazování, metody odebrání tkáně pro diagnostiku, multidisciplinární management, informovaný souhlas a soudní spory. Editoři knihy jsou z ústavů v Londýně a Cambridge, na obsahu knihy spolupracovalo 60 odborníků převážně z Velké Británie.

V první sekci jsou kapitoly s tematikou screeningu, mamografie, genetikou a endokrinní prevencí. Roční výskyt rakoviny prsu v Anglii a Walesu je u 40 tisíc žen, při čemž jich 13 tisíc zemře na toto onemocnění. Genetika rakoviny se v posledním desetiletí stala novým oborem, kategorizace žen do skupin s vysokým, středním a průměrným (nizkým) rizikem umožnila genetické testování těch nemocných, u kterých by to mohlo přinést prospěch. Referuje se o čtyřech preventivních trialech s tamoxifenem u zdravých žen se zvýšeným rizikem rakoviny prsu. Dosavadní výsledky ukazují, že v budoucnu bude možná účinná prevence u skupin žen s pokud možno přesně definovaným vysokým rizikem.

Druhá sekce obsahuje kapitoly věnované biologickému základu screeningu, mamografickému screeningu žen ve věku do 50 let, kritickému posouzení screeningu žen nad 50 let, organizaci a zajištění kvality. Tvrdí se, že je neetické provádět screening u žen pod 50 let bez získání v prvním kroku jejich informovaného souhlasu; toto má být podkladem pro diskuzi, zda

vyšetřovat nebo nikoliv ženy této věkové kategorie. Pokud se týká žen nad 50 let, experti souhlasí, že screening má být prioritou, problémem je však poměr nákladů a efektivity. Poznamenává se, že odhadnuté náklady na screening vztažené na rok zachovaného života jsou dvakrát vyšší ve Španělsku než v Holandsku nebo Velké Británii.

V sekci o zobrazování se diskutuje s názorem některých kliniků, že snímek prsu by měl umožnit klasifikovat ženy podle jejich relativního rizika vývoje zhoubného nádoru, buď s použitím třídění podle vzhledu mamografického snímku nebo jednoduše identifikací přítomnosti dysplazie nebo fibrocystické změny, o níž se často předpokládá, že je konsistentní s hutnou tkání prsu. Dokládá se, že zobrazení prsu nedovoluje v současné praxi žádnou přesnou a konzistentní předpověď rakoviny prsu a nemělo by být uváděno jako omluva zdůvodňování nadměrné frekvence kontrol vybraných pacientů. V této sekci jsou též kapitoly o mikrokalcifikacích, ultrazvuku aj., v jedné kapitole je pojednáno o digitální mamografii, MRI, PET aj.

Temata některých zajímavých kapitol z dalších sekcí: aspirační cytologie tenkou jehlou, preoperativní lokalizace nehmavných abnormalit prsu, normální prs a benigní léze, invazivní karcinom prsu, molekulární vyšetřování nemocí prsu, duktální karcinom in situ, chirurgické zásahy, úloha intraoperativní radioterapie v konzervativní léčbě časného stadia rakoviny prsu, systémová adjuvantní terapie aj.

Toto obdivuhodné dílo představuje zevrubný a aktuální popis problematiky umožňující čtenáři porozumět zhoubnému onemocnění prsu z hlediska epidemiologie, genetiky a screeningu, patologie, diagnostiky, léčby a prevence. Text je doprovázen mnoha snímky, z nichž je asi třetina barevných, přehlednými tabulkami odlišenými barevně od textu, závěry a bohatou literaturou za každou kapitolou a podrobným rejstříkem. Informace pro objednání díla lze nalézt na internetové adrese.

V. H.

CHRONICKÁ TOXICITA TROJROZMĚRNÉ KONFORMNÍ RADIOTERAPIE (3D-CRT) KARCINOMU PROSTATY

CHRONIC TOXICITY OF THE THREE-DIMENSIONAL CONFORMAL RADIOTHERAPY (3D-CRT) FOR PROSTATE CANCER

ODRÁŽKA K.¹, VACULÍKOVÁ M.¹, DOLEŽEL M.¹, ZOUHAR M.¹, PETERA J.¹, MORÁVEK P.², VOŠMIK M.¹, ZOUL Z.¹, BROŽÁK M.², ŠIMÁKOVÁ E.³

¹ KLINIKA ONKOLOGIE A RADIOTERAPIE LFUK A FN HRADEC KRÁLOVÉ

² UROLOGICKÁ KLINIKA LFUK A FN HRADEC KRÁLOVÉ

³ FINGERLANDŮV ÚSTAV PATOLOGIE LFUK A FN HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn

Východiska: Trojrozměrná konformní radioterapie (3D-CRT) je účinnou léčebnou metodou lokalizovaného karcinomu prostaty. Eskalace dávky záření je provázena přijatelnou chronickou toxicitou.

Typ studie a soubor Retrospektivně jsme vyhodnotili chronickou toxicitu u 152 pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty (T1-3 N0 M0), kteří byli léčeni pomocí 3D-CRT v letech 1997-2000.

Metody a výsledky Použili jsme 3D-CRT techniku 3 polí (0°, 90°, 270°) nebo 4 polí (30°, 90°, 270°, 330°). Klinický cílový objem tvořila prostata a baze semenných váčků (SV) u tumorů T1-2, respektive prostata a SV u tumorů T3. Plánovací cílový objem byl vytvořen přidáním lemu 10 mm anteroposteriorně a laterolaterálně, respektive 15 mm kranio-kaudálně. Dávka byla specifikována do izocentra. Dávku 70 Gy obdrželo 113/152 (74%) pacientů a dávku 74 Gy 39/152 (26%) pacientů. Chronická toxicita byla hodnocena podle modifikované stupnice Radiation Therapy Oncology Group a Late Effects Normal Tissue Task Force (RTOG/LENT). Chronická gastrointestinální (GI) toxicita 2. a 3. stupně se objevila u 22/152 (14.5%), respektive u 6/152 (3.9%) pacientů. Objem rektu ozářený dávkou 60 Gy, 65 Gy, respektive 70 Gy byl významně větší u pacientů s chronickou GI toxicitou 2. a vyššího stupně, než u pacientů s toxicitou 1. stupně anebo bez projevů toxicity ($p=0.04$, $p=0.01$, respektive $p=0.02$). Chronická genitourinární (GU) toxicita 2. a 3. stupně byla zaznamenána u 16/152 (10.5%), respektive u 15/152 (9.9%) pacientů. GU toxicita 3. stupně se manifestovala obstrukční symptomatologií s nutností invazivního řešení ($n=13$) a totální inkontinencí ($n=2$). Invazivní urologický výkon v anamnéze (transuretrální resekce prostaty TURP, transvesikální prostatektomie TVPE) byl významným prediktorem rozvoje GU toxicity. Pozdní GU symptomy 2. a vyššího stupně se objevily u 15/49 (30.6%) pacientů, kteří před léčbou prodělali TURP/TVPE, respektive u 16/103 (15.5%) pacientů, kteří invazivní výkon nepodstoupili ($p=0.03$).

Závěry Výskyt chronické toxicity provázející 3D-CRT karcinomu prostaty byl přijatelný. Invazivní urologický výkon byl významným prediktorem rozvoje chronické GU toxicity.

Klíčová slova: Karcinom prostaty; konformní radioterapie; chronická toxicita

Summary

Backgrounds Three-dimensional conformal radiotherapy (3D-CRT) is an effective treatment method of the localized prostate cancer. Dose escalation is associated with acceptable chronic toxicity.

Design and Subjects Chronic toxicity was retrospectively evaluated in 152 patients with localized prostate cancer (T1-3 N0 M0), treated using 3D-CRT between 1997 and 2000.

Methods and Results The 3-field (0°, 90°, 270°) or 4-field (30°, 90°, 270°, 330°) techniques were used for 3D-CRT. Clinical target volume consisted of prostate and the base of seminal vesicles (SV) in T1-2 tumors and of prostate and SV in T3 tumors. The planning target volume was created with a margin of 10 mm antero-posteriorly and latero-laterally and 15 mm cranio-caudally. Dose was prescribed to the isocenter. 113/152 patients (74%) were treated with 70 Gy and 39/152 patients (26%) received 74 Gy. Chronic toxicity was assessed according to the modified Radiation Therapy Oncology Group and Late Effects Normal Tissue Task Force (RTOG/LENT) scale. Chronic gastrointestinal (GI) toxicity Grades 2 and 3 was observed in 22/152 (14.5%) and 6/152 (3.9%) of patients, respectively. The volume of rectum irradiated to a dose of 60 Gy, 65 Gy, and 70 Gy was significantly greater in patients with chronic GI toxicity Grades 2 or 3 compared to patients with none or Grade 1 toxicity ($p=0.04$, $p=0.01$ and $p=0.02$, respectively). Chronic genitourinary (GU) toxicity Grades 2 and 3 was observed in 16/152 (10.5%) and 15/152 (9.9%) of patients, respectively. Grade 3 GU toxicity was expressed as obstructive symptoms requiring an invasive procedure ($n=13$), and a total incontinence ($n=2$). A history of invasive urological procedure (transurethral resection of prostate TURP, transvesical prostatectomy TVPE) was a significant predictor for the development of GU toxicity. Late GU symptoms Grade 2 or 3 were observed in 15/49 patients (30.6%) with a history of TURP/TVPE compared to 16/103 patients (15.5%) without previous invasive procedure ($p=0.03$).

Conclusions The incidence of chronic toxicity following 3D-CRT for prostate cancer was acceptable. Invasive urological procedure was a significant predictor for the development of chronic GU toxicity.

Key words: Prostate cancer; conformal radiotherapy; chronic toxicity

Úvod

Zevní radioterapie je vedle radikální prostatektomie základní kurativní léčebnou modalitou u lokalizovaného karcinomu prostaty. Riziko pozdních komplikací narůstá se stoupající dávkou záření. Při konvenční radioterapii popsali Smit a spol. výskyt středně těžké a těžké proktitidy 22% při dávce do 70 Gy, 20% při dávce 70-75 Gy a 60% v případě dávky vyšší než 75 Gy [1]. Trojrozměrná konformní radioterapie (3D-CRT) je ozařovací technika, při které hranice cílového objemu odpovídají trojrozměrnému zobrazení objemu tumoru. Lékaři na Michiganské univerzitě (Lichter, Sandler, Ten-Haken) začali v roce 1987 jako první používat 3D-CRT u pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty [2]. Sandler a spol. referovali o první studii s eskalací dávky u lokálně pokročilého karcinomu prostaty [3]. Pollack a spol. z M. D. Anderson Cancer Center uveřejnili výsledky randomizované studie u 301 pacientů s karcinomem prostaty ve stádiu T1-T3 [4]. U všech pacientů bylo nejprve provedeno ozaření pánve dávkou 46 Gy a potom byli randomizováni do dvou skupin. Nemocní ve skupině s nižší dávkou (70 Gy) měli konvenční boost na prostatu, zatímco nemocní ve skupině s vyšší dávkou (78 Gy) měli boost konformní. 6leté přežití bez biochemického anebo klinického relapsu bylo 64% ve skupině pacientů s dávkou 70 Gy, respektive 70% ve skupině s dávkou 78 Gy ($p=0.03$). Z eskalace dávky nejvíce profitovali pacienti s hodnotou PSA vyšší než 10 ng/ml. 6leté přežití bez relapsu bylo u těchto nemocných 62% při vyšší dávce ve srovnání s 43% při nižší dávce ($p=0.01$). 3D-CRT karcinomu prostaty s eskalací dávky nad 70 Gy je provázena nízkým výskytem těžkých komplikací 3. a 4. stupně. Zelefsky a spol. léčili konformní radioterapií (64.8-81.0 Gy) celkem 743 pacientů s karcinomem prostaty [5]. 5letá pravděpodobnost rozvoje chronické GI toxicity 2. a 3. stupně byla 11%, respektive 0.75%. 5letá pravděpodobnost rozvoje chronické GU toxicity 2. a 3. stupně byla 10%, respektive 3%. Dávka záření byla významným prediktorem pro vznik pozdních komplikací. 5letá pravděpodobnost rozvoje chronické GI a GU toxicity 2. a vyššího stupně byla 7%, respektive 8% při dávce ≤ 70.2 Gy a 16%, respektive 15% při dávce ≤ 75.6 Gy ($p<0.001$ pro GI toxicitu, $p=0.008$ pro GU toxicitu). Signifikantní objemový efekt popsali Jackson a spol. v souboru 576 pacientů, kteří byli léčeni pomocí 3D-CRT dávkou 70.2 Gy ($n=261$), respektive dávkou 75.6 Gy ($n=315$) [6]. Analýza DVH ukázala významně vyšší objemovou expozici stěny rektu u pacientů s chronickým rektálním krvácením oproti nemocným bez krvácení ($p=0.02$ pro úroveň dávky 70.2 Gy, $p<0.0001$ pro úroveň dávky 75.6 Gy). Fiorino a spol. doporučili nezatříbit dávkou 70 Gy více než 25-30% objemu rektu, aby riziko středně těžké či těžké hemoragické proktitidy nepřekročilo 5-10% [7].

Zaměřili jsme se na podrobnou analýzu chronické toxicity především proto, že od roku 1998 jsme u pacientů s T3 tumorem aplikovali suprakonvenční dávku záření 74 Gy. Mimoto jsme chtěli zjistit, zda existuje vztah mezi objemem rizikových orgánů ozařených určitou dávkou a chronickou toxicitou.

Soubor nemocných a metody

Charakteristika souboru pacientů

V období od prosince 1997 do prosince 2000 jsme na Klinice onkologie a radioterapie FN Hradec Králové léčili pomocí 3D-CRT 163 pacientů s karcinomem prostaty. Do programu 3D-CRT byli zahrnuti pacienti s lokalizovaným onemocněním - stádium T1-3 N0/pN0 M0 (TNM klasifikace zhoubných novotvarů, 4. vydání, 2. revize 1992) [8]. Chronickou toxicitu jsme hodnotili u pacientů s minimální dobou sledování 24 měsíců. Doba sledování byla počítána od data ukončení ozaření do data poslední kontroly. Z celkového počtu 163 pacientů umřelo 9 mužů s dobou sledování kratší než 24 měsíců. U dalších dvou pacientů jsme měli nedostatečné údaje v průběhu dispenzarizace (jeden pacient se odstěhoval neznámo kam, druhý pacient nespolupracoval a na kontroly nechodil). Těchto 11 pa-

cientů jsme z analýzy vyloučili. Soubor hodnocených pacientů tak zahrnoval 152 mužů.

Tabulka č. 1.: Charakteristika souboru ($n=152$)

Věk medián (rozmezí)		70	(52-81)
Stádium	T1	29/152	(19.1%)
	T2	80/152	(52.6%)
	T3	43/152	(28.3%)
PSA medián (rozmezí)		12.5	(0.1-150)
Invazivní urologický výkon	TURP	36/152	(23.7%)
	TVPE	13/152	(8.5%)
Pánevní lymfadenektomie		45/152	(29.6%)
Hormonální léčba		63/152	(41.4%)
Dávka	70 Gy	113/152	(74.3%)
	74 Gy	39/152	(25.7%)

PSA prostatický specifický antigen; TURP transuretrální resekce prostaty; TVPE retropubická transvezikální prostatektomie

Charakteristika souboru je uvedena v souhrnném přehledu (Tabulka 1). Medián doby sledování je 40.9 měsíce (rozmezí 24.0-60.3 měsíce). Předchozí invazivní urologický výkon (transuretrální resekce prostaty TURP, transvesikální prostatektomie TVPE) byl zaznamenán u 49 ze 152 (32.2%) pacientů. Medián intervalu mezi TURP nebo TVPE a zahájením radioterapie byl 24 týdnů (rozmezí 5-750 týdnů). Hormonální léčba neoadjuvantní, adjuvantní anebo obojí byla indikována u pacientů s objemným tumorem. Celkem 63/152 (41.4%) pacientů mělo hormonální léčbu. U 45 pacientů proběhla neoadjuvantní hormonální léčba v celkové délce 6 měsíců (LHRH analog a antiandrogen) - 4 měsíce před radioterapií a 2 měsíce během radioterapie. Permanentní adjuvantní hormonální léčba (oboustranná orchiektomie) byla následně zavedena u 18 pacientů. U pacientů ve stádiu T3 byla hormonální léčba prováděna ve 36/43 (83.7%) případech.

V prvních 4 měsících klinického provozu 3D-CRT jsme aplikovali dávku 70 Gy bez ohledu na T kategorii. Poté jsme u pacientů s T3 tumorem dávku eskalovali na 74 Gy. Dávku 70 Gy bylo tedy ozařeno celkem 113/152 (74.3%) pacientů (všichni pacienti s tumorem T1-2 a čtyři pacienti s tumorem T3). Dávku 74 Gy bylo ozařeno 39/152 (25.7%) pacientů s lokálně pokročilým T3 tumorem.

Technika radioterapie

Pacienti byli simulováni (Ximatron C, Varian) v poloze na zádech. Dolní končetiny byly imobilizovány individuální vakuovou podložkou (Vac-Lok, MED-TEC) od poloviny stehnen kranálně po chodidla kaudálně. Plánovací CT řezy byly prováděny v 5 mm rozeztupech při tloušťce řezu 5 mm. Skenovaná oblast začínala přibližně 1 cm pod hrboly sedacími kaudálně a končila zhruba 1 cm nad kupulou měchyře kranálně. Plánování bylo prováděno pomocí 3D plánovacího systému (Cadplan 2.7.9., Varian). Respektovali jsme doporučení International Commission on Radiation Units and Measurements (ICRU) 50 Report [9]. Na jednotlivých CT řezech byly vyznačeny následující struktury: klinický cílový objem (CTV), rektum, močový měchýř a hlavice femurů. CTV zahrnoval prostatu a bazi semenných váčků u tumorů T1 a T2, respektive prostatu a celé semenné váčky u stádia T3. Plánovací cílový objem (PTV) jsme vytvořili automatickou objemovou expanzí kolem CTV (10 mm anteroposteriorně a laterálně a 15 mm kraniokaudálně). Rizikové orgány (rektum, močový měchýř a femury) jsme zakreslovali v úrovni PTV a dále v řezech do 1 cm nad a 1 cm pod oblastí PTV.

Prvních 32 pacientů (prosinec 1997 - červenec 1998) bylo ozařeno technikou 3 stejně vážených polí (0° , 90° , 270°) s 30° klínovými filtry. Všichni následující pacienti (srpen 1998 - prosinec 2000) byli ozařováni technikou 4 stejně vážených polí (2 boční pole 90° , 270° a 2 přední šikmá pole 30° , 330°) s 30° nebo 45° klínovými filtry.

Cílové struktury byly zobrazeny z pohledu svazku záření (beam's eye view BEV) a svazek záření byl tvarován vícetvarovým kolimátorem (MLC). Mezi PTV a lamelami MLC byl ponechán lem 10 mm kvůli polostínu. Dávku záření jsme specifikovali do ICRU bodu (izocentra) a normalizovali na hodnotu 100%. Při optimalizaci plánu bylo využito histogramů dávka-objem (DVH). Akceptovali jsme kolísání dávky v PTV 92-107%, i když u většiny pacientů se nehomogenita pohybovala v doporučeném rozmezí 95-107%. Předepsanou dávku záření mohlo obdržet maximálně 30% objemu rektu a 40% objemu močového měchýře. Pacienti byli ozařováni na lineárním urychlovači (Clinac 600 C, Varian) při energii fotonového záření 6 MV. Předepsaná dávka záření činila 70 Gy během 7 týdnů (2 Gy na frakci) u pacientů s časným karcinomem (T1-2), respektive 74 Gy během 7,5 týdne (2 Gy na frakci) u pacientů s lokálně pokročilým karcinomem (T3). Verifikace pomocí elektronického zobrazení polí na lineárním urychlovači byla prováděna jednou týdně (PortalVision 3.8, Varian).

Histogramy objem - dávka

Vytvořili jsme DVH pro CTV, PTV a pro rizikové orgány (rektum, močový měchýř). Posuzovali jsme homogenitu rozložení dávky v CTV a PTV a expozici rizikových orgánů. Vyhodnotili jsme vztah mezi radiační zátěží kritických orgánů a chronickou toxicitou. Zaznamenávali jsme střední Dmean (Gy), minimální Dmin (Gy) a maximální dávku Dmax (Gy) v rektu a v močovém měchýři. Dále jsme registrovali objem rizikového orgánu (%), který obdržel definovanou dávku záření (50 Gy, 55 Gy, 60 Gy, 65 Gy, 70 Gy). Pro rektum tomu odpovídaly symboly R50%, R55%, R60%, R65% a R70%; pro močový měchýř analogicky B50-70%.

Hodnocení chronické toxicity

Při hodnocení chronické gastrointestinální (GI) a genitourinární (GU) toxicity jsme vycházeli z kombinovaného skórovacího systému Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) a Late Effects Normal Tissue Task Force (LENT) [10,11]. Použili jsme modifikaci tohoto skórovacího systému podle doporučení Fox Chase Cancer Center (FC-LENT scale) a M. D. Anderson Cancer Center (Tabulka 2 a 3) [12,13]. Pacienti byli sledováni v intervalu 3 měsíce během prvních dvou let, 6 měsíců mezi 3. a 5. rokem a potom v ročních intervalech. Jako chronická toxicita byly definovány obtíže, které se objevily po více než 90 dnech od ukončení ozáření nebo obtíže, které se vyvinuly během léčby a přetrvávaly déle než 90 dnů po jejím ukončení.

Tabulka č. 2.: Modifikovaný RTOG/LENT skórovací systém pro chronickou gastrointestinální (GI) radiační toxicitu

Stupeň	Symptomy
1	Průjem nevyžadující pravidelnou medikamentózní léčbu; frekvence stolice 3-5x denně; příměs krve ve stolici maximálně 1x týdně; tenesmus nevyžadující analgetika
2	Průjem vyžadující léky častěji než 2x týdně; frekvence stolice vyšší než 5x denně; intermitentní krvácení minimálně 2x týdně; maximálně 2 koagulace pro krvácení; intermitentní používání vložek pro inkontinenci; bolesti vyžadující pravidelně analgetika
3	Průjem vyžadující léky častěji než 2x denně; transfuse nebo více než 2 koagulace pro krvácení; stále používání vložek pro inkontinenci; bolesti vyžadující pravidelně opiáty
4	Dysfunkce vyžadující operaci; píštěl nebo perforace; krvácení ohrožující život

Celkový stupeň GI a GU toxicity byl stanoven podle nejhoršího symptomu během doby sledování. Striktura uretry vyžadující TURP byla považována za komplikaci po ozáření, pokud byl resekát histologicky negativní nebo obsahoval regresivně změněné nádorové buňky. Jestliže patolog popsal v resekátu

vitální nádor a výkon byl proveden s dostatečným odstupem po ozáření (více než 18 měsíců), nález jsme hodnotili jako lokální recidivu. V tomto případě se nejednalo o toxicitu radioterapie, nýbrž o selhání radioterapie ve smyslu lokální kontroly.

Tabulka č. 3.: Modifikovaný RTOG/LENT skórovací systém pro chronickou genitourinární (GU) radiační toxicitu

Stupeň	Symptomy
1	Nykturie 2x častěji oproti výchozí; příměs krve v moči maximálně 1x týdně; únik moče nevyžadující používání vložek; dysurie nevyžadující analgetika
2	Nykturie více než 2x častěji oproti výchozí; intermitentní hematurie minimálně 2x týdně; maximálně 2 koagulace pro hematurii; intermitentní používání vložek pro inkontinenci; bolesti vyžadující pravidelně analgetika
3	Nykturie v intervalu kratším než 1 hodina; transfuse nebo více než 2 koagulace pro hematurii; striktura uretry vyžadující dilataci nebo endoresektii; stále používání vložek pro inkontinenci; bolesti vyžadující pravidelně opiáty
4	Těžká hemoragická cystitida nebo ulcerace vyžadující diverzi moče nebo cystektomii; píštěl nebo perforace

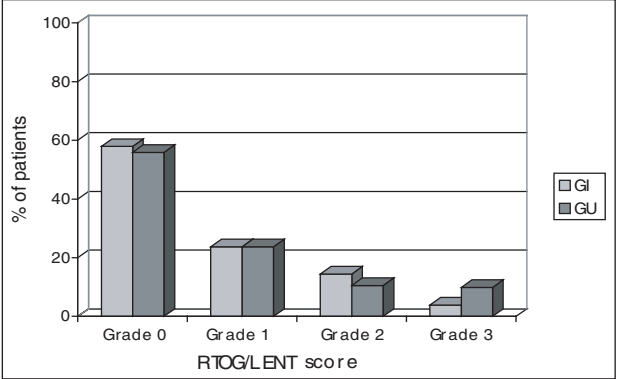
Statistika

Vyhodnotili jsme incidenci a závažnost chronické toxicity. Byly testovány rozdíly mezi skupinami pacientů s různým stupněm chronické toxicity. Analýza byla provedena statistickým programem NCSS 2001. Mezi spojitě proměnné jsme zařadili věk a parametry DVH (Dmean, Dmin a Dmax v rektu a v močovém měchýři; objem rizikového orgánu v %, který obdržel definovanou dávku záření R50-70%, respektive B50-70%). U spojitých proměnných s normálním rozdělením hodnot byl použit nepárový t-test. Jeho neparametrickou verzi - Mann-Whitneyův test - jsme použili u proměnných, které nevykazovaly normální rozdělení dat. Mezi diskrétní proměnné jsme zařadili stádium (T1-2 versus T3), dávku záření (70 Gy versus 74 Gy), hormonální léčbu, invazivní urologický výkon (TURP, TVPE), pánevní lymfadenektomii a akutní toxicitu. Pro diskrétní proměnné byl použit χ^2 test a Fisherův přesný test v kontingenčních tabulkách. Ve všech prováděných testech jsme zvolili hladinu významnosti $\alpha=0.05$. Pravděpodobnost rozvoje chronické toxicity v závislosti na čase byla vypočítána metodou Kaplan a Meierové [14]. K porovnání křivek kumulativního rizika chronické toxicity byl využit log-rank test.

Výsledky

Incidence chronické toxicity

Obr. 1.: Incidence chronické gastrointestinální (GI) a genitourinární (GU) toxicity



3D-CRT byla poměrně dobře tolerována; toxicitu 4. stupně ani fatální toxicitu jsme nezaznamenali (Obrázek 1). 22/152 (14.5%) pacientů mělo projevy chronické GI toxicity 2. stupně. Nejčastějším symptomem bylo intermitentní krvácení z konečníku, které se objevilo u 17 mužů a bylo zvládnuto kon-

zervativně nebo nanejvýš dvěma argonovými plasmakoagulacemi. Chronická GI toxicita 3. stupně byla zaznamenána pouze u 6 pacientů. Ve všech případech se jednalo o krvácení z konečníku. Léčebnou intervencí byla opakovaná argonová plasmakoagulace u 5 nemocných a transfuze u jednoho nemocného.

Přítomnost akutní GI toxicity byla významným prediktorem rozvoje chronické toxicity. Pozdní GI symptomy se objevily u 54/110 (49.1%) pacientů, kteří vykazovali známky akutní toxicity, respektive u 10/42 (23.8%) pacientů, kteří akutní obtíže neměli ($p=0.005$). Samostatně byla analyzována podskupina pacientů s chronickou GI toxicitou 2. a vyššího stupně ($n=28$). Zaznamenali jsme určitý trend ve smyslu vyššího výskytu tohoto typu toxicity u starších nemocných ($p=0.06$), respektive u pacientů s vyšší dávkou záření (74 Gy versus 70 Gy) ($p=0.07$). Přítomnost akutní GI toxicity 2. a vyššího stupně byla významným prediktorem rozvoje chronické GI toxicity 2. a vyššího stupně. Pozdní GI symptomy uvedeného stupně se objevily u 14/43 (32.5%) pacientů, kteří vykazovali známky akutní toxicity, respektive u 14/109 (12.8%) pacientů, kteří akutní obtíže neměli ($p=0.005$).

16/152 (10.5%) pacientů mělo projevy chronické GU toxicity 2. stupně. Nejčastějším symptomem byl únik moče vyžadující intermitentní používání vložek, který byl přítomen u 9 nemocných. Intermitentní hematurii udávalo 6 mužů, přičemž u 5 z nich byla rázu epizodického. Chronická GU toxicita 3. stupně byla zaznamenána u 15/152 (9.9%) pacientů. 13/15 (86.7%) nemocných trpělo obstrukční symptomatologií, která musela být řešena invazivním způsobem. Registrovali jsme 7 případů striktury bulbární uretry, přičemž optická uretrotomie (OUT) byla provedena u 6 pacientů a dilatace u jednoho pacienta. TURP pro obstrukci prostatické uretry byl indikován u 4 nemocných. Kontrakturu hrdla měchýře řešenou endoresekcí jsme pozorovali ve 2 případech. 2/15 (13.3%) pacientů byli klasifikováni jako GU toxicita 3. stupně z důvodu inkontinence, která si vynutila stálé používání vložek.

Statistické vyhodnocení prokázalo významný vztah mezi celkovou incidencí chronické GU toxicity (stupeň 1-3) a invazivním urologickým výkonem v anamnéze. Pozdní GU symptomy se vyvinuly u 32/49 (65.3%) pacientů, kteří před léčbou prodělali TURP/TVPE, respektive u 35/103 (26.9%) pacientů, kteří invazivní výkon nepodstoupili ($p<0.005$). Pozorovali jsme trend mezi neoadjuvantní hormonální léčbou a nižším rizikem rozvoje chronické GU toxicity ($p=0.06$). Podobně existoval trend mezi přítomností akutních GU symptomů a výskytem chronických obtíží. Pozdní GU toxicita se objevila u 49/99 (49.5%) pacientů, kteří vykazovali známky akutní toxicity, respektive u 18/53 (34.0%) pacientů, kteří akutní obtíže neměli ($p=0.07$).

Samostatně byla analyzována podskupina pacientů s chronickou GU toxicitou 2. a vyššího stupně ($n=31$). Invazivní urologický výkon v anamnéze byl významným prediktorem rozvoje tohoto typu toxicity. Pozdní GU symptomy 2. a vyššího stupně se objevily u 15/49 (30.6%) pacientů, kteří před léčbou prodělali TURP/TVPE, respektive u 16/103 (15.5%) pacientů, kteří invazivní výkon nepodstoupili ($p=0.03$). Také chronická GU toxicita 3. stupně ($n=15$) měla vztah k invazivnímu urologickému výkonu. Vyskytla se u 9/49 (18.4%) pacientů s pozitivní anamnézou TURP/TVPE, respektive u 6/103 (5.8%) pacientů bez invazivního výkonu ($p=0.02$).

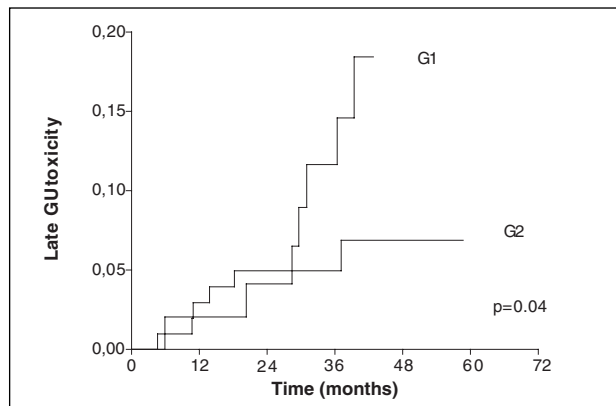
Časový průběh chronické toxicity

Chronické GI symptomy 2. a 3. stupně se objevily v časovém rozmezí 3-35 měsíců od ukončení ozáření (medián 16 měsíců). Nejvyšší výskyt těchto obtíží byl zaznamenán mezi 12. a 18. měsícem po léčbě. Chronické GU symptomy 2. a 3. stupně se rozvinuly v časovém rozmezí 3-47 měsíců od ukončení ozáření (medián 23 měsíců).

4letá pravděpodobnost rozvoje chronické GI toxicity 3. stupně byla nízká a činila 4%. Naproti tomu 4letá pravděpodob-

nost rozvoje chronické GU toxicity 3. stupně byla vyšší a činila 13%. Významným negativním prediktorem pro vznik tohoto typu toxicity byl invazivní urologický výkon v anamnéze. Pacienti, kteří před radioterapií prodělali TURP/TVPE měli významně vyšší riziko rozvoje tohoto typu toxicity (18% ve 4 letech) ve srovnání s nemocnými, kteří takový výkon neprodělali (7% ve 4 letech) ($p=0.04$) (Obrázek 2).

Obrázek 2.: Pravděpodobnost rozvoje chronické genitourinární (GU) toxicity 3. stupně ve vztahu k předchozímu invazivnímu urologickému výkonu

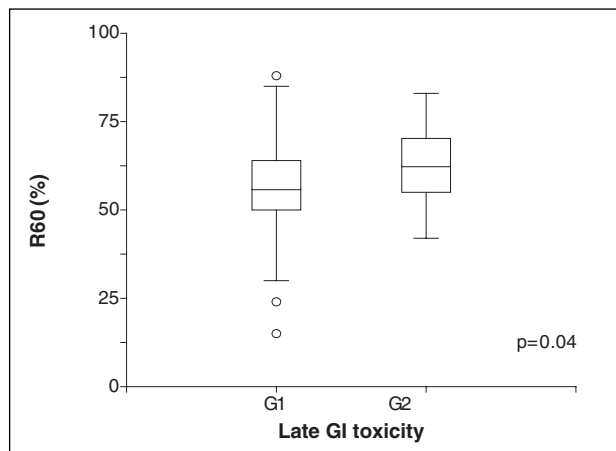


G1 skupina pacientů, kteří před ozářením prodělali TURP/TVPE; G2 skupina pacientů, kteří před ozářením neprodělali TURP/TVPE

Dozimetrické parametry a chronická toxicita

Radiační zatížení rektu bylo významným prediktorem rozvoje chronické GI toxicity. Objem rektu ozářený dávkou 60 Gy, 65 Gy, respektive 70 Gy byl významně větší u pacientů s chronickou GI toxicitou 2. a vyššího stupně, než u pacientů s toxicitou 1. stupně anebo bez projevů toxicity ($p=0.04$, $p=0.01$, respektive $p=0.02$). Medián objemu rektu, který obdržel dávku 60 Gy byl 62.1% u mužů s chronickou GI toxicitou 2. a vyššího stupně, respektive 56.8% u mužů bez projevů tohoto stupně toxicity ($p=0.04$) (Obrázek 3). Analýza DVH neprokázala vztah mezi radiační zátěží močového měchýře a incidencí chronické GU toxicity.

Obrázek 3.: Rozložení hodnot R60 u chronické gastrointestinální (GI) toxicity



R60 objem rektu (%) zatížený dávkou 60 Gy; G1 skupina pacientů s chronickou GI toxicitou stupeň 0-1; G2 skupina pacientů s chronickou GI toxicitou stupeň 2-3

Diskuse

Potenciál trojrozměrné konformní radioterapie (3D-CRT) spočívá v tom, že poskytuje prostor pro redukci objemu tkáně zatíženého vysokou dávkou záření. 3D-CRT využívá moderní

technologie k tomu, aby se tvar cílového objemu co nejvíce blížil trojrozměrnému obrazu tumoru. Možnost prostorového tvarování cílového objemu vede ke snížení radiační zátěže okolních zdravých tkání. Z pohledu klinického může být přínos 3D-CRT dvojnásobný. Lze očekávat redukci toxicity při aplikaci konvenčních dávek záření nebo je možné eskalovat dávku záření, aniž by došlo k významnému nárůstu toxicity.

Primárním cílem radikální radioterapie lokalizovaného karcinomu prostaty je eradikace nádoru. Selhání radioterapie může vést k lokální progresi onemocnění a zároveň může dojít k rozvoji vzdálených metastáz. Recentní práce Coena a spol. retrospektivně analyzuje soubor 1469 pacientů, léčených radioterapií pro lokalizovaný karcinom prostaty v letech 1972-1999 [15]. Pravděpodobnost lokální kontroly a absence distančních metastáz 10 let po léčbě byla 79%, respektive 74%. V multivariátním modelu bylo lokální selhání terapie nejvýznamnějším prediktorem rozvoje metastáz. 10leté přežití bez přítomnosti vzdálených metastáz bylo 77% u pacientů s lokální kontrolou, respektive 61% u pacientů s lokálním selháním ($p < 0.0001$). Metastazování se u pacientů s lokální recidivou objevilo poměrně dlouhou dobu po léčbě (medián 54 měsíců). Několik retrospektivních studií prokázalo významný vztah mezi dávkou záření a lokální kontrolou. Perez a spol. referovali o lepší lokální kontrole při dávce vyšší než 6500 cGy, zejména u pacientů ve stádiu C [16]. Podobně Hanks a spol. uvádějí u pacientů ve stádiu C pravděpodobnost výskytu lokální recidivy 5 let po ozáření 37% při dávce nižší než 6000 cGy, 36% při dávce 6000-6490 cGy, 29% při dávce 6500-6990 cGy a konečně 19% při dávce 7000 cGy anebo vyšší [17]. Zásadní význam dávky záření pro vyléčení karcinomu prostaty potvrdila v úvodu zmíněná randomizovaná studie fáze III z M. D. Anderson Cancer Center [4]. Zietman a spol. z Massachusetts General Hospital publikovali nedávno další randomizovanou studii u 393 pacientů, kteří obdrželi dávku 70.2 Gy nebo 79.2 Gy [18]. Pacienti byli ve stádiu T1-T2b a měli hodnotu PSA nižší než 15 ng/ml. 5leté přežití bez biochemického relapsu bylo 61.4% ve skupině s konvenční dávkou a 80.4% ve skupině s eskalovanou dávkou ($p < 0.001$).

Při hodnocení chronické GI toxicity jsme vycházeli z kombinovaného skórovacího systému Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) a Late Effects Normal Tissue Task Force (LENT) [10,11]. Použili jsme modifikaci tohoto skórovacího systému podle doporučení Fox Chase Cancer Center (FC-LENT scale) a M. D. Anderson Cancer Center [12,13]. Uvedený skórovací systém vychází ze stupnice RTOG/EORTC. Navíc podle stupnice LENT/SOMA obsahuje kategorii funkce svěrače a přesněji definuje průjem a krvácení 1. a 2. stupně. Modifikace FC-LENT scale inkorporuje argonovou plasmakoagulaci a tak lépe definuje krvácení 2. a 3. stupně.

Chronickou GI toxicitou 2. a 3. stupně jsme v analyzovaném souboru pozorovali u 22/152 (14.5%), respektive u 6/152 (3.9%) pacientů. Incidence chronické GI toxicity 2. a vyššího stupně pozorovaná v našem souboru pacientů je srovnatelná s publikovanými údaji. Hanks a spol. z Fox Chase Cancer Center analyzovali chronickou toxicitu v souboru 232 pacientů léčených 3D-CRT v dávkovém rozmezí 63-79 Gy [19]. Toxicita 2. stupně se objevila u 55/232 (24%) pacientů a toxicita 3. a 4. stupně u 12/232 (6%) pacientů. Zelefsky a spol. z Memorial Sloan-Kettering Cancer Center udávají v souboru 743 pacientů léčených 3D-CRT 74 případů (9.7%) chronické GI toxicity 2. a vyššího stupně [5]. Rektální krvácení 2. a 3. stupně postihlo celkem 65 pacientů (8.9%). Významným prediktivním faktorem pro rozvoj GI toxicity 2. a vyššího stupně byla dávka záření. 5letá pravděpodobnost rozvoje tohoto typu toxicity byla 7% při dávce 64.8-70.2 Gy, respektive 16% při dávce 75.6-81.0 Gy ($p < 0.001$). Také my jsme zaznamenali trend ve smyslu většího výskytu chronické GI toxicity 2. a vyššího stupně u pacientů s vyšší dávkou záření. Toxicitu tohoto typu jsme pozorovali u 11/39 (28.2%) nemocných, kteří obdrželi plánovanou dávku 74 Gy, respektive u 17/113 (15.0%) nemocných, kteří byli ozáření dávkou 70 Gy ($p = 0.07$).

Analýza DVH v našem souboru pacientů prokázala, že radiační zatížení rektu je významným prediktorem rozvoje chronické GI toxicity. Objem rektu ozářený dávkou 60 Gy, 65 Gy, respektive 70 Gy byl významně větší u pacientů s chronickou GI toxicitou 2. a vyššího stupně, než u pacientů s toxicitou 1. stupně anebo bez projevů toxicity. Práce Huang a spol. retrospektivně vyhodnotila toxicitu u 163 pacientů, kteří byli léčeni pomocí 3D-CRT v dávkovém rozmezí 74-78 Gy [20]. Autoři zaznamenali významný vztah mezi incidencí chronické GI toxicity 2. a vyššího stupně a objemem rektu, který byl ozářen dávkou 60 Gy, 70 Gy, 75.6 Gy a 78 Gy. 6leté riziko rozvoje rektálních komplikací bylo 54% u pacientů, kde více než 26.2% objemu rektu obdrželo dávku 70 Gy, respektive 13% u těch nemocných, kde objem rektu ozářený 70 Gy nepřekročil hodnotu 26.2% ($p = 0.0001$).

Pouze 16/152 (10.5%) pacientů v našem souboru mělo projevy chronické GU toxicity 2. stupně. Chronická GU toxicita 3. stupně byla zaznamenána u 15/152 (9.9%) pacientů. 13/15 (86.7%) nemocných trpělo obstrukční symptomatologií, která musela být řešena invazivním způsobem. 2/15 (13.3%) pacientů byli klasifikováni jako GU toxicita 3. stupně z důvodu inkontinence, která si vynutila stálé používání vložek. O nízké incidenci chronické GU toxicity referovali Nichol a spol. u 140 pacientů léčených dávkou 75.6 Gy [21]. GU symptomy 2. a 3. stupně byly zaznamenány u 24%, respektive 2% pacientů.

Pojem chronická GU toxicita u pacientů léčených radioterapií pro karcinom prostaty je relativně široký. Pokud využíváme konformní techniku radioterapie a cílový objem je omezen na prostatu (prostatu a semenné vajíčky), oblast zatížená vysokou dávkou záření představuje hrdlo močového měchýře, prostatickou uretru a částečně bulbární uretru. Naprostá většina pozdních komplikací tak postihuje uretru, případně hrdlo měchýře, a nikoliv měchýř samotný.

Statistické vyhodnocení našeho souboru pacientů prokázalo významný vztah mezi celkovou incidencí chronické GU toxicity (stupeň 1-3) a invazivním urologickým výkonem v anamnéze. Samostatně byla analyzována podskupina pacientů s chronickou GU toxicitou 2. a vyššího stupně ($n = 31$). Invazivní urologický výkon v anamnéze byl významným prediktorem rozvoje tohoto typu toxicity. Pozdní GU symptomy 2. a vyššího stupně se objevily u 15/49 (30.6%) pacientů, kteří před léčbou prodělali TURP/TVPE, respektive u 16/103 (15.5%) pacientů, kteří invazivní výkon nepodstoupili ($p = 0.03$). Několik studií prokázalo vyšší incidenci pozdních urinárních komplikací po zevní radioterapii u pacientů, kteří před léčbou podstoupili transuretrální resekci prostaty [22,23]. Zelefsky a spol. udávají 5letou pravděpodobnost vzniku uretrální striktury 4% u pacientů po předchozím TURP v porovnání s 1% u pacientů bez invazivního výkonu v anamnéze ($p = 0.03$) [5]. Otázkou zůstává, jak velký je podíl radioterapie na rozvoji uretrální striktury u pacientů po předchozím TURP. Řada urologických prací totiž prokázala, že riziko uretrální striktury u pacientů po TURP, kteří nikdy nepodstoupili radioterapii, se pohybuje v rozmezí 2-16% [24-26].

V souladu s údaji v literatuře jsme zaznamenali velmi nízký výskyt úplné inkontinence (stálé nošení vložek, chronická GU toxicita 3. stupně). Jednalo se pouze o 2 pacienty ze 152 (1.3%). Další 9/152 (5.9%) pacientů udávalo intermitentní používání vložek (chronická GU toxicita 2. stupně). Z celkového počtu 11 pacientů s inkontinencí 2. a 3. stupně měli 4 pacienti poruchu kontinence již před ozářením (2 pacienti nosili intermitentně vložky, 2 pacienti udávali únik moče po kapkách). Kromě toho 8/11 (72.7%) inkontinentních pacientů prodělalo před ozářením TURP/TVPE. Rozvoj inkontinence tudíž nelze přičíst jenom radioterapii. Souvislost mezi TURP a inkontinencí po radikálním ozáření prostaty popisují Dearnaley a spol. [27]. Inkontinenci moče 3. stupně mělo 8/225 (3.2%) pacientů, přičemž u 7 z nich předcházela radioterapií TURP.

Závěr

Výskyt chronické toxicity, provázející 3D-CRT karcinomu prostaty, se v našem souboru pacientů významně nelišil od publikovaných údajů. Větší radiační zatížení rektu bylo spojena s významně vyšší incidencí chronické GI toxicity 2. a vyššího stupně. Invazivní urologický výkon (TURP, TVPE) v ana-

mnéze byl významným prediktorem rozvoje chronické GU toxicity jakéhokoliv stupně.

*Práce byla podpořena Výzkumným záměrem
MZO 00179906 Ministerstva zdravotnictví ČR
a Grantem RASO ČOS.*

Literatura

1. Smit WGJM, Helle PA, van Putten WLJ, et al. Late radiation damage in prostate cancer patients treated by high dose external radiotherapy in relation to rectal dose. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990;18:23-29.
2. Sandler HM. 3-D conformal radiotherapy for prostate cancer. The University of Michigan Experience. In: Meyer JL, Purdy JA, editors. 3-D conformal radiotherapy. A new era in the irradiation of cancer. Basel: S. Karger; 1996. p. 238-243.
3. Sandler HM, Perez-Tamayo C, Ten-Haken RK, Lichter AS. Dose escalation for stage C (T3) prostate cancer: minimal rectal toxicity observed using conformal therapy. *Radiother Oncol* 1992;23:53-54.
4. Pollack A, Zagars GK, Starkschall G, et al. Prostate cancer radiation dose response: results of the M. D. Anderson phase III randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:1097-1105.
5. Zelefsky MJ, Cowen D, Fuks Z, et al. Long term tolerance of high dose three-dimensional conformal radiotherapy in patients with localized prostate carcinoma. *Cancer* 1999;85:2460-2468.
6. Jackson A, Skwarchuk MW, Zelefsky MJ, et al. Late rectal bleeding after conformal radiotherapy of prostate cancer (II): volume effects and dose-volume histograms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:685-698.
7. Fiorino C, Sanguineti G, Cozzarini C, et al. Rectal dose-volume constraints in high-dose radiotherapy of localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;57:953-962.
8. Rada Národního onkologického registru České republiky. TNM klasifikace zhoubných novotvarů 4. vydání 2. revize. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky; 1994.
9. ICRU Report 50. Prescribing, recording and reporting photon beam therapy. International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, MD; 1993.
10. Cox JD, Stetz J, Pajak TF. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for research and Treatment of cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:1341-1346.
11. Pavy JJ, Denekamp J, Letschert J, et al. EORTC Late Effects Working Group. Late effects toxicity scoring: the SOMA scale. *Radiother Oncol* 1995;35:11-15.
12. Hanlon AL, Schultheiss TE, Hunt MA, et al. Chronic rectal bleeding after high-dose conformal treatment of prostate cancer warrants modification of existing morbidity scales. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38:59-63.
13. Storey MR, Pollack A, Zagars G, et al. Complications from radiotherapy dose escalation in prostate cancer: preliminary results of a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:635-642.
14. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958;53:457-81.
15. Coen JJ, Zietman AL, Thakral H, Shipley WU. Radical radiation for localized prostate cancer: local persistence of disease results in a late wave of metastases. *J Clin Oncol* 2002;20:3199-3205.
16. Perez CA, Lee HK, Georgiou A, et al. Technical and tumor-related factors affecting outcome of definitive irradiation for localized carcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:581-591.
17. Hanks GE, Martz KL, Diamond JJ. The effect of dose on local control of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;15:1299-1305.
18. Zietman AL, DeSilvio ML, Slater JD, et al. Comparison of conventional-dose vs high-dose conformal radiation therapy in clinically localized adenocarcinoma of the prostate: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005;294:1233-1239.
19. Hanks GE, Hanlon AL, Schultheiss TE, et al. Dose escalation with 3D conformal treatment: five year outcomes, treatment optimization, and future directions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:501-510.
20. Huang EH, Pollack A, Levy L, et al. Late rectal toxicity: dose-volume effects of conformal radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:1314-1321.
21. Nichol A, Chung P, Lockwood G, et al. A phase II study of localized prostate cancer treated to 75.6 Gy with 3D conformal radiotherapy. *Radiother Oncol* 2005;76:11-17.
22. Green N, Treible D, Wallack D. Prostate cancer: postirradiation incontinence. *J Urol* 1990;144:307-309.
23. Lee WR, Schultheiss TE, Hanlon AL, Hanks GE. Urinary incontinence following external-beam radiotherapy for clinically localized prostate cancer. *Urology* 1996;48:95-99.
24. Meyhoff HH, Nordling J. Long term results of transvesical and transurethral prostatectomy. A randomized study. *Scand J Urol Nephrol* 1986;20:27-33.
25. Schultz A, Bay-Nielsen H, Bilde T, et al. Prevention of urethral stricture formation after transurethral resection of the prostate: a controlled randomized study of Otis urethrotomy versus urethral dilation and the use of the polytetrafluoroethylene coated versus the uninsulated metal sheath. *J Urol* 1989;141:73-75.
26. Wurnschimmel E, Lipsky H. Urethral stricture after TURP and transvesical prostatectomy. *Urologe A* 1992;31:374-377.
27. Dearnaley DP, Khoo VS, Norman AR, et al. Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial. *Lancet* 1999;353:267-272.

Došlo: 18. 1. 2006

Přijato: 14. 4. 2006

PILOTNÍ STUDIE EXPRESE IZOFOREM PROTEINU P73 U MEDULOBLASTOMU: MOŽNÝ PODÍL P53-HOMOLOGNÍHO PROTEINU S POTENCIÁLNÍM PROGNOSTICKÝM VÝZNAMEM V TUMORIGENEZI EMBRYONÁLNÍCH NÁDORŮ CNS

P73 ISOFORMS EXPRESSION IN MEDULLOBLASTOMA: A POSSIBLE INVOLVEMENT OF P53 HOMOLOGUE PROTEIN WITH POTENTIAL PROGNOSTIC IMPACT IN DEVELOPMENT OF EMBRYONAL BRAIN TUMORS

ZITTERBART K.¹, KADLECOVÁ J.², ZAVŘELOVÁ I.³, KRATOCHVÍLOVÁ A.², SPĚŠNÁ R.², KŘEN L.³, PAVELKA Z.¹, ŠTĚRBA J.¹

¹ KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE LF MU A FN BRNO

² ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY FN BRNO

³ ÚSTAV PATOLOGIE LF MU A FN BRNO

Souhrn

Východiska: TP73, člen genové rodiny p53, se vyznačuje nezvyklou komplexitou genového lokusu. Přepisem ze dvou promotorů a alternativním sestřihem primárního transkriptu vznikají dvě třídy NH₂-terminálních izoform proteinu p73: transaktivace- kompetentní TAp73 a transaktivace-deficientní ΔTAp73 (ΔNp73, p73Δex2, p73Δex2/3). TP73 je zapojen v regulaci diferenciaci a apoptózy v neuronální, mesenchymální a epiteliální tkáni. Zvýšená exprese TP73 je u řady nádorů považována za onkogenní, overexprese ΔTAp73 je negativním prognostickým znakem u některých karcinomů a neuroblastomu. **Typ studie a soubor:** Pilotní molekulárně genetická a imunohistochemická studie exprese izoform proteinu p73 v souboru nádorové tkáně medulloblastomu. **Metody a výsledky:** Metodou real-time PCR byly detekovány transkripty TAp73, ΔNp73, p73Δex2 u nádorů (n=11) a v referenční RNA z mozečku. Byla prokázána zvýšená exprese ΔNp73 a trend ke zvýšené expresi TAp73 u medulloblastomu. Nebyla prokázána korelace izoform TP73 s expresí genů TRKC, MYCC v jednotlivých vzorcích. Imunohistochemické značení ΔNp73 a p73α (n=23) potvrdilo dosažené výsledky na úrovni proteinu. **Závěr:** Exprese N-terminálních izoform p73 se může podílet na molekulární podstatě tumorigeneze u medulloblastomu. Definujeme TP73 jako vhodný kandidátní gen pro další studium jeho prognostického a terapeutického významu u tohoto onemocnění.

Klíčová slova: TP73, medulloblastom, izoformy p73, real-time PCR, imunohistochemie, prognóza

Summary

Backgrounds: TP73 gives rise to two diametrically opposed protein classes: transactivation-competent p73 proteins (TAp73) and transactivation-deficient NH₂-terminally truncated ΔTAp73 proteins. ΔTAp73 are generated by aberrant splicing (p73Δex2, p73Δex2/3) and alternative promoter usage of intronic promoter P2 (ΔNp73). TP73 is involved in neural, mesenchymal and epithelial morphogenesis. Oncogenic activity of TP73 has been well documented and frequent tumor specific up-regulation of ΔTAp73 forms was observed in some types of cancer. ΔNp73 overexpression was found to be an independent prognostic marker for aggressive clinical behavior in patients with carcinomas and neuroblastoma. **Design and subject:** Real-time PCR and immunohistochemical detection of TP73 isoforms in medulloblastoma samples. **Methods and results:** TAp73, ΔNp73, p73Δex2 transcripts have been analyzed in medulloblastoma specimens and normal cerebellar tissue. ΔNp73 overexpression as well as a trend to increased TAp73 expression were found. No correlations between TP73 isoforms and TRKC, MYCC expression were documented. Immunohistochemical analysis of ΔNp73 and p73α confirmed molecular genetic data. **Conclusions:** Our findings suggest the involvement of TP73 in medulloblastoma tumorigenesis, defining TP73 as potential prognostic and therapeutic target for medulloblastoma.

Key words: TP73, medulloblastoma, p73 isoforms, real-time PCR, immunohistochemistry, prognosis

Úvod

Ztráta funkce proteinu p53 je klíčovou událostí v procesu karcinogeneze u řady nádorů [1,2]. Studie hledající homology tohoto klasického nádorového supresoru vedly k objevu dalších členů p53-genové rodiny, TP73 [3] a TP63 [4]. TP73 je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 1 (1p36.2-3), v oblasti podléhající u řady nádorů ztrátě heterozygosity. Strukturální homologie proteinu p73 a p53 vede k překrývajícím se protein-proteinovým a DNA-proteinovým interakcím [5]. Přesto však není p73 klasickým nádorovým supresorem Knudsonova typu, neboť jeho inaktivující mutace jsou v lidských nádorech nalézány extrémně řídké [6] a p73^{-/-} deficientní myš nemá zvýšený sklon ke spontánnímu výskytu nádorů [7]. Spektrum biologických funkcí proteinu p73 je široké, vykazuje funkce obdobné proteinu p53, ale rovněž funkce antagonistické, či je zapojen do signálních drah, na nichž se p53 nepodílí [8,9]. Za touto skutečností stojí nezvyklý počet COOH- a NH₂-terminálních izoform proteinu p73, jejichž existence vychází z komplexity genového lokusu TP73. Kromě promotoru P1 je v oblasti intronu 3 lokalizován další, interní promotor P2. Přepis z P1 dává vznik nezkrácené (*full-length*) transkripčně kompetentní TA-formě, přepis z P2 vede ke vzniku NH₂-zkráceného (*truncated*) proteinu ΔNp73. U ΔNp73 je 61 N-koncových aminokyselin proteinu TAp73 nahrazeno 13 aminokyselinami kódovanými z alternativního exonu 3B. Dále byla dokumentována existence aberantních transkriptů p73Δex2, p73Δex2/3, ΔN'p73, které, byť přepisovány z promotoru P1 rovněž postrádají TA doménu. p73Δex2 a p73Δ2/3 vznikají alternativním sestřihem exonů 2 resp. 2/3, kódují protein počínající aminokyselinou 49 resp. 72. Transkript ΔN'p73 obsahuje 198 párů bází z alternativního exonu 3B (jeho 3'-koncovou část) a po translaci kóduje protein identický s ΔNp73. Souhrnně jsou tyto TA-deficientní, vůči TAp73 a *wt* p53 dominantně negativní izoformy p73 označovány jako ΔTAp73. Kromě transkriptu kódujícího p73 v plné délce 14 exonů (α-izoforma) nalézáme v normální či nádorové tkáni dalších nejméně osm C-terminálních izoform β, γ, δ, ζ, η, θ, vznikajících mnohočetným sestřihem exonů 10 až 14. Experimentální data naznačují, že především rozdílně modulují transkripční roli proteinu p73. [5,8-11].

TAp73 sdílí s proteinem p53 částečnou funkční homologii. Ektopicky navozená zvýšená exprese TAp73 vede u buněk *in vitro* k vazbě p73α a p73β na promotory některých p53-cílových genů s antiproliferativní a proapoptotickou funkcí, mezi jinými CDKN1A/p21, GADD45, BTG2, 14-3-3σ, IGFBP3, BAX a PUMA [8,12]. Zvýšená exprese TAp73 je indukována (i) buněčnými a virovými onkogeny E2F1, MYC, E1A (ii) poškozením DNA γ-ionizujícím zářením či alkylací (iii) při hyperaktivaci T-receptorů na periferních T-lymfocytech [13-15]. Dle nově publikovaných dat je pravděpodobné, že po aktivaci TP73 je výsledná transkripční odpověď buňky dána vzájemnými interakcemi TA vs. ΔTA izoform, zastoupením jednotlivých COOH-terminálních izoform a rovněž transkripční aktivitou ostatních členů rodiny p53 spolu s dalším buněčným kontextem. To lze demonstrovat na příkladu práce *Goldschneidera et al.* [12], který prokázal, že u buněk neuroblastomové linie SH-SY5Y vede zvýšená exprese ΔNp73α k akumulaci nemutované formy p53, dochází k inhibici WAF1/p21 genové exprese (díky dominantně negativnímu efektu ΔNp73α), ovšem překvapivě k indukci BTG^{TIS21/PC3}, dalšího z p53-cílových genů. Tato transkripce je navíc závislá jak na statusu genu p53 (nedochází k ní u p53^{-/-} neuroblastomových buněk), tak na dalším buněčném kontextu (je nalézána u p53^{+/+} neuroblastomových buněk, nikoliv však u p53^{+/+} buněk karcinomu prsu).

Významná je role p73 při diferenciaci v neuronální, mesenchymální a epitelální tkáni [8,16-19]. Protein p73 se

podílí na nádorovém fenotypu buňky u řady malignit, nejčastěji zmiňovanými nádory s účastí p73 v tumorigenezi jsou karcinom plic, prsu, spinocelulární karcinom hlavy a krku, karcinom jícnu, žaludku a kolorekta, hepatocelulární karcinom a cholangiokarcinom, ovariální karcinom, karcinom močového měchýře, neuroblastom, ependyom, meningiomy, AML a blastická krize CML [8,9,20-29]. Většina těchto studií detekovala expresi p73 metodou RT-PCR, novější studie potvrzují expresi na úrovni proteinu imunoblottingem či imunohistochemicky [18,27-29]. Vrstvící evidence o tom, že především ΔTA izoformy se podílejí na dysregulaci signálních drah nádorových buněk. Zvýšená exprese ΔNp73 byla prokázána v případě neuroblastomu, hepatocelulárního a ovariálního karcinomu a rovněž u karcinomu prsu, plic a kolorekta; ve všech těchto případech měla prognosticky negativní význam [21-23,27,28]. U řady nádorů je nalézáno konkomitantní zvýšení exprese TAp73 i ΔTAp73 izoform [28].

Cílem práce bylo provést pilotní studii exprese N-terminálních izoform proteinu p73 v nádorové tkáni meduloblastomu. Pracovní hypotéza, že se izoformy p73 mohou účastnit na dysregulaci signálních drah tohoto nejčastěji se vyskytujícího embryonálního nádoru centrální nervové soustavy dětí, vycházela z následujících zjištění: (i) p73 se podílí na tumorigenezi nervové soustavy, aberantní exprese morfogenů v tumorigenezi je dobře dokumentována [16,30-33] (ii) p73 reguluje apoptózu v neuronální tkáni [16,17,30] (iii) ΔNp73 overexpres je nepříznivým prognostickým znakem u neuroblastomu, maligního extrakraniálního neurogenního nádoru dětského věku [23].

Byla zavedena kvantifikace transkriptů TAp73, ΔNp73 a p73Δex2 metodou real-time PCR a imunohistochemická detekce ΔNp73 a p73α a vyšetřeny dostupné vzorky meduloblastomu pacientů Kliniky dětské onkologie LF MU a FN Brno. V případě real-time PCR byla provedena analýza korelace izoform TP73 s expresí genů MYCC a TRKC, jejichž detekce má u pacienta s meduloblastomem potenciální prognostický význam [34-36].

Materiál a metody

Tkáň meduloblastomu: Dostupná nádorová tkáň pacientů s diagnózou primárního meduloblastomu Kliniky dětské onkologie LF MU a FN Brno (KDO). Nativní vzorky (n=11) pocházely z banky nádorové tkáně KDO při Oddělení lékařské genetiky FN Brno, byly získány, archivovány a vyšetřeny za dodržení všech zákonných norem po obdržení informovaného souhlasu. Parafinové bloky (n=23) byly získány z archívů patologicko-anatomických ústavů. Důvodem absence některých vzorků byla především velikost biopsie dostačující jen rutinní diagnostice a operace mimo dětské onkocentrum.

Human Brain, Cerebellum Total RNA (BD Biosciences): Referenční RNA z lidského mozečku 24 mužů/žen zmírajících náhlou smrtí byla užitá jako idealizovaná normální tkáň ke srovnání exprese TP73 v tkáni nádoru a v tkáni, ze které meduloblastom histogeneticky vzniká. V případě mozkových nádorů není při neurochirurgické operaci možno získat normální, k nádoru přiléhající tkáň.

Real-Time PCR: Celková RNA byla izolována z nativní nádorové tkáně užitím TRIzol (Invitrogen), koncentrace byla určena spektrofotometricky. 1 μg RNA byl reverzně přepsán užitím oligo(dT) primeru a reverzní transkriptázy Transcriptor (Roche Diagnostics). Vyšetření metodou real-time PCR bylo provedeno na systému LightCycler (Roche Diagnostics), vlastní PCR kvantifikace v modifikaci TaqMan (*homogenous 5' nuclease assay*). Každá reakce byla provedena v LC kapiláře v objemu 10 μl reakční směsi, skládající se z 1 μl alikvoty vyšetřované cDNA, 1 μl hot-start reakčního kitu LC FastStart DNA

Master Hybridization Probes obsahujícího Taq DNA polymerázu, dNTP, Mg²⁺ a pufr (Roche Diagnostics), 1 µl (0,5 µM) každého páru primerů (KRD, TIB MOLBIOL), 1 µl (0,2 mM) TM sondy (TIB MOLBIOL), 0,25 µl Uracil-DNA glykosylázy (Roche Diagnostics) a optimalizovaného množství Mg²⁺. Sekvence užitých primerů a TM sond uvádí Tab. 1. (design

Tabulka č. 1.:
(a)

mRNA	Sense-primer	Antisense-primer
TAp73	5'-CCTCTGGAGCTCTCTGGAAC-3'	5'-GCTCAGCAGATTGAAGTGGGCCATG-3'
p73Dex2	5'-GGTCGCGACGGCTGCAGGGA-3'	5'-CAGGCGCGGCGACATGG-3'
ΔNp73	5'-CAACGGCCCGCATGTTCCC-3'	5'-TGGTCCCATGGTGTGCTCAGC-3'
Beta-aktin	5'-TGAGCGCGCTACAGCTT-3'	5'-TCCTTAATGTACGCACGATT-3'

(b)

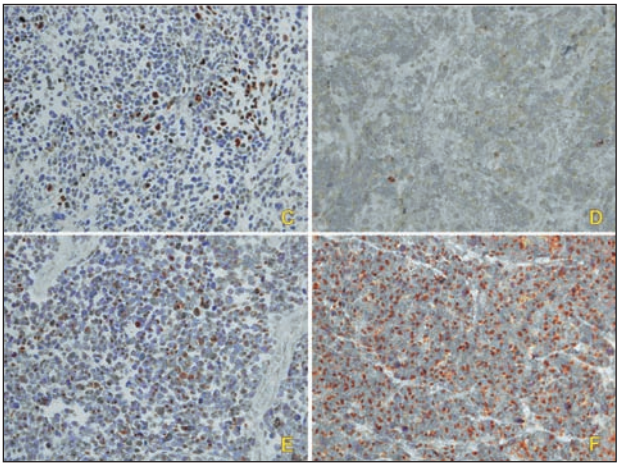
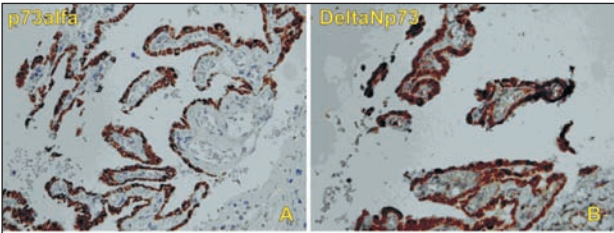
mRNA	Sekvence TM sondy
TAp73	5'-CCCTCCAGGTGGAAGACGTCCATGC-3'
p73Dex2	5'-CCCTCCAGGTGGAAGACGTCCATGC-3'
ΔNp73	5'-CCGTGCGGGGTACCCAGCGT-3'
Beta-aktin	5'-ACCACCGCGCCGAGCGGT-3'

Sekvence použitých primerů (a), sekvence užitých TaqMan sond (b)

primerů dle [20], v případě TAp73 byla modifikována sekvence R primeru) V pilotních experimentech byly produkty amplifikace ověřeny gelovou elektroforézou a sekvenací, v nutných případech byly reakční podmínky optimalizovány pomocí temperature gradient PCR. Expres cílového transkriptu byla paralelně stanovována ve 2 kapilárách, vyšetření každého vzorku bylo nezávisle opakováno v jedné kapiláře. Byly vyšetřovány odpovídající negativní kontroly (cDNA lymfocytů zdravých dárců, genomová DNA, H₂O), plasmid pcDNA3 s amplikonem TAp73α sloužil jako pozitivní kontrola při detekci TAp73 (dar Dr. P. Müllera, Ph.D., Masarykův onkologický ústav, Brno). Byla užit relativní kvantifikace cílových transkriptů, jejich exprese byla normalizována k expresi beta-aktinu jako housekeepingovému genu, k výpočtu koncentrací transkriptů byla užitá interpolace ze standardní kalibrační křivky [37]. Normalizované výsledky exprese neurotrofinového receptoru TRKC a protoonkogenu MYCC v analyzovaném materiálu byly získány v rámci dřívějších rutinních diagnostických vyšetření.

Imunohistochemie: Z formalínem fixované, v parafinových blocích zalité tkáně byly získány 4 µm řezy. Po standardních procedurách byly vzorky inkubovány při 4 °C přes noc s následujícími primárními protilátkami: (i) myší monoklonální protilátka p73α/β (klon ER-15, Lab Vision, Neomarkers; ředění 1:2000), epitop lokalizován mezi AK 380-637 lidského proteinu p73, tato protilátka specificky značí pouze α-izoformu [38] (ii) myší monoklonální protilátka delta-Np73 (klon 38C674.2, Imgenex; ředění 1:4000), epitop lokalizován mezi AK 2-13 lidského proteinu ΔNp73 [18]. Imunodetekce byla provedena pomocí avidin-biotinového komplexu (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories) a vizualizována užitím diaminobenzidinu jako substrátu. Řezy bylyobarveny Gillovým hematoxylinem.

Obrázek 2



Imunohistochemická detekce p73α (A, C, E) a ΔNp73 (B, D, F) v nádorové tkáni meduloblastomu. Plexus choroideus byl užit jako pozitivní kontrola pro p73α (A) a ΔNp73 (B) [28]. Střední p73α pozitivita a velmi slabá (<1 %) ΔNp73 pozitivita byla detekována v tomto meduloblastomu s extrémní nodulární predominancí (C,D). Silná jadená i cytoplazmatická exprese p73α a cytoplazmatická exprese ΔNp73 byla detekována v případě tohoto klasického meduloblastomu (E, F).

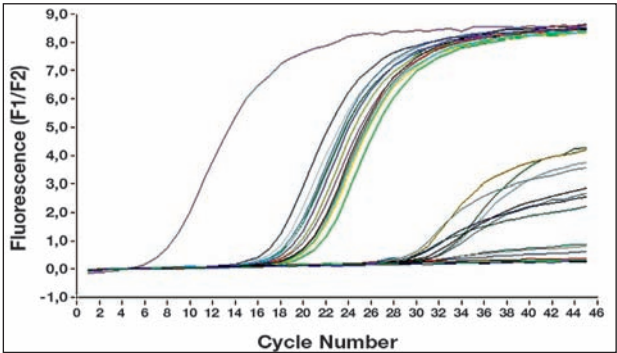
Statistická analýza: Normalizovaná exprese TAp73, ΔNp73, p73Dex-2 zjištěná metodou real-time PCR ve vzorcích meduloblastomu (MBL) byla deskriptivně vyhodnocena (median, 25. a 75. kvantil, minimum, maximum). Human Brain, Cerebellum Total RNA byla užitá jako idealizovaná normální tkáň mozečku (N), medián exprese v tomto referenčním vzorku byl užit k porovnání s meduloblastomy (MBL:N). Vzhledem k tomu, že relativně malý analyzovaný počet vzorků neumožnil užit robustní statistickou analýzu, byla zvolena kontingenční tabulka porovnávající v souboru tkáně meduloblastomu počet hodnot ležících nad a pod mediánem exprese referenční RNA (Fisher's exact test). Spearmanův korelační koeficient byl užit k porovnání exprese cílových transkriptů s expresí TRKC a MYCC (stanoveno rutinně v rámci diagnostických vyšetření).

Výsledky

Expres izoforem TAp73, ΔNp73, p73Dex2 u meduloblastomu detekovaná metodou real-time PCR

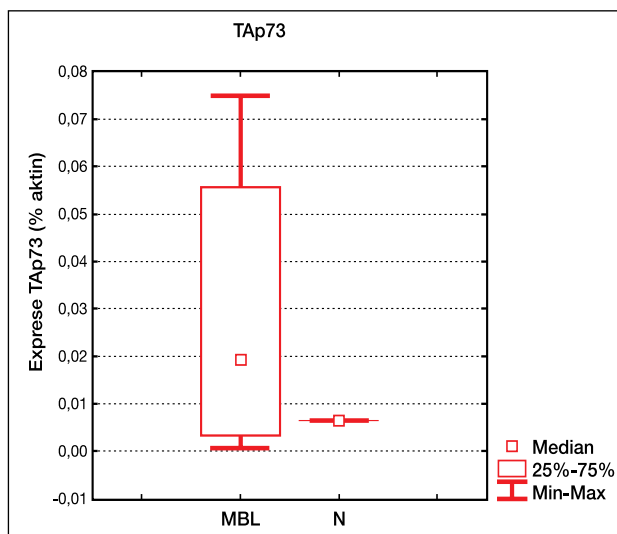
TAp73 exprese byla detekována ve všech vyšetřených vzorcích meduloblastomu a rovněž v RNA z lidského mozečku. Medián exprese v referenční RNA (Human Brain, Cerebellum Total RNA), činil 0,0065 % exprese beta-aktinu, u meduloblastomu 0,0192 % exprese beta-aktinu (rozsah 0,0008 % - 0,0749 %). Medián up-regulace TAp73 jednotlivých vzorků (MBL:N) činil 2,95 (rozsah 0,13 - 11,52). Byl pozorován trend k nádorově specifické overexpresi TAp73, vzhledem k limitovanému počtu vyšetřených vzorků nádoru však nebylo dosaženo statistické významnosti (p=0,194). (Graf 1a., Obr. 1)

Obrázek 1



Real-time PCR analýza exprese TAp73 a housekeepingového genu (beta-aktin), je znázorněn reprezentativní amplification plot.

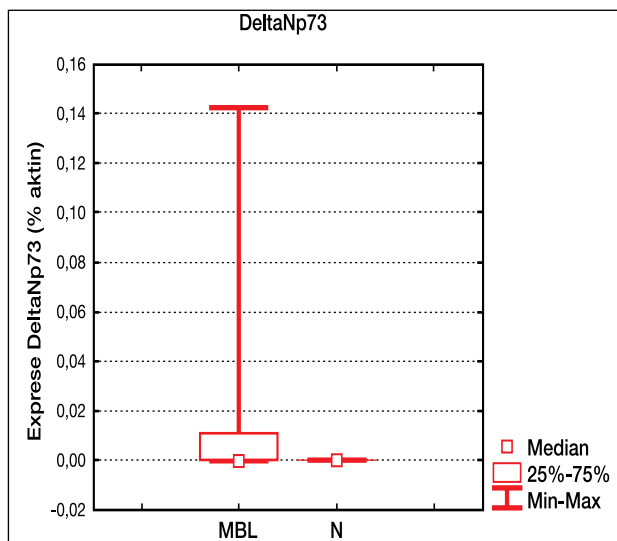
Graf 1a



Normalizovaná exprese TAp73 (a), Δ Np73 (b) a p73 Δ ex2 (c). Box-ploxy znázorňují medián, 25. a 75. percentil a rozsah normalizované exprese cílových transkriptů v nádorové tkáni meduloblastomu (MBL, $n=11$), pro srovnání je vyneseno medián normalizované exprese v referenční RNA mozečku od 24 zdravých dárců (N).

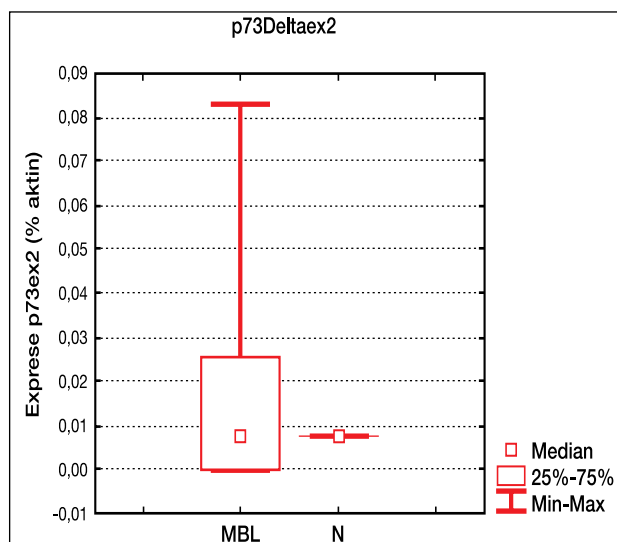
Δ Np73 exprese byla detekována u 5 z celkem 11 vyšetřených vzorků meduloblastomu. Medián exprese v referenční RNA z mozečku byl nulový. Rozsah hodnot exprese v nádorové tkáni činil 0 - 0,1428 % exprese beta-aktinu. Byla pozorována signifikantně zvýšená exprese Δ Np73 v našem souboru tkáně meduloblastomu ($p=0,0175$) (Graf 1b.)

Graf 1b



p73 Δ ex2 exprese byla detekována u 8 z 11 vyšetřených vzorků meduloblastomu a rovněž v referenční RNA z lidského mozečku. Medián exprese v referenční RNA činil 0,0084 % exprese beta-aktinu, u meduloblastomu 0,0077 % exprese beta-aktinu (rozsah 0 - 0,0828 %). Medián hodnot exprese v jednotlivých vzorcích nádoru ku referenční RNA (MBL:N) byl 0,92 (rozsah 0 - 9,86). Nebyl pozorován trend k nádorově specifické overexpresi p73 Δ ex2 v našem souboru pacientů, toto zjištění je však limitováno malým počtem vyšetřených vzorků, u 4 z 11 vzorků přesahuje normalizovaná hodnota 75. percentil exprese v referenční RNA mozečku. (Graf 1c.)

Graf 1c



Imunohistochemická detekce p73 α a Δ Np73

V souboru 23 histopatologicky vyšetřených meduloblastomů bylo dle morfologických kritérií WHO klasifikováno 17 nádorů jako klasický podtyp, 5 meduloblastomů bylo desmoplastických, 1 velkobuněčný. Byla provedena imunohistochemická detekce p73 α a Δ Np73, jako pozitivní byl hodnocen výsledek, při němž došlo k požadované reakci u více než 1 % buněk nádorové populace. Plexus choroideus byl užít jako pozitivní kontrola p73 α i Δ Np73 [28] (Obr. 2. A,B); v případě p73 α sloužila za pozitivní kontrolu rovněž epidermis, vykazující jadernou pozitivitu v parabazální vrstvě buněk [29]. 14 z 23 (61 %) vyšetřených meduloblastomů bylo p73 α pozitivních, vzorky vykazovaly difúzní jadernou i cytoplasmatickou pozitivitu, která v 6 případech přesáhla 10 % buněk (Obr. 2. C,E).

9 z 23 vzorků (39 %) bylo Δ Np73 pozitivních, byla detekována pouze cytoplasmatická exprese Δ Np73 (Obr. 2. D,F). Společná exprese Δ Np73 a α -řetězce (protein Δ Np73 α) byla prokázána v 7 z 9 Δ Np73 pozitivních vzorků. Vždy se jednalo o Δ Np73 pozitivitu v menším procentu buněk oproti α -řetězci, pouze u 2 vzorků překročila Δ Np73 pozitivita 10 % buněk nádoru. U dvou vzorků byla prokázána Δ Np73 pozitivita (v jednom případě pouze fokální) při negativitě α -řetězce. Nebyl detekován specifický vzorec exprese v desmoplastických meduloblastomomech ve srovnání s klasickým histologickým podtypem, toto pozorování je však omezeno počtem analyzovaných vzorků.

Imunohistochemie vs. real-time PCR detekce TP73 izoforem
9 vzorků bylo možno analyzovat metodou real-time PCR i imunohistochemicky. Detekce mRNA Δ Np73 korelovala s imunohistochemickou pozitivitou v 5 z 9 případů. Jednou byla pozorována nízká exprese transkriptu Δ Np73 a fokální imunohistochemické značení nepřesahující 1 % buněk preparátu, třikrát byla detekována pozitivita na úrovni proteinu a nikoliv mRNA. Vzorek vykazující nejvyšší expresi mRNA Δ Np73 byl imunoreaktivní v 50 % buněk preparátu, což byla rovněž nejvyšší pozitivita z vyšetřených meduloblastomů. 4 z 9 vzorků hodnocených oběma metodami mělo méně než 1 % p73 α -imunoreaktivních buněk, šlo o meduloblastomy, u nichž na úrovni mRNA byla detekována nízká a v jednom případě střední exprese TAp73 a zároveň žádná či nízká exprese transkriptů p73 Δ ex2 a Δ Np73.

Korelace exprese izoforem TAp73, Δ Np73, p73 Δ ex2 s expresí TRKC, MYCC - genů s dokumentovaným prognostickým významem u meduloblastomu

Neprokázali jsme korelaci mezi expresí transkriptů jednotlivých

vých izoforem p73 a protoonkogenu MYCC či neurotrophinového receptoru TRKC ($p > 0,05$, Spearmanův korelační koeficient).

Diskuse

Naše výsledky prokazují expresi N-terminálních izoforem p73 (TAp73, Δ Np73, p73 Δ ex2) u meduloblastomu, maligního embryonálního nádoru centrální nervové soustavy. Ve srovnání se zdravou tkání mozečku, z níž tento nádor histogeneticky vzniká, jsme prokázali metodou real-time PCR zvýšení exprese transkriptu Δ Np73 a trend k zvýšení exprese TAp73. Imunohistochemické značení potvrdilo pozitivitu Δ Np73 u více než třetiny vyšetřených nádorů. Rovněž imunoreaktivita p73 α pozorovaná u více než poloviny vzorků nepřímo svědčí pro skutečnost, že jsou exprimovány i další N-terminální izoformy p73, což je v souladu s analýzou na úrovni mRNA. Podíl p53-homologního proteinu p73 maligním fenotypu buňky byl dokumentován u řady nádorů [8,9,20-29]. Dle současných prací přibývá důkazů, že zvýšená exprese Δ TA forem p73, především Δ Np73, je u některých nádorů nepříznivým prognostickým znakem. Dobře je tato skutečnost dokumentována především u karcinomů - hepatocelulárního karcinomu, karcinomu plic, prsu, kolorekta, ovaria [21,22,27,28] a rovněž u neuroblastomu [23,39]. Překvapivě jen málo pozornosti je věnováno průkazu p73 v dalších nádorech neuronální histogeneze, přestože jsou p53 i p73 významně zapojeny v regulaci apoptózy a diferenciace v tkáni periferního i centrálního nervového systému [16,30,31]. Autorům předkládané práce není známa jiná studie zkoumající zastoupení TA vs. Δ TA N-terminálních izoforem u meduloblastomu. Jednou z mála prací zabývajících se expresí TP73 u mozkových nádorů je publikace Loiseau H. et al. [24], která prokazuje, pomocí semi-kvantitativní RT-PCR s primery neumožňujícími rozlišit TAp73 vs. Δ TAp73, zvýšenou expresi transkriptu p73 u ependymomu. Analyzovány byly v této práci i další vybrané nádory CNS, z nichž některé vzorky anaplastických astrocytomů a meduloblastomů vykazovaly zvýšený obsah mRNA p73. Ugur H. et al. [40] podal důkaz overexpresí mRNA TAp73 u 8 z 12 a Δ Np73 u 3 z 12 vyšetřených vzorků multiformního glioblastomu. Imunohistochemicky byl detekován protein p73 α/β v nádorové tkáni ependymomu, kraniofaryngeomu a některých vzorcích high-grade gliomů [41,42]. Mutační analýza p73 nedetekovala u meduloblastomu přítomnost mutace (soubor 5 vyšetřených vzorků) [43], analýza metylace TP73 prokázala tuto epigenetickou změnu u 2 z 11 vyšetřených meduloblastomů [44].

Meduloblastom představuje přibližně 20 % všech primárních nádorů mozku dětí, je nejčastějším maligním nádorem centrální nervové soustavy dětského věku. Dle klinických ukazatelů rozlišujeme onemocnění standardního a vysokého rizika, komplexní péče ve specializovaných centrech dět-

ské onkologie dosahuje 5-letého přežití bez progresu u 65-80 % pacientů standardního, avšak jen u 25-40 % pacientů vysokého rizika [45,46]. Protinádorová léčba je spjata s dlouhodobými nežádoucími účinky na dětský organismus, především s poruchami růstu, insuficiencí žláz s vnitřní sekrecí a s trvalým snížením kognitivních schopností. Nové poznatky nádorové biologie a klinická zkušenost ukazují, že meduloblastom je heterogenním onemocněním, všeobecně přijaté stratifikační ukazatele, jako jsou Changova klasifikace a rozsah resekcí nádoru, nedostatečně vystihují biologickou povahu nádoru [46]. Nejčastěji popisovanými možnými biologickými prediktory meduloblastomu jsou neurotrofinový receptor TrkC a neuregulinový receptor ErbB2 (Her-2/neu) a dále protoonkogeny MYCC a MYCN. Vysoká exprese MYCC a nízká exprese TRKC jsou přijímány, byť ne obecně, za biomarkery s negativním prognostickým významem [34-36]. V práci Nakagawary A. [47] lze najít model hypotetizující zapojení proteinů rodiny p53, v prvé řadě Δ Np73, v signální kaskádě inhibice neurotrofinových receptorů Trk v neuronální tkáni. V naší práci jsme neprokázali společnou down- či upregulaci exprese TRKC či MYCC s expresí izoforem TP73 jako nepřímý důkaz možného prognostického významu exprese izoforem p73 u meduloblastomu. Asociace zjištěných biologických dat s klinickým ukazatelem přežití v našem souboru prozatím nebyla provedena pro krátký medián sledování pacientů. Prospektivní vyšetřování izoforem p73 u meduloblastomu, spolu s výzkumem dalších členů rodiny proteinu p53, nám v budoucnu umožní vyvodit závěry stran vzájemných vztahů TAp73 vs. Δ TAp73 a jejich prognostického významu.

Závěr

Na základě pozorované zvýšené exprese Δ Np73 a TAp73 v některých vzorcích meduloblastomu ve srovnání s referenční nenádorovou tkání mozečku vyvozujeme, že exprese izoforem p73 se může podílet na molekulární podstatě tumorogeneze tohoto onemocnění. Definujeme TP73 jako vhodný kandidátní gen pro další studium jeho prognostického a terapeutického významu u meduloblastomu.

Poděkování

Práce vznikla za podpory grantových prostředků shromážděných při Běžích Terryho Foxe pořádaných Českou obcí sokolskou v roce 2004. Částečně byla podpořena grantem FRVŠ 1303/05. Autoři děkují prim. Dr. R. Čufíkovi (FN Ostrava-Poruba) a prof. Dr. S. Němečkovi (FN Hradec Králové) za zapůjčení některých parafinových bloků pacientů léčených na KDO LF MU a FN Brno, a Dr. P. Müllerovi (MOÚ Brno) za poskytnutí plasmidu s amplikonem TAp73. J.K. a I.Z. přispěly ke vzniku práce stejným dílem.

Literatura

1. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307-310.
2. Nenutil R, Smardova J, Pavlova S et al.: Discriminating functional and non-functional p53 in human tumours by p53 and MDM2 immunohistochemistry. *J Pathol* 2005;207:251-259.
3. Kaghad M, Bonnet H, Yang A et al.: Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-819.
4. Yang A, Walker R, Bronson R et al.: p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant negative activities. *Mol Cell* 1998;2:305-316.
5. Česková P, Valík D, Vojtěšek B: What we currently know about the structure and function of the p53 homologue - p73 protein: facts, hypotheses and expectations. *Folia Biologica (Praha)* 2003;49:1-8.
6. Ikawa S, Nakagawara A, Ikawa Y: p53 family genes: structural comparison, expression and mutation. *Cell Death Differ* 1999;6:1154-1161.
7. Yang A, Walker N, Bronson R et al.: p73-deficient mice have neurological, phenomonal and inflammatory defects, but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000;404:99-103.
8. Moll UM, Slade N: p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004;2:371-386.
9. Ozaki T, Nakagawara A: p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. *Cancer Sci* 2005;96:729-737.
10. Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A et al.: Transactivation-deficient Δ TA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res* 2002;62:3598-3602.
11. Fillippovich I, Sorokina N, Gatei M et al.: Transactivation-deficient p73 α (p73 Δ exon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene* 2002;20:514-522.
12. Goldschneider D, Million K, Meiller A et al.: The neurogene BTG2/TIS21/PC3 is transactivated by ?Np73a via p53 specifically in neuroblastoma cells. *J Cell Sci* 2005; 118:1245-1253.
13. Lissi NA, Davis PK, Irwin M et al.: A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* 2000;407:642-5.

14. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ et al.: The tyrosin kinase c- Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999;399:806-809.
15. Yuan ZM, Shioya T, Ishiko T et al.: p73 is regulated by tyrosin kinase c- Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 1999;399:814-817.
16. Pozniak CD, Radinovic S, Yang A et al.: An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* 2000;289:304-306.
17. Miller FD, Pozniak CD, Walsh GS: Neuronal life and death: an essential role for the p53 family. *Cell Death Differ* 2000; 7:880-888.
18. Saifudeen Z, Diavolitis V, Stefkova J et al.: Spatiotemporal switch from deltaNp73 to TAp73 isoforms during nephrogenesis: impact on differentiation gene expression. *J Biol Chem* 2005;280:23094-102.
19. De Laurenzi V, Rossi A, Terrinoni A et al.: p63 and p73 transactivate differentiation gene promoters in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:342-346.
20. Stiewe T, Tuve S, Peter M et al.: Quantitative TP73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:626-633.
21. Müller M, Schilling M, Sayan AE et al.: TAp73/DNp73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ* 2005;12, 564-1577.
22. Concin N, Becker K, Slade N et al.: Transdominant Δ TAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res* 2004;64:2449-2460.
23. Douc-Rasy S, Barrois M, Echeynne M, et al. DeltaN- p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. *Am J Pathol* 2002;160:631-639.
24. Loiseau H, Arsaut J, Demotes-Mainard J: p73 gene transcripts in human brain tumors: overexpression and altered splicing in ependymomas. *Neurosci Lett* 1999;263:173- 176.
25. Nozaki M, Tada M, Kashiwazaki H et al.: p73 is not mutated in meningiomas as determined with a functional yeast assay but p73 expression increases with tumor grade. *Brain Pathol* 2001;11: 296-305.
26. Zaika AI, Slade N, Erster SH et al.: Δ Np73, a dominant- negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up- regulated in human tumors. *J Exp Med* 2002;196:765-780.
27. Uramoto H, Sugio K, Oyama T et al.: Expression of Δ Np73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10:6905-6911.
28. Domínguez G, García JM, Pena C et al.: Δ TAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53 and E2F- 1. *J Clin Oncol* 2006; DOI: 10.1200/JCO.2005.02.2350
29. Rejthar A, Nenutil R., Češková P et al.: p53 homologní proteiny: jedna rodina - rozdílné funkce? Jejich exprese je alterována při přechodu z prekancerózy do invazivního spinocelulárního karcinomu. *Klin Onkol* 2003;16:54-59.
30. Pozniak CD, Barnbė-Heider F, Rymar V et al.: p73 is required for survival and maintenance of CNS neurons. *J Neurosci* 2002;22:9800-9809.
31. Mayer G, Perez-Garcia CG, Abraham H et al.: Expression of p73 and reelin in the developing human cortex. *J Neurosci* 2002;22:4973-4986.
32. Fogarty MP et al.: Morphing into cancer : the role of developmental signaling pathways in brain tumor formation. *J Neurobiol* 2005;64:458-475.
33. Marino S: Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control. *Trends in Mol Med* 2005;11:17-22.
34. Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK et al.: Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12867-71.
35. Grotzer MA, Janss AJ, Fung K-M et al.: TrkC expression predicts good clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors. *J Clin Oncol* 2000;18:1027-1035.
36. Grotzer MA, Hogarty MD, Janss AJ et al.: MYC messenger RNA expression predicts survival outcome in childhood primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:2425-33.
37. Witter C, Hahn M, Kaul K (Eds.) *Rapid Cycle Real-Time PCR - Methods and Applications, Quantification*. Berlin: Springer. 2004.
38. Sayan AE, Paradisi A, Vojtesek B et al.: New antibodies recognising p73: comparison with commercial antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:186-193.
39. Casciano I, Mazzocco K, Boni L, et al. Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ* 2002;9:246 -251.
40. Ugur H, Sayan AE, Ozdamar SO et al.: Expression of TAP73 and Delfa NP73 in malignant gliomas. *Oncol Rep* 2004;11:1337-1341.
41. Kamyia M, Nakazato Y: The expression of p73, p21 and MDM2 proteins in gliomas. *J Neurooncol* 2002;59:143-149.
42. Momota H, Ichimiya S, Ikeda T et al.: Immunohistochemical analysis of the p53 family members in human craniopharyngeomas. *Brain Tumor Pathol* 2003;20:73-77.
43. Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P et al.: Mutation analysis of the p73 gene in nonastrocytic brain tumours. *Br J Cancer* 2001;85:204-208.
44. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Lomas J et al.: Epigenetic changes in pilocytic astrocytomas and medulloblastomas. *Int J Mol Med* 2003;11:655-660.
45. Ellison DW, Clifford CS, Gajjar A et al.: What's new in neuro-oncology? Recent advances in medulloblastoma. *Eur J Paediatr Neurol* 2003;7:53-66.
46. Gajjar A, Hernan R, Kocak M et al.: Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma. *J Clin Oncol* 2004;22: 984-993.
47. Nakagawara A: Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett*;169:107- 114;2001.

Došlo: 31. 1. 2006
Přijato: 3. 4. 2006

ZHODNOCENÍ LÉČBY PACIENTEK S DIAGNÓZOU KARCINOMU ČÍPKU DĚLOŽNÍHO LÉČENÝCH SAMOSTATNOU RADIOTERAPIÍ VERSUS KONKOMITANTNÍ CHEMORADIOTERAPIÍ

EVALUATION OF TREATMENT OF PATIENTS WITH CERVICAL CANCER TREATED BY RADIOTHERAPY ALONE VERSUS CONCURRENT CHEMORADIOTHERAPY

KMONÍČKOVÁ E.¹, PAVLOVIČOVÁ H.²

¹Ústav radiační onkologie 1.LF UK, FN Bulovka Praha 8

²ÚAMVT PŘF UK Praha

Souhrn

Cílem šetření bylo retrospektivní porovnání výsledků léčby a vedlejších účinků u pacientek s pokročilým karcinomem čípku děložního léčených samostatnou radioterapií versus konkomitantní chemoradioterapií. 193 pacientek bylo rozděleno do dvou skupin podle způsobu léčby, který podstoupily. 93 pacientek léčených radikální samostatnou či adjuvantní radioterapií tvořilo první skupinu a 100 žen léčených radikální či pooperační chemoradioterapií druhou skupinu. **Metodou** Kaplan-Meier na 5% hladině významnosti jsme porovnávaly dobu do relapsu a dobu přežívání mezi těmito dvěma skupinami pacientek. Celkově mezi oběma způsoby léčby statisticky významný rozdíl mezi dobou do relapsu či délkou přežití nebyl prokázán. Pokud se však vzaly v úvahu pouze pacientky s pozitivními lymfatickými uzlinami, pak s ohledem na délku doby do relapsu (Log Rank test, $p=0,023<0,05$) i na celkovou dobu přežití (Log Rank test, $p=0,012<0,05$) se konkomitantní chemoradioterapie ukázala jako efektivnější způsob léčby. Po dvou resp. pěti letech bylo bez relapsu 74,2% resp. 67,0% pacientek léčených konkomitancí a 62,7% resp. 31,3% pacientek po samostatné radioterapii. Po uplynutí doby dvou resp. pěti let přežívalo 81,7% resp. 73,8% pacientek léčených konkomitancí a 78,9% resp. 35,4% pacientek léčených samostatnou radioterapií. S výjimkou akutní gastrointestinální toxicity a časně toxicity močového traktu byla celkově toxicita léčby konkomitantní chemoradioterapií hodnocena Chí-kvadrát testem jako statisticky významně vyšší.

Klíčová slova: karcinom čípku děložního, radioterapie, konkomitantní chemoradioterapie

Summary

The purpose of the retrospective study was to determine whether concurrent chemoradiotherapy is better than radiotherapy alone in respect of treatment results and side-effects of patients with advanced cervical carcinoma. The total number of patients included in the study was 193. Patients were divided into two groups. 93 patients were treated with adjuvant radiotherapy or radiotherapy alone and 100 patients were treated with radical or adjuvant concurrent chemoradiotherapy. DFS (Disease-Free Survival) and OS (Overall Survival) were compared between the two patient groups by the Kaplan-Meier method at 5% of significance level. In general, there was no significant difference between DFS and OS of patients in the two tested groups. However, when only the patients with positive lymph nodes were analysed, then chemoradiotherapy has proved to be more efficient therapy in terms of DFS duration (Log-Rank test, $p=0,023<0,05$) and OS duration (Log-Rank test, $p=0,012<0,05$). 74,2% (67,0% resp.) patients treated by chemoradiation and 62,7% (31,3% resp.) patients treated by radiation alone were without relaps after 2 (5 years resp.). 81,7% (73,8% resp.) patients treated by chemoradiation and 78,9% (35,4% resp.) patients treated by radiation alone were alive after 2 (5 years resp.). With the exception of acute gastrointestinal and early urinary tract toxicity, the general toxicity in concurrent chemoradiotherapy was significantly higher when evaluated by Chi-square test.

Key words : cervical cancer, radiotherapy, concurrent chemoradiotherapy

Úvod:

Karcinom děložního čípku je řazen celosvětově mezi hlavní zdravotní problémy. Od počátku 80.let je u nás výskyt zhoubného novotvaru čípku děložního relativně stálý a pohybuje se kolem 20-21 onemocnění na 100 000 žen, v roce 2002 to byly

4% všech nově hlášených novotvarů v naší republice. Ve stejném roce bylo hlášeno 399 úmrtí na tuto diagnózu [1]. Nejlepších léčebných výsledků dosahujeme u pacientek s iniciálním stádiem onemocnění. 5-leté přežití pro stádium IB2-IIIB je v literatuře udáváno 60-70%, pro stádium IIIA 25-30%, IIIB

25-30% a 10-15% pro stadium IVA [2]. Tradiční léčbou invazivního karcinomu čípku děložního bylo operativní řešení a radioterapie, v některých případech kombinace obou těchto léčebných modalit. Pro lokálně pokročilá stadia onemocnění (stádium IIB a vyšší) se stala radioterapie metodou volby. Pro pacientky s takto pokročilým onemocněním klesá šance na úplné vyléčení především s velikostí primárního nálezu, podstatně horší prognózu přežívání mají ženy s metastatickým postižením spádových lymfatických uzlin. I s nástupem zvýšení celkové dávky radioterapie, nástupem kvalitnějších ozařovacích přístrojů a plánovacích programů, zlepšením a zpřesněním ozařovacích technik i využitím dalších léčebných modalit, jako např. hypertermie, radioterapie těžkými částicemi, léčba alternativními frakcionačními režimy, zavedením HDR brachyradioterapie, užití hypoxie se výsledky léčby od šedesátých let příliš nezlepšily [3].

V posledních letech demonstrovalo několik randomizovaných celosvětových studií zlepšení přežívání při konkomitantním podávání chemoterapie s radioterapií. Studie šetřily a porovnávaly různé cytostatické preparáty, porovnávaly různé režimy podání chemoterapie, hodnotily DFS, OS, toxický efekt léčby [4,5,6,7]. Chemoterapie v konkomitanci s radioterapií se ukázala jako potenciační agens pro usmrcování tumorozních buněk, dále jako inhibitor reparačních procesů po radiačním poškození buněk a induktor buněčné synchronizace. Přínos chemoterapie je také v tom, že způsobuje recruitment buněk z G0 fáze do buněčného cyklu a především zmenšuje nádorovou masu, čímž zbývá menší objem tumoru jako cíl pro další léčebnou modalitu.

Jako vhodný agens k potenciaci radioterapie u pokročilého karcinomu čípku děložního doporučila většina publikovaných prací cisplatinu [2,8,9,10,11,12,13,14,15].

Cisplatin má navíc jen omezenou hematologickou toxicitu, takže její použití nebývá důvodem přerušení cyklu radioterapie, čímž nedojde k prodloužení celkového léčebného procesu [3].

Metody a materiál:

Od roku 1999 jsme na Ústavu radiační onkologie FNB a 1.LF zařadili do léčebného protokolu konkomitantní chemoradioterapii pro pacientky s pokročilým karcinomem čípku děložního tam, kde takovou léčbu umožňuje celkový stav pacientky, její ledvinné funkce a hematologické parametry. Léčbu konkomitantní chemoradioterapií navrhujeme tedy všem pacientkám s nádorem velikosti T2b a výše a všem pacientkách s pozitivními lymfatickými uzlinami. Pacientky s pokročilým onemocněním, které ale nesplňují podmínky podání cisplatinu, jsou léčeny tak, jak tomu bylo před zavedením konkomitance, tedy radikální samostatnou radioterapií. Pacientky jsou před zahájením léčby podrobně informovány o způsobu léčby, jejím průběhu a event. vedlejších komplikacích a podepisují informovaný souhlas s léčbou.

Charakteristika pacientek:

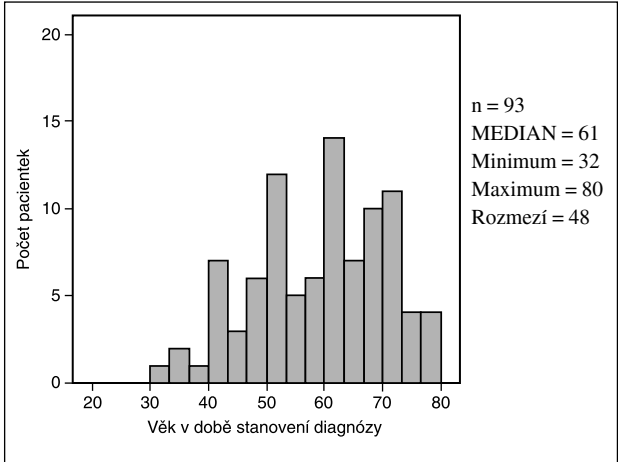
V této studii byla zpracována data 193 pacientek, 93 žen bylo léčeno samostatnou radikální nebo pooperační radioterapií, 100 pacientek bylo léčeno konkomitantní radikální anebo pooperační chemoradioterapií (tab.č.1). Do studie jsme zařadily ženy léčené v časovém rozmezí r. 1997 – 2003.

Tabulka č.1.: Počty pacientek podle typu léčby a podstoupení operace

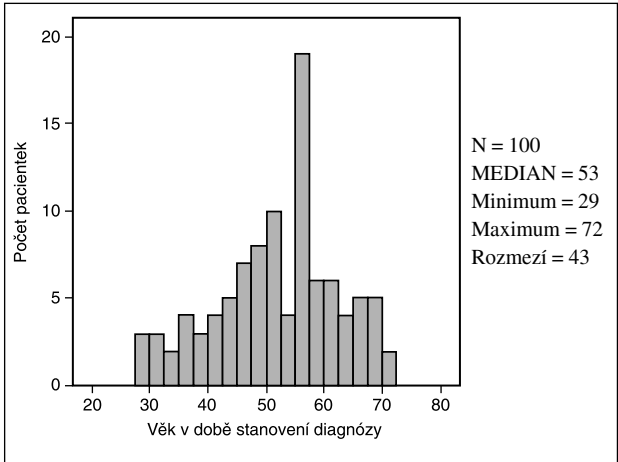
Typ léčby	Postup léčby	Počet	%
Samostatná radioterapie	operace nepředcházela	78	83,9
	operace předcházela	15	16,1
	Total	93	100
Konkomitantní chemoradioterapie	operace nepředcházela	67	67,0
	operace předcházela	33	33,0
	Total	100	100

Věkové rozvrstvení obou skupin znázorňují grafy č.1a, 1b. Zastoupení pacientek dle TNM stádia onemocnění ukazují tabulky č.2, č.3 a č.4. V obou skupinách převažují pacientky s onemocněním stádia T2b. Histologický nález spinocelulárního karcinomu zvysoka dominuje v obou skupinách (tab.č.5). Grading onemocnění prezentuje tab.č.6.

Graf č. 1a: Histogram věku pacientek léčených samostatnou radioterapií



Graf č. 1b: Histogram věku pacientek léčených konkomitantní chemoradioterapií



Tabulka č. 2.: Počty pacientek podle typu léčby a stagingu tumoru

Staging Tumoru	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
T1a2+T1b1	2	2,2	4	4,0
T1b2	6	6,5	29	29,0
T2a	5	5,4	3	3,0
T2b	59	63,4	53	53,0
T3a	1	1,0	1	1,0
T3b	20	21,5	10	10
Total	93	100	100	100

Tabulka č. 3.: Počty pacientek podle typu léčby a stavu mizních uzlin

Stav mizních uzlin	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
N0	74	79,6	52	52,0
N1	19	20,4	48	48,0
Total	93	100	100	100

Tabulka č. 4.: Počty pacientek podle typu léčby a přítomnosti metastáz

Přítomnost metastáz	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
M1	4	4,3	5	5,0
M0	89	95,7	95	95,0
Total	93	100	100	100

Tabulka č.5.: Počty pacientek podle typu léčby a histologie

Histologie	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
adenoCa	7	7,5	7	7,0
clearcell Ca	-	-	1	1,0
malobuněčný	-	-	3	3,0
nediferencovaný	3	3,2	3	3,0
spinocelulární	82	88,2	85	85,0
velkobuněčný	1	1,1	1	1,0
Total	93	100	100	100

Tabulka č. 6.: Počty pacientek podle typu léčby a gradingu

Grading	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
G1	6	6,5	12	12,0
G2	24	25,8	45	45,0
G3	35	37,6	32	32,0
G4	6	6,5	4	4,0
G neuveden	22	23,7	7	7,0
Total	93	100	100	100

Radioterapie:

Teleradioterapie byla u všech pacientek prováděna na lineárním urychlovači. Ve všech případech byla malá pánev ozářena technikou box, v případě ozáření paraaortálních uzlin technikou dvou kontra polí. Cílovým objemem byl primární nádor, celá děložní dutina a spádové lymfatické uzliny. Indikací rozšíření cílového objemu na paraaortální oblast byla pozitivita společných ilických uzlin anebo pozitivita paraaortálních uzlin.

Ve všech případech byla použita normofrakcionace 200 cGy denně, 5 frakcí v týdnu, CD byla od 4400-4800 cGy na celou oblast malé pánve, v případě navýšení dávky na parametria byla tato dávka 1000-1400 cGy. Oblast parametrií byla-li ozářena, tedy dávkou 4400 cGy.

Pro brachyterapii byl použit přístroj Selectron LDR s dávkovým příkonem 120-150 cGy/hod. Výkon prováděl ve všech případech stejný lékař. Brachyterapie byla provedena ve dvou frakcích s celkovou dávkou 3500 cGy do bodu A. U 13 pacientek z celého souboru nebyla brachyterapie provedena (tab.č.7). Medián délky radioterapie byl 45 dní u obou skupin léčených žen.

Tabulka č.7 Počty pacientek podle typu léčby a radioterapie

Typ radioterapie	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
ozářena MP + brachyterapie	81	87,1	91	91,0
ozářena MP, PA uzliny+brachyterapie	3	3,2	5	5,0
ozářena malá pánev	8	8,6	3	3,0
ozářena malá pánev a PA uzliny	1	1,1	1	1,0
Total	93	100	100	100

Chemoterapie:

CDDP byla použita v dávce 40 mg/m2, infuze s hydratací. Preparát byl podáván lx v týdnu během cyklu radioterapie. Průměrný počet cyklů chemoterapie byl 4,5 , modus 5 cyklů. Léčba konkomitantní chemoterapií byla přerušena při snížené kreatininové clerence a léčba byla ukončena při leukopenii pod 2 x10 9/l, při anemii, nebo odmítla-li pacientka další aplikaci chemoterapie.

Toxicita léčby:

Toxicitu jsme hodnotily 4-škálovou stupnicí WHO a UICC [16,17,18,19,20,21]. Hodnotily jsme akutní hematologickou toxicitu během léčby, akutní potíže ze strany gastrointestinálního a močového traktu. Dále jsme hodnotily pozdní toxické projevy gastrointerstiniálního a močového traktu.

Výsledky:

Sledovaly jsme dobu do relapsu onemocnění a místo relapsu (tab.č.8 a č.9). Bylo provedeno porovnání délky doby do relapsu mezi oběma skupinami pacientek metodou kumulativního přežívání podle Kaplan-Meier na 5% hladině významnosti. Pokud nebyly pacientky rozděleny podle toho, zda měly negativní či pozitivní lymfatické uzliny, pak signifikantní rozdíl nebyl prokázán (Log Rank test, p=0,296>0,05) (graf č.2).

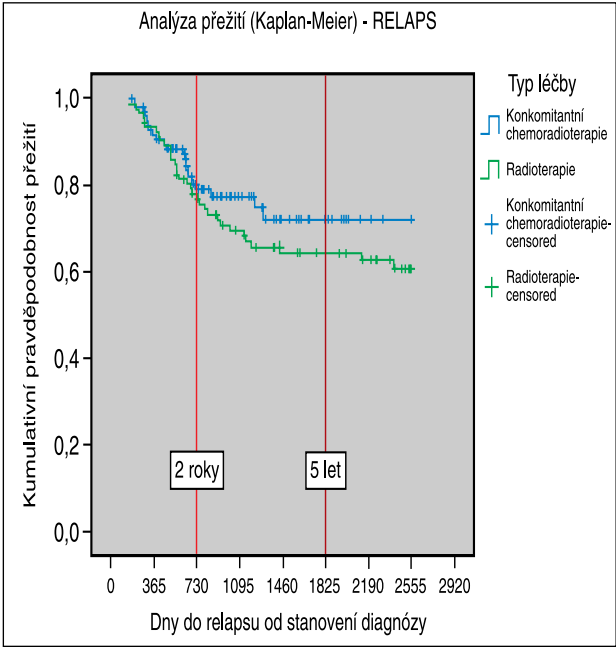
Tabulka č. 8.: Počty pacientek podle typu léčby a výskytu relapsu

Relaps	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
ANO	34	37,0	22	22,0
NE	59	63,0	78	78,0
Total	93	100	100	100

Tabulka č.9 Počty pacientek podle typu léčby a místa výskytu relapsu

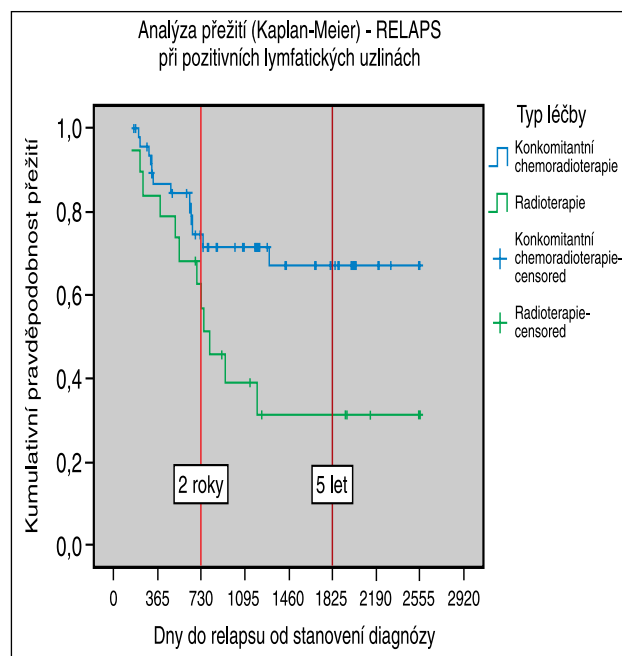
Místo relapsu	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
lokální	8	23,5	2	9,1
vzdálené metastáze	21	61,8	17	77,3
lokální i vzdálené metastázy	5	14,7	3	13,6
Total	34	100	22	100

Graf č. 2

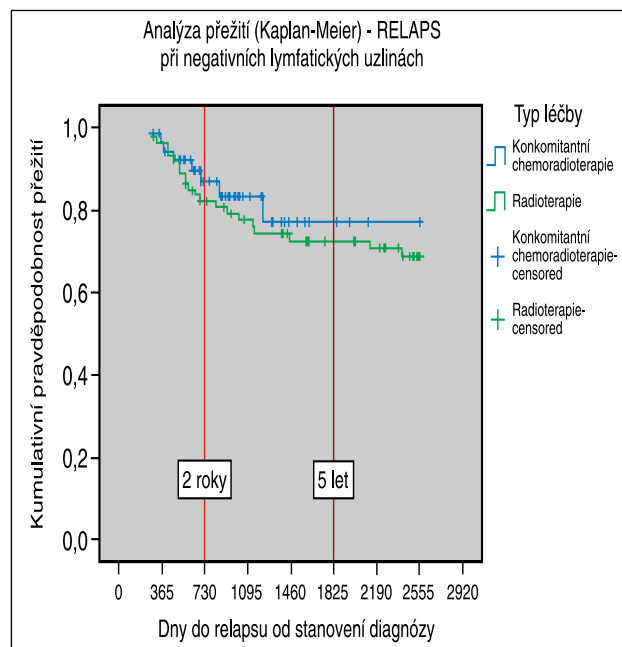


Pokud jsme však vzaly v úvahu pouze pacientky s pozitivními lymfatickými uzlinami, pak s ohledem na délku doby do relapsu ženy léčené konkomitantní chemoradioterapií znatelně profitovaly oproti pacientkám léčeným samostatnou radioterapií (Log Rank test, $p=0,023<0,05$) (graf č.3). Po uplynutí doby 2 let bylo bez relapsu 74,2% patientek skupiny B (konkom.chemorad.) a 62,7% patientek skupiny A (samostatná rad.). Po uplynutí doby 5let kleslo procento patientek bez relapsu u skupiny B na 67,0%, u skupiny A na 31,3%. U patientek s negativními uzlinami nebyl rozdíl mezi skupinou A a B prokázán (Log Rank test, $p=0,524>0,05$) (graf č.4).

Graf č. 3



Graf č. 4

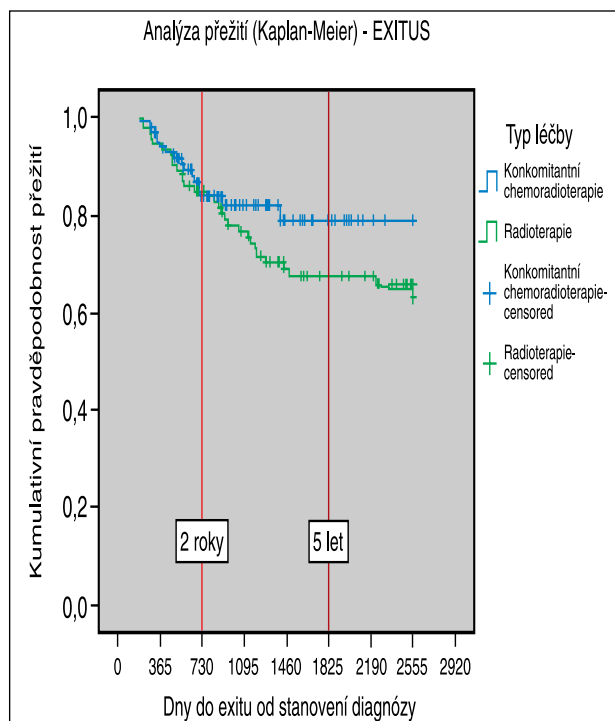


Ke stejným závěrům jsme došli i při hodnocení celkového přežívání.

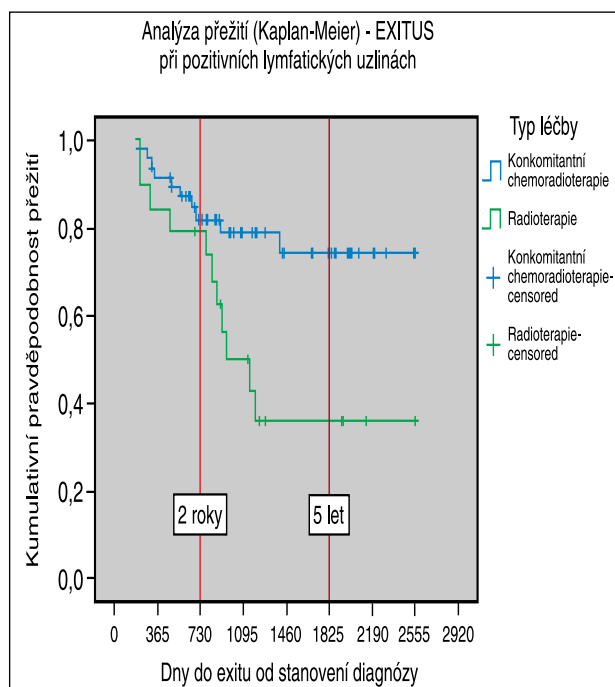
Pokud nebyly pacientky rozděleny podle toho, zda měly negativní či pozitivní uzliny, pak signifikantní rozdíl v době celkového přežívání nebyl prokázán (Log Rank test, $p=0,210>0,05$)

(graf č.5). Pokud se však vzaly v úvahu pouze pacientky s pozitivními uzlinami, pak s ohledem na délku doby do úmrtí se léčba konkomitantní chemoradioterapií ukázala jako efektivnější typ léčby oproti léčbě samostatnou radioterapií (Log Rank test, $p=0,012<0,05$) (graf č.6). Po uplynutí doby 2 let přeživalo 81,7% patientek skupiny B (konkomitantní chemoradioterapie) a 78,9% patientek skupiny A (samostatná radioterapie). Po uplynutí doby 5let kleslo procento přežívajících patientek u skupiny B na 73,8% a u skupiny A na 35,4%. U patientek s negativními uzlinami nebyl rozdíl mezi skupinou A a B prokázán (Log Rank test, $p=0,513>0,05$) (graf č.7). Tabulky č.10 a č.11 ukazují absolutní počet úmrtí a jeho příčiny.

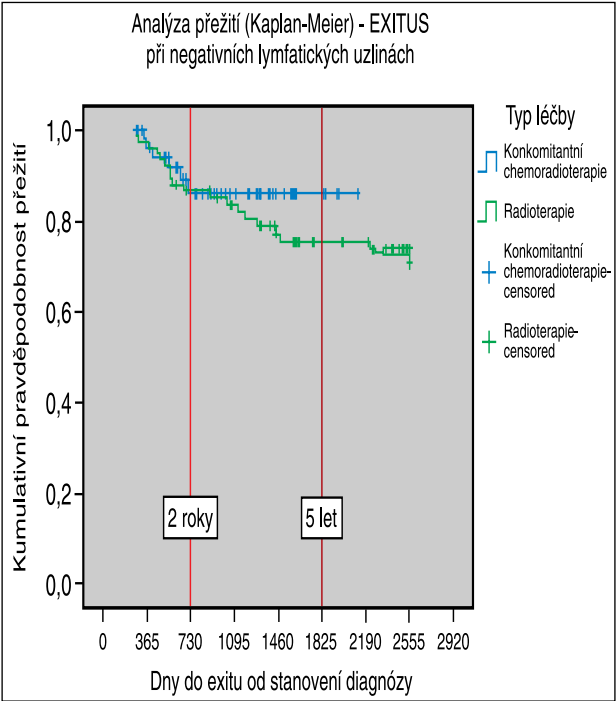
Graf č. 5



Graf č. 6



Graf č. 7



Tabulka č.10.: Počty pacientek podle typu léčby a přežívání

Exitus	Typ léčby			
	Samostatná radioterapie		Konkomitantní chemoradiot.	
	Počet	%	Počet	%
ANO	39	41,9	28	28,0
NE	54	58,1	72	72,0
Total	93	100	100	100

Tabulka č.11.: Počty pacientek podle typu léčby a příčiny exitu

Exitus-příčina	Typ léčby			
	Samostatná radioterapie		Konkomitantní chemoradiot.	
	Počet	očet	Počet	očet
karcinoděložního čípku	30	78,0	16	53,3
komplikace léčby	-	-	2	6,7
z jiného důvodu	4	9,8	3	10,0
neznámý důvod	5	12,2	7	30,0
Total	39	100	28	100

Toxicitu léčby jsme testovali pomocí Chí-kvadrát testu. Akutní hematologickou toxicitu ukazuje tabulka č.12. Pozdní hematologickou toxicitu jsme nezaznamenaly u žádné naší pacientky. Tab.č.13 popisuje akutní toxicitu z hlediska zaživacího traktu, akutní změny močového ústrojí tab.č.14. Pozdní změny v gastrointestinální oblasti jsou zaznamenány v tab.č.15, pozdní toxické projevy močového ústrojí v tab.č.16. S výjimkou akutní gastrointestinální toxicity a časných toxicity močového traktu byla toxicita ve skupině pacientek léčených konkomitantní chemoradioterapií hodnocena jako statisticky významně vyšší.

Tabulka č.12.: Počty pacientek podle typu léčby a akutní hematologické toxicity

Akutní hematologická toxicita	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
G0	81	87,1	41	41,0
G1	12	12,9	49	49,0
G2	0	0,0	9	9,0
G3	0	0,0	1	1,0
G4	0	0,0	0	0,0
Total	93	100	100	100
Total	93	100	100	100

Tabulka č.13 Počty pacientek podle typu léčby a akutní toxicity zaživacího traktu

Akutní toxicita zaživacího traktu	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
G0	30	32,3	21	21,0
G1	48	51,6	65	65,0
G2	15	16,1	13	13,0
G3	0	0,0	1	1,0
G4	0	0,0	0	0,0
Total	93	100	100	100

Tabulka č.14 Počty pacientek podle typu léčby a akutní toxicity močového traktu

Akutní toxicita močového traktu	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
G0	62	66,7	68	68,0
G1	31	33,3	28	28,0
G2	0	0,0	4	4,0
G3	0	0,0	0	0,0
G4	0	0,0	0	0,0
Total	93	100	100	100

Tabulka č.15 Počty pacientek podle typu léčby a pozdní toxicity zaživacího traktu

Pozdní toxicita zaživacího traktu	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
G0	60	64,5	49	49,0
G1	17	18,4	27	27,0
G2	7	7,5	14	14,0
G3	3	3,2	2	2,0
G4	3	3,2	3	3,0
nebylo možno hodnotit	3	3,2	5	5,0
Total	93	100	100	100

Tabulk č.16 Počty pacientek podle typu léčby a pozdní toxicity močového traktu

Pozdní toxicita močového traktu	Typ léčby			
	Samostatná R		Konkomitantní CHR	
	Počet	%	Počet	%
G0	72	77,4	63	63,0
G1	11	11,8	19	19,0
G2	6	6,5	10	10,0
G3	0	0,0	2	2,0
G4	1	1,1	0	0,0
nebylo možno hodnotit	3	3,2	6	6,0
Total	93	100	100	100

Diskuse:

Cílem šetření bylo ověřit na našem souboru pacientek hypotézu, že léčba konkomitantní chemoradioterapií s použitím CDDP u pokročilého karcinomu čípku děložního zvyšuje DFS a prodlužuje celkové přežívání pacientek v porovnání se samostatnou radioterapií. Výsledky řady obdobných studií [12,13,14,15] navrhuji, aby se postup konkomitantní chemoradioterapie stal léčebným standardem. Konkomitantní chemoradioterapie má několik výhod. Jednak dochází k využití synergistu mezi oběma léčebnými modalitami, jednak je odpověď tumoru rychlejší, s vyšší počáteční lokální kontrolou ve srovnání se samostatnou radioterapií. Oproti neoadjuvantní chemoterapii je výhodou okamžitý nástup primární radikální léčby, odstraní se tedy časová prodleva mezi oběma léčebnými metodami, což zabrání nejen vzniku zkrácené resistance, ale také vzniku fenomenu akcelerované repopulace, který neoadjuvantní chemoterapie nastartuje. Myšlenka zlepšit léčebné výsledky podporou radioterapie chemoterapií vznikla v sedmdesátých letech, kdy byla prvním preparátem užitým ke konkomitanci hydroxyurea. Ke zlepšení léčebných výsledků sice došlo, ale hematologická toxicita

zabránila zavedení preparátu do standardních léčebných protokolů. V roce 1994 byly uveřejněny výsledky randomizované studie GOG (protokol 110), ve které bylo porovnáváno užití tří různých režimů - CDDP v monoterapii, CPPD/holoxan, CDDP/dibromdulcitol, přičemž nejefektivnější léčbou se ukázala být kombinace CDDP/holoxan. V roce 1999 pak byly uveřejněny výsledky tří randomizovaných studií týkajících se užití konkomitantní chemoradioterapie u pokročilého onemocnění karcinomem čípku děložního. Shrnutím jejich výsledků bylo signifikantně delší období bez příznaku nemoci a snížení úmrtnosti tam, kde byla podána cisplatin. V porovnání se samotnou cisplatinou neprokázala kombinace více cytostatik lepší léčebné efekty a toxicita léčby byla vyšší [22]. V současnosti neustále probíhají další studie mající za cíl prokázat dlouhodobý benefit konkomitantní chemoradioterapie u pokročilého karcinomu čípku děložního, přičemž se ověřuje také toxicita této kombinované léčby [23]. Dále jsou rovněž testovány nově vznikající cytostatika i další léčebné látky (retinoidy, interferon) a jejich možné uplatnění u pokročilého karcinomu čípku děložního. U našeho souboru pacientek byl prokázán signifikantní rozdíl v délce doby bez relapsu, stejně jako v celkovém přežívání ve smyslu efektivnější konkomitantní léčby oproti samostatné radioterapii pouze u skupiny pacientek s pozitivními lymfatickými uzlinami. Akutní hematologická toxicita byla větší u skupiny žen léčených kombinovanou chemoradioterapií, totéž bylo prokázáno u pozdní toxicity zažívacího i močového traktu. Rozdílná akutní toxicita zažívacího a močového traktu nebyla v našich dvou skupinách rozdílně léčených žen prokázána.

Závěr:
Konkomitantní chemoradioterapie s použitím CDDP se ukázala i v našem souboru pacientek jako metoda, která významně zlepšuje DFS a prodlužuje celkovou dobu přežívání u pacientek s pozitivními lymfatickými uzlinami oproti léčbě samostatnou radioterapií. Nadále zůstává tato kombinovaná metoda léčby součástí našeho léčebného protokolu v indikovaných případech. Práce byla podpořena grantem Nadace Běhu Terryho Foxe

Literatura:

1 Novotvary 2002 ČR – ÚZIS ČR 2005

2 Lehman M., Thomas G. Is concurrent chemotherapy and radiotherapy the new standard of care for locally advanced cervical cancer?. Int J Gynecol Cancer, 11, 87-99, 2001

3 Santin A.D., Hermonat P.L., Ravaggi A. et al. Effects of concurrent cisplatin administration during radiotherapy vs. Radiotherapy alone on the immune function of patients with cancer of the uterine cervix. Int J.Rad.Oncol Biol.Phys., Vol 48, No 4, 997-1006, 2000

4 Peters W.A., Liu P.Y., Barrett R.J. et al. Cisplatin and 5-FU plus radiation therapy are superior to radiation therapy as adjunctive in high-risk early-stage carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: report of a phase III intergroup study. Gynecol Oncol. 72, 443, 1999

5 Whitney C.W., Sause W., Bundy B.N. et al. A randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stages IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative paraaortic lymph nodes. A Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group Study. J Clin Oncol. 17, 1339-1348, 1999

6 Chang H.C.H. et al. Preliminary results of concurrent radiotherapy and chemotherapy with Cisplatinum, Vincristine and Bleomycin in bulky advanced cervical carcinoma. A pilot study. Gynecol.Oncol. 44, 182-188, 1992

7 Omura G.A. Chemotherapy for Cervical Cancer. Seminars in Oncology 21, 1, 54-62, 1994

8 Pearcey R., Brundage M., Drouin P. et al. Phase III trial comparing radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. Jour of Clin Oncology, vol.20, No 4, 966-972, 2000

9 Rose P.G. Chemoradiotherapy for cervical cancer. Europ Journal of Cancer, 38, 270-278, 2000

10 Gillian M.T. Concurrent chemotherapy and radiation for locally advanced

cervical cancer: The new standard of care. Seminars in Rad Onco., vol.10, No 1, 44-50, 2000

12 Rose P.G., Bundy B.N., Watkins E.B. et al. Concurrent cisplatin based chemoradiation improves progression free and overall survival in advanced cervical cancer: Results of a randomized GOG study. N Engl J Med 340, 1137-1143, 1999

13 Keys H.M., Bundy B.M., Stehman et al. A comparison of weekly cisplatin during radiation therapy versus irradiation alone each followed by adjuvant hysterectomy in bulky stage IB cervical carcinoma: A randomized trial of the Gynecologic Oncology Group. N Engl J Med 340, 1154-1161, 1999

14 Morris M., Eifel P.J., Lu J. et al. Pelvis radiation with concurrent chemotherapy versus pelvic and para-aortic radiation for high risk cervical cancer: A Randomized Radiation Therapy Oncology Group study. N Engl J Med 340, 1137-1143, 1999

15 Peters W.A., Liu P.Y., Barrett R.J. et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. J Clin Oncol 18, 1606-1613, 2000

16 Heidemann E., Kaesberger J., Herschbach P. Graduated WHO analogue satisfaction scales for the assessment of quality of life in clinical trials in cancer patients. Oncology 14, 419-426, 1991

17 Monfardini S., Brunner D., Crowther D. et al. Manual of cancer chemotherapy (3rd ed.). UICC Techn. Report Ser. 56, 1981

18 Radiation Therapy Oncology Group : Acute and late radiation morbidity scoring (2 tables). Written communication, 1984

19 Rubin P., Wasserman T.H. The late effects of toxicity scoring. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 14, 29-38, 1988

20 Sauer R. Bericht der Arbeitsgemeinschaft für Radiologische Onkologie (ARO). Mitteilung der Deutschen Krebsgesellschaft 3, 20, 1989

- 21 Seegenschmiedt M.H., Sauer R. Systematik der akuten und chronischen Strahlenfolgen. Strahlentherapie und Onkologie 169, Nr.2, 83-95, 1993
- 22 Omura G. et al. A Randomized trial of Cisplatin Versus Cisplatin+Mito-lactol Versus Cisplatin+Ifosfamid in Advanced Squamous Carcinoma of the Cervix by the Gynecology Oncology Group. Gynecologic Oncology 60, 120-121, 1996
- 23 Kalábová R. Uplatnění chemoterapie ve strategii léčby pokročilého cervikálního karcinomu. Klinická onkologie 15, 170-175, 2002
- 24 Kleinbaum D.G., Klein M. Survival Analysis: A Self-Learning Text. 2nd ed. Hardcover, 2005
- 25 Zvárová J.: Základy statistiky pro biomedicínské obory. J. Zvárová, ed.: Biomedicínská statistika I. Karolinum, Praha, 2001

Došlo: 28. 2. 2006
Přijato: 13. 4. 2006

informace - knihy

OUTCOMES ASSESSMENT IN CANCER - MEASURES, METHODS, AND APPLICATIONS LIPSCOMB, J., GOTAY, C. C. (EDS.)

Cambridge, Cambridge University Press 2005
662 str., 40 obr., 64 tab., cena 90,- GBP. ISBN 0-521-83890-8

Kniha obsahuje 28 kapitol rozdělených do osmi sekcí: kvalita života nemocných se zhoubnými nádory, posuzování kvality života během léčby, posuzování kvality života během života s rakovinou, měření zkušeností a potřeb nemocných a ošetřujících osob, metodologické úvahy při aplikacích výsledků výzkumu, moderní psychometrické teorie ve výzkumu výsledků léčby, posuzování ekonomického dopadu rakoviny, výzkum a jeho strategie. Temata vyžádaných sdělení připojených v závěru knihy: minulost, přítomnost a budoucnost výsledků výzkumu, charakteristiky výsledků měření zdravotního stavu ve 21. století, použití kognitivní dotazovací metody, perspektiva výzkumu výsledků v onkologii z hlediska farmakologického výzkumu. Na tvorbě díla spolupracovalo třicet odborníků z pracovišť v USA, autorský kolektiv poslední vyzvané kapitoly zahrnuje 23 expertů z farmaceutických firem. V textu knihy se pro kvalitu života vztahující se ke zdraví používá zkratka HRQOL (health-related quality of life).

Kapitoly v první sekci jsou věnovány definicím a pojmovým modelům kvality života, obecným nástrojům hodnocení zdravotního stavu pacientů se zhoubnými nádory a úloze preferenčních opatření na podporu výzkumu rakoviny. Existují dvě hlavní skupiny preferenčních metod: přímé, při nichž je přímo pacient dotazován na hodnoty zdravotního stavu a nepřímé postupy, jež se zakládají na stupnici (skóre) hypotetických pre-

ferencí (tzv. multiatributní přístup). Obě tyto skupiny metod jsou zvláště důležité při studiu pacientů s nádory prsu, prostaty, plic a kolorektálním karcinomem; zatím jsou však podceňovány. Hodnocení HRQOL u těchto čtyřech onemocnění je probíráno ve druhé sekci.

Kapitoly ve třetí sekci se zabývají krátkodobými výsledky chemoprevence, testování genetické susceptibilitě a screeningových intervencí, hodnocení kvality života osob přežívajících onemocnění rakovinou a HRQOL na konci života.

Kapitoly ve čtvrté sekci se zaměřují na kritický přehled literatury o zprávách pacientů a hodnocení interpersonálních vztahů jako indikátorů péče o pacienty, doporučení k výzkumu potřeb pacientů a hodnocení subjektivního dopadu péče o pacienty na rodinné příslušníky.

Temata některých kapitol: hodnocení klinických trialů a statistické zpracování (pátá sekce), podstupnice a sumární stupnice HRQOL (šestá sekce), analýza efektivity a nákladů (sedmá sekce) a souhrn výsledků pracovní skupiny pro měření výsledků týkajících se rakoviny (osmá sekce). Text je doprovázen četnými rozsáhlými tabulkami a schémata

Skutečnost, že rakovina se každý rok dotýká milionů lidí na celém světě, se odráží nejen ve statistikách úmrtnosti, ale také na závažných důsledcích na HRQOL, ekonomiku a zdraví pacientů a jejich rodin. Právě o těchto obtížně měřitelných a hodnotitelných parametrech poskytuje kniha bohaté informace. Jak dokumentuje obsáhlá literatura za každou kapitolou, výsledky značného úsilí ve výzkumu uvedených dopadů zhoubných nádorů byly již do značné míry publikovány, editoři díla však soudí, že tato oblast je stále ještě relativně nová a otevírající další perspektivy hledání dokonalejších metod. Informace pro objednání knihy lze nalézt na internetové adrese/www.cambridge.org.

V. H.

ZÁPIS Z JEDNÁNÍ VÝBORU ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI KONANÉHO DNE 13. 6. 2006 V CHOMUTOVĚ

Přítomni: Vorlíček, Aschermannová, Fínek, Eckschlager, Jelínková, Petruželka, Petera, Stáhalová, Stankušová, Žaloudík

Omluveni: Abrahámová, Cwierka, Konopásek, Příbylová, Rob, Vyzula

Hosté: prim. MUDr. Milan Kůta, ing. Milan Burša, MBA, ing. Varga

Členy výboru přivítali ředitel chomutovské nemocnice ing. Milan Burša, MBA a primář onkologie MUDr. Milan Kůta, který pak v přehledné prezentaci seznámil výbor se strukturou, vybavením a rozsahem činnosti chomutovského komplexní onkocentra. Zazněly také záměry konstitovat Severozápadní onkologickou skupinu propojením činností FN Plzeň, nemocnice Chomutov a nemocnice Cheb. V další části pak ing. Varga informoval o kontrole objemu a kvality péče v nemocnici a zejména o srovnávacích analýzách onkologické péče. V diskusi prof. Žaloudík navrhl řediteli nemocnice Chomutov, aby požádal o odkódování dat chomutovské nemocnice v NOR/SVOD a nemocnice tak mohla využívat pro analýzu objemu a kvality péče i této celostátní databáze. Přístup chomutovské nemocnice k analýze dat je nesporně nadprůměrný a příkladný.

Výbor ČOS dodatečně blahopřeje k významnému životnímu jubileu prof. MUDr. Z. Dienstbierovi, DrSc., který se významně zasloužil o rozvoj nukleární medicíny, onkologie a Ligy proti rakovině Praha.

1. Prim. Stankušová podala komplexní informaci o potřebě radioterapie v ČR zohledňující potřeby ČR i srovnání se zahraničím. Jako příklad posilování RT a očekávaného vlivu na křivky přežití byla uvedena Velká Británie. SROBF provedla podrobnou analýzu infrastruktury a činností za rok 2004 na všech 28 RT pracovištích provádějících léčbu zářením ZN a která jsou vybavena alespoň 1 megavoltovým ozařovačem (lineární urychlovač nebo kobaltový ozařovač). Analýza byla provedena na základě dotazníku, který všechna oddělení vyplnila a prezentované výsledky se týkaly těchto 28 RT pracovišť. Na uvedených odděleních pracovalo 310 lékařů, fakticky radioterapii (skutečný podíl na plánování a provádění léčby zářením) vykonávalo však jenom 88 kvalifikovaných radioterapeutů. Potřeba je aktuálně 115, perspektivně 150. Podobně byly charakterizovány potřeby ve skupinách fyziků a laborantů. V roce 2004 bylo na 28 pracovištích RT ozářeno 29 500 nemocných se ZN, z toho 18 600 nových případů. Údaje ÚZIS udávají dosti odlišná čísla, a to 71 565 včetně ozařených pro nenádorovou indikaci (těch bylo 24 824). Podle ÚZIS bylo ozařeno 23 079 nových onkologických pacientů. Diskrepance v údajích radioterapeutů a hlášeními pro ÚZIS jsou tedy značné. Dr. Stankušová ukázala anonymní srovnání počtu ozařených na jednotlivých RT pracovištích. Údaje mohou být odkódovány na žádost pracovišť. Byla předvedena také některá data týkající se kvality provádění radioterapie (počty ozařovacích plánů a simulací plánu) a dalších podmínek pro zajištění kvalitní radioterapie.

Rozšiřování brachyterapie není z hlediska dosavadního využívání nutné. Největší podíl léčených zářením tvoří pacientky s nádory prsu. Zejména indikace RT u nádorů plic (13% z celkového objemu ozařovaných pacientů) však pokulhávají za vyspělým zahraničím. Dále byly diskutovány otázky proporcí léčebných modalit, jejich vývoje a oprávněnosti podpořit vybavenost radioterapie, pokud bude stav dále monitorován v podobných analýzách. Prim. Stankušová byla vyzvána k publikaci výsledků analýzy nejen v časopise Radiační onkologie, nýbrž také v časopise Klinická onkologie. Po ustavení nové vlády bude potřeba podpořit tato stanoviska také v písemném stanovisku výborů SROBF a ČOS novému ministru zdravotnictví a důsledným prosazováním zdůvodněných potřeb v přístrojových komisích.

2. Doc. Fínek informoval o jednání Onkofóra v Brně. Všechny léky kategorie X jsou překlopeny do P, cytostatika do O. Po novém návrhu úhrad by pacienti za bioterapii platili neúnosné částky a překlopení do O není tedy reálné. Zůstává požadavek určení správného pacienta pro správnou léčbu s transparentní registrací a vazbou na onkocentra.
3. Prof. Vorlíček konstatoval, že klíčovou otázkou zůstává zohlednění onkocentra v pojistných smlouvách s VZP. Předseda s vědeckým sekretářem se ohlásili k jednání u ředitele VZP dr. Horáka na 16.6.06, aby ho informovali o potřebách dalších systémových kroků v účelné integraci onkologické péče, na které dosud všichni vyslovují zájem.
4. Prof. Vorlíček informoval, že za výbor ČOS odeslal v termínu protest proti nové úhradové vyhlášce, která bude mít v případě platnosti nepříznivé dopady především na pacienty.
5. Prof. Žaloudík informoval, že updating SVOD daty za rok 2003 bude k dispozici do konce června 06.
6. Prof. Žaloudík informoval o trendech u karcinomu prsu v roce 2003, které již odrážejí přínos organizovaného mamárního screeningu. Markantně se zvyšuje podíl I. stádií a v několika krajích se historicky již poprvé kříží s II. stádií, která klesají. Výrazně se zvyšuje také zachyt karcinomu in situ, tedy kategorie D05. Tomuto vývoji odpovídá iniciální pokles mortality, a to i přes stále rostoucí incidence. Tyto pozitivní trendy je třeba posílit především vyšší účastí žen ve screening; nejvyšší účast přes 46% má Jihomoravský kraj, průměr se pohybuje do 30%, existují však i kraje s účastí pod 20%.
7. Výbor byl informován o právním výkladu interpretace Zák. 95/2004 k vícenásobným akreditacím již jednou akreditovaných pracovišť pod organizační hlavičkou jiné instituce. Právní výklad na základě požadavku prof. Žaloudíka zajistil u MZd předseda akreditační komise klinické onkologie prof. Klener. Podle dodaného výkladu je vícenásobná akreditace stejného onkologického pracoviště pod jinými hlavičkami zprostředkujících institucí možná. V současné době tak postupuje IPVZ. Výklad zakládá možnost,

- aby tak postupovaly i jiné instituce, například lékařské fakulty.
8. Byla diskutována problematika atestačních zkoušek v novém systému specializačního vzdělávání. Výbor se jednomyslně shodl, že bude požadovat, aby zkouškám byl přítomen zástupce výboru ČOS.
 9. Dr. Aschermannová informovala o závěrech z návštěvy pracovního semináře Ligy proti rakovině Praha. Základními cíli Ligy proti rakovině zůstává podpora prevence a onkologické osvěty ve veřejnosti, angažovanost v následné péči, naplňování Evropského kodexu boje proti rakovině a spolupráce s odbornými společnostmi. Cílem LPR je udržet na rozdíl od různých nadací celebrit profesionální úroveň aktivit.
 10. Výbor diskutoval na podnět kolegy Možného realitu současné nedostupnosti lysodrenu. Bude vznesen dotaz na možný postup u VZP. Zajistí doc. Petruželka.
 11. Nově byli do ČOS přijatí za členy - dr. Janů (Most), Mgr. Vigášová (Brno)
 13. Byly stanoveny příští termíny a místa jednání výboru ČOS:
26. 9. - Brno - FN uSA,
24. 10. - POKO Benešov,
21. 11. - MOÚ Brno
19. 12. - VFN Praha, 23.1.07 - FNB Brno
- V závěru jednání popřál předseda Vorlíček všem členům výboru a zápisem i všem členům České onkologické společnosti hezké léto a příjemně strávené letní dovolené.