

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

Grafická a technická úprava:
Bohuslav Havlíček

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

REDAKTOŘI:

ČOUPEK PETR VALÍK DALIBOR
HÁJEK ROMAN VORLÍČEK JIŘÍ
KOCÁK IVO ŽALOUĐÍK JAN

REDAKČNÍ RADA:

ADAM ZDENĚK, Brno KOVAŘÍK JAN, Brno
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava KOZA IVAN, Bratislava
BEDNAŘÍK OTAKAR, Praha MAYER JIŘÍ, Brno
BEŠKA FRANTIŠEK, Ostrava MECHL ZDENĚK, Brno
BILDER JOSEF, Brno NĚMEC JAROSLAV, Brno
ČOUPEK PETR, Brno ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
DRBAL JOSEF, Brno PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
ECKHARDT SANDOR, Budapešť PLEŠKO IVAN, Bratislava
FAIT VUK, Brno PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
HÁJEK ROMAN, Brno REJTHAR ALEŠ, Brno
JURGA LUDOVIT, Trnava SPURNÝ VLADIMÍR, Brno
KALLAY JOZEF, Bratislava UJHÁZY VILIAM, Bratislava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
KLAŠTERSKÝ JAN, Brusel VYZULA ROSTISLAV, Brno
KLENER PAVEL, Praha WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
KOCÁK IVO, Brno ŽALOUĐÍK JAN, Brno
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

Přehled	
Demlová R., Radina M., Štěrba J., Valík D. Foláty: fyziologie, metabolismus a mechanismus rezistence na jejich antagonisty	185
Zelená J., Potěšil D., Vacek J., Adam V., Hradecký J., Průša R., Vojtěšek B. Metallothionein jako prognostický marker nádorového onemocnění	190
Kolombo I., Hanuš T., Kolombová J. Místo bisfosfonátů při skeletálním postižení u karcinomu prostaty	196
Horová H., Hynková L., Košťáková Š., Staniček J. Využití pozitronové emisní tomografie v radioterapii	201
Původní práce	
Jansová E., Krantorád P., Svoboda Z., Pavlík T., Kotná I., Kozubek M., Žaloudík J., Kozubek S. Nové možnosti v diagnostice kolorektálního karcinomu s využitím technologie DNA mikročipů	203
Dražan L., Dungelová E., Konečný T. Hodnota rekonstrukce prsu TRAM lalokem u pacientek s invazivním karcinomem prsu	208
Zprávy	
Šimíčková Zpráva z konference o nádorových markerech	213
Fait V., Chrenko V. XXXII symposium in Südtirol	213
Informace	
– Onkologický program	195
– Horvath T. Fotodiagnóza a fotoléčba	212
Rejstřík –jmenný a věcný	215
Onkologické společnosti	216

CONTENTS

Reviews	
Demlová R., Radina M., Štěrba J., Valík D. Folates: physiology, metabolism and mechanism of resistance to their antagonists	185
Zelená J., Potěšil D., Vacek J., Adam V., Hradecký J., Průša R., Vojtěšek B. Metallothionein as a prognostic marker of tumor disease	190
Kolombo I., Hanuš T., Kolombová J. Bone lesions and the role of bisphosphonates in prostate cancer	196
Horová H., Hynková L., Košťáková Š., Staniček J. Utilization of positron emission tomography in radiotherapy	201
Original publications	
Jansová E., Krantorád P., Svoboda Z., Pavlík T., Kotná I., Kozubek M., Žaloudík J., Kozubek S. New possibilities in colorectal carcinoma diagnostics using DNA microarrays	203
Dražan L., Dungelová E., Konečný T. The value of the TRAM flap breast reconstruction in patients with breast carcinoma	208
Case Report	
Šimíčková Report from a tumor marker conference	213
Fait V., Chrenko V. XXXII symposium in Südtirol	213
Notification	
– Oncological program	195
– Horvath T. Fotodiagnosis and phototherapy	212
Register nominal and factual	215
Oncological associations	216

FOLÁTY: FYZIOLOGIE, METABOLISMUS A MECHANISMUS REZISTENCE NA JEJICH ANTAGONISTY

FOLATES: PHYSIOLOGY, METABOLISM AND MECHANISM OF RESISTANCE TO THEIR ANTAGONISTS

DEMLOVÁ R.¹, RADINA M.², ŠTĚRBA J.³, VALÍK D.⁴

¹ ODDĚLENÍ KLINICKÝCH HODNOCENÍ, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

² ONKOLOGICKÉ CENTRUM J.G.MENDELA, NOVÝ JIČÍN

³ KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGICE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, DĚTSKÁ NEMOCNICE, ČERNOPOLNÍ 9

⁴ ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

e-mail: valik@mou.cz, autor pro korespondenci

Souhrn: Antifoláty byly prvními metabolickými antagonisty uvedenými do klinické praxe přibližně před šedesáti lety. Již tehdy se vědělo, že aminopterin a jeho methylderivát, methotrexat (4-amino, 10-methylpterin) zasahují do metabolismu folátů inhibicí enzymu dihydrofolátreduktázy. Zlomem v pohledu na metabolismus a působení jak přirozených forem folátů, tak jejich antagonistů, byl objev jejich polyglutamylace v 80. letech minulého století. Významnými momenty v procesu porozumění antifolátového účinku methotrexatu bylo objasnění kinetické podstaty jeho interakce s enzymem dihydrofolátreduktáza a základních principů transportních mechanismů. V této době byl již methotrexat standardní součástí celé řady klinicky používaných chemoterapeutických režimů. Zejména v dětské onkologii se do popředí dostala otázka objasnění možných mechanismů rezistence na antifoláty, která je spolu s toxicitou základním a často limitujícím klinickým problémem chemoterapie.

Klíčová slova: antifoláty, folát, polyglutamáty, metotrexat, folátové receptory, thymidylátsyntáza, dihydrofolátreduktáza

Summary: Antifolates were the first metabolic antagonists that were brought to the clinical practice about sixty years ago. By that time it was known that aminopterin and its methyl derivative, methotrexate, can interfere with folate metabolism by inhibiting the enzyme dihydrofolate reductase. The discovery of polyglutamylation that came during the eighties brought a breakthrough in understanding both physiology of natural folates and pharmacology of folate inhibitors as well. Another important milestone was elucidation of interactions of antifolates with its target enzyme, dihydrofolate reductase, and discovery of folate transport processes. By that time methotrexate was already a standard component of a number of chemotherapy regimens used in the clinic. In pediatric oncology, where the high-dose administration schemes have been successfully used, toxicity and mechanisms of resistance emerged as significant problems that often limit clinical use of folate antagonists.

Key words: antifolates, folates, polyglutamates, methotrexate, folate receptors, thymidylate synthase, dihydrofolate reductase

Úvod

Antifoláty byly prvními metabolickými antagonisty uvedenými do klinické praxe již koncem čtyřicátých let minulého století (1). Přestože se již tehdy vědělo, že aminopterin a methotrexat (4-amino, 10-methylpterin) zasahují do metabolismu folátů inhibicí enzymu dihydrofolátreduktázy (DHFR), hlubší pochopení mechanismu jejich účinku se vyvíjelo postupně a poměrně zdlouhavě. Zlomem v pohledu na metabolismus a působení jak přirozených forem folátů, tak jejich antagonistů, byl objev jejich polyglutamylace v 80. letech minulého století. Dalšími významnými momenty v procesu porozumění antifolátového účinku methotrexatu bylo objasnění kinetické podstaty jeho interakce s enzymem dihydrofolátreduktáza a základních principů transportních mechanismů (2). V této době byl již methotrexat standardní součástí celé řady klinicky používaných chemoterapeutických režimů a s jeho rostoucí úlohou v terapii některých malignit, zejména v dětské onkologii, se do popředí dostala také otázka objasnění možných mechanismů rezistence na antifoláty (3), která je spolu s toxicitou základním a často limitujícím klinickým problémem v chemoterapii nádorových chorob (4).

Foláty

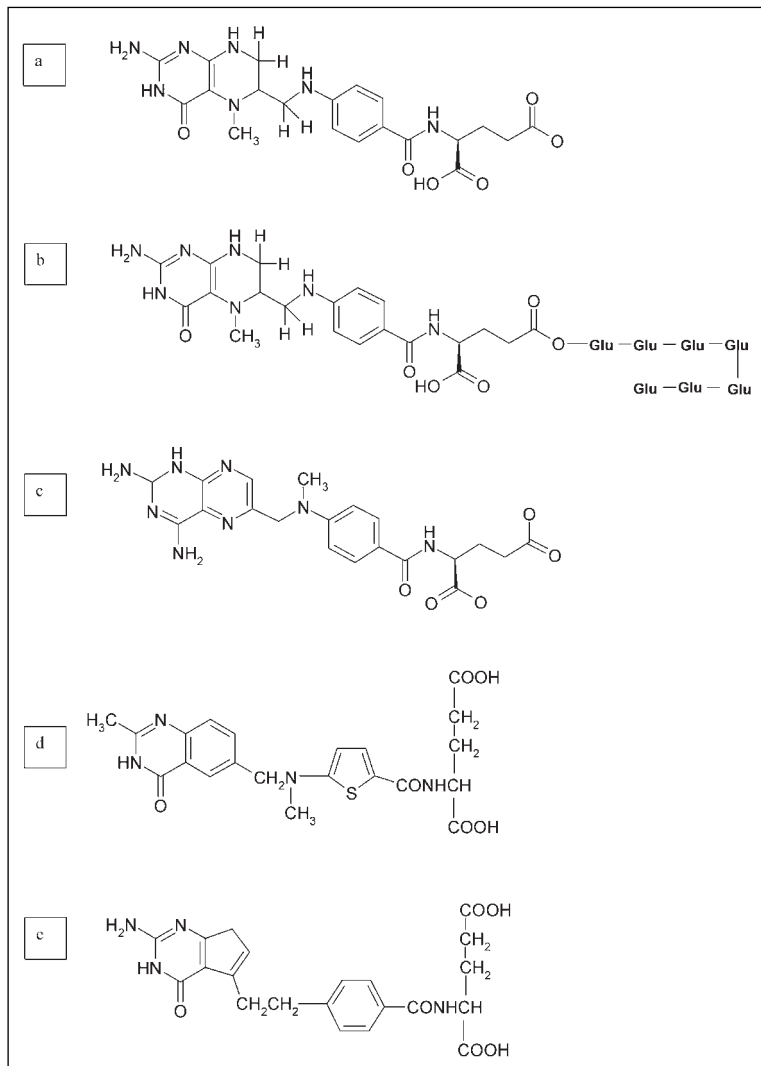
Obecným pojmem „foláty“ označujeme skupinu příbuzných látek obsahujících ve své molekule pteridinový heterocyclus,

kteří se jako kofaktory (přesněji kosubstráty, protože v průběhu reakcí, kterých se účastní, dochází k jejich chemické změně) účastní celé řady klíčových reakcí v metabolickém přenosu jednonukleotidových zbytků a jsou nepostradatelné pro řadu pochodů v živých organismech. Jde zejména o biosyntézu purinů a pyrimidinů, interkonverze glycinu, serinu a methioninu a degradace histidinu (5). Pojem „foláty“ je tedy obecně zažité synonymum pro kyselinu pteroylglutamovou a celou skupinu pteroylglutamátů, které se vzájemně liší stupněm redukce pteridinového kruhu, jednonukleotidovými substituenty a počtem glutamátových zbytků. Pteroylpolyglutamáty vznikají navázáním glutamátů gama-peptidickou vazbou na pteridinový kruh a bude o nich pojednáno později. Foláty se v buňce vyskytují fyziologicky v koncentracích pohybujících se od 10^{-8} až více než 10^{-5} mol/l (4,5). Hlavním plazmatickým folátem je 5-methyltetrahydrofolát (MTHF, struktura viz obr. 1a, funkce v metabolismu viz obr. 2 a obr. 3), který vzniká redukcí a methylací folátů z potravy v buňkách střevní sliznice (8). V plazmě se vyskytuje v nanomolární koncentraci, tedy v koncentraci nižší než jsou dosahované koncentrace intracelulární.

Transport folátů

V transportu folátů, stejně tak jako v transportu folátových antagonistů (antifolátů), přes buněčnou membránu hrají roli dva odlišné systémy (10,11). Prvním systémem je vysoko-

Obr. 1. Strukturní vzorce přirozené plasmatické formy 5-methyltetrahydrofolátu (a), jeho intracelulární polyglutamované formy (b) – znázorněn 5-MTHF-heptaglutamát, methotrexatu (c), raltitrexedu (d) a pemetrexedu (e).



kapacitní, nízkoafinity systém přenosu redukovaných forem folátů a methotrexatu, který se označuje jako tzv. Reduced Folate Carrier (RFC, ref. 10, 11, 12, 13, 14, 15). Jeho gen byl lokalizován na 21. chromozomu a byl studován především v nádorových buňkách. Druhý systém představuje rodina membránově lokalizovaných folát-vazebných proteinů (FBP) neboli folátových receptorů (FR), jejichž gen byl identifikován na 11 chromozomu (11,16). Tyto glykoproteiny zprostředkovávají vysokoafinitní, nízkokapacitní systém přenosu exogenních folátů v nižších koncentracích. Současně byla popsána také úloha pasivního transportu, jež se uplatňuje například při transplacentárním přenosu folátů (17).

Folátové polyglutamáty

Lidské buňky vyžadují určitou kritickou koncentraci intracelulárních folátů tak, aby byla zachována aktivita folát-dependenčních enzymových systémů. Tato koncentrace kolísá od hodnot 50 nmol/l v lidských fibroblastech k hodnotě kolem 1 μmol/l v lidských lymfocytech a nádorových buňkách (16). Jsou-li foláty v buňce přítomny v podobě polyglutamátů s delším řetězcem, je pro zachování veškerých kritických pochodů v buňce dostatečná mnohem nižší koncentrace folátů (3). Proces polyglutamylace je zprostředkován enzymem folylpolyglutamátsyntázou (FPGS), která je přítomna jak v cytoplazmě tak v mitochondriích (obr. 1b). Gen lokalizovaný na chromo-

zomu 9 kóduje dva proteiny, jež mají oba syntázovou aktivitu a které zprostředkovávají vazbu gama-karboxylu jednoho glutamátu a alfa-aminokupiny další molekuly glutamátu. Tato reakce je ATP-dependenční a jako substráty se při nich spotřebovávají tetrahydrofoláty i další formy folátů (19). Jsou-li foláty v buňce přítomny v podobě polyglutamátů, nestávají se substrátem transportních systémů a je tak omezen jejich únik z mitochondrií do cytoplazmy. Byly již popsány buněčné linie, které mají defektní syntézu polyglutamátů; v analogii s tímto se předpokládá defektní polyglutamylace methotrexatu a z ní vyplývající rezistence na methotrexat např. u buněčných linií karcinomu prsu. Plasmatické foláty, zejména MTHF, jak bylo již zmíněno výše, se v plazmě nacházejí ve formě monoglutamátů.

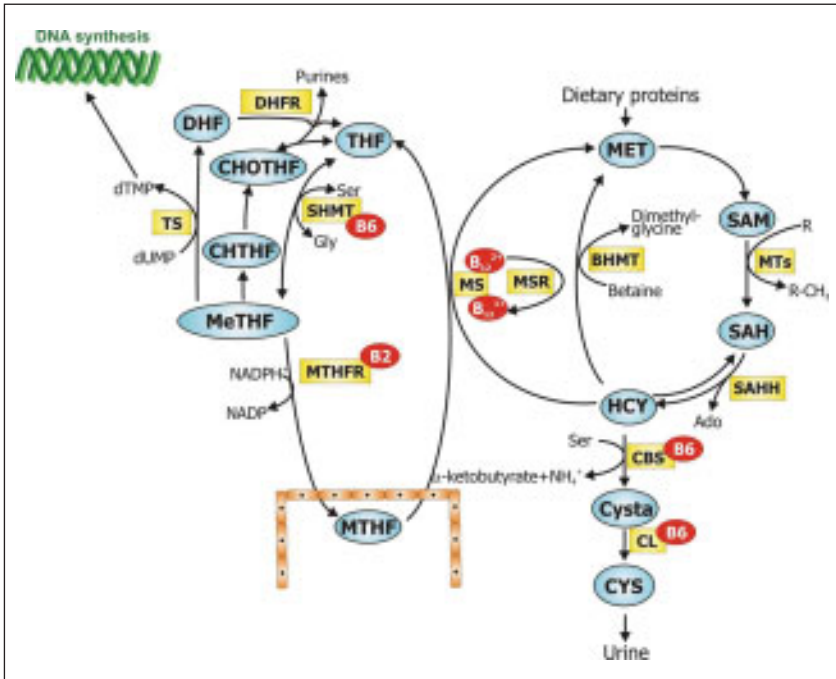
Metabolické cesty folátů, jejich interakce s transulfuračními reakcemi a jejich klíčové enzymy

Základní procesy interkonverze folátů a jejich role při zapojení do folát-dependenčních metabolických reakcí jsou znázorněny na obr. 2 – popis funkce a zkratky jsou uvedeny v legendě a jsou shodné s označením v textu. Při pohledu na diagram metabolismu je nutno si také uvědomit, že při syntéze thymidylátu je MeTHF oxidován na dihydrofolát (DHF), a tak je k jeho zpětné regeneraci nutné zapojení enzymu dihydrofolátreduktázy (DHFR). V případech snížené aktivity DHFR se rapidně snižuje hladina THF-kosubstrátů; tato situace vede během několika minut k zastavení THF-dependenčních reakcí. Z tohoto důvodu se enzym DHFR stal cílovým místem při vývoji chemoterapeutik, jež řadíme do skupiny folátových antagonistů (6,7).

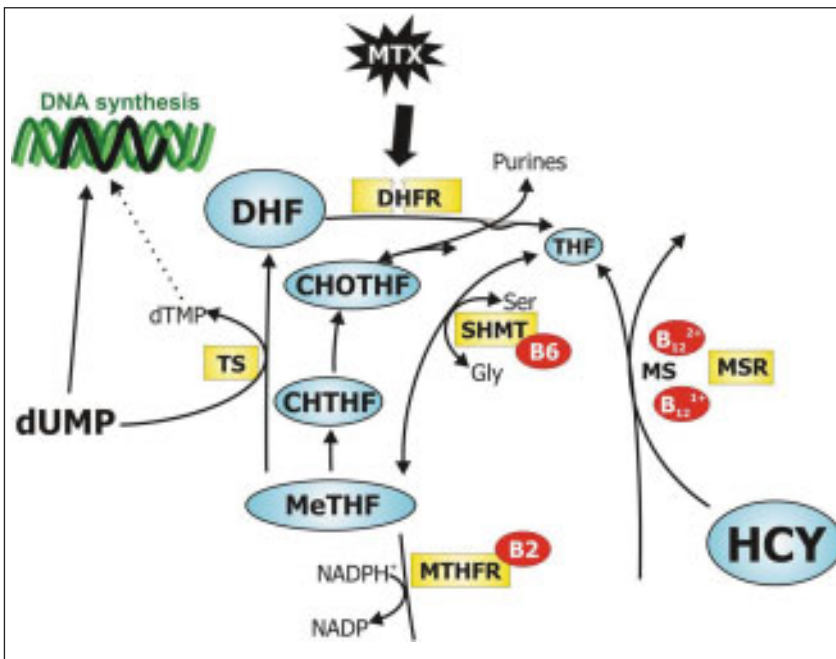
Antifoláty

Antifoláty jsou látky, jejichž obecným mechanismem účinku je ovlivnění specifického enzymu zapojeného do folátového metabolismu. Klasickým příkladem – a také mateřskou látkou celé skupiny – je methotrexat (MTX, struktura viz obr. 1c, jeho funkce viz obr. 3), který je silným inhibitorem enzymu dihydrofolátreduktázy (DHFR, ref. 21). Jsou-li v buňce přítomny vysoké koncentrace MTX, dochází k zástavě syntézy tetrahydrofolátu, jejímž důsledkem je deplece substrátů kriticky důležitých k syntéze DNA. MTX se v klinické praxi používá již přes 50 let a je součástí léčebných schémata zejména u hematologických malignit, nádorů prsu, nádorů ORL oblasti, nádorů plic, ale také řady neonkologických onemocnění, např. autoimunitních. V průběhu 80. a 90. let se stala předmětem výzkumu nová generace folátových antagonistů. Jejich společným mechanismem účinku je přímé ovlivnění dalších enzymů zapojených do metabolismu folátů, nejčastěji enzymu thymidylátsyntázy (TS) a glycinamid-ribonucleotidtransformylázy (GARFT) (2). Příkladem může být raltitrexed (Tomudex, ZD 1694), který je přímým inhibitorem enzymu TS a je již používán v klinické praxi (22). Raltitrexed (obr. 1d) je v buňce přeměněn na polyglutamát a je zde tak retinován minimálně 24 hodin, což se metabolicky projevuje protrahovanou inhibicí TS. Přípravek je indikován zejména v léčbě kolorektálních nádorů, v klinickém zkoušení se ale testuje účinnost i u jiných solidních nádorů (24). Pemetrexed (obr. 1e) je další, nově zaváděné antifolikum, které se označuje také jako MTA – multitarget antifolate, neboť je schopen kromě thymidylátsyntázy slabě inhibovat také enzym GARFT (23). Jeho kumulativním efektem je blokáda syntézy purinů a thymidy-

Obr. 2. Metabolické cesty a jejich klíčové enzymy: 5,10-methylentetrahydrofolát (MeTHF) poskytuje jednoruký zbytek pro syntézu deoxythymidylátu (dTMP) z deoxyuridylátu (dUMP); tato konverze je katalyzována enzymem thymidylátsyntázou (TS) a je iniciálním krokem při syntéze DNA. MeTHF může být dále redukován na MTHF za účasti methioninsyntázy (MS); tato reakce vede k B12-dependentní syntéze methioninu, nebo může být naopak oxidován na 10-formyltetrahydrofolát (CHOTHF), což je kosubstrát de novo syntézy purinů; tyto reakce jsou katalyzovány enzymy phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid ribonukleotid transformylázou (AICARFT) a glycinamid ribonucleotide transformylázou (GARFT). Spotřeba jednorukých zbytků při syntéze purinů nebo methioninu vyžaduje jejich rychlé doplnění, což je zajišťováno obnovou tetrahydrofolátového poolu, zejména pomocí enzymů formyl-THF-syntetázy a serinhydroxymethyltransferázy, jež zpětně formují 10-CHOTHF a MeTHF – tyto reakce již nejsou pro přehlednost ve schématu znázorněny. Další použité zkratky v obrázku: DHF – dihydrofolát, DHFR – dihydrofolátreduktasa, THF – tetrahydrofolát, CHTHF – methenyltetrahydrofolát, SHMT – serin-glycin hydroxymethyltransferasa, NADP – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát, MTHFR – methylenetetrahydrofolát reduktasa, B2 – riboflavinový kofaktor, B6 – pyridoxinový kofaktor, Met – methionin, BHMT – betain hydroxymethyltransferasa, MSR – MS reduktasa, B12 – kobalaminový kofaktor, SAM – S-adenosylmethionin, MTs – methyltransferasy obecně, SAH – S-adenosylhomocystein, SAHH – S-adenosylhomocystein hydrolasa, Ado – adenosine, HCY – homocystein, CBS – cystathionin-beta synthasa, Cysta – cystathionin, CL – cystathionin gama lyasa, Cys – cystein.



Obr. 3. Metabolická změna po zásahu DHFR methotrexatem; zkratky stejné jako v obr. 2 a textu.



látu (24). K dalším inhibitorům TS, které jsou zatím ve fázi klinického zkoušení, patří například látky ZD 9331 nebo AG337 (Thymitaq), k novějším zkoušeným inhibitorům enzymu dihydrofolátreduktázy patří například PT-523.

Jaké jsou možné příčiny rezistence na methotrexat a příbuzné 4-aminofoláty?

al' zvýšená exprese DHFR: Za podmínek zvýšené exprese tohoto enzymu je velmi obtížné dosáhnout takové intracelulární hladiny MTX, jež by byla dostatečná pro téměř kompletní inhibici tohoto cílového enzymu; taková situace by vyžadovala navodit velmi vysokou extracelulární koncentraci léčiva, což je v podmínkách in vivo obtížně možné (20) vzhledem k nastupující toxicitě. Zvýšená exprese cílového enzymu je v tomto případě důsledkem amplifikace genu, který byl lokalizován v lokusu DHFR chromozomu 21 (24, 25). Celý proces je spojen se zvýšením počtu genových kopií, mRNA a vlastního enzymu. Amplifikace genu byla prokázána například v tkáňových vzorcích pacientů s ALL (26) nebo s ovariálním Ca (27), kteří byli léčeni MTX a u kterých byla pozorována rezistence na podávanou léčbu. Li a spolupracovníci zmiňuje (28), že prokázána amplifikace genu pro DHFR před léčbou pacientů se sarkomy měkkých tkání je důvodem pro volbu vysokodávkované chemoterapie. Tento mechanismus možné rezistence se vysoce pravděpodobně uplatňuje nejen u MTX, ale také i u jiných antifolátů, a v neposlední řadě také u novějších skupin léčiv jako například STI-571 (29).

bl' snížená afinita DHFR k MTX: Snížená afinita DHFR k MTX byla prokázána v celé řadě zvířecích i lidských buněčných linií a byla spojena s nižší vnitřní aktivitou léčiva, jejímž výsledkem je rezistence buněk na podávaný MTX (30). Jako možný mechanismus vzniku těchto změn ve vlastnostech DHFR byly označeny změny struktury proteinu způsobené mutacemi, což bylo také experimentálně potvrzeno (31, 32, 33). Jako podstatný se jeví fakt, že mutace ovlivňuje především vazbu enzym-inhibitor, přičemž zůstává zachována dostatečná aktivita pro DHF jako substrát, což vede právě k rezistenci na podávaný MTX nebo další 4-aminofoláty. V literatuře je popsána celá řada mutací na buněčných liniích, příkladem uveďme Phe31 → Ser mutaci v oblasti ligand-vazebního místa u MOLT-3 leukemie (34) a HTC-8R4 (human colon cancer cell lines, ref. 35) nebo Phe31 → Trp mutaci u myších leukemických buněk (36). Velmi často je mutace DHFR spojena s amplifikací genu, pravděpodobně z důvodu potře-

by buněk zachovat katalytickou aktivitu za podmínek, kdy je snížena afinita enzymu pro svůj substrát, DHF.

cl narušený membránový transport: Transportní mechanismy regulují influx a eflux MTX přes buněčnou membránu, přičemž hladina volného intracelulárního MTX je kritickým parametrem v interakci s cílovým enzymem. Alterace membránového transportu se tak může stát dalším možným mechanismem vzniku rezistence na podávané antifoláty. Jak již bylo zmíněno výše, v transportu folátů přes membránu se uplatňují dva základní transportní mechanismy: i) systém RFC (Reduced Folate Carrier) a systém FBP (Folate Binding Protein). Gen pro RFC byl lokalizován na 21 chromozomu (21q22.2-q.22.3). Sekundární struktura FBProteinu je charakterizována 12 transmembránovými doménami. RFC zprostředkovává vysoce senzitivní transport závislý na redukované formě folátů, přičemž jejich influx může být ovlivněn celou řadou organických i anorganických anionů (37, 38, 39, 40, 41). Při přenosu zprostředkovaném tímto typem nosiče se vytváří malý transmembránový chemický gradient, výměnou za organické fosfáty a částečně adeninové nukleotidy, jež jsou syntetizovány a akumulovány uvnitř buňky (42). Tento předpoklad byl potvrzen i tím, že v buňkách, které měly inaktivní nebo mutovaný RFC, byly naměřeny nejvyšší intracelulární koncentrace thiaminpyrofosfátu (43). Narušení transportní schopnosti RFC se tak stává dalším podstatným mechanismem, který může být zodpovědný za rezistenci na MTX nebo další antifoláty. V literatuře je uvedena řada *in vitro* i *in vivo* studií, které se zabývaly možnými vlivy na porušení transportní schopnosti RFC (44,45,46,47). Možné změny zahrnují zvýšení K_m , snížení V_{max} , popřípadě změny obou parametrů, které byly objasněny postupujícími možnostmi detekce mutací na molekulární úrovni. Řada prací se zabývá a popisuje různé typy mutací genu pro RFC, zejména těch, které ovlivňují strukturu některé z transmembránových domén v nádorových buňkách (48,49,50). Rovněž v případě folátových receptorů (tedy FBP-roteins) byla vcelku detailně popsána jejich struktura a úloha. Byly klonovány 2 humánní membránově lokalizované folátové receptory, FR- α a FR- β (51,52). Jejich gen byl identifikován na 11 chromozomu (11q13.3-3.5) (53). Membránové FBPs mají vysokou afinitu pro kyselinu listovou (FA) s rozdílnou specificitou pro různé formy redukovaných folátů. Obecně lze říci, že oba subtypy receptorů mají k redukovaným formám folátů nižší aktivitu, než je tomu v případě kyseliny folinové (54,55). Oba subtypy mají také nižší afinitu k MTX v porovnání s afinitou k nové generaci antifolátů (56). Transport folátů zprostředkovaný FBPs je obecně pomalejší, s poměrem cca 1:100, ve srovnání s transportem prostřednictvím RFC (57,58). Alterace exprese membránových receptorů (FBPs) může hrát svou roli v získané rezistenci na MTX a příbuzné antifoláty. Informace o tomto možném typu rezistence jsou relativně kusé (59,60).

dl Snížení syntézy thymidylátu: Aktivita DHFR je závislá na regeneraci THF cestou oxidace 5,10-methylenTHF na dihydrofolát. V případě snížené aktivity TS (jako např. v klidové G_0 fázi) je rovněž snížena potřeba aktivity DHFR a je navozen stav relativní rezistence na MTX. Opačně, v případě suprese TS například fluoropyrimidiny, nebo některými látkami z nové generace antifolátů, je blokována tvorba DHF, a tak je intracelulární pool jednonukleotidových kosubstrátů obsahujících THF chráněn před degradací, resp. konzumpcí. Celá nová generace antifolátů (ZD1694, ZD9331, pemetrexed nebo AG337) jsou, jak víme, velmi potentními inhibitory TS. Získaná rezistence na tyto antifoláty je spojena ve velké většině případů se zvýšenou expresí TS nebo méně často s mutací, která pak na úrovni enzymu ovlivňuje především vazbu vlastního léčiva. Overexprese TS je podobně jako v případě DHFR nejčastěji spojena s amplifikací genu. Jako příklad můžeme uvést prokázanou rezistenci linií MCF-7 a některých linií ovariálního

karcinomu na podávání látky ZD1694, u kterých byla potvrzena amplifikace genu pro TS (61, 62, 63).

el poškození polyglutamylace: Jak již bylo zmíněno dříve, i v nádorových buňkách podléhají antifoláty procesu polyglutamylace. Celý proces je katalyzován enzymem folylpolyglutamátsynthasou (FPGS), který je přítomný jak v cytosolu tak v mitochondriích. Polyglutamylace molekuly je pro efektivitu antifolátů zásadním krokem – v této formě jsou antifoláty déle retinovány uvnitř buňky, protože v této podobě nejsou substrátem pro RFC podobně jako přirozené foláty. Polyglutamylací se také zvyšuje jejich afinita k cílovým enzymům. Příkladem můžeme uvést afinitu ZD1694 nebo pemetrexedu k enzymu TS v pentaglutamátové formě, která je až 100-násobně vyšší ve srovnání s monoglutamátem (64). LY309887 je potentním inhibitorem enzymu GARFT i v monoglutamátové formě, efekt polyglutamylace je v tomto případě podstatný především pro zvýšení retence a koncentrace léčiva uvnitř buňky (65, 66). Proces polyglutamylace může být ovlivněn změnami na úrovni klíčového enzymu folylpolyglutamátsynthasy (FPGS), ať již z důvodu alterace exprese FPGS nebo mutace ovlivňující její katalytickou aktivitu. FPGS mutace byly nalezeny například v obou alelách DDATHF-rezistentních leukemických buněčných liniích L1210 (67). Tyto buněčné linie vykazovaly zkříženou rezistenci na podávání LY308887, ZD 1694 i pemetrexedu. Dalším mechanismem ovlivnění polyglutamylace může být také narušení transportu volných monoglutamátů, ať již snížením jejich influxu nebo zvýšením jejich exportu z buňky. Výsledkem těchto spřažených dějů je vždy snížení dostupnosti volných forem, což omezuje celý proces polyglutamylace.

fl metabolická dostupnost thymidylátu a purinů: tyto metabolické intermediáty jsou klíčovými koncovými produkty reakcí využívajících kosubstráty obsahující THF. Pokud jsou v buňce přítomny v dostatečné kvantitě, není aktivita potřebná DHFR, a tak se její suprese stává irelevantní.

Závěr

Jak je vidět, existuje celá řada více či méně složitých mechanismů, které se podílejí na udržení homeostázy v metabolismu folátů, ať již na úrovni jejich transportu, procesu polyglutamylace nebo interkonverze folátů při zapojení do folát-dependenčních metabolických reakcí. Řada těchto procesů vykazuje poměrně velkou míru inter-individuální variability a tato variabilita je v řadě případů podmíněna genetickými faktory. Příkladem uveďme genetický polymorfismus jednoho z klíčových enzymů, thymidylátsyntházy nebo geneticky podmíněné varianty „reduced folate carrier“ (RFC). (68). Farmakogeneticky podmíněná variabilita metabolizujících enzymů je jednou z hlavních determinant, určujících benefit terapie pro pacienta. V krajním případě se při podání standardní dávky můžeme setkat s nedostatečným efektem s následným selháním kurativního záměru onkologické léčby, v opačném případě s nepředvídatelnou excesivní toxicitou (MTX v léčbě dětských malignit). Paleta toxických příznaků, které můžeme pozorovat po např. high-dose MTX terapii může být velmi široká a v některých případech může progredovat až do život ohrožujícího stavu (69). Jedním z přístupů, které mohou v budoucnu umožnit individualizovat stávající standardní dávkovací schémata, je modifikace dávky na základě určení genotypu a fenotypu specifických drah ovlivňujících interkonverzi, aktivaci, resp. metabolismus podané látky u konkrétního pacienta (70). Instrumenty, které bude možno v budoucnu použít ke sledování efektu podané terapie, jsou biomarkery efektu podané látky (71), jejichž výzkum a potenciální aplikace jsou v současnosti ve středu pozornosti v aplikované (translational) onkologii.

Poděkování: realizováno s podporou grantu IGA MZČR NC 7104-3.

Literatura

- Farber S, Diamond LK, Mercer RD, Sylvester RF and Wolf VA. (1948). *N. Engl. J. Med.*, 238, 787 – 793
- Bleyer WA. The clinical pharmacology of methotrexate. (1978). *Cancer*, 41, 36-42.
- Zhao R, Goldman ID. Resistance to antifolates. (2003). *Oncogene*, 22, 7431-7457
- Perry MC. Toxicity of chemotherapy. (1992). Baltimore:Williams and Wilkins
- Rosenblatt DS, Fenton WA. Inherited disorders of folate and cobalamin transport and metabolism, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS (eds). (2001). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*, 8th edition. New York, McGraw-Hill, 3898.
- White JC and Goldman ID. (1976). *Mol. Pharmacol.* 12, 711-719
- Seither RL, Trent DF, Mikulleczy DC, Rape TJ and Goldman ID. (1989). *J. Biol. Chem.*, 264, 17016-17023
- Zhao R and Goldman ID. (2003). *Oncogene*, 22, 7431-7457
- Rosenblatt DS: Inherited disorders of folate transport and metabolism, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). (1995). *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. New York, McGraw-Hill, p.3111
- Antony AC. (1996). Folate receptors. *Annu Rev Nutr.*, 16, 501
- Williams FMR, Flintoff WF. Isolation of a human cDNA that complements a mutant hamster cell defective in methotrexate uptake. (1995). *J Biol Chem.*, 270, 2987
- Moscow JA, Gong M, He R, Sgagias MK, Dixion KH, Anzick SL, Meltzer JA, Cowan KH: Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. (1995). *Cancer Res.*, 55, 3790.
- Wong SC, Proefke SA, Bhushan A, Matherly LH. Isolation of human cDNA that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective chinese hamster ovary cells. (1995). *J Biol Chem.*, 270(29), 17468.
- Tolner B, Roy K, Sirotinak FM. Structural analysis of the human RFC-1 gene encoding a folate transporter reveals multiple promoters and alternatively spliced transcripts with 5' end heterogeneity. (1998). *Gene*, 211, 331.
- Wang H, Ross JF, Ratnam M. Structure and regulation of a polymorphic gene encoding folate receptor type (γ/γ). (1998). *Nucleic acids Res.*, 26, 2132
- Henderson GI, Perez T, Schenker S, Mackins J, Antony AC. Maternal-to-fetal transfer of 5-methyl-THF by the perfused human placental cotyledon. Evidence for a concentrative role by placental folate receptor in fetal folate delivery. (1995). *J Lab Clin Med.*, 126, 184.
- Watkins D, Cooper BA. A critical intracellular concentration of fully reduced non-methylated folate polyglutamates prevents macrocytosis and diminished growth rate of human cell line K562 in culture. (1983). *Biochem J.*, 214, 465.
- Mackenzie RE. Summary. Pteroylpolylglutamate metabolism, chemistry and biology of pteridines, in Coper BA, Whitehead VM (eds). (1986). *Pteridines and folic acid derivatives*. Berlin, de Gruyter, p.767.
- Jackson RC and Harrap KR. (1973). *Arch. Biochem. Biophys.*, 158, 827-841
- Goldman ID, Metherly LH. The cellular Pharmacology of methotrexate. (1985). *Pharmacol Ther.*, 28, 77-81
- Jackman AL, Kimbell R, Aherne GW, Brunton L, Jansen G, Stephens TC, Smith MN, Wardleworth JM and Boyle FT. (1997). *Clin Cancer Res.*, 3, 911 – 921
- Shih C, Chen VJ, Gossett LS, Gates SB, MacKellar WC, Habeck LL, Shackelford KA, Mendelsohn LG, Soose DJ, Patel VF, Andis SL, Bewley JR, Rayl FA, Moroson BA, Beardsley GP, Kohler W, Ratnam M and Schultz RM. (1997). *Cancer Res.*, 57, 1116-1123
- Klener P. Klinická onkologie, Galén (2002), 163-167
- Dolnick BJ, Berenson RJ, Bertino JR, Kaufman RJ, Nunberg JH and Schimke RT. (1979). *J Cell Biol.*, 83,394-402
- Mini E, Srimatkandada S, Medina WD, Moroson BA, Carman MD and Bertino JR. (1985). *Cancer Res.*, 45, 317-324
- Horns Jr RC, Dower WJ and Schimke RT. (1984). *J Clin Oncol.*, 2, 2-7
- Trent JM, Buick RN, Olson S, Horns Jr RC and Schimke RT. (1984). *J Clin Oncol.*, 2, 8-15
- Li W-W, Lin JT, Schweitzer BI, Tong WP, Niedzwiecki D and Bertino JR. (1992a). *Cancer Res.*, 52, 3908-3913
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN and Sawyers CL. (2001). *Science*, 293, 876-880
- Jackson RC, Hart LI and Harrap KR. (1976). *Cancer Res.*, 36, 1991-1997
- Albrecht Am, Biedler JL and Hutchison DJ. (1972). *Cancer Res.*, 32, 1539-1546
- Flintoff Wf, Davidson SV and Siminovitch L. (1976). *Somatic Cell Genet.*, 2, 245-261
- Goldie JH, Krystal G, Hartley D, Gudauskas G and Dedhar S. (1980). *Eur J Cancer*, 16, 1539-1546
- Miyachi H, Takemura Y, Kobayashi H and Ando Y. (1995). *Cancer Lett.*, 88, 93-99
- Srimatkandada S, Schweitzer BI, Moroson BA, Dube S and Bertino JR. (1989). *J Biol Chem.*, 264, 3524-3528
- McIvor RS and Simonsen CC. (1990). *Nucleic acids Res.*, 18, 7025-7032
- Goldman ID. (1971). *Ann NY Acad Sci.*, 186, 400-422
- Henderson GB and Zevely EM. (1981). *Biochem Biophys Res Commun.*, 99, 163-169
- Henderson GB and Zevely EM. (1982a). *Biochem Int.*, 4, 493-502
- Henderson GB and Zevely EM. (1982b). *Biochem Biophys Res Commun.*, 104, 474-482
- Henderson GB and Zevely EM. (1983). *Arch Biochem Biophys.*, 221, 438-446
- Yang C-H, Sirotinak FM and Dembo M. (1984). *J Membr Boil.*, 79, 85-292
- Yang C-H, Sirotinak FM and Dembo M. (1984). *J Membr Biol.*, 79, 285-292
- Sirotinak FM, Kurita S and Hutchinson DJ. (1968). *Cancer Res.*, 28, 75-90
- Neithammer D and Jackson RS. (1975). *Eur J Cancer*, 11, 845-854 1975
- Hill BT, Builey BD, White JC nad Goldman ID. (1979). *Cancer Res.*, 39, 2440-2446
- Sirotinak FM, Moccio Dm, Kelleher LE and Goutas LJ. (1981b). *Cancer Res.*, 41, 4447-4452
- Jansen G, Mauritz R, Drori S, Sprecher H, Kathman I, Bunni M, Priest DG, Noordhuis P, Schornagel JH, Pinedo HM, Peters GJ and Assaraf YG. (1998). *J Biol Chem.*, 273, 30189-30198
- Drori S, Jansen G, Mauritz R, Peters GJ and Assaraf YG. (2000). *J Biol Chem.*, 275, 30855-30863
- Zhao R, Assaraf YG and Goldman ID. (198a). *J Biol Chem.*, 373, 19065-19071
- Ratnam M, Marquardt H, Duhring JL and Freisheim JH. (1989). *Biochemistry*, 28, 8249-8254
- Sadasivan E and Rothenberg SP. (1989). *J Biol Chem.*, 264, 5806-5811
- Ragoussis J, Senger G, Trowsdale J and Campbell IG. (1992). *Genomics*, 14, 423-430
- Wang X, Shen F, Freisheim JH, Gentry LE and Ratnam M. (1992). *Biochem Pharmacol.*, 44, 1898-1901
- Brigle KE, Spinella MJ, Westin EH and Goldman ID. (1994). *Biochem Pharmacol.*, 47, 337-345
- Westerhof GR, Schornagel JH, Kathmann I, Jackman AL, Rosowsky A, Forsch RA, Hynes JB, Boyle FT, Peters GJ, Pinedo HM and Jansen G. (1995). *Mol Pharmacol.*, 48, 459-471
- Spinella MJ, Brigle KE, Sierra EE and Goldman ID. (1995). *J Biol Chem.*, 270, 7842-7849
- Sierra EE, Brigle KE, Spinella MJ and Goldman ID. (1997). *Biochem Pharmacol.*, 53, 223-231
- Saikawa Y, Knight CB, Saikawa T, Page ST, Chabner BA and Elwood PC. (1993). *Biol Chem.*, 268, 5293-5301
- Hsueh C-T and Dolnick BJ. (1994). *Biochem Pharmacol.*, 47, 1019-1027
- O'Connor BM, Jackman AL, Crossley PH, Freemantle SJ, Lunec J and Calvert AH. (1992). *Cancer Res.*, 52, 1137-1143
- Freemantle SJ, Jackman AL, Kelland LR, Calvert Ah and Lunec J. (1995). *Br J Cancer*, 71, 925-930
- Kitchens ME, Forshoefel AM, Barbour KW, Spencer HT and Berger FG. (1999a). *Mol Pharmacol.*, 56, 1063-1070
- Shih C, Chen VJ, Gossett LS, Gates SB, MacKellar WC, Habeck LL, Shackelford KA, Mendelsohn LG, Soose DJ, Patel VF, Andis SL, Bewley JR, Rayl EA, Moroson BA, Beardsley GP, Kohler W, Ratnam M and Schultz RM. (1997). *Cancer Res.*, 57, 1116-1123
- Sanghani SP and Moran RG. (1997). *Biochemistry*, 36, 10506-10516
- Zhao R, Gao F and Goldman ID. (2001). *Biochem Pharmacol.*, 61, 857-865
- Zhao R, Titus S, Gao F, Moran RG and Goldman ID. (2000e). *J Biol Chem.*, 275, 26599-26606
- Ulrich CM, Robien K and McLeod HL. (2003). *Nature*, 3, 912-920
- Valik D, Zapletal O, Demlová R. (2002). *Klinická onkologie*, 6, 230-233.
- Evans WE, Relling MV, Rodman JH, Crom WR, Boyett JM, Pui CHH. (1998). *N Engl J Med.*, 338, 499-505.
- TDM Renaissance and Pharmacogenomic Forum III: Managing the Future. American Association of Clinical Chemistry, Baltimore 2004

METALOTHIONEIN JAKO PROGNOSTICKÝ MARKER NÁDOROVÉHO ONEMOCNĚNÍ

METALLOTHIONEIN AS A PROGNOSTIC MARKER OF TUMOR DISEASE

ZELENÁ J.¹, POTĚŠIL D.¹, VACEK J.¹, ADAM V.¹, HRADECKÝ J.¹, PRŮŠA R.², KIZEK R.¹, VOJTĚŠEK B.

¹ ÚSTAV CHEMIE A BIOCHEMIE, MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ UNIVERZITA, BRNO

² ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A PATOBIOCHEMIE, 2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY, PRAHA

³ ZÁKLADNA EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Metallothionein (MT) je nízkomolekulární intracelulární protein, jehož primární funkcí je udržení homeostázy těžkých kovů v živých organismech. O molekulárních mechanismech exprese MT je známo velmi málo. Regulace exprese se pravděpodobně účastní samotný kov vazbou na transkripční faktor MTF-1. Syntéza lidského metallothioneinu (MT-1a, MT-2a) může být indukována vzrůstající koncentrací těžkých kovů, hormonů, cytokinů nebo xenobiotik. Nedávné výzkumy ukazují na významný vztah koncentrace MT ke karcinogenezi, spontánní mutagenезi a účinnosti protinádorových léčiv. Overexprese metallothioneinů je studována jako nový prognostický marker u řady maligních a gradingovaných nádorů.

Klíčová slova: metallothionein, MT, diagnostika, zvýšená exprese, prognostický marker, lidské nádory

Summary: Metallothionein is a low-molecular intracellular protein which can play an important role in heavy metal homeostasis in living organisms. Less is known about molecular mechanisms of MT expression. Metals probably participate in MT expression by binding to transcriptional factor MTF-1. Expression of human metallothioneins (MT-1a, MT-2a) can be induced by increasing amount of heavy metals, hormones, cytokines, and/or xenobiotics. Recent studies described the important relationship between MT and carcinogenesis, spontaneous mutagenesis and anti-cancer drugs. Overexpression of metallothioneins is studied as a new prognostic marker in a number of malignant and high grading tumors.

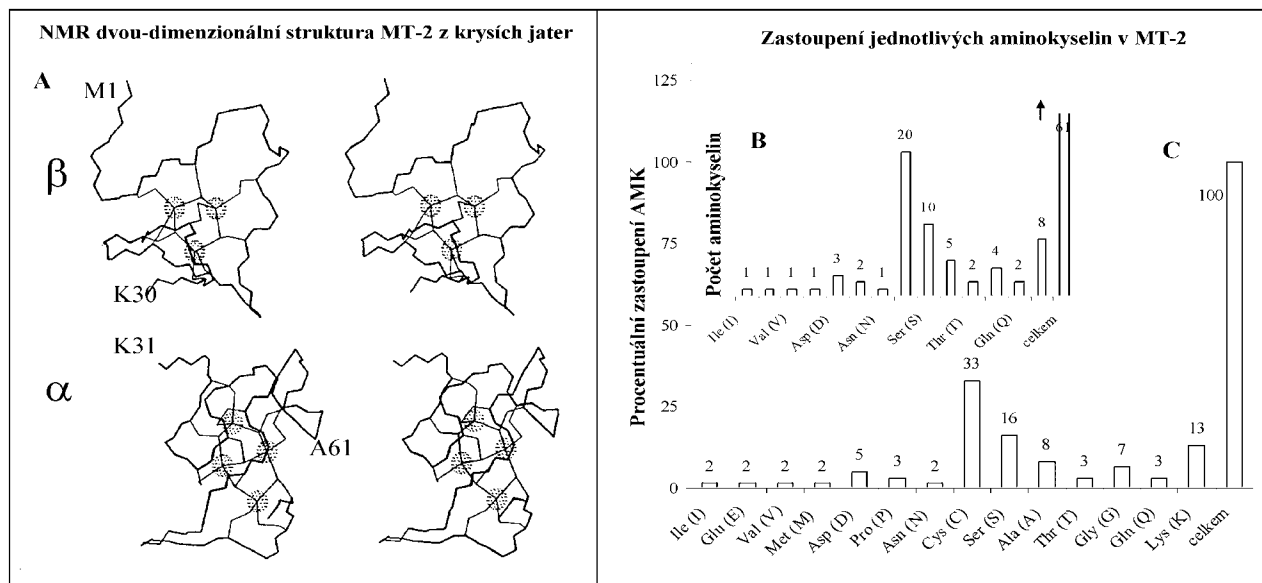
Key words: metallothionein, MT, diagnostics, overexpression, prognostic marker, human tumors

Úvod

Metallothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30 % v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa (1). Díky své vysoké afinitě k těžkým kovům, např. k zinku, mědi nebo kadmii, je jejich hlavní funkcí homeostatická kontrola a detoxikace těchto těžkých kovů u vývojově rozdílných organismů. Objev MT je datován rokem 1957, kdy

Margoshes a Valee izolovali MT z koňských ledvin (2). V molekule MT nejsou přítomny aromatické aminokyseliny a 20 cysteinů se v primární sekvenci vyskytuje obvykle v těchto repetičích: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys, kde X představuje jinou aminokyselinu než cystein. MT se skládají ze dvou vazebných domén (α , β), které jsou složeny z cysteinových klastrů a kovalentní vazby atomů kovů se účastní sulfhydrylové zbytky cysteinů (Obr. 1). N-terminální

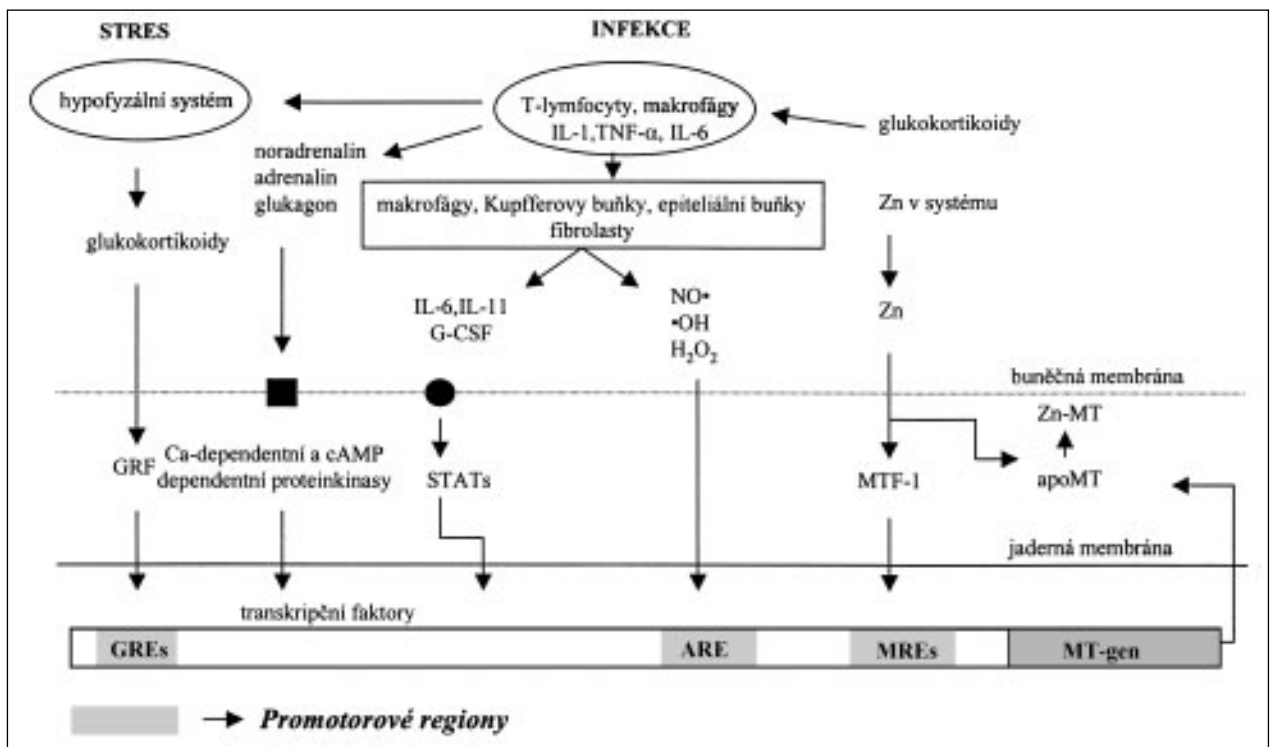
Obr. 1. NMR dvou-dimenzionální struktura β -domény (nahore) a α -domény (dole) MT-2 izolovaného z krysích jater. Tečkami vyznačené oblasti reprezentují atomy kadmia (A). Počet (B) a procentické zastoupení (C) jednotlivých aminokyselin v MT-2 proteinu (izolát z krysích jater). *Převzato a upraveno podle Kägi, Schäffer 1988.*



Obr. 2. Klasifikace metalothioneinů a aminokyselinové sekvence u různých organismů. Vysvětlivky: a) třída MT-I, proteiny zařazené do této třídy byly determinovány u vyšších organismů, především u savců; b) třída MT-II je strukturou podobná metalothioneinům třídy MT-I determinována u savců, ale i v kvasinkách a bakteriích; c) zkratky uvedené v závorkách jsou označení pro specifické isoformy metalothioneinů; převzato z databáze Swiss-Prot (ExPASy Molecular Biology Server, zdroj: <http://www.expasy.ch>).

	1	20	40	60
TŘÍDA I ^{a)}	Člověk (MT-1a ^{a)})	MDPNCSCATGGSCCTCTGSCKCKECKNSCKKSCCSCCPMSCAKCAQGCICKGASEKCSCCA		
	Kůň (MT-1a)	MDPNCSCPTGGSCCTCAGSCKCKECCRTSCKKSCCSCCPGGCARCAQGCVCCKGASDKCSCCA		
	Ovce (MT-1b)	MDPNCSCPTSGSCSCAGSCTCKACRCPSCKKSCCSCCPVCGAKCAQGCVCCKGASDKCSCCA		
	Pes (MT-1)	MDPDCSCSTGGSCCTCAGSCKCKECKCTSCCKKSCCSCCPVCGAKCAQGCICKGASDKCSCCA		
	1	20	40	60
TŘÍDA II ^{b)}	Prase (MT-2a)	MDPNCSCAAGGSCCTCAGSCKCKDCKCTSCCKKSCCSCCPVCGAKCAQGCICKGASDKCSCCA		
	Kvasinka (E_c protein)	GNEGHECQCQCQGSCKNNEQCQKSCSCPTGCNSDDKPCPGNKSEETFKKSCCSGK		
	Cyanobacterium	TSTTLVKACEPECLCNVDPKALDRNGLYYCCEACADGHTGGSKGCGHTGCNC		
	Candida glabrata (MT-2)	PEQVNCQYDCHCSNCACENTCNCCKAPACTNSASNECSCQTCKCQTCKC		

Obr. 3. Schéma regulace *MT* genu během zánětlivé reakce organismu. Při zánětu se zvyšuje hladina cytokinů (IL-1: interleukin-1, TNF- α : tumor necrosis factor- α a IL-6: interleukin-6) v aktivovaných T-lymfocytech a makrofágích. Hladina glukokortikoidů se při stresu prostřednictvím těchto cytokinů zvyšuje přes aktivovaný hypofyzální systém. Glukokortikoidy se v cytoplazmě vážou na GRF (glucocorticoid receptor komplex) a ten pak aktivuje GRE (glucocorticoid responsive element). Zvýšená hladina Zn iontů vazbou na MTF-1 (metal transkripcion faktor) v cytoplazmě naopak aktivuje MRE (metal response element) (MRE) v promotorové oblasti *MT* genu. Při zánětu se z proteinů akutní fáze uvolňuje IL-6, který spouští kaskádu fosorylace tyrosinových zbytků STATs (signal transducer and activator of transcription) a následně jeho vazbu na odpovídající promotorový region *MT* genu. Reaktivní kyslíkové radikály jsou schopny aktivace *MT* genu prostřednictvím antioxidant response elementu (ARE). Kombinací těchto regulačních mechanismů se efektivně zvyšuje hladina *MT* v buňkách jako odpověď na stres a poškození buňky. Převzato a upraveno podle Coyle, P. et al.



část peptidu je označena jako β -doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty a α -doména má schopnost vyvízet čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem 12 atomů (3). MT jsou rozděleny do tříd MT-I a MT-II s ohledem na jejich primární strukturu a organismus, ze kterého byly izolovány (4). MT-I. třída zahrnuje savčí metalothioneiny tvořené 61 až 68 aminokyselinami s molekulovou hmotností 6–7 kDa. Ve MT-II. třídě jsou zařazeny bakteriální MT, proteiny se vzdálenou podobností

k MT-I. třídě, které mají odlišné rozmístění Cys zbytků v molekule proteinu ve srovnání s MT-I. třídou (Obr. 2).

Isoformy metalothioneinů a jejich exprese v lidské tkáni
Lidské MT patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódovány rodinou genů vytvářejících 10 isoformem. Vzniklé proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. Je známo, že *MT-2A* gen kóduje pouze jeden MT-2 protein, zatímco MT-1 protein existuje ve více isoformách, respektive MT-1

protein vytváří více subtypů kódovaných sadou *MT-1* genů (*MT-1A*, *MT-1B*, *MT-1E*, *MT-1F*, *MT-1G*, *MT-1X*) (5). Rozdíly v MT genech pravděpodobně souvisí s jejich rozdílnou funkcí v odlišných podmínkách, ve kterých se organismy vyvíjely (1, 3). V organismu dospělých jedinců jsou nejvíce zastoupeny dvě isoformy MT (*MT-1a*, *MT-2a*), které se exprimují ve většině lidských tkání, v mozkové tkáni je přítomna pouze isoforma *MT-3* (někdy označována jako růstový inhibiční faktor - GIF) (6). V dlaždicovém epitelu je hojně zastoupena isoforma *MT-4* (7).

MT-1 a *MT-2* isoformy jsou obvykle exprimovány v lidském organismu ve velmi malých koncentracích. Jejich exprese výrazně stoupá při indukci mnoha exogenními a endogenními faktory jako jsou UV záření, těžké kovy (Cd, Cu, Pt, Zn, Pb aj.), stresové hormony, volné kyslíkové radikály a cytokiny uvolňující se z poškozené tkáně či xenobiotika (8). Molekulární mechanismus exprese MT je prozatím znám velmi málo, ale pravděpodobně se ho účastní samotný kov vazbou na specifický transkripční faktor, protein označený jako metal transcription factor 1 (MTF-1) (9). Komplex kov-MTF-1 pak v jádře nasedá na metal-responsive element (MRE) v promotorové oblasti MT-genu a spouští jeho transkripci. Na syntéze MT se mohou podílet další regulační proteiny prostřednictvím responsivních elementů jako je glucocorticoid response element (GRE), interferon response element (IRE), signal transducer and activator of transcription (STAT) nebo antioxidant response element (ARE), dále vazebné receptory spojené s tvor-

Tab. 1. Porovnání analytických metod pro stanovení metalothioneinu.

Metoda ^{a)}	Detekční limit (ng/100 µl)	Vzorek
ELISA	0,2	lidská, krysí moč
Western blotting	10 ng proteinu	vzorky <i>MT-1</i> , <i>MT-2</i> , <i>MT-3</i>
CZE-UV detekce	27,2	ovčí jaterní buňky
HPLC-UV detekce	3,1	lidské jaterní buňky
GPC-fluorimetrie	2	krysí tkáňové buňky
DPP	62	vzorky Cd, Zn-MT
AdTS-CPSA ^{b)}	0,16	krabí tkáň

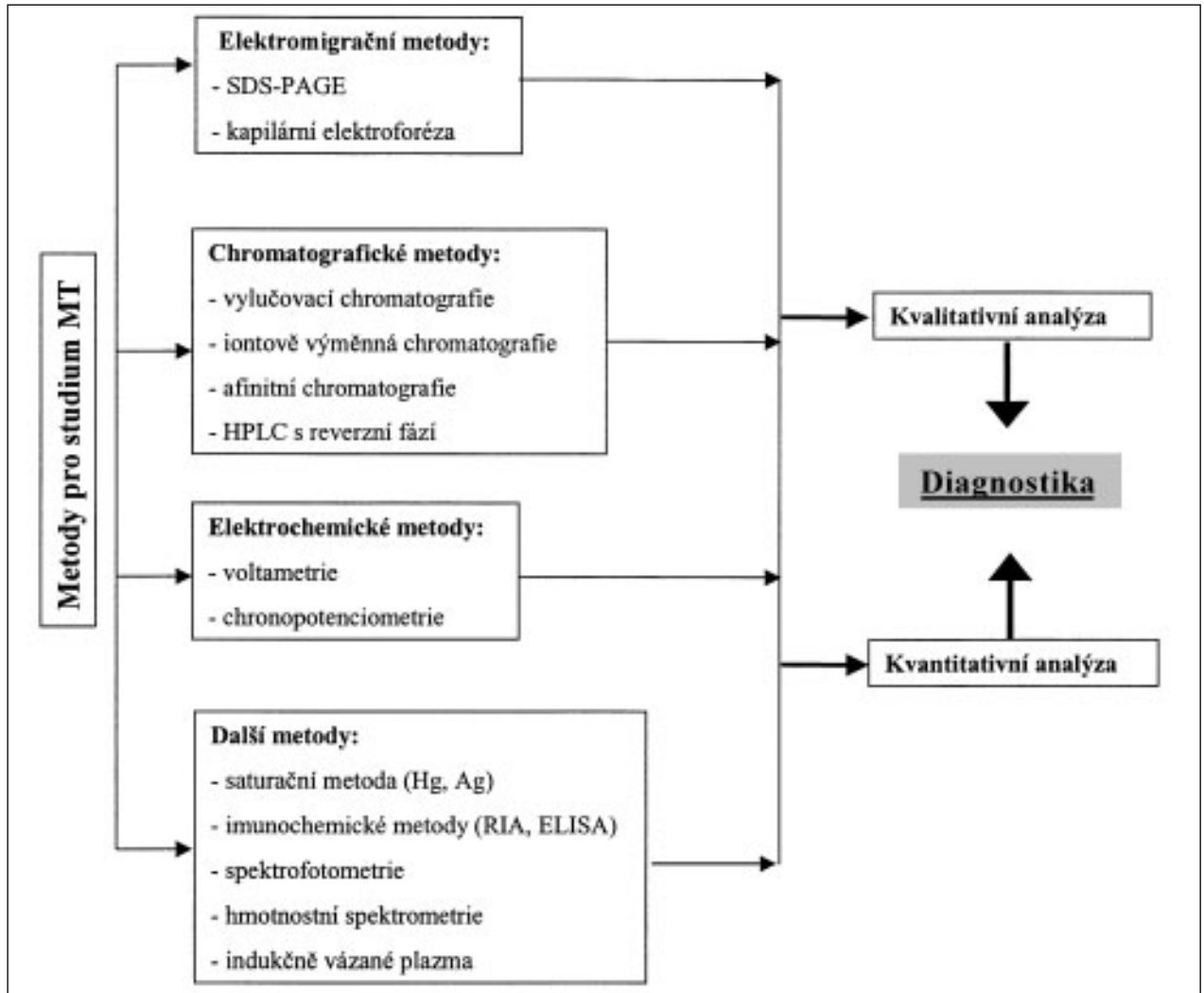
Vysvětlivky: ELISA: enzymová imunoanalýza, CZE: kapilární zónová elektroforéza, HPLC: vysokoúčinná kapalinová chromatografie, GPC: gelová permeační chromatografie, DPP: diferenční pulzní polarografie, AdTS-CPSA: adsorpční přenosová technika kombinovaná s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou za konstantního proudu. a) převzato z práce: *Dabrio, M. et al.* b) převzato z práce: *Kizek, R. et al.*

bou druhých posílů či aktivací běžných transkripčních faktorů (Obr. 3) (10). Jednotlivé isoformy metalothioneinů se pak podílejí na metabolismu detoxikace a homeostázy těžkých kovů, účastní se ochrany organismu před vzniklými volnými kyslíkovými radikály a podporují regeneraci poškozené tkáně (11).

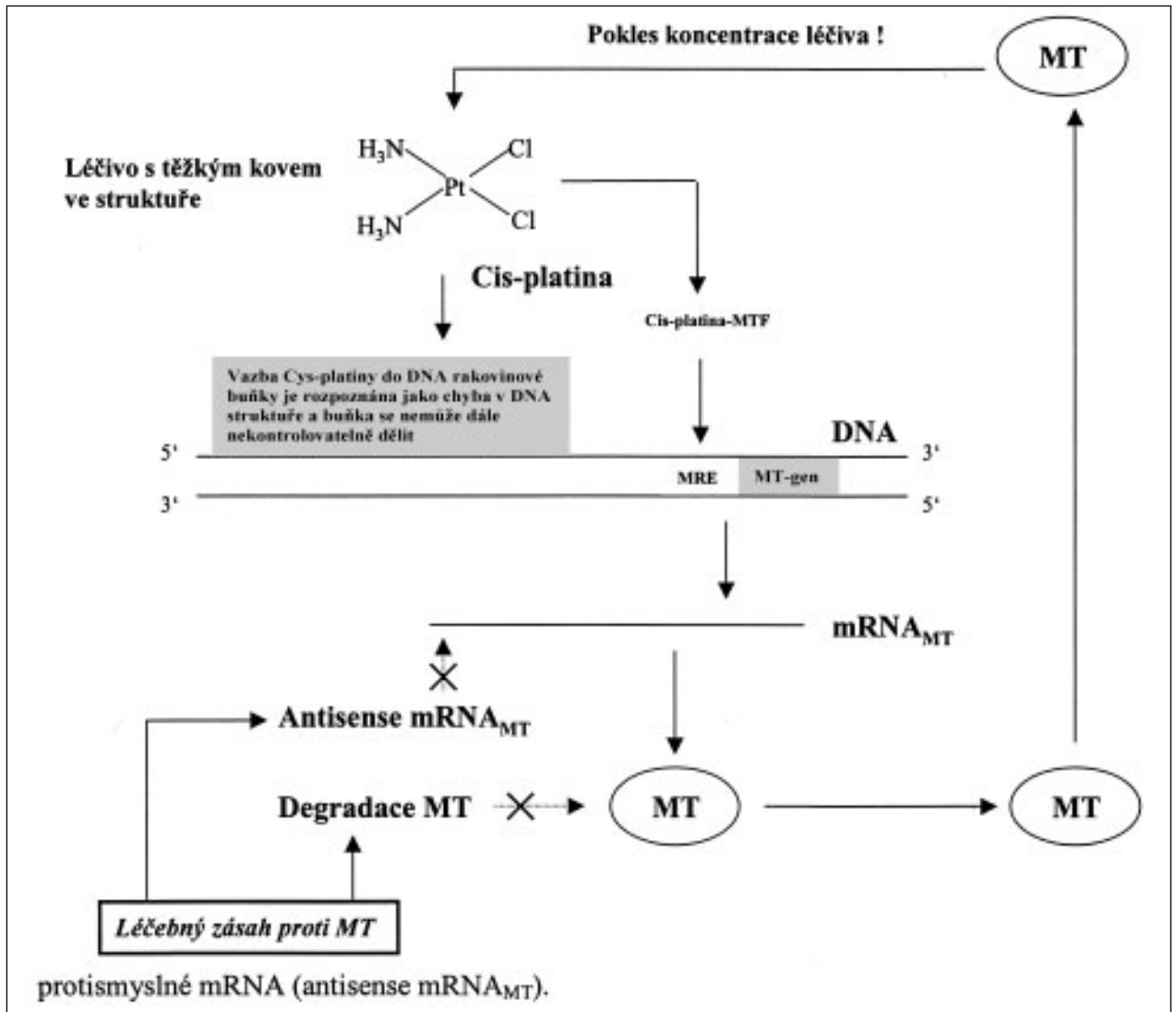
Stanovení MT

Ke stanovení MT je využíváno široké spektrum metod chemické analýzy (12). Tyto metody pro studium MT lze rozdě-

Obr. 4. Schéma pro kvalitativní a kvantitativní analýzu MT aplikovatelnou pro diagnostiku nádorů.



Obr. 5. Pravděpodobný vznik rezistence nádorových buněk k podávanému léčivu – cisplatině. Protinádorový efekt je dán blokováním replikace DNA za vzniku aduktu DNA-cisplatinu. Cisplatinu pravděpodobně indukují MTF-1, který vazbou na MRE spouští expresi MT genu. Syntetizovaný MT vyvazuje podávanou cisplatinu a jeho terapeutická koncentrace výrazně klesá. Léčebný zásah využívá genové terapie zahrnující přímou degradaci MT či vytvoření protismyslné mRNA (antisense mRNA_{MT}).



lit do několika skupin, jak je ukázáno na obrázku 4. Nejčastěji se pro stanovení MT využívá elektromigračních metod: gelové a kapilární elektroforézy a dále pak chromatografických metod. Elektrochemické metody jako je voltametrie zapojená v diferenčním pulzním módu (DPV) nebo derivační chronopotenciometrie s konstantním proudem (CPSA) (13) umožňují studium vazby kovů do struktur MT (14). Pomocí CPSA v kombinaci s technikou adsorptivního přenosu (AdTS) lze stanovovat koncentrace MT na úrovni femtomolů ve velmi malých objemech (jednotky μl) vzorku (15-17) viz tab. 1. Imunochemické metody (RIA a ELISA metody) jsou přesné a citlivé avšak nevýhodou je obtížná příprava protilátek. Detekční limit stanovení koncentrace MT těmito metodami je srovnatelný s CPSA technikou. V klinické praxi se celková koncentrace MT detekuje nejčastěji imunohistochemicky s použitím monoklonální myši protilátky E9 (18).

Metalthioneinový marker – interakce s léčivem

Základní molekulární charakteristiku o vztahu metalothioneinu k rakovině jsme nedávno publikovali v souhrnné práci (19). Zvýšené množství metalothioneinu v nádorových buňkách pravděpodobně souvisí s buněčnou proliferací. Toto zjištění

vede vědce k výzkumu role lidských MT v nádorech. Studuje se zapojení MT do procesu karcinogeneze a spontánní mutagenese (20-22). V novějších výzkumech se posuzuje vztah nadměrné exprese MT a koncentrace protinádorových léčiv obsahujících ve své molekule kov (23, 24). Působení protinádorového léčiva je v organismu velmi komplikované (Obr. 5). V okamžiku, kdy je organismu podána cisplatinu dochází k interakci léčiva a DNA pacienta. Protinádorový efekt cisplatinu je dán jeho vazbou do DNA, čímž dochází k zabránění replikace DNA. Vzniklý adukt DNA-cisplatinu je rozpoznáván reparačními mechanismy buňky, které se tuto chybu snaží opravit. Výsledkem je pak opravená DNA. Naproti tomu podávaná cisplatinu může pravděpodobně stimulovat vazbu MTF-1 na MRE, čímž se spustí transkripce MT genu a dochází k rychlému nárůstu MT koncentrace v buňkách. Exprimovaný MT začne okamžitě vyvazovat cisplatinu přítomnou v buňkách. Výsledkem je prudký pokles koncentrace cisplatinu a její množství se stane biologicky velmi málo účinné. Kombinace aktivní reparace DNA a zvýšené exprese MT vede k selhání klasické terapie (Obr. 5). Terapeutické řešení je při současných technologiích obtížné. Lze navrhnout strategii založenou na genové terapii (Obr. 5) (25, 26). K dispozici jsou

pravděpodobně tři cesty léčebného zásahu. Jednou z cest je blokování syntézy MT s využitím antisense RNA (protismylné RNA) (25). Tato molekula vytvoří s mRNAMT komplex, který je z organismu velmi rychle odbouráván. Výsledkem je, že nedojde ke zvýšení koncentrace MT a cisplatinu může intenzivněji působit na nádorové buňky. Tento způsob byl již experimentálně ověřován (25). Podobná strategie je nezbytná pro vyřazení reparačních mechanismů buňky. Další možností je pokusit se vzniklý protein degradovat specifickou proteázou nebo se pokusit jej vyvazovat dalším externě podávaným kovem (25) (Obr. 5).

Spojitost nadměrné exprese s nádorovým onemocněním – metallothionein jako prognostický marker

V posledních letech je studována zvýšená exprese MT (overexpres) u různých nádorů. Jedná se o expresi dvou isoform MT (konkrétně MT-1a a MT-2a), které se detekují nejčastěji imunohistochemicky E9 protilátkou. Zvýšená exprese těchto MT isoform je převážně spojena s maligními nádory a je studována jako nový prognostický marker v progresi onemocnění, přežití pacientů, korelací s histologickým typem nádoru a nádorovým gradingem (27-30). Zvýšená exprese MT je iniciována s maligními nádory a typy nádorů s vyšším gradingem u karcinomu prsu (27, 31), u kožních karcinomů (32), hepatocelulárního karcinomu (33), kožních melanomů (34), cervikálních karcinomů (35), akutní lymfoblastické leukémie (36), karcinomu pankreatu (37) a je významně spojena s progresí a horší prognózou nádorového onemocnění. Naproti tomu bylo zjištěno, že zvýšená exprese MT souvisí s typy nádorů s nižším gradingem u karcinomu tlustého střeva (38), karcinomu močového měchýře (39) a fibroblastických kožních nádorů (40). Novější studie potvrdily korelaci mezi nadměrnou expresí MT a gradingem u karcinomu vaječníku (41) a karcinomu plic (23). U pacientů s primárním kožním melanomem byla Weinlichem statisticky potvrzena spojitost overexpres MT s progresí onemocnění a úmrtí pacientů na metastázy (34). Weinlich tuto studii prováděl u 520 pacientů s primárním kož-

ním melanomem po dobu 5ti let. Zvýšená MT-exprese byla detekována u 156 pacientů z 520 (30 % z 520). Pacienti s overexpresí byli označeni jako MT-positivní. Z vybraného souboru 30 MT-positivních pacientů se zhoršenou progresí onemocnění spojenou s metastázami jich v průběhu studie 24 zemřelo. Naopak u 364 pacientů, kteří patřili do MT-negativní skupiny bez overexpres MT (70 % z 520), bylo u vybrané skupiny 30 pacientů se zhoršenou progresí onemocnění a metastázami pozorováno 6 případů s letálním koncem. Z těchto výsledků vyplývá, že zvýšená exprese MT by mohla být novým prognostickým markerem v progresi onemocnění a přežití pacientů u toho typu nádoru.

Závěr

V této práci jsme se snažili poukázat na významnost nadměrné exprese metallothioneinů v lidských nádorech. Zvýšená exprese MT je statisticky významná u maligních nádorů a nádorů s vyšším gradingem. Sledování nadměrné exprese MT v těchto nádorech by mohlo být novým prognostickým markerem progresie nádorového onemocnění. Vyšetření pomocí MT-markeru by tak mohlo identifikovat pacienty ohrožené progresí maligního onemocnění, a tak pomoci zlepšit kvalitu jejich života.

Poděkování. Práce na tomto příspěvku byla financována grantem: FRVŠ 164/2004, GAČR 525/04/P132, IGA MZLU 3/2004.

Zkratky

MT – metallothionein
SH – sulfhydrylová skupina
GIF – růstový inhibiční faktor
MTF-1 – metal transcription faktor
MRE – metal responsive element
GRE – glucocorticoid response element
STAT – signal transducer and activator of transcription
ARE – antioxidant response element
DPV – diferenční pulzní voltametrie
AdTS-CPSA – adsorptivní přenosová technika kombinovaná s chronopotentiometrickou rozpuštěcí analýzou za konstantního proudu
RIA – radioimunoanalýza
ELISA – enzymová imunoanalýza

Literatura

1. Kägi, J. H. R., Schäffer, A. Biochemistry of Metallothionein. Biochemistry, 27, 1988, s. 8509–8515.
2. Margoshes, M., Vallee, B. L. A. A cadmium protein from equine kidney cortex. J. Am. Chem. Soc., 79, 1957, s. 4813–4814.
3. Kägi, J. H. R., Kojima, Y. Biochemistry of Metallothionein. Experientia, Suppl., 52, 1987, s. 25–61.
4. Kojima, Y. Definitions and nomenclature of metallothioneins. Methods Enzymol., 205, 1991, s. 8–10.
5. Karin, M., Eddy, R. L., Haley, L. L., Byers, M. G., Shows, T. B. Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 1984, s. 5494–5498.
6. Masters, B. A., Quaipe, C. J., Erickson, J. C., Kelley, E. J., Froelick, G. J., Zambrowicz, B. P., Brinster, R. L., Palmiter, R. D. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. J. Neurosci., 14, 1994, s. 5844–5857.
7. Vašák, M., Hasler, D. W. Metallothioneins: new functional and structural insights. Curr. Opin. Chem. Biol., 4, 2000, s. 177–183.
8. Kägi, J. H. R. Overview of metallothionein. Metallobiochemistry Part B: metallothionein and related molecules. Methods Enzymol., 205, 1993, s. 613–626.
9. Palmiter, R. D. Regulation of metallothionein gene by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 1994, s. 1219–1223.
10. Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., Rofe, A. M. Metallothionein: The multipurpose protein. Cell. Mol. Life Sci., 59, 2002, s. 627–647.
11. Brady, F. The physiological function of metallothionein. Trends Biochem. Sci., 7, 1982, s. 143–145.
12. Dabrio, M., Rodriguez, A. R., Bordin, G., Bebianno, M. J., De Ley, M., Šestáková, I., Vašák, M., Nordberg, M. Recent developments in quantification methods for metallothionein. J. Inorg. Biochem., 88, 2002, s. 123–134.
13. Trnková, L., Kizek, R., Vacek, J. Catalytic signal of rabbit liver metallothionein on a mercury electrode: combination of derivative chronopotentiometry with adsorptive transfer stripping. Bioelectrochem., 56, 2002, s. 57–61.
14. Průša, R., Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Zehnálek, J. Study of relationship between metallothionein and heavy metals by CPSCA method. Clin. Chem. (v tisku), 2004.
15. Kizek, R., Trnková, L., Paleček, E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. Anal. Chem., 73, 2001, s. 4801–4807.
16. Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Klejduš, B., Havel, L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for metallothionein electrochemical detection. Chem. Listy, 98, 2004, s. 160–167.
17. Strouhal, M., Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Němec, M. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. Bioelectrochem., 60, 2003, s. 29–36.
18. Jasani, B., Elmes, M. E. Immunohistochemical detection of metallothionein. Metallobiochemistry Part B: Metallothionein and related molecules. Methods Enzymol., 205, 1991, s. 95–107.
19. Kizek, R., Vacek, J., Adam, V., Vojtěšek, B. Vztah metallothioneinu k rakovině a protinádorové léčbě. Klin. Biochem. Metab., 12, 2004, s. 72–78.
20. Goncharova, E. I., Rossman, T. G. A role for metallothionein and zinc in spontaneous mutagenesis. Cancer Res., 54, 1994, s. 5318–5323.
21. Coogan, T. P., Shiraishi, N., Waalkes, M. P. Apparent quiescence of metallothionein gene in rat ventral prostate-association with cadmium-induced prostate tumors in rats. Environ. Health Perspec., 102, 1994, s. 137–139.
22. Waalkes, M. P., Diwang, B. A., Weghorst, C. M., Bare, R. M., Ward, J. M., Rice, J. M. Anticarcinogenic effects of cadmium in B6C3F1 mouse liver and lung. Toxicol. Appl. Pharmacol., 110, 1991, s. 327–335.
23. Theocharis, S., Karkantaris, C., Philipides, T., Agapitos, E., Gika, A., Margeli, A., Kittas, C., Koutselinis, A. Expression of metallothionein in lung carcinoma: correlation with histological type and grade. Histopathology, 40, 2002, s. 143–151.
24. Kelly, S. L., Basu, A., Teicher, B. A., Hacker, M. P., Hamer, D. H., Lazo, J. S. Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. Science, 241, 1988, s. 1813–1815.
25. Ebadi, M., Iversen, P. L. Metallothionein in carcinogenesis and cancer chemotherapy. Gen. Pharmac., 25, 1994, s. 1297–1310.

26. Vandier, D., Calvez, V., Massade, L., Gouyette, A., Mickley, L., Fojo, T., Rixe, O. Transactivation of the metallothionein promoter in cisplatin-resistant cancer cells: a specific gene therapy strategy. *J. Natl. Cancer I.*, 8, 2000, s. 642-647.
27. Douglas-Jones, A. G., Schmid, K. W. S., Bier, B., Horgan, K., Lyons, K., Dallimore, N. D., Moneypenny, I. J., Jasani, B. Metallothionein expression in duct carcinoma in situ of the breast. *Hum. Pathol.*, 26, 1995, s. 217-222.
28. Kuo, T., Lo, S. K. Immunohistochemical metallothionein expression in thymoma: correlation with histological types and cellular origin. *Histopathology*, 30, 1997, s. 243-248.
29. Jasani, B., Schmid, K. W. S. Significance of metallothionein over-expression in human tumors. *Histopathology*, 31, 1997, s. 211-214.
30. Joseph, M. G., Banerjee, D., Kochar, W., Feld, R., Stitt, L. W., Cherian, M. G. metallothionein expression in patients with small cell carcinoma of the lung. *Cancer*, 92, 2001, s. 836-842.
31. Bier, B., Douglas-Jones, A. G., Totsh, M., al., e. Immunohistochemical demonstration of metallothionein in normal human breast tissue and benign and malignant lesions. *Breast Cancer Res. Treat.*, 30, 1994, s. 213-221.
32. Zelger, B., Hittmair, A., Schir, M., al., e. Metallothionein expression in nonmelanoma skin cancer. *Appl. Immunohistochem.*, 2, 1993, s. 254-260.
33. Huang, G. W., Yang, L. Y. Metallothionein expression in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.*, 8, 2002, s. 650.
34. Weinlich, G., Bitterlich, W., Mayr, V., Fritsch, P. O., Zelger, B. Metallothionein-overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. *Brith. J. of Dermatol.*, 149, 2003, s. 535-541.
35. Lim, K., Evans, A., Adams, M. Association of immunohistochemically detectable metallothionein (IDMT) expression with malignant transformation in cervical neoplasia. *J. Pathol.*, 178 (Suppl.), 1996, s. 48A.
36. Sauerbrey, A., Zintl, F., Volm, M. Expression of metallothionein in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Ann. Haematol.*, 69, 1994, s. 111-115.
37. Ohsio, G., Imamura, T., Okada, N., al., e. Immunohistochemical study of metallothionein in pancreatic carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 122, 1996, s. 351-355.
38. Tuccari, G., Giuffre, G., Barresi, G. Immunohistochemical expression of metallothioneins in colorectal adenocarcinoma. *Virchows Arch.*, 427, 1996, s. 547-548.
39. Bahnson, R., Banner, B. F., Ernstoff, M. S., Lazo, J. S., Cherian, M. G., Banerjee, D., Chin, J. L. Immunohistochemical localization of metallothionein in transitional cell-carcinoma of the bladder. *J. Urology*, 146, 1991, s. 1518-1520.
40. Zelger, B. W. H., Sidoroff, A., Stanzl, U., Fritsch, P. O., Ofner, D., Zelger, B., Jasani, B., Schmid, K. W. S. Deep penetrating dermatofibroma versus dermatofibrosarcoma protruberans - a clinicopathologic comparison. *Am. J. Surg. Pathol.*, 18, 1994, s. 677-686.
41. McCluggage, W. G., Strand, K., Abdulkadir, A. Immunohistochemical localization of metallothionein in benign and malignant epithelial ovarian tumors. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 12, 2002, s. 62-65.

informace

Návrh textu pro distribuci praktickým lékařům použitelný jako deklarace spoluúčasti na plnění Národního onkologického programu veřejně vyvěšená v čekárně či ordinaci

NAŠE ORDINACE PŘÍSPÍVÁ K BOJI S RAKOVINOU

při plnění Národního onkologického programu
záchtem zhoubných nádorových onemocnění v časných stádiích,
 kdy jsou zhoubné nádory vyléčitelné,
a prevencí jejich vzniku

proto **nabízíme, poskytujeme, zprostředkujeme:**

- konzultace individuálního rizika** vzniku zhoubných nádorů v souvislosti s jejich výskytem u příbuzných, při zvýšeném riziku pak **vyšetření specializovaným onkogenetikem**
- informaci o individuální míře rizika** vzniku jednotlivých typů zhoubných nádorů ve vztahu k pohlaví a aktuálnímu věku s doporučením vhodných preventivních vyšetření
- preventivní vyšetření** v rozsahu hrazeném podle platné vyhlášky zdravotní pojišťovnou nebo v nadstandardním rozsahu, přiměřeném věku zájemce, jako zvlášť placenou službu
- informaci a od příslušného věku i **přístup do screeningových programů** pro časný záchyt nádorů prsu, nádorů hrdla děložního a nádorů tlustého střeva a konečníku
- přímý kontakt a doporučení na specializovaná pracoviště** pro diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění v případě zjištěného nádoru nebo podezření na nádor
- napojení na onkologické informační centrum**, které poskytuje rady a informace o diagnostice, léčbě a prevenci nádorů i kontaktech na specialisty, a to telefonicky, elektronickou poštou nebo v přímém osobním kontaktu
- kontakt na poradnu pro **odvykání kouření** a poradnu pro **zdravou výživu a redukci nadváhy**

Podpis a razítko lékaře

MÍSTO BISFOSFONÁTŮ PŘI SKELETÁLNÍM POSTIŽENÍ U KARCINOMU PROSTATY

BONE LESIONS AND THE ROLE OF BISPHOSPHONATES IN PROSTATE CANCER

KOLOMBO I.¹, KOLOMBOVÁ J.², HANUŠ, T.³

¹UROLOGICKÁ AMBULANCE MĚSTSKÉ NEMOCNICE TURNOV

²OSTEOLOGICKÁ PORADNA MĚSTSKÉ NEMOCNICE TURNOV

³UROLOGICKÁ KLINIKA VFN PRAHA A 1. LF UK A KATEDRA UROLOGIE IPVZ PRAHA

Souhrn: Karcinom prostaty je nejčastějším maligním onemocněním mužů. Kostní postižení metastázami a osteoporózou často navozenou protinádorovou léčbou je spojeno se značným rizikem vzniku skeletálních komplikací. Prevence a léčba těchto stavů zoledronátem zlepšuje kvalitu života nemocných a účinně zamezuje či oddaluje rozvoj těchto komplikací. Zoledronát je považován za bezpečný, dobře tolerovaný a účinný preparát při prevenci a léčbě skeletálního postižení u karcinomu prostaty. Rovněž naše první zkušenosti potvrzují dobrou toleranci a bezpečnost u nemocných se závažným kostním postižením u karcinomu prostaty.

Klíčová slova: karcinom prostaty, bisfosfonáty, skeletální komplikace

Summary: Prostate cancer is the most common malignancy in males. Metastatic or osteoporotic bone affections induced by cancer treatment are associated with a significant risk of adverse skeletal complications. Prevention and treatment of skeletal related events (SREs) by zoledronic acid can improve quality of life and effectively prevent and postpone SREs. Zoledronic acid is considered the progression of safe, well tolerated, and effective in the prophylaxis and treatment of SREs due to prostate cancer. Our first experiences support these findings concerning safety and good tolerability by patients with serious bone affection of prostate cancer.

Key words: prostate cancer, bisphosphonates, skeletal complications

Úvod

Karcinom prostaty je nejčastějším maligním nedermatologickým nádorovým onemocněním na světě [23,26,31] a druhou nejčastější příčinou úmrtí na nádorové onemocnění u mužů ve Spojených státech amerických [31]. Incidence a mortalita karcinomu prostaty je obecně vyšší v západních zemích než v zemích rozvojových [49]. Nejhorší je situace v Evropě a na severoamerickém kontinentu. V Evropě je diagnostikováno asi 2,6 milionů nových případů karcinomu ročně [1] a karcinom prostaty představuje 9 % úmrtí na karcinom v Evropské unii [9]. Dle údajů švédského Ministerstva zdravotnictví je ve Švédsku karcinom prostaty nejčastějším maligním onemocněním mužů a celkový počet dosáhl 31,5 % nových případů rakoviny v roce 1999 (Cancer incidence in Sweden 2000)[15]. Obdobně i v USA představuje karcinom prostaty celou jednu třetinu všech nově zjištěných maligních nádorů u mužů [31]. Je odhadováno, že v letošním roce bude mít karcinom prostaty nově diagnostikováno asi 540.000 mužů celosvětově [25]. Dle údajů Národního onkologického registru ČR dosáhla v roce 2000 incidence karcinomu prostaty v České republice 54,4/100.000 mužů. Na rozdíl od jiných zhoubných nádorů bohužel narůstá i mortalita, která v roce 2000 dosahovala 26,5/100.000 mužů. Přes zavedení PSA do diagnostiky karcinomu prostaty zůstává nepříznivě vysoký podíl pokročilého onemocnění v době stanovení diagnózy. Přibližně třetina nemocných má zjištěný lokalizovaný nádor a asi 40 % tumorů je v době diagnózy generalizovaných [2]. Skelet je nejčastějším místem lokalizace metastáz při pokročilém karcinomu prostaty a u nemocných, kteří zemřou na karcinom prostaty se kostní metastázy vyskytují téměř v 80% případů [29]. Přes dosažené pokroky v léčbě pokročilých nádorových onemocnění zůstávají u kostních metastáz v platnosti slova GR Mundyho: „Bone metastasis is a catastrophic complication for most

patients with cancer. Not only does it cause intractable pain and fracture after trivial injury, spinal cord compression, and hypercalcemia, it also signifies that the malignant process is incurable.“ Gregory R.Mundy, MD (Cancer 1997; 80: 1546) „Kostní metastáza je katastrofickou komplikací pro většinu pacientů s rakovinou. Nejenže působí neustupující bolest a zlomeninu po triviálním úrazu, míšní kompresi, hyperkalcemii, ale také znamená, že se maligní proces stal nevyhléditelným.“ Rozvoj kostní zlomeniny u nemocných s karcinomem prostaty je negativním prediktorem celkového přežití nezávislým na patologickém stadiu onemocnění [44]. Kromě vlastních metastáz přispívá ke zvýšenému riziku patologických zlomenin také rozvoj metabolického postižení skeletu charakteru syndromu kostního hladu („bone hunger syndrome“) při sekundární hyperparatyreóze [6] a ztráta kostní hmoty indukovaná samotnou protinádorovou terapií [17].

Skelet a karcinom prostaty

Pro urologické malignity a zvláště pro karcinom prostaty je typický sklon k častému metastazování do skeletu. Pro lepší představu je incidence kostních metastáz u nejčastějších malignit uvedena v tabulce č 1.

Kostní metastázy jsou nejčastějším projevem pokročilého karcinomu prostaty a mohou být provázeny výraznou morbiditou [33,34,39] a výrazně narušují kvalitu života [27]. Riziko skeletálních komplikací vyplývá z několika faktorů: 1) často snížená kostní denzita již v době diagnózy maligního onemocnění [42], 2) protinádorová léčba indukující další ztrátu kostní hmoty [17,18,20,21], 3) rozvoj generalizovaného či lokalizovaného kostního postižení vlastními metastázami a jimi navozenými metabolickými změnami v rámci „bone hunger syndromu“ [7]. Morbidita spojená s výskytem skeletových komplikací si mnohdy vyžádá další léčbu, která zahrnuje zevní

Tabulka č. 1: Prevalence některých nádorových onemocnění a incidence kostních metastáz u těchto onemocnění.

Typ karcinomu	Prevalence onemocnění USA (x 100 000)	Kostní metastázy Incidence (%)	Medián přežívání (měsíce)
Prostata	984	65-75	36
Močový měchýř	582	40	6-9
Ledvina	198	20-25	12
Myelom	75-100	95-100	24
Plíce	386	30-40	7
Melanom	467	14-45	6
Prsní žláza	1993	65-75	24
Štítná žláza	207	60	48

Upraveno podle zdrojů: Coleman RE: Skeletal complication of malignancy. Cancer 1997; 80 (suppl): 1588-1594 a National Cancer Institute. US Estimated Prevalence Counts on 1/1/2000. Available at [http://canques.seer.cancer.gov/cgi-bin/cq_submit?dir=prev2000&d \[18,43\]](http://canques.seer.cancer.gov/cgi-bin/cq_submit?dir=prev2000&d [18,43])

radioterapii, nutnost provedení ortopedicko-chirurgických výkonů na skeletu ohroženého či postiženého patologickými zlomeninami, změnu protinádorové terapie a paliativní analgetickou léčbu [53]. Situaci komplikuje a postižení skeletu dále prohlubuje častá koincidence s metabolickými onemocněními skeletu, mezi které patří například **osteoporóza**. Rovněž vlastní protinádorová léčba vede k rozvoji demineralizace skeletu. Příkladem je antiandrogenní léčba u karcinomu prostaty [19,20,21,45]. Medikamentózní i chirurgická kastrace přispívají k rozvoji osteoporózy, která však je zatím z ne zcela jasných důvodů vyjádřena u řady nemocných ještě před zahájením léčby [42]. Rovněž kurativní aktinoterapie karcinomu prostaty a močového měchýře vede ke snížení hladin testosteronu asi o 30 %. Také vlastní metastatické postižení kostního systému vede k rozvoji rozsáhlých hormonálně-metabolických procesů, které dále přispívají ke zvýšené fragilitě skeletu. Příkladem může být například rozvoj **sekundární hyperparatyreózy** [6] u pokročilého karcinomu prostaty s rozvojem „**bone hunger syndromu**“ (syndromu kostního hladu). Kromě jasně zhoršené kvality života u takto postižených nemocných bylo prokázáno i signifikantně kratší přežívání těchto nemocných při rozvoji skeletální komplikace. Vzhledem k této skutečnosti je vhodné mimo standardní scintigrafie skeletu vyšetřování denzitometrie skeletu – DEXA [44] a metabolického postižení skeletu moderními osteomarkery [4,5,6,8].

Současné terapeutické možnosti a doporučení při skeletálním postižení u karcinomu prostaty

Při potvrzení kostního postižení a hrozících komplikací je plně indikována časná léčba ve spolupráci s onkologem a osteologem. Vzhledem k závažnosti a vysoké četnosti skeletálního postižení u karcinomu prostaty je této problematice věnována velká pozornost předních odborníků a jsou vypracována léčebná schémata těchto stavů. Základem léčby pokročilého karcinomu je antiandrogenní terapie a následně další hormonální manipulace v režimech druhé a třetí linie [16,28]. Zevní radioterapie představuje další významnou léčebnou modalitu a může být aplikována lokálně nebo v případě rozsáhlejšího skeletálního postižení plošně tzv. „hemi-body radiation“ [28]. V paliativních režimech má své místo i systémová aplikace radionuklidů ⁸⁹Stroncium (⁸⁹St), ¹⁸⁶Rhenium (¹⁸⁶Re) a ¹⁵³Samarium (¹⁵³Sm), kdy využití těchto paliativních postupů přináší zajištěnou uspokojivě kvalitu života [14,30,46]. Kromě čistě analgetických režimů se v paliativní léčbě skeletových metastáz užívají **bisfosfonáty**. Efekt prvních generací bisfosfonátů spočíval v redukci bolesti se zlepšením kvality života a mobility nemocných [24,36]. Byl prokázán i pozitivní vliv bisfosfonátů na přidružené osteoporotické postižení skeletu [13,47,57,58]. Na rozdíl od prvních generací bisfosfonátů, kdy příznivý efekt jejich

aplikace u metastatického postižení skeletu byl spojen s prodloužením intervalu bez progresu, ale nebyl ještě statisticky významný, byl u zoledronátu (3. generace bisfosfonátů) prokázán statisticky významný efekt v řadě parametrů [53,54,56]. V multicentrické, randomizované, dvojitě zaslepené a placebem kontrolované studii, kdy nemocným byla současně podávána protinádorová léčba byl prokázán příznivý efekt podávání 4 mg zoledronátu i.v. každé 3 týdny u nemocných s hormonálně independentním karcinomem prostaty s metastatickým postižením skeletu [54]. Potenciální výhodou bisfosfonátů v prevenci skeletálních komplikací může být i jejich protinádorové působení. V celé řadě studií byl prokázán také přímý protinádorový vliv bisfosfonátů [11,12,41]. Při srovnávání cytostatického a apoptického efektu jednotlivých bisfosfonátů na buňky karcinomu prostaty (klodronátu, pamidronátu, ibandronátu a zoledronátu) byl zaznamenán nejvýraznější apoptotický potenciál u zoledronátu [22]. Přehled relativní účinnosti bisfosfonátů in vivo je uveden v tabulce č. 2. Výhoda intravenózního podání u bisfosfonátů vyplývá z obecně charakteristického nedostatečného vstřebávání z gastrointestinálního traktu. Biologická dostupnost při perorální aplikaci je pouze kolem 1-3 % [3].

Tabulka č. 2 shrnuje relativní účinnost bisfosfonátů in vivo.

Typ bisphosphonátu	Relativní účinnost in vivo	RI	RII	Způsob aplikace
Etidronát	1	OH	CH3	orální;intravenózní
Clodronát	10	Cl	Cl	orální;intravenózní
Pamidronát	100	OH	CH2CH2NH2	intravenózní
Alendronát	700	OH	(CH2)3NH2	orální;intravenózní
Ibandronát	4 000	OH	CH2CH2N(CH3)(pentyl)	orální;intravenózní
Zoledronát	10 000	OH	CH2-imidazol	intravenózní

V rámci komplexní péče o skelet je v současnosti věnována velká péče prevenci ztráty kostní hmoty, kterou působí vlastní protinádorová léčba a také prevenci a léčbě vlastního metastatického procesu. Tabulka č. 3 shrnuje doporučené režimy a postupy u karcinomu prostaty [35].

Tabulka č. 3 shrnující možnosti prevence a léčby skeletálních komplikací.

Prevence a léčba skeletálních komplikací	
Protinádorová léčba indukující ztrátu kostní hmoty	Metastatické postižení skeletu
Vitamin D 400-800 IU/denně	Chemoterapie (mnohdy však pouze s paliativním efektem bez signifikantního prodloužení celkové délky života)
Kalcium –suplementace 500-1500 mg/denně	Medikamentózní či chirurgická kastrace u CaP (s užitím či bez užití antiandrogenů)
Kalcitonin	Podpurná symptomatická léčba • Zevní radioterapie/užití radioizotopů • Komplexní analgetická léčba lokálních symptomů • Ortopedicko-chirurgické intervence při hrozících či již manifestních patologických frakturách
Bisfosfonáty s preferencí intravenózního podání	Bisfosfonáty intravenózně s preferencí zoledronátu (Zometa)

Upraveno podle Kurth KH, 2004 [35]

Přehled indikace k zahájení léčby zoledronátem u karcinomu prostaty vychází z doporučení 3rd International Consultation on Prostate Cancer 2003 – Paříž; 249-284 [16] – viz. tabulka č. 4. Přehled preventivní léčby skeletálního postižení a současně platných léčebných schémat u karcinomu prostaty i v dalších indikacích shrnují následující tabulky.

Indikace k zahájení léčby intravenózními bisfosfonáty (zoledronát) při karcinomu prostaty			
Stadium onemocnění a stav pacienta			
Negativní kostní sken		Pozitivní kostní sken	
Hormonálně senzitivní	Hormonálně refrakterní	Hormonálně senzitivní	Hormonálně refrakterní
Ne	Nasazení bisfosfonátů v závislosti na individuálním zhodnocení ošetřujícím lékařem, protože riziko rozvoje skeletálních metastáz je vysoké- nutná monitorace.	O nasazení bisfosfonátů by mělo být velmi vážně uvažováno.	Ano
Kdykoliv v průběhu léčby se známkami ztráty kostní hmoty by mělo být zvaženo nasazení bisfosfonátů (zoledronátu).			

Komplexní přístup ke skeletálnímu postižení u karcinomu prostaty – vlastní zkušenosti

Vzhledem k častosti kostních komplikací u nemocných s pokročilými urologickými malignitami a zejména u karcinomu prostaty jsme v minulosti museli opakovaně přistoupit k chirurgické léčbě patologických zlomenin. Příkladem je 57letý nemocný s pokročilým karcinomem prostaty, u kterého bylo nutné řešit patologickou subkapitální zlomeninu kyčelního kloubu (vzniklou při běžném nasedání na kolo) cervikokapitální endoprotézou (obr. 1+2 předoperační a pooperační nálezy). Na obr. 3 je příklad rozsáhlého metastatického postižení osového skeletu v oblasti krční páteře u 76letého nemocného s rozvojem kompresivní radikulopatie C5 vlevo řešené ve spolupráci s neurochirurgickým pracovištěm aplikací pevného „turtle-neck“ límce.

Metodika a soubor

Z výše uvedeného vyplývá, že k nemocným se skeletálním postižením proto přistupujeme komplexně ve spolupráci s osteologickou poradnou, onkology a radioterapeuty, případně chi-

Obrázek 1.



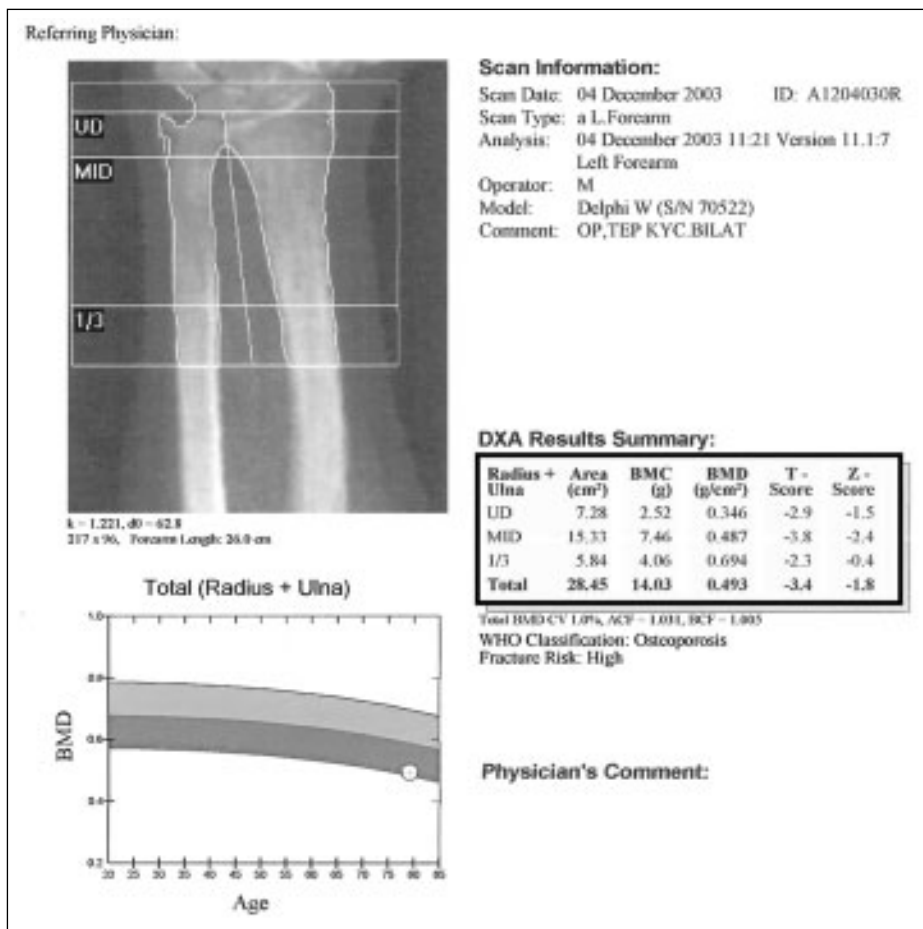
Obrázek 2.



Obr. 3. Zobrazení metastatického postižení obratlů v krčním úseku páteře magnetickou rezonancí u nemocného s pokročilým karcinomem prostaty. Maximum postižení je v oblasti obratlových těl C5-7 s klinickým obrazem kompresivní radikulopatie v příslušných segmentech levé horní končetiny.



Obr. 4. Denzitometrické vyšetření prokazuje pokročilou osteoporózu s vysokým rizikem patologické zlomeniny.



Diskuze

Zoledronát může být pro svoji vysokou efektivitu v léčbě a prevenci osteoporotických komplikací přínosný také v řadě dalších situacích, které se v souvislosti se snahou o prevenci a léčbu skeletálního postižení vyskytnou. Obecně lze považovat zoledronát za bezpečný, dobře tolerovaný a účinný preparát při prevenci a léčbě skeletálního postižení u karcinomu prostaty, ale i u celé řady dalších malignit a patologických stavů. Dobrá tolerance a bezpečnost zoledronátu je srovnatelná s ostatními bisfosfonáty a placebem [48]. Potenciální výhodou bisfosfonátů v prevenci skeletálních komplikací může být i jejich protinádorové působení. V metaanalýze studií používajících v léčbě bisfosfonáty byla výhoda zvláště patrná u nemocných léčených déle než 1 rok, kdy došlo ke snížení rizika vzniku zlomeniny až o 40 % [52]. Výhody zoledronátu byly kromě karcinomu prostaty potvrzeny také u karcinomu prsu [50] a hyperkalcémie u maligních onemocnění [40]. Rovněž pokroky ve vývoji molekulární biologie s uplatněním tzv. „smart drugs“, imunoterapie a genové léčby mohou znamenat přínos pro naše nemocné s pokročilým karcinomem prostaty.

urgie a ortopedie. Cílem komplexní péče je zlepšit kvalitu života nemocných co nejúčelnějším zmírněním bolesti, zabránit další progresi kostního postižení a předejít hrozcím skeletálním komplikacím s rozvojem patologických zlomenin. Od roku 2003 jsme na základě závěrů a doporučení z 3rd International Consultation on Prostate Cancer 2003 – Paříž začali s používáním zoledronátu. K intravenózní léčbě Zometou 4 mg v 15minutové infúzi ve 4týdenních intervalech jsme ve spolupráci s onkology indikovali 10 nemocných s metastatickým postižením skeletu. U 3 nemocných byl laboratorně potvrzen „bone hunger syndrom“ při sekundární hyperparatyreóze a třikrát jsme denzitometricky zjistili významnou osteoporózu s vysokým rizikem patologických zlomenin. Na obr. 4 je patrný denzitometrický obraz osteoporózy s vysokým rizikem zlomenin u 73letého nemocného s generalizovaným karcinomem prostaty.

Výsledky

Během prvního roku jsme v souladu se zkušenostmi jiných autorů nezaznamenali významnější nežádoucí účinky či zhoršení renálních funkcí. U jednoho nemocného je aplikace spojená s „flu-like“ symptomatologií, kdy však obtíže vždy odezněly během 24 hodin a nemocného výrazněji neobtěžují. U jednoho nemocného byla k zajištění lepší kontroly bolesti podána systémová aplikace radionuklidu ¹⁵³Samaria (¹⁵³Sm) a u jednoho nemocného byla využita paliativní analgetická zevní radioterapie. Ve sledovaném období jsme nezaznamenali patologickou frakturu, která by vyžadovala chirurgickou intervenci.

Léčebná schémata využívající aplikaci Zometry® 4 mg v intravenózní 15minutové infúzi o objemu 100 ml v různých situacích s hrozcími skeletálními komplikacemi Upraveno podle [55,56,59,37,16,10,51]

Osteoporóza (Zvláště u nemocných netolerujících perorální léčbu bisfosfonáty.)	Zometa® 4 mg 1/rok
Transplantace orgánů (Nezbytná imunosupresivní léčba vede ke vzniku patologických zlomenin přibližně u třetiny nemocných po transplantaci.)	Zometa® 4 mg každé 3 měsíce
Hormonálně refrakterní lokálně pokročilý karcinom prostaty (Rozvoj skeletálních metastáz a následných komplikací je vzhledem k biologické povaze nádoru i vzhledem k předchozí androgenní deprivaci velmi pravděpodobný.)	Zometa® 4 mg každé 3 měsíce
Skeletální metastatické postižení (Kromě řady jiných nádorových onemocnění byl příznivý efekt prokázán u karcinomu prostaty, ledviny a močového měchýře, prsu, plic, myelomu.)	Zometa® 4 mg každé 4 týdny

Závěr

V současné době i přes dosažené pokroky je léčba generalizovaného hormonálně refrakterního karcinomu prostaty jednou z nejsložitějších problematik uroonkologie. Naděje jsou vkládány do nových kombinačních chemoterapeutických režimů s užitím taxanů a své pevné místo si ve stávajících „guidelines“ pro terapii karcinomu prostaty našla léčba moderními intravenózními bisfosfonáty (zvláště vysoce účinným zoledronátem), zejména v prevenci a léčbě skeletálních komplikací [16].

Literatura

1. Aus G, Abbou CC, Heidenreich A, Schmidt HP, van Poppel H, Wolff JM, Zattoni F: EAU Guidelines on prostate cancer. Update February 2003
2. Babjuk M, Matoušková M, Novák J: Zhoubné nádory prostaty: 17-27, In Doporučené diagnostické a léčebné postupy u urologických nádorů, Galén, 2003.
3. Belej K, Zátura F, Belejová M: Kostní změny u nemocných s karcinomem prostaty In: Belej K et al: Hormonální léčba adenokarcinomu prostaty. Praha, StudiaGeo, 2004, 147-159
4. Berruti A, Dogliotti L, Bitossi R: Incidence of skeletal complications in patients with bone metastatic prostate cancer and hormone refractory disease. Predictive role of bone resorption and formation markers evaluated at baseline. *J Urol* 2000; 164: 1248
5. Berruti A, Dogliotti L, Gorzegno G a kol: Differential patterns of bone turnover in relation to bone pain and disease extent in bone in cancer patients with skeletal metastase. *Clin Chem*, 45: 1240, 1999
6. Berruti A, Dogliotti L, Tucci M, Tarabuzzi R, Fontana D, Angeli A: Metabolic bone disease induced by prostate cancer: Rationale for the use of bisphosphonates. *J Urol* 2001; 166: 2023-2031
7. Berruti A, Perone P, Fasolis G a kol: Pamidronate administration improves the secondary hyperparathyroidism due to „Bone Hunger Syndrome“ in a patient with osteoblastic metastases from prostate cancer. *Prostate*, 33: 252, 1997
8. Berruti A., Piovesan A., Torta, M. et al.: Biochemical evaluation of bone turnover in cancer patients with bone metastases: relationship with radiograph appearances and disease extension. *Br. J. Cancer*, 1996, 73, s. 1581-1587
9. Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM: Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997; 33: 1075-1107
10. Body JJ: Zoledronic acid: an advance in tumour bone disease therapy and a new hope for osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2003 Apr; 4(4): 567-580
11. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O a kol: Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 2000; 60: 2949-2954
12. Boissier S, Magnetto S, Frappart L a kol: Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell adhesion to unmineralized and mineralized bone extracellular matrix. *Cancer Res* 1997; 57: 3890
13. Brunsen C, Papapoulos SE, Lips P, Geelhoed-Duijvestijn PH, Hamdy NA, Landman JO a kol: Daily oral pamidronate in women and men with osteoporosis: a 3-year randomized placebo-controlled clinical trial with a 2-year open extension. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1057-1064
14. Campa III JA, Payne R: The management of intractable bone pain: a clinician's perspective. *Semin Nucl Med* 1992; 22: 3-10
15. Cancer incidence in Sweden 2000. The national board of health and welfare. <http://www.sos.se/plus/english2.asp?valPubl id=2002-42-5>
16. Carroll PR, Altwein J, Brawley A, Cockett M, Cooperberg Y, Hiraio B, Lobel D, McLeod D, Neal D, Van Poppel H, Richard F, Scher H, Wood C: Management of Disseminated Prostate Cancer In Prostate Cancer-3rd International Consultation on Prostate Cancer-Paris Edit Denis L, Bartsch G, Khoury S, Kurzi M, Partin A, Paris Health Publications 2003; 249-284
17. Coleman RE: Hormone- and chemotherapy-induced bone loss in women with breast cancer: 4-8. In *Evolving role of bisphosphonates for cancer treatment-induced bone loss. Professional excellence in medical education*, 2003
18. Coleman RE: Skeletal complication of malignancy. *Cancer* 1997; 80 (suppl): 1588-1594
19. Daniell HW, Dunn SR, Ferguson DW, Lomas G, Niazi Z, Stratte PF: Progressive osteoporosis during androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Urol* 2000; 163: 181-186
20. Daniell HW: Osteoporosis after orchiectomy for prostate cancer. *J Urol* 1997; 157: 439-444
21. Daniell HW: Osteoporosis due to androgen deprivation therapy in men with prostate cancer. *Urology*, 2001, 58 (Suppl 2A), s. 101-107.
22. Dumon JC, Journé F, Kheddoumi N, Lagneaux L, Body JJ: Cytostatic and apoptotic effects of bisphosphonates on prostate cancer cells. *Eur Urol* 2004; 45: 521-529
23. Dvořáček J: Rakovina prostaty. In *Urologie praktického lékaře*, ISV, Praha 2000, 144-165
24. Elomaa I, Kymälä T, Tammela T, Viitanen J, Otrelin J, Ruutu M a kol: Effect of oral clodronate on bone pain. A controlled study in patients with metastatic prostatic cancer. *Int Urol Nephrol* 1992; 24: 159-166
25. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parken DM: GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version 1.0. Limited version available at: <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.html>. In *IARC CancerBase No. 5*. Lyon: IARC Press; 2001.
26. Fiala R, Zátura F, Ženíšek J: Adenokarcinom prostaty od PSA k terapii. *Edice Urolog*, č.1/2001, StudiaGeo, Praha
27. Cheng EY: Prospective quality of life research in bony metastatic disease. *Clin Orthop* 2003; (suppl): 289-297
28. Iversen P: Current Topics in the Treatment of Hormone-refractory Prostate Cancer. *Eur Urol Suppl* 2003; 2: 3-8
29. Jacobs SC: Spread of prostatic cancer to bone. *Urology* 1983; 21: 337
30. Jager PL, Kooistra A, Piers DA: Treatment with radioactive (89) strontium for patients with bone metastases from prostate cancer. *BJU Int* 2000; 86: 929-934
31. Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ: Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 5-26
32. Klener P: Kostní metastázy. Patogeneze, diagnostika a léčba. *Klin Okol* 2004; 17: 29-32
33. Kolombo I, Kolombová J, Berndt D, Hrubý M, Porš J et al: Skeletální postižení při karcinomu prostaty představuje komplexní problém – kazuistická sdělení ve světle nových poznatků. *Česká urologie* 2004; 1: 29-33
34. Kolombo I, Kolombová J, Berndt D, Hrubý M, Porš J, Fröml J a kol: Skeletální postižení při karcinomu prostaty představuje komplexní problém; 52-55. In *Abrahámová J: Vybrané otázky onkologie VII.*, Galén Praha, 2003, 54-57
35. Kurth KH: Skeletal complications and their impact on patient quality of life. Genitourinary cancer: management of skeletal complications. An official EAU satellite symposium of XIXth congress of the European Association of Urology Vienna 2004; Abstract 24 March 2004, 16-17
36. Kymälä T, Taube T, Tammela TL, Risteli L, Risteli J, Elomaa I: Concomitant i.v. and oral clodronate in the relief of bone pain – a double-blind placebo-controlled study in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 1997; 76: 939-942
37. Lipton A, Zheng M, Seaman J: Zoledronic acid delays the onset of skeletal-related events and progression of skeletal disease in patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2003 Sep 1; 98(5): 962-969
38. Lipton A., Small E., Saad F. et al.: The new bisphosphonate, Zometa (zoledronic acid), decreases skeletal complications in both osteolytic and osteoblastic lesions: a comparison to pamidronate. *Cancer. Invest.*, 2002, 20 (Suppl 2), s. 45 – 54.
39. Major PP, Cook R: Efficacy of bisphosphonates in the management of skeletal complications of bone metastases and selection of clinical endpoints. *Am J Clin Oncol* 2002; 25 (6 Suppl 1): S10-8
40. Major PP, Lortholary A, Hon J et al: Zoledronic acid is superior to pamidronate in the treatment of hypercalcemia of malignancy: a pooled analysis of two randomized, controlled clinical trials. *J Clin Oncol* 2001; 19: 558-567
41. Montague R, Hart CA, Georgie NJ, Ramani VAC, Brown MD, Clarke NW: Differential inhibition of invasion and proliferation by bisphosphonates: anti-metastatic potential of zoledronic acid in prostate cancer. *Eur Urol* 2004; 46: 389-402
42. Morote J, Martinez E, Trilla E, Esquena S, Abascal JM, Encabo G, Reventós J: Osteoporosis during continuous androgen deprivation: Influence of the modality and length of treatment. *Eur Urol* 2004; 44: 661-665
43. National Cancer Institute. US Estimated Prevalence Counts on 1/1/2000. Available at http://canques.seer.cancer.gov/cgi-bin/cq_submit?dir=prev 2000&d
44. Oefelein MG, Ricchiuti V, Conrad W, Resnick MI: Skeletal fractures negatively correlate with overall survival in men with prostate cancer. *J Urol* 2002; 168: 1005-1007
45. Oefelein MG, Ricchiuti V, Conrad W, Seftel A, Bodner D, Goldman W a kol: Skeletal fracture associated with androgen suppression induced osteoporosis: the clinical incidence and risk factors for patients with prostate cancer. *J Urol* 2001; 166: 1724-8
46. Olson KB, Pienta KJ: Pain management in patients with advanced prostate cancer. *Oncology (Huntingt)* 1999; 13: 1537-1549
47. Orwoll E, Ettinger M, Weiss S, Miller P, Kendler D, Grahem J, Adams S et al: Alendronate for the treatment of osteoporosis in men. *N Engl J Med* 2000; 343: 604
48. Perry CM, Figgitt DP: Zoledronic acid. A review of its use in patients with advanced cancer. *Drugs* 2004; 64: 1197-1211
49. Dvořáček J, Šafařík L, Vachalovský V: Nádory prostaty, 1035-1140, In *Dvořáček J, Urologie*, Puga, ISV, 1998, II. díl
50. Rosen LS, Gordon DH, Dugan W, Major P, Eisenberg PD, Provencher L, Kaminski M, Simone J, Seman J, Chen BL, Coleman RE: Zoledronic acid is superior to pamidronate for the treatment of bone metastase in breast carcinoma patients with at least one osteolytic lesion. *Cancer* 2004; 1: 36-43
51. Rosen LS, Gordon DH, Tchekmedyian S: Zoledronic acid versus placebo in the treatment of skeletal metastase in patients with lung cancer and other solid tumors: a phase III, double-blind, randomized trial. The Zoledronic Acid Lung Cancer and Other Solid Tumors Study Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3150-3157
52. Ross JR, Saunders Y, Edmonds PM a kol: Systematic review of role of bisphosphonates on skeletal morbidity in metastatic cancer. *BMJ*, 327: 463-469, 2003.
53. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Chen B: A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone – refractory metastatic prostate carcinoma. *Jour of the National Cancer Institute* 2002; 94: 1458-1468
54. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin J, Vinholes J, Goas JA, Chen BL, Seman J: Zoledronic acid is well tolerated for up to 24 months and significantly reduces skeletal complications in patients with advanced prostate cancer metastatic to bone. *American Urological Association Annual Meeting* 2003 (poster).
55. Saad F, Schulman CC: Role of bisphosphonates in prostate cancer. *Eur Urol* 2004; 45: 26-34
56. Saad F: Recent advances in the treatment of metastatic prostate cancer. Genitourinary cancer: management of skeletal complications. An official EAU satellite symposium of XIXth congress of the European Association of Urology Vienna 2004; Abstract 24 March 2004, 10-11
57. Smith MR, McGovern FJ, Zietman AL, Fallon MA, Hayden DL, Schoenfeld DA a kol: Pamidronate to prevent bone loss during androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 948-955
58. Smith MR: Bisphosphonates to prevent osteoporosis in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Drugs Aging* 2003; 20: 175-183
59. Vyskočil V, Kutílek Š: Bisfosfonáty u metabolických onemocnění skeletu. *Remedia* 2004; 14: 75-80

VYUŽITÍ POZITRONOVÉ EMISNÍ TOMOGRAFIE V RADIOTERAPII

UTILIZATION OF POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY IN RADIOTHERAPY

HOROVÁ H.¹, HYNKOVÁ L.¹, KOŠŤÁKOVÁ Š.¹, STANÍČEK J.²

¹ ODDĚLENÍ RADIAČNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

² ODDĚLENÍ NUKLEÁRNÍ MEDICÍNY, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Pozitronová emisní tomografie je novou diagnostickou metodou, která se začíná uplatňovat v onkologii. Je doplňkovou metodou ke standardně používaným vyšetření, uplatňuje se v diferenciální diagnostice benigních a maligních lézí, v rozlišení recidiv a poléčebných změn. Nově se začíná uplatňovat v predikci léčebné odpovědi a vytipování pacientů s horší prognózou. V radioterapii má své místo jako doplňující metoda při určování cílových objemů. Zvýšené zařazení PET do léčebné praxe může změnit strategii léčby a tím i zlepšit léčebné výsledky.

Klíčová slova: pozitronová emisní tomografie, radioterapie

Summary: Positron emission tomography (PET) is a new diagnostic method used in oncology. It is applied in differential diagnostics of benign versus malign tumors and/or disease relapse versus post-therapeutic changes. It also represents an important complementary method to the standard diagnostic methods such as computer tomography (CT) and/or magnetic resonance imaging (MRI). Recently PET has been employed as a tool in prediction of treatment response and in selecting patients with poor prognosis. PET can also assist in defining the target volume during radiotherapy planning. Increased utilization of PET in the oncology practice can lead to changes in treatment strategies and to improved therapeutic results.

Key words: positron emission tomography, radiotherapy

Pozitronová emisní tomografie (PET) patří mezi nejmodernější diagnostické metody. V onkologii se PET uplatňuje především v hledání primárního ložiska metastatického onemocnění, v rozlišení benigních a maligních ložisek, detekci rezidua nebo recidivy onemocnění a sledování odpovědi na léčbu. Je také doplňkovou diagnostickou metodou standardně používaných vyšetření: CT, UZ, NMR.

Detekce kumulace specifického radiofarmaka je zjišťována pomocí speciální kamery. Mezi nejčastěji používané radiofarmakum patří 18-F-fluoro-deoxyglukóza. Tato látka se v těle chová podobně jako glukóza a je nejvíce vychytávána v buňkách se zvýšeným metabolismem. V důsledku metabolických změn je největší kumulace radiofarmaka v nádorových buňkách. Rozpadem izotopu dochází k uvolnění pozitronu, který s elektronem z okolí vytváří anihilační záření detekovatelné PET kamerou.

PET hraje doplňující nebo diferenciačně diagnostickou roli ke standardním vyšetřovacím metodám. Největší zkušenosti jsou v diagnostice a sledování pacientů s lymfomy. Další využití PET je v diagnostice recidiv kolorektálního karcinomu, kdy je někdy těžké pomocí standardních vyšetřovacích metod rozlišit jizevnaté změny od recidiv. Další možností indikace tohoto vyšetření jsou gynekologické malignity, nádory plic a další.

Nyní probíhají nové studie, jejichž snahou je zjistit význam PET ve strategii léčby a predikci léčebné odpovědi. V odborné literatuře byly publikovány studie využívající PET v plánování cílových objemů a ve strategii radioterapie.

Několik nedávno publikovaných studií se snažilo nalézt využití PET vyšetření v diagnostice a léčbě gynekologických malignit.

Grigsby ve své práci retrospektivně hodnotil 101 pacientek s diagnózou karcinomu hrdla děložního. Pacientky absolvovaly předléčebné CT a PET vyšetření. Podstoupily kombinovanou léčbu (chemoradioterapii) a byly dále sledovány. Všechny pacientky, které dle CT měly postiženy paraaortální uzliny, byly i PET pozitivní. Pacientky byly rozděleny do tří skupin podle pozitivivity a negativity CT a PET vyšetření. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn v dvouletém progression free survival (73% pro CT negat. + PET negat.; 49% pro CT negat. + PET pozit.; 39% pro CT pozit. + PET pozit.). V závěru studie

byla vyslovena hypotéza, že abnormální PET lymfatických uzlin je důležitým prediktorem progresu onemocnění.

Také Singh ve své studii použil PET vyšetření před léčbou pacientek v klinickém stádiu IIIb. Třileté přežití bylo u pacientek bez postižení uzlin (dle PET) 79%, ve skupině pacientek s pozitivními pánevními uzlinami bylo 58%, při nálezů pozitivních paraaortálních uzlin 29% a při postižení nadklíčkových uzlin 0%. GOG studie udávají postižení paraaortálních uzlin u pacientek ve IIIb klinickém stádiu kolem 30%. Survival rate se u těchto pacientek pohybuje kolem 26-30%. Singh v závěru studie doporučuje PET vyšetření ve stagingu všech pacientek s karcinomem děložního čípku. U pacientek s PET pozitivními paraaortálními uzlinami doporučuje radioterapii i na oblast těchto uzlin, případně zvýšit dávku pomocí IMRT (intensity modulated radiotherapy) či aplikovat agresivnější režim chemoterapie.

Vysokou specificitu a senzitivitu PET vyšetření prokázal také Rose. Pacientky absolvovaly předléčebné PET vyšetření. Poté následovala operace s lymfadenektomií. Cílem studie bylo zjistit korelaci mezi PET vyšetřením a histologickým nálezem. Senzitivita PET vyšetření byla 75%, specificita 92%, pozitivní prediktivní hodnota 75%, negativní prediktivní kontrola 92%.

Podobně také Miller hodnotí význam PET ve vyhledávání rizikovějších pacientek, které by měly prospěch z agresivnější léčby (např. uplatnění PET při IMRT ve studii Murtieho).

Kromě předléčebného stagingu a ve výběru léčebné modalitity se může PET uplatnit i v následném sledování pacientů po léčbě.

Nakumoto hodnotil možnosti PET v diagnostice recidivy onemocnění. Brzká diagnóza recidivy má také vliv na celkovou prognózu. Nejčastějším projevem relapsu je tumorózní infiltrát v páni nebo lymfadenopatie. Někdy je těžké rozlišit nádorovou tkáň od tkáňových jizev a postradiačních změn standardně používanými diagnostickými metodami. Nakumoto prováděl PET vyšetření za 3-7 měsíců po radioterapii. Lokální recidiva byla vždy PET pozitivní. Falešně pozitivní nálezy byly způsobeny zánětlivými změnami po radioterapii. Falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny zánětem nejen ve fázi makrofágové a leukocytární kumulace, ale i v pozdní fázi zánětu s dělicími se fibroblasty. Senzitivita byla 100%, specificita 60%, pozitivní prediktivní hodnota 45%, negativní prediktivní hodnota 100%.

Další diagnózou využívající PET v poléčebném sledování je karcinom rekta. Zde může PET pomoci rozlišit benigní a maligní změny v presakrální oblasti u pacientů po chirurgické léčbě. Např. studie Calco et al. sledovala pacienty s diagnózou karcinomu rekta. Tito pacienti podstoupili neoadjuvantní konkomitantní chemoradioterapii. PET vyšetření absolvovali před léčbou a 4-5 týdnů po léčbě. U všech pacientů došlo po léčbě ke snížení hodnot SUV_{max} (standardized uptake value). Tato hodnota je dána poměrem maximální absorpce radiofarmaka v nádorové tkáni, váhy pacienta a aktivitou aplikované látky. Vysoké hodnoty předléčebné SUV_{max} byly spojeny s vyšším rizikem relapsu a smrti. Také v této studii byly pomocí PET odhaleny metastázy v játrech, které nebyly detekovány standardními vyšetřovacími metodami. Vysoké hodnoty SUV_{max} tak mohou ukazovat na zvýšené riziko návratu choroby a pacientům s takovým nálezem by mohla být nabídnuta agresivnější léčba.

Vlastností PET lze také použít v léčbě nádorů jícnu. Touto otázkou se zabývala studie Wiedera. Sledoval pacienty s diagnózou karcinomu jícnu, kteří podstoupili konkomitantní léčbu. PET bylo provedeno před léčbou a 3-4 týdnů po léčbě. Po aplikaci konkomitantní chemoradioterapie následovala operace. U 57 % pacientů došlo k regresi tumoru dle histopatologického nálezu. Nebyl nalezen vztah signifikantní korelace mezi klinickou odpovědí a histopatologickým nálezem. U všech pacientů došlo ale k poklesu hodnot SUV. U pacientů s histopatologickou odezvou došlo k výraznějšímu poklesu SUV než u pacientů s nezměněným histopatologickým nálezem (pokles o 44% vs. 21%). Studie prokázala, že PET může identifikovat pacienty, kteří špatně reagují na léčbu. Sensitivita vyšetření byla 93%, specificita 88%.

Další využití PET nacházíme v diagnostice a léčbě nemalobuněčného karcinomu plic. Důležitý je zde mediastinální staging, který je pro PET udáván: senzitivita 84%, specificita 89% a pro CT senzitivita 57%, specificita 84% (dle Tolera).

PET také může správně odhalit extrathorakální metastázy u pacientů, kteří byli jinými metodami indikováni k chirurgické resekcí. To pak vede ke změně léčebné strategie.

Studie Bradley et al. zjišťovala, zda výsledky PET budou mít vliv i na velikost ozařovaného objemu. Dva lékaři nezávisle zakreslovali cílové objemy, jeden měl k dispozici CT vyšetření, druhý fúzi PET a CT vyšetření. Mezi cílovými objemy byly značné rozdíly. V případě atelektázy pomohl PET redukovat GTV, to vedlo ke zmenšení ozařovaného objemu a redukci dávky na zdravé tkáni. Naopak v některých případech došlo ke

zvětšení cílového objemu, kdy pomocí PET byly odhaleny metastázy v lymfatických uzlinách nedetekovatelné na CT.

V nedávno publikovaných studiích se udává, že PET vede ke změně cílového objemu u 30-60% pacientů. Použití fúze PET a CT vyšetření při plánování radioterapie je ukázáno na obrázku 1, na obrázku 2 je samostatné plánovací CT.

Velmi důležitou roli hraje PET ve stagingu a sledování odpovědi na léčbu pacientů s diagnózou lymfomu. U pacientů po terapii má PET oproti CT vyšší specificitu a to 96 % vs. 38 % pro Hodgkinovu chorobu a 100% vs. 83% pro NHL. Také pozitivní prediktivní hodnota je vyšší u PET (100% vs. 42%). Největším problémem v terapii lymfomů je nález vitálních nádorových buněk v reziduální tkáni. Zde PET také prokazuje vyšší specificitu, bohužel jeho nevýhodou je špatné prostorové rozložení a nižší rozlišovací schopnost u malých objemů.

Téměř 80-90% pacientů s negativním PET po skončení léčby zůstává v kompletní remisi. Existuje ale 10-20% pacientů s mikroskopickým reziduálním onemocněním, kteří mohou relabovat.

Nově se začíná PET využívat i v terapii nádorů hlavy a krku. Yao hledal význam PET u pacientů po radioterapeutické léčbě v indikaci krční disekce.

U pacientů, kteří po radioterapeutické a chemoterapeutické léčbě jsou v kompletní remisi, je riziko samostatné krční recidivy pouze 5 %. Krční disekce je spojena s řadou nežádoucím účinků a vysokou morbiditou. Dochází také k výrazné mutilaci pacienta. Proto byla snaha najít pacienty, kteří by z krční disekce měli prospěch a naopak, kteří by byli disekce ušetřeni.

Pacienti byli po léčbě sledováni pomocí CT i PET. Velikost reziduální lymfadenopatie nekorelovala se zvýšenou kumulací radiofarmaka na výsledku PET vyšetření po léčbě. Předléčebná velikost uzlin také nesouvisela s odpovědí na léčbu. Ale všichni pacienti s reziduálními viabilními nádorovými buňkami měli abnormální PET (SUV 3,5-6,9). Všichni s negativním reziduem měli SUV menší 3 nebo normální PET. Všichni pacienti s negativním PET měli i negativní histologický nález i při reziduální lymfadenopatii.

PET tedy má své místo v onkologické léčbě. Její možnosti a využití se ale dále hledají. Přesto již existuje řada indikací, které mohou zlepšit diagnostiku, léčbu a posléze i prognózu řady maligních onemocnění. V kombinaci s CT vyšetřením (vytvořením fúze obou vyšetření) usnadňuje určování cílových objemů u pacientů léčených radioterapií a tím zabraňuje možnému overtreatmentu a možným pozdním nežádoucím účinkům ozáření.

Literatura

1. Belhocine T, Thille A, Fridman V, Albert A, Seidel L, Nickers P, Kridelka F, Rigo P.: Contribution of whole-body 18FDG PET imaging in the management of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2002;87(1):90-97
2. Bradley J, Thorstad WL, Mutic S, Miller TR, Dehdashti F, Siegel BA, Bosch W, Bertrand RJ.: Impact of FDG-PET on radiation therapy volume delineation in non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004, 59(1):78-86
3. Calvo FA, Domper M, Matute R et al.: 18F-FDG positron emission tomography staging and restaging in rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58(2):528-535
4. Grigsby PW, Siegel BA, Dehdashti F, Mutch DG.: Posttherapy surveillance monitoring of cervical cancer by FDG-PET. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 55(4):907-913
5. Grigsby PW, Siegel BA, Dehdashti F.: Lymph node staging by positron emission tomography in patients with carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol* 2001;19(17):3745-3749
6. Koike I, Ohmura M, Hata M, Takahashi N, Oka T et al.: FDG-PET scanning after radiation can predict tumor regrowth three months later. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 57(5):1231-1238
7. Lavelly WC, Delbeke D, Greer JP, Morgan DS, Byrne DW, Price RR, Hallahan DE.: FDG PET in the follow-up management of patients with newly diagnosed Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma after first-line chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 57(2):307-315
8. Miller TR, Grigsby PW.: Measurement of tumor volume by PET to evaluate prognosis in patients with advanced cervical cancer treated by radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53(2):353-359
9. Miller TR, Pinkus E, Desdashi F, Grigsby PW.: Improved prognostic value of 18F-FDG PET using a simple visual analysis of tumor characteristics in patients with cervical cancer. *J Nucl Med* 2003;44(2):192-197
10. Mutic S, Malyapa RS, Grigsby PW, Dehdashti F, Miller TR, Zoberi I, Bosch WR, Esthappan J, Low DA.: PET-guided IMRT for cervical carcinoma with positive para-aortic lymph nodes- a dose-escalation treatment planning study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55(1):28-35
11. Nakamoto Y, Eisbruch A, Achtyes ED, Sugawara Y, Reynolds KR, Johnston CM, Wahl RL.: Prognostic value of positron tomography using F-18-Fluorodeoxyglucose in patients with cervical cancer undergoing radiotherapy. *Gynecol Oncol* 2002;84:289-295
12. Narayan K, McKenzie AF, Hicks RJ, Fisher R, Bernshaw, Bau S.: Relation between FIGO stage, primary tumor volume and presence of lymph node metastases in cervical cancer patients referred for radiotherapy. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13,657-663
13. Narayan K, Hicks RJ, Jobling T, Bernshaw D, McKenzie AF.: A comparison of MRI and PET scanning in surgically staged loco-regionally advanced cervical cancer: Potential impact on treatment. *Int J Gynecol Cancer* 2001,11,263-271
14. Rose PG, Adler LP, Rodriguez M, Faulhaber PF, Abdul-Karim FW, Miraldi F.: Positron emission tomography for evaluating para-aortic nodal metastasis in locally advanced cervical cancer before surgical staging: A surgicopathologic study. *J Clin Oncol* 1999;17(1):41-45
15. Ryu SY, Kim MH, Choi SC, Choi CW, Lee KH.: Detection of early recurrence with 18F-FDG PET in patients with cervical cancer. *J Nucl Med* 2003;44(3):347-52
16. Singh AK, Grigsby PW, Dehdashti F, Herzog TJ, Siegel BA.: PDG-PET lymph node staging and survival of patients with FIGO stage IIIB cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56(2):489-493
17. Wiedera HA, Brücher BLD, Zimmermann F, Becker K, Lordick F, Beer A, Schwaiger M, Fink U et al.: Time course of tumor metabolic activity of esophageal squamous cell carcinoma and response to treatment. *J Clin Oncol* 2004, 22(5):900-8
18. Yao M, Graham MM, HoffmanHT, Smith RB, et al.: The role of post-radiation therapy FDG PET in prediction of necessity for post-radiation therapy neck dissection in locally advanced head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004, 59(4):1001-1010

NOVÉ MOŽNOSTI V DIAGNOSTICE KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU S VYUŽITÍM TECHNOLOGIE DNA MIKROČIPŮ

NEW POSSIBILITIES IN COLORECTAL CARCINOMA DIAGNOSTICS USING DNA MICROARRAYS

JANSOVÁ E.¹, KRONTORÁD P.¹, SVOBODA Z.¹, PAVLÍK T.², KOUTNÁ I.¹, KOZUBEK M.¹, ŽALOUDEK J.³, KOZUBEK S.⁴

¹ FAKULTA INFORMATIKY MU BRNO

² PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MU BRNO

³ LÉKAŘSKÁ FAKULTA MU BRNO

⁴ BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AVČR BRNO

Souhrn: *Východiska:* Technologie DNA mikročipů patří mezi nejmodernější biotechnologie zaznamenávající v posledních letech velký rozvoj. Tato technologie umožňuje porovnání expresních profilů zkoumaných vzorků a je tak vhodná k diagnostice různých onemocnění na genové úrovni. *Typ studie a soubor:* Cílem této práce bylo porovnat genovou expresi kolorektálního karcinomu s normálním epitelem a detekovat rozdíly v expresi genů mezi pacienty s regionálními metastázemi a bez metastáz. Studie byla provedena na skupině 12 pacientů s kolorektálním karcinomem. *Metody a výsledky:* Expresní profil pacientů byl studován na 1.7K Human cDNA mikročipech obsahujících 1700 fragmentů lidské cDNA. Mezi kolorektálním karcinomem a zdravým epitelem tlustého střeva bylo nalezeno 22 genů s odlišnou expresí. Pomocí klastrové analýzy byli pacienti rozděleni na 2 skupiny podle výskytu metastáz v lymfatických uzlinách a mezi těmito dvěma skupinami pacientů bylo identifikováno celkem 6 genů se změněnou expresí. *Závěr:* cDNA microarray technologii bude možné v budoucnu použít jako diagnostický nástroj ke stanovení, včasnému a přesnému rozpoznání onemocnění na základě expresního profilu pacienta. Geny vytípané pomocí cDNA mikročipů v našich experimentech mohou být v budoucnu součástí diagnostických mikročipů pro analýzu nádorů tlustého střeva.

Klíčová slova: cDNA mikročipy; microarray technologie; klastrová analýza; nádor tlustého střeva; metastáze v lymfatických uzlinách

Summary: Backgrounds: In the last decade various new technologies in medicine and molecular biology have been developed, among others cDNA microarray technology. The cDNA microarray technology enables comparison of expression profiles of tested samples and it is convenient for diagnostics of diseases on gene level. **Design and Subject:** The aim of this study was comparison of gene expression of colorectal carcinoma and colon epithelium and detection of differences in expression profiles of patients with regional metastases and non-metastatic patients. The study was performed on a group of 12 patients with colorectal carcinoma. **Methods and Results:** 1.7K Human cDNA microarrays containing 1700 fragments of human cDNA were used for determination of expression profiles of patients. We have found 22 genes with altered expression in colorectal carcinoma as compared with normal tissue. Using hierarchical clustering, patients were divided into two groups according to occurrence of regional metastases: patients with regional metastases and non-metastatic patients. These two groups differed in expression of 6 genes. **Conclusion:** cDNA microarray technology, based on the detection of changes in the expression profiles, provides easier, quicker and more effective diagnostics of various diseases. In future, genes found by cDNA microarrays in our experiments could constitute a part of the newly developed colon cancer diagnostics chips.

Key words: cDNA microarray technology; cluster analysis; colorectal cancer; regional metastases

Úvod

Nádory tlustého střeva patří mezi nejčastější onemocnění trávicího traktu. Navíc, první místo ve světových statistikách výskytu kolorektálního karcinomu zaujímá Česká republika. Riziko vzniku tohoto onemocnění roste po 45. roce života. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je četnost nádorů u věkové skupiny do 45 let dána poměrem 2 případy na 100 000 obyvatel, u věkové skupiny nad 75 let je to již 300 případů na 100 000 obyvatel za rok. Ročně je diagnostikováno téměř 7 500 nových případů výskytu tohoto onemocnění a více než 4 000 pacientů s tímto onemocněním každoročně umírá.

Karcinomy tlustého střeva patří do skupiny zhoubných epitelálních nádorů, které se v průběhu svého vývoje nejprve šíří ve sliznici, později prorůstají střevní stěnou, v dalším vývoji buňky pronikají do lymfatických cest a vytvářejí metastázy v lymfatických uzlinách, naposledy pronikají do krevních cév

a vytvářejí vzdálené metastázy. Převážná většina (90 %) těchto nádorů vzniká sporadicky a na jejich vznik mají vliv faktory okolního prostředí, dietetické zvyklosti a vnitřní prostředí střeva. Dědičné formy nádorů tlustého střeva (10 %) jsou často spojeny s Familiární adenomatózní polypózou (FAP) nebo Hereditární nepolypózní rakovinou tlustého střeva. Mutace zodpovědné za tyto syndromy jsou především mutace APC genu (FAP) a genů „mismatch“ reparace DNA (HNPCC) [1,2]. Průměrný věk detekce těchto onemocnění se pohybuje okolo 40 let. U pacientů s FAP je možné nalézt zvýšený výskyt polypů (stovky až tisíce), z nichž některé s velkou pravděpodobností podléhají maligní transformaci. HNPCC sice není spojen s výskytem prekurzorových adenomů, patří však k nádorům s velkou genetickou nestabilitou spojenou s rychlou progresí nádoru. Vzhledem k frekvenci výskytu onemocnění a jeho vážnosti je nutné provádět u pacientů pečlivý screening. V dnešní době s přibývajícím počtem nových zhoubných one-

mocnění roste potřeba jejich včasné diagnostiky a navržení odpovídající léčby pacienta. V této oblasti se dostává v posledním desetiletí do popředí zájmu tzv. cDNA microarray technologie umožňující monitorování exprese několika tisíc genů současně a napomáhá tak k odhalení genetické podstaty onemocnění. Tato technologie je založena na využití malých čipů nesoucích na svém povrchu fragmenty cDNA schopné specificky interagovat s cDNA získanou přepisem RNA izolovaného z pacientů. První studie využívající tuto technologii byly prováděny na akutní leukemii, lymfomech a nádorech prsu [3-8]. Řada studií byla prováděna i na nádorech tlustého střeva [9-15].

Cíl práce

Využití cDNA microarrays technologie ke sledování rozdílů genové exprese nádoru tlustého střeva v porovnání s normální epiteliální tkání a dále rozlišení pacientů s výskytem regionálních metastáz od pacientů, u nichž žádné metastázy v lymfatických uzlinách nejsou patrné. Pomocí této technologie jsme se pokusili vytipovat potenciální možné nádorové a metastatické markery, které by bylo možné použít pro včasnou diagnostiku a klasifikaci onemocnění.

Materiál a metody

Vzorky tkání a microarrays

Vzorky kolorektálního karcinomu a zdravé tkáně tlustého střeva byly získány z pacientů Masarykova onkologického ústavu v Brně a Fakultní nemocnice Brno. Vzorky tkání byly okamžitě po chirurgickém vyjmutí zmrazeny a uskladněny při -80°C . Získaná tkáň byla homogenizována (Polytron System PT 1200CL) a byla z ní izolována celková RNA pomocí TRI REAGENT (Sigma). RNA pak byla následně přečištěna s využitím RNeasy Mini Kit (Qiagen). Takto získaná RNA byla rozpuštěná v superčisté vodě bez DNáz a RNáz. Tato metoda izolace je modifikací protokolu pro izolaci super čisté RNA [16]. Pro kontrolu hybridizačního procesu byla použita *Arabidopsis* cDNA získaná z pArab plasmidu (the UHN Microarray Centre) pomocí *in vitro* transkripce (T7 Transcription kit, Fermentas; SacI, Fermentas; T4 DNA Polymerase, Fermentas). Jako společná reference pro srovnávání pacientů vzájemně mezi sebou byla použita Human colon total RNA (Clontech).

V této studii byly použity Human H1.7k4 mikročipy (Clinical Genomic Centre (CGC), Toronto, Ontario, Canada) obsahující 1718 fragmentů lidské cDNA, pozitivní kontroly (fragmenty genu pro *Arabidopsis* chlorophyll syntetázu). Celkový počet spotů na mikročipu byl 3840.

Příprava sond, hybridizace a odmytí

Pro každý experiment bylo potřeba 10-20 μg celkové RNA získané z pacienta. Tato RNA byla v průběhu RT-PCR přepsána do jednořetězové cDNA a současně naznačena pomocí fluorescenčních barev (nádorová Cy5-dCTP, zdravá Cy3-dCTP) (Amersham) pomocí Oligo(dT) primeru (Anchored) a SuperScript II reverzní transkriptázy (Invitrogen). Takto získaná cDNA pak byla hybridizována na mikročip při 37°C přes noc a odmyta (protokol the OCI Microarray Centre, 2000). Expresní obraz byl získán měřením fluorescence pomocí scanneru ScanArray Express V2.0 (PerkinElmer).

Semikvantitativní RT-PCR

Vzorky celkové RNA byly nejdříve přepsány do jednořetězové cDNA pomocí oligo(dT) primeru (Anchored) a SuperScript II reverzní transkriptázy (Invitrogen). Získaná cDNA byla použita pro následnou PCR amplifikaci. Každá PCR reakce probíhala v objemu 50 μl master mixu s 1mM MgCl_2 a Tag DNA polymerázy 5 minut při 94°C (počáteční denaturace), následovalo 35 cyklů: 30s při 94°C , 30s při 58°C , a 1.5 min při 72°C , v PCR systému (PTC-100MJ, Research, Inc.). Sekvence primerů použitých pro RT-PCR byly: FTL forward, 5'-ATGAGCTCCCAGATTCGTCAG-3', reverse, 5'-GCTT-

GAGAGTGAGCCTTTTCG-3'; NNMT forward, 5'-AGACCTGCTGATTGACATCGG-3', reverse, 5'-GTCAGT-GACGACCTCCTTAA-3'; WNT2 forward, 5'-CATGGT-GGTACATGAGACTAC-3', reverse, 5'-GGCAAATACA-ATTCCAGCTGAG-3'; MT1B forward, 5'-CCTGACTCT-CATATCTTGCC-3', reverse, 5'-GTGTTTTATTGTCTTT-CACA-3'.

Analýza obrazu a zpracování dat

K analýze obrazových dat jsme použili dva programové balíky. Spotfinder vyvinutý institutem TIGR (www.tigr.org), ve kterém je implementován Otsuův segmentační algoritmus (hledání prahové hodnoty) [17]. Proces segmentace se spouští na obdélníkové mřížce, kterou je nutno nastavit ručně s malou asistencí programu. Každému spotu patří jeden obdélník v mřížce. Program vyžaduje na uživateli zadat minimální a maximální počet pixelů, které mohou tvořit spot. Na výstup pak Spotfinder vrátí sumu intenzit všech pixelů tvořících daný spot, od které je odečtena aproximace intenzity pozadí (pixelů z obdélníku, které mají podprahovou intenzitu).

Druhým programem použitým pro analýzu obrazu byl Spot, vyvinutý institutem CSIRO jako skript ve statistickém jazyce R. Ve Spotu je implementován algoritmus SRG (Seeded Region Growing) [18], jež principem vychází ze známého algoritmu Watershed [19]. V důsledku to znamená, že oblast, kterou SRG přisoudí danému spotu, je vždy spojitá. I Spot aproximuje intenzitu pozadí, kterou vypočítává z malých oblastí okolo nalezeného spotu. Na výstup Spot vrací průměr a medián popředí (oblast spotu) a pozadí.

Dalším důležitým krokem při analýze je rozpoznání systematických odchylek v intenzitách fluorescence mezi vzorky na jednom sklíčku a mezi jednotlivými sklíčky navzájem a následná oprava těchto odchylek, které nejsou připisovány biologickým rozdílům mezi vzorky, ale jsou způsobeny různými vlastnostmi fluorescenčních barviček, scannerem, atd. pomocí procesu zvaného normalizace.

Při normalizaci dat jsme nejdříve použili regresní metodu LOWESS (locally weighted scatterplot smoothing) pro lokální normalizaci [20-23]. Tuto metodu jsme prováděli pro celé sklíčko a následně lokálně mezi jednotlivými subgridy. Umožnila nám vypočítat intenzitní a prostorový bias. Vyhlažovací parametr byl nastaven na 0,33.

Dále bylo nutné použít scale normalizaci, protože sklíčka měla různé stupnice a to by mohlo vést k nesprávným rolím, když jsou porovnávány. Pro scale normalizaci jsme použili metodu Standard deviation [21]. Vhodným škálovacím faktorem je rozptýl pro určité sklíčko dělené geometrickým průměrem rozptýlů všech sklíček. Nakonec jsme použili Slice analysis filtr [21], který smaže geny, jejichž z-score je mimo zajímavý rozsah. K vyhodnocení našich experimentálních dat jsme použili program MIDAS (TIGR), který má implementovány všechny výše zmíněné metody.

Po analýze obrazu a normalizaci získaných dat byla provedena statistická analýza. Geny, které se exprimovaly rozdílně mezi zdravou a nádorovou tkání, byly identifikovány pomocí t-testu a statistické metody SAM [24] (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>). Vzhledem k párovému uspořádání dat byl použit jednovýběrový t-test s $\alpha = 0,01$, přičemž jsme testovali, jestli $M = \text{průměrný } \log_2(R/G)$ se významně liší od nuly, s dodatečnou podmínkou, že $|M|$ musí být větší než 0,5. V softwaru SAM (Excel verze 1.21) byla data hodnocena jako „one class data“ s počtem permutací 5000, chybějící hodnoty byly doplněny metodou 10-nejbližších sousedů. Pro data ze Spotfinderu byla stanovena hranice $\Delta = 1,8$ a pro data ze Spotu $\Delta = 1,9$.

Dalším cílem našeho experimentu byla identifikace genů rozdílně exprimovaných mezi pacienty bez metastáze a s metastázou, proto byl použit SAM software a dvouvýběrový t-test ($\alpha = 0,01$ a $|M| > 0,5$). SAM software byl použit jako „two class unpaired data“ s počtem permutací 5000. Chybějící hod-

noty byly dopočítány pomocí metody řádkového průměru, naše hranice Δ byla stanovena pro minimální hodnotu odhadu FDR jako $\Delta = 0,45$.

Několik nejvýznamnějších genů pak bylo použito pro shlukování pacientů bez metastázy a s metastázami, přičemž byla použita shlukovací metoda k-průměru (pro $k = 2$) a hierarchické shlukování.

Výsledky

Studie expresního profilu nádoru tlustého střeva byla prováděna na skupině 12 pacientů (tab. 1), která zahrnovala 6 mužů (50%) a 6 žen (50%) u nichž byl diagnostikován kolorektální karcinom. Studovaná skupina zahrnovala 6 pacientů s výskytem regionálních metastáz (Dukes' C) a 6 pacientů, u nichž žádné metastázy detekovány nebyly (Dukes' B a A). Průměrný věk pacientů činil 67 let. Expresní profil pacientů byl monitorován pomocí cDNA mikročipů, umožňujících sledovat expresi až několika tisíc genů současně a poskytující tak komplexní pohled na vývoj a stádium onemocnění pacientů. Při monitorování rozdílů v expresi kolorektálního karcinomu a normálního epitelu byly na cDNA mikročipy nanášeny fluorescenčně označené vzorky cDNA nádorové tkáně (Cy5-dCTP) a vzorky cDNA zdravého epitelu (Cy3-dCTP) vždy ze stejného pacienta. Tím byl získán pacientův celkový expresní profil. Pro porovnání pacientů s rozdílnou diagnózou bylo nutné zařadit do experimentu společnou referenci, kterou byla cDNA získaná z epitelu tlustého střeva zdravých jedinců (Clontech). V tomto případě byly na mikročipy nanášeny společně vzorky cDNA nádorové tkáně (Cy5-dCTP) a vzorky referenční cDNA (Cy3-dCTP). Analýza cDNA mikročipů spočívala v několika po sobě následujících krocích. Nejprve byla provedena analýza obrazu pomocí dvou softwarů pro analýzu obrazu SpotFinderu a Spotu. Získaná data bylo nutné nejprve znormalizovat, aby došlo k vyrovnání systematických rozdílů v intenzitě různých barev, které nebyly způsobené biologickými rozdíly ve vzorcích a dále následovala statistická analýza pomocí t-testu, SAM metody a HCL metody.

Tabulka č. 1: Charakteristiky pacientů.

Pacient č.	Věk	Pohlaví	TNM klasifikace	Dukes diagnóza	Lokalizace
1	65	žena	T:2 N:1 M:X	Dukes C	ascending colon
2	59	muž	T:3 N:1 M:X	Dukes C	rectum
3	66	muž	T:3 N:1 M:X	Dukes C	rectum
4	61	žena	T:2 N:0 M:X	Dukes A	rectum
5	64	žena	T:3 N:1 M:X	Dukes C	rectum
6	74	žena	T:4 N:1 M:X	Dukes C	cecum
7	50	muž	T:3 N:1 M:X	Dukes C	rectum
8	74	muž	T:3 N:0 M:X	Dukes B	rectosigmoid junction
9	57	žena	T:3 N:0 M:X	Dukes B	sigmoid colon
10	80	žena	T:3 N:0 M:X	Dukes B	sigmoid colon
11	91	muž	T:3 N:0 M:X	Dukes B	cecum
12	64	muž	T:3 N:0 M:X	Dukes B	rectum

V první fázi experimentu byly sledovány změny v expresi mezi kolorektálním karcinomem a normálním epitelem. V tomto případě byly cDNA microarray data analyzovány pomocí metody SAM a t-testu, který byl kombinován s metodou HCL. Metoda HCL umožnila rozdělit pacienty na dvě skupiny podle výskytu metastáz v lymfatických uzlinách. Statistické metody t-test a SAM umožnily vytipování genů, které by mohly sloužit jako markery specifické pro kolorektální karcinom. Při monitorování rozdílů v expresi mezi normálním epitelem tlustého střeva a kolorektálním karcinomem bylo nalezeno celkem 22 genů s odlišnou expresí. 4 geny vykazovaly zvýšenou expresi v nádorové tkáni oproti zdravé a 18 genů mělo expresi v nádoru sníženou (tab. 2).

Tabulka č. 2: Seznam genů se změnou expresí v nádoru tlustého střeva oproti zdravému epitelu.

Accession number	Unigene ID	Symbol	Název genu
Geny se sníženou expresí v nádoru tlustého střeva			
AA046143	Hs.80776	PLCD1	phospholipase C, delta 1
AI027434	Hs.264509	LOC51326	ARF protein
AW025250	Hs.191979	KIAA1733	RPEL repeat containing 1
BF218768	Hs.184326	CDC10	CDC10 cell division cycle 10 homolog (S. cerevisiae)
BG531969	Hs.81892	KIAA0101	KIAA0101 gene product
N77287	Hs.47913	F10	coagulation factor X
N79851	Hs.46440	SLC21A3	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
R01959	Hs.78683	USP7	ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated)
R06555	Hs.19718	PTPRU	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U
R14146	Hs.75652	GSTM5	glutathione S-transferase M5
R20063	Hs.169750	TPR	translocated promoter region (to activated MET oncogene)
R23802	Hs.1376	HSD11B2	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2
R59684	Hs.75379	SLC1A3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3
R81039	Hs.3745	MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein
T74000	Hs.78943	BLMH	bleomycin hydrolase
T74462	Hs.352018	TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
W03376	Hs.364345	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase
W25194	Hs.75372	NAGA	N-acetylgalactosaminidase
Geny se zvýšenou expresí v nádoru tlustého střeva			
H21130	Hs.183800	RANGAP1	RAN binding protein 1
N77157	Hs.62	PTPN12	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12
T99684	Hs. 90073	CSE1L	CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)
W45012	Hs.183650	CRABP2	cellular retinoic acid binding protein 2

Tabulka č. 3: Seznam genů navržených jako potenciální markery regionálních metastáz.

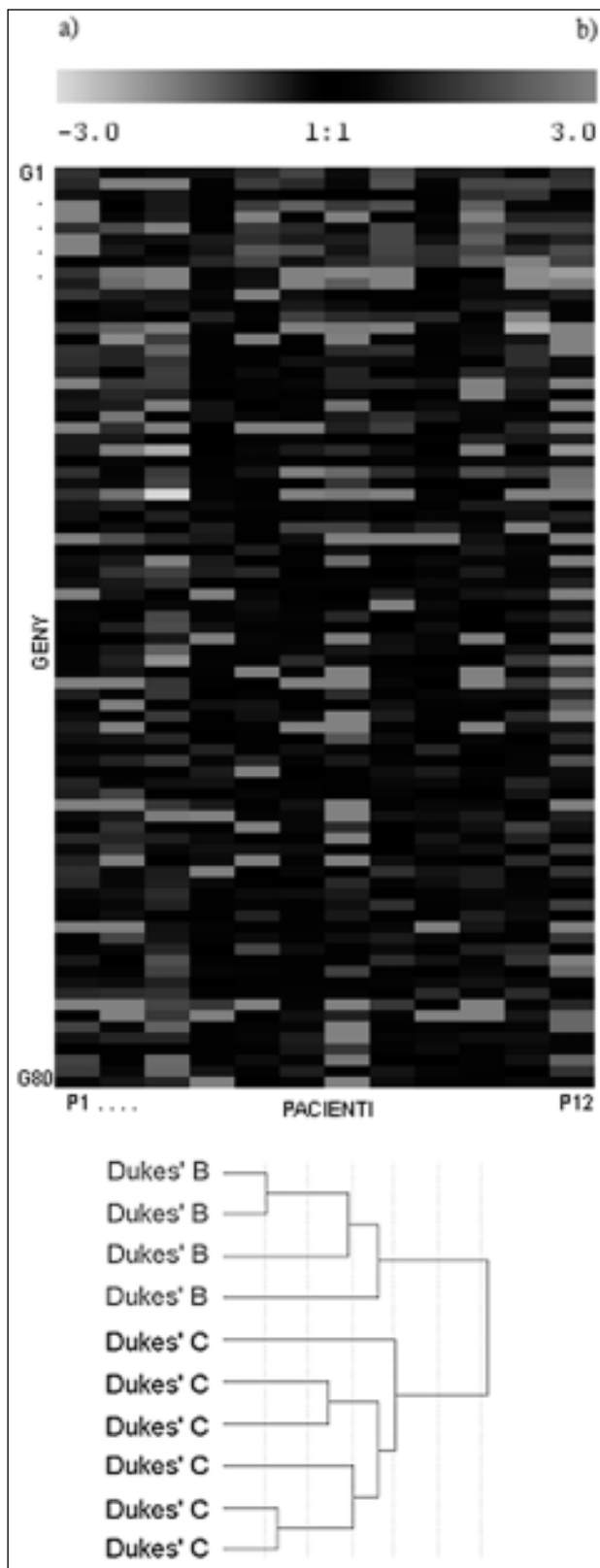
Accession number	Unigene ID	Symbol	Název genu
AA010908	Hs.348401	LCAT	lecithin-cholesterol acyltransferase
AA156696	Hs.77054	BTG1	B-cell translocation gene 1
AI889525	Hs.26670	MGC17330	HGFL gene
H82390	Hs.180911	RPS4Y	ribosomal protein S4, Y-linked
W42478	Hs.119403	HEXA	hexosaminidase A (alpha polypeptide)
W60777	Hs.181418	KIAA0152	KIAA0152 gene product

V další fázi experimentu bylo využito získané rozdělení pacientů pomocí HCL na dvě skupiny: pacienti s výskytem regionálních metastáz a pacienti bez výskytu metastáz. Tato diagnostika byla ověřena pomocí histopatologické zkoušky.

Při porovnávání expresního profilu pacientů s metastázemi a pacientů bez metastáz bylo nutné použít společnou referenci. Statistická analýza byla provedena opět pomocí metody SAM a t-testu. Podařilo se nám identifikovat 6 genů (tab. 3), které měly expresi lišící se mezi těmito dvěma skupinami pacientů.

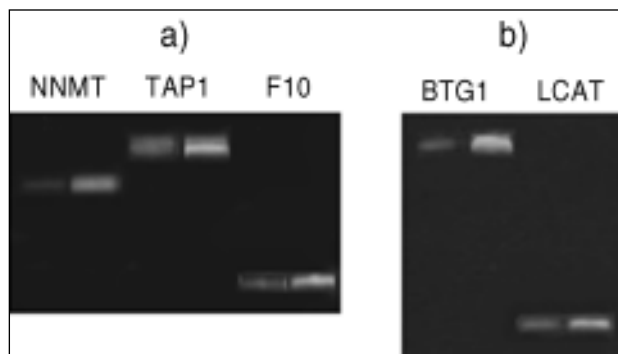
Těchto vybraných 6 genů (markerů pro regionální metastázy)

Obr. 1. Statistická analýza cDNA mikročipů. a) ukázka expresních profilů přibližně 80 genů u pacientů s kolorektálním karcinomem získaná pomocí softwaru MeV (TIGR); b) klastrogram vzorků kolorektálního karcinomu s regionálními metastázemi a bez metastáz získaný pomocí „two-sample“ t-testu, vytvořený na základě detekovaných potenciálních metastatických markerů.



následně sloužilo jako vstupní data pro další následnou klastrovou analýzu. Tato analýza umožnila na základě rozdílů exprese v normální a nádorové tkáni u jednotlivců rozdělit paci-

Obr. 2. Verifikace změny exprese u vybraných genů detekovaných cDNA mikročipy pomocí RT-PCR (2% agarózový gel). a) geny s odlišnou expresí mezi nádorovou tkání (nalevo) a normálním epitelem (napravo); b) geny se změněnou expresí u pacientů s regionálními metastázemi (napravo) a bez metastáz (nalevo).



enty na 2 skupiny: pacienti s metastázemi v lymfatických uzlinách a pacienti bez detekovatelných metastáz. (obr. 1).

Pro ověření výsledků cDNA microarray experimentů jsme použili RT-PCR, kterou jsme provedli na vzorcích 6 pacientů. Z 22 genů s rozdílnou expresí mezi nádorovou tkání a normálním epitelem jsme vybrali 3 geny (NNMT, F10, TAP1), které vykazovaly sníženou expresi v nádoru. Pomocí RT-PCR byla tato změna exprese potvrzena. Také byla provedena RT-PCR dvou genů s odlišnou expresí mezi pacienty s metastázemi v lymfatických uzlinách a bez metastáz. Jednalo se o geny BTG1 a LCAT, které vykazovaly zvýšenou expresi u pacientů s regionální metastází. I v tomto případě byla pomocí RT-PCR potvrzena změna exprese v těchto genech (obr. 2).

Diskuse

V této práci jsme se pokusili o porovnání expresního profilu 12 pacientů s kolorektálním karcinomem a detekci změn v genové expresi mezi pacienty s metastázemi v lymfatických uzlinách a pacienty bez metastáz. Experimenty byly prováděny na 1,7K Human cDNA mikročipech, které obsahovaly 1700 fragmentů lidské cDNA. Cílem této práce bylo využití cDNA microarrays technologie pro diagnostiku kolorektálního karcinomu, vzhledem k jejím možnostem poskytnout komplexní pohled na expresní profil pacienta. Podařilo se nám identifikovat celkem 22 genů s odlišnou expresí mezi zdravým epitelem tlustého střeva a kolorektálním karcinomem a pomocí klastrovací analýzy rozdělit pacienty na dvě skupiny, které bylo možno identifikovat jako skupinu s regionálními metastázemi a bez nich. 18 genů vykazovalo sníženou expresi v nádoru a 4 geny zvýšenou expresi v nádoru. Skupina down-regulovaných genů zahrnovala geny, jejichž produkty jsou zapojeny v signálních drahách, regulaci buněčného cyklu a regulaci transkripce jako např. PLCD1 gen kódující fosfolipázu C, která hydrolyzuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP_2) na diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trisfosfát (IP_3) a je tak součástí základních signálních drah. Dalším zástupcem je USP7 gen kódující ubiquitin specifickou proteázu, která hraje roli ve stabilizaci p53 a je důležitá pro tumor supresorovou funkci p53. Mezi skupinu genů se zvýšenou expresí v nádoru byly zařazeny geny kódující proteiny spojené se signálními drahami např. aktivitou RAS proteinů a aktivací MAP kinázových kaskád (RANGAP1) nebo produkty zapojené v remodelaci chromatinu jako např. CRABP2, který negativně ovlivňuje deacetylaci histonů vazbou na kyselinu retinovou.

Při porovnávání expresního profilu pacientů s detekovaným výskytem regionálních metastáz a pacientů bez metastáz, se nám podařilo identifikovat 6 genů, které mají mezi těmito dvěma skupinami pacientů odlišnou expresi. Tyto geny jsou spojeny s buněčnou proliferací, diferenciací a základním metabolismem, např. gen LCAT nacházející se na 16 chromosomu kódující lecitin-cholesterol acyltransferázu, gen kódující ribo-

somální protein S4 (RPS4Y) na chromosomu Y nebo HGFL gen na chromosomu 22 kódující hepatocytární růstový faktor. Tyto geny pak sloužily jako markery pro následnou klastrovou analýzu zaměřenou na detekci metastáz u pacientů. Sledováním změn v expresi genů u nádoru tlustého střeva pomocí cDNA mikročipů se zabývá řada známých laboratoří [9-12]. Častým problémem microarray experimentů je jejich obrazová a statistická analýza neboť různé softwary pro analýzu dat a různé statistické metody vedou k různým výsledkům. V naší práci jsme se proto pokusili o vyhodnocení cDNA mikročipů pomocí dvou softwarů pro analýzu obrazu (SpotFinder a Spot) a dvou statistických metod (t-test, SAM). Výsledky prezentované v této práci jsou průnikem všech možných kombinací analýzy obrazu a statických metod. Při porovnání námi identifikovaných genů a výsledků prezentovaných jinými autory je možné konstatovat, že spolu částečně korespondují a současně přinášejí nové způsoby možnosti analýzy dat cDNA mikročipů, který umožnil identifikaci několika nových potenciálních markerů kolorektálního karcinomu a přidružených metastáz.

Závěr

Pomocí cDNA mikročipů byly porovnány expresní profily nádoru tlustého střeva a zdravého epitelu. Podařilo se nám identifikovat 22 genů se změnou expresí mezi nádorovou a zdravou tkání. Pomocí klastrové analýzy se nám podařilo vybrat 6 genů, které rozdělují pacienty podle výskytu regionálních metastáz a prokázat funkčnost těchto markerů. Nový přístup v diagnostice kolorektálního karcinomu spočívá ve využití cDNA microarrays k vytipování genů, které se liší svou expresí ve zkoumaných vzorcích a mohou tak být potenciálními markery onemocnění. Takto vytipované geny lze pak využít v klastrové analýze, kde na základě jejich specifické exprese, jsou pacienti rozděleni do jednotlivých skupin podle typu (stádia) onemocnění. Tuto technologii by bylo možné v budoucnu využít v klinických laboratořích pro včasnou a přesnou diagnostiku onemocnění.

Práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR NC6987-3.

Literatura

1. R.S. Cotran, V. Kumar, T. Collins, Robbins Pathologic Basis of Disease, six ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999.
2. E. R.Fearon, B.Vogelstein, A genetic model for colorectal tumorigenesis, Cell 61 (1990) 759-767.
3. S. Chu, J. DeRisi, M. Eisen, J. Mulholland, D. Botstein, P.O. Brown, I. Herskowitz, The transcriptional program of sporulation in budding yeast, Science 282 (1998) 699-705.
4. P.T. Spellman, G. Sherlock, M.Q. Zhang, V.R. Iyer, K. Anders, M.B. Eisen, P.O. Brown, D. Botstein, B. Futcher, Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization, Mol. Biol. Cell 9 (1998) 3273-3297.
5. M.B. Eisen, P.O. Brown, DNA arrays for analysis of gene expression, Methods Enzymol. 303 (1999) 179-205.
6. A.A. Alizadeh, M.B. Eisen, R.E. Davis, C. Ma, I.S. Lossos, A. Rosenwald, J.C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J.I. Powell, L. Yang, G.E. Marti, T. Moore, J. Jr. Hudson, L. Lu, D.B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W.C. Chan, T.C. Greiner, D.D. Weisenburger, J.O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M.R. Grever, J.C. Byrd, D. Botstein, P.O. Brown, L.M. Staudt, Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling, Nature 403 (2000) 503-511.
7. C.M. Perou, S.S. Jeffrey, M. van de Rijn, C.A. Rees, M.B. Eisen, D.T. Ross, A. Pergamenschikov, C.F. Williams, S.X. Zhu, J.C. Lee, D. Lashkari, D. Shalon, P.O. Brown, D. Botstein, Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (1999) 9212-9217.
8. C.M. Perou, T. Sorlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lonning, A.L. Borresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours, Nature 406 (2000) 747-752.
9. D.A. Notterman, U. Alon, A.J. Sierk, A.J. Levine, Transcriptional gene expression profiles of colorectal adenoma, adenocarcinoma, and normal tissue examined by oligonucleotide arrays, Cancer Res. 61 (2001) 3124-3130.
10. K. Birkenkamp-Demtroder, L.L. Christensen, S.H. Olesen, C.M. Frederiksen, P. Laiho, L.A. Aaltonen, S. Laurberg, F.B. Sorensen, R. Hagemann, T.F. Orntoft, Gene expression in colorectal cancer, Cancer Res. 62 (2002) 4352-4363.
11. T.T. Zou, F.M. Selaru, Y. Xu, V. Shustova, J. Yin, Y. Mori, D. Shibata, F. Sato, S. Wang, A. Olaru, E. Deacu, T.C. Liu, J.M. Abraham, S.J. Meltzer, Application of cDNA microarrays to generate a molecular taxonomy capable of distinguishing between colon cancer and normal colon, Oncogene 21 (2002) 4855-4862.
12. O. Kitahara, Y. Furukawa, T. Tanaka, C. Kihara, K. Ono, R. Yanagawa, M.E. Nita, T. Takagi, Y. Nakamura, T. Tsunoda, Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia, Cancer Res. 61 (2001) 3544-3549.
13. P. Platzer, M.B. Upender, K. Wilson, J. Willis, J. Lutterbaugh, A. Nosrati, J.K.V. Willson, D. Mack, T. Ried, S. Markowitz, Silence of chromosomal amplifications in colon cancer, Cancer Res. 62 (2002) 1134-1138.
14. P. Hegde, R. Qi, R. Gaspard, K. Abernathy, S. Dharap, J. Earle-Hughes, C. Gay, N.U. Nwokekeh, T. Chen, A.I. Saeed, V. Sharov, N.H. Lee, T.J. Yeatman, J. Quackenbush, Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray, Cancer Res. 61 (2001) 7792-7797.
15. H.M. Lee, G.H.Jr. Greeley, E.W. Englander, Age-associated changes in gene expression patterns in the duodenum and colon of rats, Mech Ageing Dev. 122 (2001) 355-371.
16. Baelde H. J.: High quality RNA isolation from tumours with low cellularity and high extracellular matrix component for cDNA microarrays: application to chondrosarcoma. Journal of Clinical Pathology 54: 778-782, 2001.
17. N. Otsu, A threshold selection method from gray-level histograms, IEEE Trans. Syst. Man. Cybern.9 (1979) 62-66.
18. R. Adams, L. Bischof, Seeded region growing, IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.16 (1994) 641-647.
19. S. Beucher, Watersheds of functions and picture segmentation, ICASSP 82, Proc. IEEE Intern. Conf. on Acoustics, Speech and Signal Processing, Paris, 3-5 May 1982.
20. J. Quackenbush, Microarray data normalization and transformation, Nat. Genet.32 (2002) 496-501.
21. W. S. Cleveland, Robust locally-weighted regression and smoothing scatterplots, J. Am. Stat.Assoc. 74 (1979) 829-836.
22. Y.H. Yang, S. Dudoit, P. Luu, D.M. Lin, V. Peng, J. Ngai, T.P. Speed, Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation, Nucleic Acids Res. 30 (2002) e15.
23. I.V. Yang, E. Chen, J.P. Haseman, W. Liang, B.C. Frank, S. Wang, V. Sharov, A.I. Saeed, J. White, J. Li, N.H. Lee, T.J. Yeatman, J. Quackenbush, Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays, Genome Biol. 3 (2002) research 0062.1-0062.12.
24. V.G. Tusher, R. Tibshirani, G. Chu, Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 5116-5121.

HODNOTA REKONSTRUKCE PRSU TRAM LALOKEM U PACIENTEK S INVAZIVNÍM KARCINOMEM PRSU

THE VALUE OF THE TRAM FLAP BREAST RECONSTRUCTION IN PATIENTS WITH BREAST CARCINOMA

DRAŽAN L.¹, DUNGELOVÁ E.², KONEČNÝ T.³

¹ KLINIKA PLASTICKÉ A ESTETICKÉ CHIRURGIE, FN U SV. ANNY V BRNĚ

² KLINIKA PLASTICKÉ A ESTETICKÉ CHIRURGIE, FN U SV. ANNY V BRNĚ, + 2001

³ COLUMBIA UNIVERSITY IN NEW YORK - COLLEGE OF PHYSICIANS AND SURGEONS

Souhrn: Východiska: Rekonstrukce prsu po mastektomii přenosem TRAM (transversus rectus abdominis musculocutaneus) laloku je technicky zvládnutá na mnoha pracovištích plastické chirurgie České republiky. Přesto se provádí jen u malého procenta kandidátek. Jakou hodnotu má tato operace pro pacientky s karcinodem prsu není známo a může být sporná pro pacientky, u kterých se vyvinou v pooperačním období metastasy. **Typ studie:** Cílem bylo 1. pokusit se určit hodnotu rekonstrukce prsu přirovnáním k délce života s rekonstruovaným prsem, která by vyvážila veškeré útrapy spojené s rekonstrukcí. 2. Porovnat estetický výsledek rekonstrukce s hodnotou rekonstrukce. **Soubor:** 78 pacientek operovaných na klinice plastické a estetické chirurgie, FN u sv. Anny v Brně, v letech 1990-1996. **Metoda:** V 8 položkovém dotazníku definovaly pacientky na základě vlastních zkušeností délku života s rekonstruovaným prsem, které vyrovná útrapy s rekonstrukcí. Hodnotu jsme porovnali s objektivním posouzením estetického vzhledu rekonstrukce. **Výsledek a závěr:** 1. Nejčastější hodnota rekonstrukce prsu TRAM lalokem u pacientek po mastektomii je 2,5 roku života s rekonstruovaným prsem. I když je tato hodnota velmi individuální je možné ji brát v úvahu při indikaci i plánování termínu operace. 2. Vzdor obtížnosti operace hodnotí, na základě svých zkušeností, téměř všechny pacientky rekonstrukci pozitivně a doporučily by ji ostatním pacientkám. 3. Neprokázala se korelace mezi hodnotou a estetickým výsledkem rekonstrukce. Pacientky oceňují především obnovení základní symetrie hrudníku.

Klíčová slova: rekonstrukce prsu: TRAM lalok: psychologické hodnocení: hodnota rekonstrukce

Summary: Backgrounds: Breast reconstruction after mastectomy with TRAM (transversus rectus abdominis musculocutaneous) flap became a standard in many plastic surgery units in Czech Republic. However, breast reconstruction is performed in a small percentage of potential candidates. The value of this procedure is unknown for patients with breast carcinoma and is questionable in patients whose metastatic disease develops in the postoperative period. **Design:** 1. We attempted to measure the value of breast reconstruction by defining the number of years of life following breast reconstruction that would compensate all negatives associated with the reconstructive surgery and recovery. 2. We compared the value of reconstruction with the aesthetic result for each patient. **Subjects:** 78 patients who underwent breast reconstruction after mastectomy using TRAM flap at the Clinic of Plastic and Aesthetic Surgery, St. Anna's Faculty Hospital in Brno during period of years 1990-1996. **Method:** A questionnaire was sent that consisted of 8 questions which should define the length of life with reconstructed breast that would compensate all negatives associated with surgery and recovery. We have compared this value with the objective evaluation of the aesthetic result of each patient. **Result and Conclusion:** 1. We have found that most commonly 2,5 years of life following the breast reconstruction were worth the surgery and recovery. This value was very individual but, when compared with the life expectancy, it may help determine the indication for breast reconstruction in patients with poor prognosis of survival of the disease. 2. Nearly all patients appreciate reconstruction highly and positively and they would recommend it to the other patients with breast cancer. 3. There was a substantially weak correlation between the value of reconstruction and the objective evaluation of aesthetic result of each patient. Most patients appreciate mainly restoration of basic symmetry of their breast.

Key words: breast reconstruction: TRAM flap: psychological evaluation: value of reconstruction

Úvod

Rekonstrukce prsu živou tkání z podbříšku se provádí v České republice již 15 let [1-7]. Tkáň z břicha se přenáší v podobě stopkovaného TRAM laloku (Transversus Rectus Abdominis Myocutaneous), volného TRAM laloku anebo jako tzv. perforátorového DIEP (podle vyživující arterie Deep Inferior Epigastric Perforator) laloku. I když většina pracovišť plastické chirurgie je schopna nabídnout některou metodu rekonstrukce, provádí se u nás ročně tento typ operace asi jen u 150-200 pacientek [8]. Toto množství je jen malá část z celkového počtu pacientek po mastektomii provedených v posledních 10 letech. Zdá se tedy, že rekonstrukce prsu po mastektomii živou tkání není ještě běžnou součástí komplexní péče o pacientku s karcinodem prsu. Příčiny mohou být různé:

a) Rekonstrukce není nabízena z nedostatečné informovanosti ošetřujícího lékaře o možnostech a současných výsledcích těchto operací

b) Rekonstrukce není nabízena ošetřujícím lékařem, protože tento není přesvědčen o léčebné správnosti rekonstrukce. Někteří lékaři mají obavu z onkologických rizik rekonstrukce

c) Pacientka se o rekonstrukci dozví ale je jí rozmlouvána okolím ve smyslu: „Buďte ráda, že jste přežila rakovinu a nepokoušejte osud další velkou operací.“

d) Pacientka má obavy z operace a není si jista zda rizika a celkové útrapy spojené s rekonstrukcí stojí za konečný kosmetický výsledek.

Zátěž pro pacientku podstupující rekonstrukci živou tkání představují především tyto skutečnosti:

- obtížné rozhodování před operací
- 4hodinová operace v celkové anestezii (7-8 hodin u oboustranné rekonstrukce)
- rozsáhlé operační pole zahrnující celou přední stěnu břišní a polovinu přední strany hrudní

- zásah do svaloviny břicha
 - 10denní hospitalisace
 - obvykle další 1-3 menší operace, z toho jedna zpravidla v celkové anestezii
 - celková délka rekonstrukce včetně bradavky a tetováže dvorce kolem jednoho roku
 - možné komplikace a s tím spojené další opravné operace
- Otázka „Stojí to za to?“ vyjadřuje složitost a relativitu indikace téměř každé rekonstrukční operace v plastické chirurgii. Nejde o záchranu života ale o nápravu ztracené tvarové integrity a symetrie těla. Jde o relativní zlepšení kvality života. Relativnost spočívá v tom, že tentýž morfologický defekt má u různých jedinců různý vliv na jejich kvalitu života. Měření kvality života, resp její změny po operaci je složité a v případě rekonstrukce prsu po mastektomii u pacientek s karcinomem jsme nenašli v literatuře žádnou práci, která by se o to pokusila.

Možnost poměřit subjektivní výtěžek z rekonstrukce prsu břišním lalokem by mohla být prospěšná z několika hledisek. Jednak pro orientaci samotných pacientek ale také ošetřujících lékařů, kteří rekonstrukci indikují. Například u pacientek s nejistou prognosou resp. špatnou prognosou by mohly údaje o prospěšnosti, či hodnotě rekonstrukce usnadnit rozhodnutí zda rekonstrukci provádět či ji odmítnout. Stanovení významu rekonstrukce pro pacientku s karcinomem prsu by mohlo přinést podklady pro rozhodnutí zda a v jaké míře má být rekonstrukce hrazena zdravotní pojišťovnou.

Cíl studie

1. Pokusit se změřit hodnotu provedené rekonstrukce přirovnáním k délce života s rekonstruovaným prsem, která by vyvážila útrapy pacientky spojené s rekonstrukcí tak jak je pacientka sama prožila.
2. Porovnat subjektivní hodnocení výsledku rekonstrukce pacientkou s objektivním hodnocením estetického výsledku rekonstrukce třetí osobou.

Materiál a metoda

Oslovili jsme dotazníkem 78 pacientek, které byly operovány pro rekonstrukci prsu lalokem z břicha (stopkovaný nebo volný TRAM lalok) na klinice plastické a estetické chirurgie v Brně, Fakultní nemocnice u sv. Anny, v letech 1990 - 1996. Z těchto mělo 61 pacientek jednostrannou rekonstrukci pro invazivní karcinom na jedné straně, 17 pacientek prodělalo oboustrannou rekonstrukci, z toho 7 pacientek pro oboustranný invazivní karcinom a 10 pacientek pro jednostranný invazivní karcinom a druhostranný rizikový parenchym. Z celkových 95 přenesených TRAM laloků bylo 53 stopkovaných a 41 mikrochirurgických. Průměrný věk pacientek v souboru byl 51,5 let (40-58 let). V době studie měly všechny pacientky alespoň 2 roky od ukončení rekonstrukce. Interval mezi mastektomií a rekonstrukcí byl průměrně 35 měsíců (6 měsíců – 9 let). Během tohoto intervalu prožily všechny pacientky zkušenost alespoň jednoho chybějícího prsu po předešlé mastektomii.

1. Stanovení hodnoty rekonstrukce bylo provedeno z odpovědí na 3 otázky v dotazníku (otázky 2-4), jejichž smyslem bylo definovat počet let života s rekonstruovaným prsem, které by vyvážily veškeré nesnáze a utrpení spojené s rekonstrukcí.
2. Subjektivní hodnocení výsledku rekonstrukce vyplynulo z odpovědí na 8. otázku dotazníku, kdy pacientky přiřadily výsledek své rekonstrukce do tří kategorií- vynikající, uspokojivý a neuspokojivý.
3. Objektivní hodnocení výsledku rekonstrukce provedla třetí, profesně nechirurgická osoba (psycholožka) posouzením pooperačních fotografií a zařazením do 4 kategorií: výborný, pěkný, uspokojivý a s pochybnostmi. Toto hodnocení jsme porovnali s výsledky subjektivního hodnocení pacientkami.

Výsledky

Ze 78 oslovených pacientek vrátilo po telefonické urgenci dotazník 71 pacientek (91 %). Ze 7 pacientek, které nevrátily dotazník a nebyly zařazeny do studie zemřely 3 na metastatický proces, 2 pacientky změnilы bydliště a nepodařilo se zjistit novou adresu a 2 pacientky nereagovaly na urgenci z neznámých důvodů. Ze zbývajících 71 pacientek bylo zevrubně anamnesticky zjištěno, že 4 pacientky mají vzdálené metastázy, zatímco 67 pacientek se vyjádřilo, že jsou onkologicky v pořádku.

A. Výsledky stanovení hodnoty rekonstrukce dotazníkem

1. Rozhodla byste se pro rekonstrukční operaci i po zkušenostech, které jste získala během léčení?

ANO	69 pacientek (97,2 %)
NE	2 pacientky (2,8 %)
2. Podstoupila byste rekonstrukční operaci i v případě, že byste v době rozhodnutí věděla, že se Vaše původní onemocnění pravděpodobně vrátí?

ANO	40 pacientek (56,3 %)
NE	17 pacientek (23,9 %)
NEVÍM	14 pacientek (19,7%)
3. Kolik let života s nově vytvořeným prsem může, dle Vašeho názoru, vyvážit zátěž spojenou s operací (tj. nejistota volby, pochybnosti o výsledku, pooperační bolesti a průběh rekonvalescence atd.) Jinak řečeno, pro kolik let života s novým prsem by stálo celou zátěž podstoupit. Uveďte počet let.

61 pacientek uvedlo rozsah 2 měsíce až 9 let, průměr 3,1 roku, median 2,5 roky	
8 pacientek uvedlo NEVÍM	
4. Podstoupila byste operaci i v případě, že budete žít jen: uveďte jednu možnost

krátce:	8 pacientek (11,3 %)
jeden rok:	12 pacientek (16,9 %)
2 - 5 let:	48 pacientek (67,4 %)
5 - 10 let:	2 pacientky (2,8 %)
více než 10 let:	1 pacientka (1,4 %)
5. Se kterou z níže uvedených okolností bylo pro Vás nejtěžší se vyrovnat? Uveďte jednu z uvedených možností

fáze rozhodování:	25 pacientek (35,2 %)
vlastní operace a hospitalizace:	21 pacientek (29,6 %)
doba rekonvalescence:	7 pacientek (9,8 %)
kosmetický výsledek rekonstrukce:	8 pacientek (11,2 %)
vzhled a funkce stěny břicha:	10 pacientek (14,3 %)
6. Co pro Vás bylo nejobtížnější překonat, než jste dospěla k rozhodnutí operaci podstoupit?

obavy z bolesti po operaci	4 pacientky (5,6 %)
obavy z komplikací	10 pacientek (14,3 %)
pochybnosti o kosmetickém výsledku	7 pacientek (9,8 %)
odrazující názory blízkých osob (manžel, přítelkyně aj.)	8 pacientek (11,3 %)
odrazující názory zdravotníků	42 pacientek (59,0 %)
7. V čem především Vám rekonstrukční operace pomohla?

překonat pocit znetvoření	29 pacientek (40,1 %)
cítit se zdravěji	0 pacientek
zbavit se deprese	11 pacientek (15,5 %)
zmírnit (odstranit) psychické zábrany v intimních situacích	0 pacientek
oblékat se bez omezení	9 pacientek (12,7 %)
získat zpět pocit ženskosti	27 pacientek (38,0 %)
8. Estetický výsledek operace hodnotíte jako:

VYNIKAJÍCÍ	31 pacientek (43,7 %)
USPOKOJIVÝ	40 pacientek (56,3 %)
NEUSPOKOJIVÝ	0 pacientek

B. Výsledky objektivního hodnocení estetického výsledku.

- Do skupiny A.-VÝBORNÉ výsledky - 10 pacientek (14,1 %)
- Do skupiny B. PĚKNÉ výsledky - 38 pacientek (53,5 %)
- Do skupiny C. USPOKOJIVÉ výsledky - 17 pacientek (24,0 %)
- Do skupiny D. výsledky S POCHYBNOSTMI - 6 pacientek (8,4 %)

C. Výsledky porovnání objektivního estetického výsledku operace se subjektivním stanovením hodnoty rekonstrukce pacientkami (obr. 1-4).

- Ve skupině A. - tj. VÝBORNÝCH estetických výsledků (10 pacientek), definovaly tyto pacientky hodnotu rekonstrukce průměrně délkou **2,3** roku života.
- Ve skupině B - tj. PĚKNÝCH estetických výsledků (38 pacientek) definovaly tyto pacientky hodnotu rekonstrukce průměrně délkou **3,3** roku života.
- Ve skupině C - tj. USPOKOJIVÝCH estetických výsledků (17 pacientek) definovaly tyto pacientky hodnotu rekonstrukce průměrně **3,1** roku života.
- Ve skupině D - tj. estetických výsledků S POCHYBNOSTMI (6 pacientek) definovaly tyto pacientky průměrnou hodnotu rekonstrukce životem v délce **3,1** roku.

Diskuse

V uvedené studii jsme se snažili pomocí dotazníku zjistit jednak celkovou spokojenost pacientek s rekonstrukcí prsu pomocí laloku z břicha a dále vyjádřit její hodnotu pomocí délky života, která by vyvážila útrapy související s operací. Ve sledovaném souboru 71 pacientek byly převážně (77,5 %) pacientky po jednostranné modifikované radikální mastektomii pro invazivní karcinom. Z ostatních mělo 6 pacientek po oboustranné mastektomii a u 10 pacientek, které měly po jednostranné mastektomii se na druhé straně provedla subkutánní mastektomie a současně oboustranná rekonstrukce. Všechny pacientky žily určitou dobu (průměrně 35 měsíců) bez alespoň jednoho prsu a prožily období obtížné adaptace na vzniklou pooperační asymetrii hrudníku.

Z dotazníku vyplývá (otázka 1 a 8), že 97 % pacientek byly s výsledkem spokojené a na operaci by šly znovu. Téměř polovina (44 %) pacientek hodnotilo estetický výsledek jako vynikající.

Více než polovina (56,3 %) dotázaných by se pro operaci rozhodla i v případě, že by v době rozhodování věděla, že budou mít později recidivu onemocnění (otázka 2). Mimo jiné, měla tato otázka navést pacientku na situaci, kterou si musela přestavit aby odpověděla na další dvě otázky.

Určení délky života pro který má smysl podstoupit tuto nelehkou operaci bylo obtížnější a proto byla tato otázka formulována dvakrát, pokaždé trochu jinak ale směřující ke stejnému

odhadu (otázka 3 a 4). Otázky jsme se snažili položit tak, aby bylo jasné, že čím kratší interval pacientka uvede, tím hodnotí operaci více. Průměrná hodnota vyšla **3,1 roku života**, ale vzhledem k asymetrickému rozložení souboru (jen 3 pacientky uvedly délku na 5 let) uvádíme medián, který je jen **2,5 roku**. V otázce č. 4. nejvíce pacientek (48 tj. 67,4 %) odpovědělo v intervalu 2-5 let, což odpovídá odpovědím a hodnotě jak průměru, tak mediánu. Lze tedy konstatovat, že hodnota rekonstrukce prsu lalokem z břicha oceňují pacientky nejčastěji délkou kolem 2,5 let života. Jsme si ovšem plně vědomi, že jde jen o orientační hodnotu a že při indikacích je vždy potřeba vycházet z individuality pacientky a její touhy po nabytí nové celistvosti. Pro ilustraci citujeme odpověď pacientky, kterou náš dotazník zastihl ve stadiu metastatického rozsevu a na otázku 3 přesto vypovídá pozitivně:

„Když jsem rekonstrukci podstoupila, byla jsem šťastná pro 2-3 roky klidného a příjemného života. Nelituji ani jedné vteřiny, že bych se rozhodla špatně. Můj život končí, mám rakovinu všude, ale děkuji Bohu a lékařům, kteří stáli při mně, když jsem se rozhodovala, protože moje psychika by to stejně nevydržela.“

Otázky 5 a 6 ukazují, že nejtěžší fází procesu je rozhodování, ve kterém zřejmě pacientky nemají dostatek informací, podle kterých by se mohli rozhodovat. Paradoxně vyšlo najevo, že nejtěžší překážkou při rozhodování jsou zdravotníci účastníci se léčby, kteří mohou mít k rekonstrukcím i zamítavý postoj. Odpovědi na otázku 7 potvrzují, že touha po celistvosti lidského těla a symetrii patří k přirozeným požadavkům každého člověka, včetně pacientky s invazivním karcinomem prsu. Rekonstrukční operace však nemůže vrátit stav hrudníku do původního vzhledu a pocitu jako před mastektomií a v tomto smyslu je potřeba informovat pacientku popravdě a realisticky. Nadměrné očekávání perfektního výsledku může být příčinou nespokojenosti pacientky po operaci.

Autoři jsou si plně vědomi omezené platnosti termínu „objektivní hodnocení“ estetického vzhledu rekonstruovaného prsu, protože bylo hodnoceno pouze jednou osobou, která je navíc součástí autorského týmu. Toto objektivní hodnocení sloužilo pouze k rozdělení výsledků do kategorií v rámci daného souboru a nikoliv k porovnávání kosmetického výsledku s jiným souborem, ke kterému by měl hodnotitel jiný vztah.

Vztah mezi subjektivním posouzením vzhledu a hodnotou rekonstrukce nekoreloval přímo s objektivním hodnocením kosmetického výsledku. Hodnota rekonstrukce byla sice nejvyšší u skupiny A s nejlepšími kosmetickými výsledky (nejkratší časový interval 2,3 roku, který by vyvážil strasti spojené s rekonstrukcí), nicméně nebyl významný rozdíl mezi dalšími skupinami, např. ve skupině B s pěknými výsledky



Obr. 1. VÝBORNÝ výsledek: 10 pacientek – hodnota rekonstrukce 2,3 roku života.

byla hodnota 3,3 roku, zatímco u skupiny D s ne příliš zdařilými výsledky byla hodnota dokonce vyšší, tedy 3,1 roku. Žádná pacientka ze skupiny D s nevydařenými výsledky nevyjádřila nespokojenost s kosmetickým vzhledem rekonstruovaného prsu, jedna z nich uvedla hodnocení jako vynikající. Tento stav si vysvětlujeme buďto přemírou slušnosti ze strany pacientek vážících si péče a úsilí ošetřujícího personálu, anebo jde pacientkám hlavně o dosažení přibližné objemové symetrie hrudníku. Při úspěšné rekonstrukci ales-

poň objemu a polohy prsu na hrudníku může pacientka začít opět nosit pohodlně podprsenku, která modeluje nerovnosti a skryje jizvy a dává pacientce možnost se běžně oblékat. Pacientky často vyslovily uspokojení nad tím, že se mohou opět koupat bez nebezpečí posunu nebo dokonce ztráty epitezy. Domníváme se však, že přítomnost dvorce a bradavky má psychologický význam při přijetí nově vytvořeného prsu jako integrální součásti těla a proto tuto konečnou fázi rekonstrukce každé pacientce nabízíme.



Obr. 2. **PĚKNÝ** výsledek: 38 pacientek – hodnota rekonstrukce 3,3 roku života.



Obr. 3. **USPOKOJIVÝ** výsledek: 17 pacientek – hodnota rekonstrukce 3,1 roku života.



Obr. 4. Výsledek **S POCHYBNOSTMI**: 6 pacientek – hodnota rekonstrukce 3,1 roku života.

Závěr

- I. Nejčastější hodnota rekonstrukce prsu TRAM lalokem u pacientek po mastektomii je 2,5 roku života s rekonstruovaným prsem. I když je tato hodnota velmi individuální je možné ji brát v úvahu při indikaci i plánování termínu operace.
- II. Vzdor obtížnosti operace hodnotí, na základě svých zku-

šeností, téměř všechny pacientky rekonstrukci pozitivně a doporučily by ji ostatním pacientkám.

- III. Hlavním přáním pacientek a cílem rekonstrukce je znovu dosažení přibližné symetrie hrudníku.
- IV. Lepší spolupráce mezi zdravotníky a dostupnost objektivních informací o rekonstrukcích by měla usnadnit pacientce rozhodovací fázi před operací.

Literatura

1. Dražan, L., Mrázek, T., Dungelová, E. Bilateral breast reconstruction after mastectomy. Acta Chir. Plast. 1991, Vol. 33, str. 217-224.
2. Veselý, J. Rekonstrukce prstů po ablacích autogenní tkáně. Lékařské listy. 1997, 25. dubna č. 17, s. 2.
3. Dražan, L. Subkutánní mastektomie mohou nahradit implantáty. Lékařské listy. 1997, 25. dubna, č. 17, s.3.
4. Veselý, J., Stupka, I., Dražan, L., Holuša, P., Licata, G., Corradini, B. DIEP Flap Breast Reconstruction - New Experience. Acta Plast. Chir. 2001, 3-6.
5. Nejedlý, A., Tvrdek, M., Kletenský, J., Pros, Z. Breast reconstruction with living tissue, Prague experience. Ve sborníku: International Symposium on Plastic Surgery, Praha 1992, s.49-50.
6. Nejedlý, A., Tvrdek, M., Kletenský, J. Breast reconstruction using free TRAM flap transfer - ten years experience. Acta Chir. Plast., 2001, 2, s.35-38.
7. Tvrdek, M., Kletenský, J., Svoboda, S. Aplasia of the breast - reconstruction using a free TRAM flap. Acta Chir. Plast., 43, 2001, 2, s.39-41.
8. Osobní komunikace s přednosty a primáři pracovišť plastické chirurgie v ČR.

informace

FOTODIAGNÓZA A FOTOLÉČBA

HORVÁTH T.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Fotodynamická terapie (PDT) hematoporfyrinovými deriváty vstoupila do moderní klinické arény koncem sedmdesátých let minulého století. Fotodiagnóza (PD) paradoxně zhruba 10 let poté. Posun klinického úsilí v moderní onkologii směrem ke karcinogenéze akceleruje jejich propojení a samozřejmě konvertoval pořadí jejich aplikace. Z toho plyne, že lze diagnostikovat něco, co ještě není (nádorem), a léčit nemoc dříve než vznikne. Fundovaná klinická vize? Blouznění, nebo úžasný prostý fakt?? Existují dvě odpovědi: Ano a Ne. Obě vyžadují odvahu. Je-li totiž jedna z nich moudrá, ta druhá bude pošelilá.

V Elsevier Science zjistili, že doba, kdy se na(ne)štěstí téměř každý, soustřeďuje na finance, dozrála na konstituování multidisciplinárního týmu kliniků a badatelů napříč spektrem soudobé medicíny, zaměřených na světlo - sledující jak medicínský, tak ekonomický aspekt jeho diagnostických a léčebných aplikací. Tento krok podněcuje výměnu informací, rozšiřování poznatků, definování nových standardů a kýžené odstraňování bariér. Skupinu shromáždil (a vede) v redakci čtvrtletníku Photodiagnosis and Photodynamic Therapy pdpdt'4 britský hrudní chirurg Keyvan Moghissi. První číslo prvního ročníku je již k dispozici v Ústavní knihovně Masarykova onkologického ústavu v Brně, který má institucionální předplatné v ČR a okolí unikátní. Jeho obsah Vás bude jistě zajímat, když se odpočatí a plni invence vrátíte z fantastické letošní dovolené. Blíže na www.elsevier.com/locate/pdpdt.

ZPRÁVA Z KONFERENCE O NÁDOROVÝCH MARKERECH (CECHTUMA 2004)

REPORT FROM A TUMOR MARKER CONFERENCE

ŠIMÍČKOVÁ M.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO (simickom@mou.cz)

Ve dnech 1.–3. 10. se konala v Praze „5th Central European Conference on Human Tumor Markers“ (CECHTUMA 2004). Program byl zaměřen na aktuality v oblasti sérových nádorových markerů především u karcinomu prsu, kolorekta, dále na novinky v oblasti sledování minimální reziduální choroby. Ze závažných sdělení týkajících se nádorových markerů je třeba si všimnout sdělení Van Dalena a spolupracovníků (Plzeň, Praha, Mnichov) o výsledcích dvouleté multicentrické studie týkající se prognostických hodnot preoperačních hladin sérového CEA a CA19-9 u nemocných s kolorektálním karcinomem s adjuvantní terapií. Ve studii s téměř 500 nemocnými byla optimalizována hladina těchto předoperačních hodnot podle maximální diskriminace nemocných s DFI nebo s relapsem: **je-li předoperační CEA > 39,8 ug/l a CA19-9 > 87,9 kU/l, pak se jedná o rizikovější skupinu nemocných vyžadujících agresivnější terapii.**

Dr. Lamerz (Mnichov) vyzdvihl význam stanovení nádorových markerů u germinativních nádorů. Zcela nezaměnitelnou roli hrají v těchto případech AFP a hCG především u neseminomů. Podle zcela aktuálních guidelines vydaných skupinou EGCCG (European Germ Cell Cancer Consensus Group) je jejich hodnota součástí prognostických kritérií (*H. J. Schmoll et al., European Consensus on Diagnosis and Treatment of Germ Cell Cancer: A Report of the European Germ Cell Cancer Consensus Group: Ann Oncol. 2004 Sep;15(9):1377-99*).

Je-li hraniční hodnota AFP do 1000 ug/l, hCG do 5000 IU/l a LD do 1,5násobku normální hladiny, jedná se o nese-minomy s dobrou prognózou. Vysoce riziková skupina je charakterizována hodnotami AFP nad 10 000 ug/l, hCG nad 50 000 U/l, LD nad 10násobkem normální hodnoty. Pro nese-minomy byl diskutován význam placentární formy alkalické fosfatázy, podle našich zkušeností je izoenzym pyruvátkinázy vhodnější, protože toto stanovení není ovlivněno kouřením pacienta. Standardně vysokou úroveň mělo sdělení mnichovského pracoviště dr. Stiebrové o významu **předterapeutických hodnot CEA u kolorektálního karcinomu**, dále byla publikována práce z téhož pracoviště o srovnání významu nukleosomů u CYFRA21-1 pro predikci účinku chemoterapie NSCLC: CYFRA před druhým cyklem terapie je nejlepší prediktor odpovědi.

Byl zhodnocen i význam stanovení nového markeru – **sérového kalikreinu (hK)** pro monitorování nemocných s karcinomem ovarií, na němž naše oddělení spolupracuje (dr. Diamandis, USA). Specifická různých typů hK se pro jednotlivé nádorové lokalizace liší, pro ovaria je nejlepší hK6 a 10. Dosavadní výsledky nepřesvědčují jasně o větším významu monitorování uvedeného parametru ve vztahu k CA125, definitivní zhodnocení je však třeba ještě dokončit.

Z tkáňových parametrů bylo zajímavé sdělení hodnotící význam **urokinázového typu plasminogenového aktivátoru a jeho inhibitoru – PAI1**. Je to asi nevýznamnější dosud popsáný tkáňový prognostický indikátor pro karcinom kolorekta i prsu.

Metodicky se vyvíjejí možnosti stanovení **S-100**, markeru vhodného pro monitorování melanomu. Pro malobuněčný kar-

cinom plic se jeví být dobrým markerem (výrazně lepším než NSE) **proGRP** (progastrin-releasing peptid). **SCC antigen** se na trhu objeví ve dvou izoformách, jejich význam však bude teprve testován. Falešnou pozitivitu lze očekávat pro tento marker i u některých dermatologických poruch (dermatomyositis). Novinky se objevují i u monitorování ca prostaty, jednotlivé **izoformy volného PSA** (pro-PSA, intaktní PSA a benigní PSA) snadlepší možnosti diferenciální diagnostiky karcinomu a benigní hyperplazie prostaty. Stále se vyvíjející postupy kontroly správnosti analytických postupů byly prezentovány významnou odborníci z této oblasti – dr. Sturgeon z Anglie. Jako nadějně nové výsledky zazněly na sjezdu sdělení, týkající se **detekce minimální reziduální choroby v krvi na úrovni komerčních souprav**. Aplikace metody, která již prošla schvalováním FDA, byla prezentována dr. Fritschem (USA). Dosavadní postupy detekce cirkulujících nádorových buněk, založených převážně na detekci RT-PCR specifických genů, jsou podle zveřejněných výsledků dosti kontroverzní, což je způsobeno převážně falešnou pozitivitou detekce. Metoda *CellSearch, komerčně připravená firmou VERIDEX ve spolupráci s Immunicon (USA)*, využívá imunomagnetickou separaci cirkulujících epiteliálních buněk s jejich následujícím fluorescenčním značením prostřednictvím cytokeratinů a semikvantitativním cytometrickým hodnocením. Metoda je automatizovaná, což podle výrobců vede k vysoké reprodukovatelnosti stanovení.

Druhá metoda, která byla prezentována firmou *AdnaGen (Německo)* pracuje rovněž na principu imunomagnetické separace, a výsledný produkt je testován prostřednictvím vybraných mRNA specifických pro kolorektální tumory (Adna Test Colon Cancer Select + Detect), tatáž souprava existuje i pro mamární karcinom. Oba postupy vykazují senzitivitu asi 1 nádorová buňka na 2,5 ml krve.

Bratislavské pracoviště doc. Kaušitz se rovněž touto problematicou zabývá, autoři zvolili pro detekci cirkulujících nádorových buněk v krvi metodu cytometrie s laserovou detekcí, udávaná senzitivita je 1-5 buněk na 1 ml krve. U prvních vyšetřovaných nemocných s ca cervixu již byly předneseny první snad nadějně výsledky.

Konference byla navštívena světovými odborníky, snad jen zájem českých účastníků mohl být větší (www.cechtuma.cz, souhrny publikovány v časopise Biomarkers and Environment, 8, 2004). Na výsledcích renomovaných pracovišť jsme potvrdili, že např. programy užívané v našem ústavu patří ke špičkovým (viz program Bianta na určení neznámého primárního nádoru pomocí vyšetření sérových nádorových markerů). Diskuse týkající se vyšetřování sérového HER-2/neu v průběhu terapie Herceptinem potvrdila, že námi zvolený postup monitorování jeho hladin bude mít s velkou pravděpodobností prediktivní význam.

XXXII SYMPOSIUM IN SÜDTIROL

Aktuelle Behandlungsmaßnahmen beim Mammakarzinom, Hotel Schloß Korb Missian-Eppan/Südtirol 21.–23. 10. 2004

FAIT V., CHRENKO V.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Měli jsme možnost zúčastnit se pravidelného setkání v Jižním Tyrolsku, které je každoročně pořádáno v hotelu Schloß Korb firmou B. Braun. Letošní setkání bylo věnováno problematice nádorů prsu.

Jednání proběhlo v hotelu, vytvořeném přestavbou středověkého hradu, obklopeného vinicemi a jablonořnými sady v širo-

kém panoramatu velehor s počínajícím sněhovým popraškem na nejvyšších vrcholcích. Jednání probíhala v režii rakouských kolegů, pro které je Jižní Tyrolsko nostalgickou oblastí, kterou dosud považují za širší součást své vlasti.

Vzhledem k našemu zaměření jsme se zajímali především o chirurgickou problematiku: M. Stierer, z Vídně se zabýval využitím prediktivních faktorů, o nichž se v terapii maligních tumorů a tedy i v terapii karcinomu prsu se stále častěji hovoří. Pro klinika je zapotřebí jasné definice prediktivních faktorů a odlišení od prognostických faktorů, s nimiž bývají často směřovány.

V běžné praxi jsou v současnosti použitelné především faktory predikce spojené s typem dosavadní terapie a dále relativně často využívané stanovení steroidních receptorů, mutace HER2, eventuálně stanovení cyklinu. Využití spočívá především v rozhodnutí o typu adjuvantní systémové terapie.

R. Mader z Vídně v přehledné přednášce byly stručně shrnul dosavadní způsoby stanovení exprese genových mutací, od stanovování jednotlivých genů, po současné metody čipových analýz. Jednoznačné využití těchto techniky současné praxi je zatím problematické, zapotřebí bude hodnocení na velkém počtu klinických případů a vymezení jasných korelací výsledků s klinickými jevy.

R. Jakesz z Vídně se zabýval současnými možnostmi prevence karcinomu prsu. V současnosti jediná klinicky použitelná cesta je chemoprevence, ať již Tamoxifenem, Raloxifenem nebo inhibitory aromatáz. Proběhlé klinické studie významným způsobem snížily výskyt nově vzniklých karcinomů prsu. Snížení bylo pouze ve složce SR pozitivních nádorů, bez efektu ve složce SR negativních nádorů. Minimální efekt je také u nádorů familiárních. Chemoprevence však přináší i významné vedlejší účinky, které v masovém nasazení u zdravé populace nejsou akceptabilní. Více méně jedinou smysluplnou indikací k chemoprevenci vidí v současnosti autor v histologicky prokázané atypické duktální hyperplazii.

Ch. Tausch z Lince stručně uvedl problematiku konzervativních výkonů u karcinomu prsu. Tyto výkony jsou v současnosti standardem, v Rakousku je v současnosti 80% pacientek s karcinomem prsu operováno konzervativně.

R. Kolb z Vídně se zabýval rolí mastektomie v dnešní době. Mastektomie, jakkoliv se může jevit obsoletní, zůstává stále jedním ze základních chirurgických výkonů u karcinomu prsu, ať již v tradiční formě radikální modifikované mastektomie, nebo ve formě kůži šetřícího výkonu.

Jednoznačnou indikací je multicentricita, ostatní kontraindikace jsou více či méně relativní.

Některé jsou dosti významné a jejich vliv na rozhodnutí o mastektomii je velmi vysoký, například nemožnost pooperačního ozáření, systémové kolagenózy, gravidita, nepochopitelné velikosti nádoru a prsu. Nicméně rozhodnutí o mastektomii je vždy individuální, musí předcházet jasná rozvaha a do rozhodování musí být zapojena pacientka.

M. Kaufmann z Frankfortu přiblížil hlavní otázky předoperační chemoterapie. Neoadjuvantní chemo a hormonoterapie je stále častěji indikována a jejich indikace se posouvá do stále nižších stádií. V současnosti existují již pracoviště, která indikují neoadjuvantní systémovou terapii i u nádorů o velikosti nad 1 cm.

Z chirurgického hlediska je před zahájením neoadjuvantní terapie nutností velmi přesné zmapování lokality tumoru, autor doporučuje fotodokumentaci před zahájením, s proměřením vzdálenosti od tumoru od spojnice jugula s mamillou. Další z možností je označení klipem nebo karbonem.

Vzhledem ke snižujícím se stádiím, indikovaným k neoadjuvantní, začíná být zajímavá i otázka vhodnosti použití sentinelové biopsie. Možnost využití sentinelové biopsie u těchto pacientů připadá v úvahu jak před zahájením samotné systémové léčby, tak po jejím skončení. Jednoznačný závěr prozatím neexistuje, prozatím se jedná buď o spekulace, nebo o velmi malé

sestavy pacientek, dosavadní výsledky vyžadují velmi opatrný postoj.

M. Frey z Vídně předvedl možnosti rekonstrukčních výkonů. Rekonstrukční chirurgie po mastektomii nebo po kosmeticky nevyhovující parciální mastektomii je možná jak okamžitá, tak odložená, všeobecně se dává přednost spíše odloženým výkonům, důvody jsou jak technické, tak psychologické.

Metody rekonstrukce jsou všeobecně známy, jedná se o možnosti s využitím expandéru a protézy nebo s využitím tkáně tělu vlastní, tedy využití muskulokutánních laloků, především TRAM nebo laloku z latissimus dorsi.

Alarmující je průzkum pacientek o tom, proč nepodstoupily rekonstrukci, mnohé pacientky udávají strach z operace, nežádem, potřebu nejdříve ukončit terapii rakoviny, což jsou zcela pochopitelné důvody, nicméně však až 90% pacientek udává, že o možnosti rekonstrukce nebyly vůbec informovány!

A. Haid z Feldkirchu se zabýval indikacemi a technikou sentinelové biopsie. Sentinelová biopsie se u karcinomu prsu začíná prosazovat jako téměř standardní postup. Doporučované indikace jsou solitární, eventuálně multifokální karcinom prsu se sonograficky vyloučeným makroskopickým postižením axilárních uzlin. Kontraindikací je kromě pokročilejšího tumoru alergie na barvivo a předchozí operace v oblasti axilly.

Problémy, které vyžadují řešení jsou extraaxilární uzliny, otázka použití u multicentrických karcinomů, otázka využití po neoadjuvantní a využití u karcinomů in situ.

Extraaxilární sentinelové uzliny a jejich detekce významně závisí na způsobu vyhledávání, jejich výskyt může být od de facto nulového až po významné procento, skutečná prognostická a terapeutická hodnota je ale prozatím spíše sporná.

Využití techniky u multicentrických karcinomů spolesná na to, že prs se chová jako jedna anatomická oblast, a tedy, že může existuje jedna sentinelová uzlina pro celý prs.

Ve využití metody po neoadjuvantní chemoterapii je pravděpodobně správné tuto nabídnout pacientkám, které měla před terapií tumory T1-T2, se sonograficky negativními uzlinami, u pacientek, u nichž došlo k vymizení klinických metastáz po chemoterapii je indikace prozatím spíše sporná. Využití u DCIS je nyní doporučováno u tumorů kolem 2-3cm, u palpabilních tumorů, u tumorů indikovaných k mastektomii a při radiologickém podezření na invazivitu.

Probrány byly i techniky aplikace a preparace.

I. Köves z Budapešti předvedl rozsáhlou sestavu 787 pacientek, zajímavostí je indikace k sentinelové biopsii u preventivních mastektomií u nositelek mutace BCRA. Další zajímavostí je rutinní vřazení imprint cytologie při sentinelové biopsii. Z pohledu stagingu je však zajímavý přístup, kdy je u pacientek po operaci prsu pro karcinom rutinně doplňována aspirace dřeně s vyšetřením na cirkulující nádorové buňky, které jsou pozitivní až u 21 % pacientek s negativním uzlinovým nálezem.

P. Steindorfer z Lince hodnotil možnost použití zmrazeného řezu v sentinelové biopsii. Možnost využití zmrazeného řezu při sentinelových biopsiích je opakovaně diskutována. Možnost definitivního řešení při jedné operaci je poměrně lákavá, ať již snížením počtu operací, tak i technicky jednodušší disekcí v terénu bez relativně čerstvé jizvy. Proti této možnosti stojí organizační obtížnost, časová a personální náročnost, a při běžně používané metodice ne absolutní přesnost, s trvajícím možností reoperace i při negativním výsledku zmrazeného řezu, obzvláště u lobulárních karcinomů. Autoři jsou zastánci zmrazeného řezu, i za cenu jistých nepřesností a trvajícím možností reoperace.

Celá akce, byť svým rozsahem nevelká, zato ale pečlivě připravená, jak po organizační stránce, tak po stránce přípravenosti přednášejících byla cenným přehledem současného stavu terapie karcinomu prsu i impulsem k dalšímu zdokonalování.

JMENNÝ REJSTŘÍK

Abrahámová, J. 11/S, 39/S, 49/S
 Adam, V. 190/6
 Adam, Z. 64/2, 180/5, 73/S
 Andres, P. 61/S
 Bačovský, J. 13/1
 Bartoňková, H. 46/2, 49/2
 Belada, D. 84/S
 Bourek, A. 27/S
 Breza, J. 119/4
 Brychta, M. 18/1
 Büchler, T. 64/2
 Buchtová, I. 79/S
 Burgetová, D. 172/5
 Cetkovský, P. 25/1, 101/3, 79/S
 Coufal, O. 59/2, 98/3, 101/S
 Cwiertka, K. 51/S
 Čapov, I. 85/3
 Čermák, J. 25/1, 101/3, 79/S
 Černý, M. 85/3
 Češková, P. 157/5
 Čoupková, H. 85/3
 Daneš, J. 46/2, 49/2
 Dembická, D. 172/5
 Demlová, R. 185/6
 Dócezeová, A. 41/2
 Doležal, T. 106/3, 114/3
 Doležel, J. 85/3
 Dorociak, F. 98/3
 Dražan, L. 208/6
 Dunglelová, E. 208/6
 Dušek, L. 98/3, 5/S, 11/S, 39/S, 79/S, 97/S, 101/S
 Eckschlager, T. 131/4
 Fait, V. 98/3, 212/6
 Fakan, F. 84/S
 Filipenský, P. 61/2
 Finek, J. 142/4
 Foretová, L. 178/5
 Forýtková, L. 27/S
 Geryk, E. 17/1
 Goetz, P. 178/5
 Goncalves, F. 119/4
 Hajdúch, M. 51/S
 Hájek, R. 64/2, 73/S
 Haki, M. 106/3, 114/3
 Hanák, L. 64/2
 Hanuš, T. 196/6
 Hanzelková, Z. 91/3
 Helánová, Š. 157/5
 Heráček, J. 9/1
 Hladíková, M. 51/2, 131/4
 Hlavatá, Z. 57/2
 Hnilica, K. 18/1
 Horňák, M. 119/4
 Horová, H. 201/6
 Horváth, TA. 38/1
 Hradecký, J. 190/6
 Hubáček, J. 79/S
 Hušák, V. 13/1
 Hynková, L. 201/6
 Charvát, J. 136/4
 Chrenko, V. 59/2, 212/6
 Indrák, K. 39/S, 51/S, 68/S, 79/S
 Janiček, P. 85/3
 Jansová, E. 203/6
 Jarošová, M. 51/S, 79/S
 Jedlička, V. 85/3
 Jelínek, O. 85/3
 Jelínek, P. 151/5
 Jurga, L. 41/2
 Kačirková, P. 25/1
 Kalábová, R. 167/5
 Kalinová, M. 3/1
 Kamínek, M. 13/1

Kapičková, M. 123/4
 Kaplan, Z. 151/5
 Katolická, J. 61/2, 85/3
 Kepák, T. 162/5
 Kiss, I. 57/S, 64/S
 Klener, P. 29/1, 84/S
 Klimeš, D. 79/S, 97/S
 Klimeš, L. 49/2
 Kocák, I. 144/4
 Kocáková, I. 144/4
 Kodet, R. 3/1, 51/2, 68/2, 84/S
 Kolář, Z. 77/3
 Kolombo, I. 196/6
 Kolombová, J. 196/6
 Konečný, T. 208/6
 Koptíková, J. 11/S, 79/S
 Koranda, P. 13/1
 Korbička, J. 85/3
 Košťáková, Š. 201/6
 Kotná, I. 203/6
 Kouba, M. 25/1, 101/3
 Koukalová, H. 33/1, 123/4, 167/5, 61/S
 Koutecký, J. 51/2, 131/4
 Kovářová, L. 64/2
 Koza, V. 79/S
 Kozák, J. 106/3, 114/3
 Kozák, T. 79/S, 84/S
 Kozubek, M. 203/6
 Kozubek, S. 203/6
 Krejčí, E. 59/2
 Krejčí, M. 64/2, 73/S
 Krsková, L. 3/1
 Kršiak, M. 106/3, 114/3
 Kruntorád, P. 203/6
 Křen, L. 172/5
 Kubáčková, K. 68/2, 84/S
 Kubala, E. 68/2
 Kuncová, J. 9/1
 Kuře, J. 37/S
 Lejško, J. 106/3, 114/3
 Linke, Z. 68/2, 136/4
 Lukeš, M. 9/1
 Lysý, M. 84/S
 Maalouf, J. 25/1, 101/3
 Maaloufová, J. 79/S
 Macková, D. 144/4
 Málková, M. 131/4
 Malý, J. 79/S
 Mandáková, P. 3/1
 Mardiak, J. 57/2
 Marek, J. 131/4
 Mayer, J. 79/S
 Mego, M. 57/2
 Mihál, V. 92/S
 Michálek, J. 64/2
 Michalová, K. 79/S
 Moravcová, I. 131/4
 Mrhalová, M. 3/1
 Mudrý, P. 172/5
 Müller, P. 91/3, 157/5
 Mužík, J. 11/S, 79/S
 Mysliveček, M. 13/1
 Nekula, J. 13/1
 Nenutil, R. 91/3, 143/4, 157/5
 Neumannová, R. 167/5
 Novák, J. 33/1, 61/S
 Novotný, J. 68/2, 139/4
 Obertová, J. 57/2
 Odrážka, K. 74/2
 Ondrák, M. 151/5
 Ondruš, D. 119/4
 Papajík, T. 51/S, 68/S, 84/S
 Pavlík, T. 203/6
 Pavliš, P. 79/S, 97/S
 Pavlová, Š. 91/3
 Penka, M. 64/2

Peštál, A. 85/3
 Petera, J. 74/2
 Petraková, K. 144/4
 Petrová, M. 84/S
 Petruželka, L. 139/4
 Piešťanská, G. 57/2
 Pipková, R. 68/2
 Písačka, M. 25/1
 Pohreich, D. 25/1, 101/3
 Postránecká, V. 85/3
 Potěšil, D. 190/6
 Pour, L. 73/S
 Prausová, J. 68/2, 136/4
 Procházka, J. 172/5
 Průša, R. 131/4, 190/6
 Příbylová, O. 51/2
 Pytlík, R. 25/1
 Radina, M. 185/6
 Radvanská, J. 51/2, 131/4
 Radvanský, J. 51/2, 131/4
 Rašovská, L. 59/2
 Rejthar, A. 91/3
 Rovný, A. 61/2
 Salaj, P. 101/3
 Sedláčková, Š. 57/S, 64/S
 Sičová, K. 79/S
 Skála, B. 106/3, 114/3
 Skovajsová, M. 46/2, 49/2
 Skříčková, J. 57/S, 64/S
 Slabý, K. 51/2, 131/4
 Sláma, O. 106/3, 114/3
 Smejkalová, J. 64/2
 Souček, M. 136/4
 Soukup, P. 25/1, 101/3
 Soumarová, R. 127/4
 Spurný, V. 61/2, 85/3
 Staniček, J. 201/6
 Suchý, M. 31/S
 Suškevič, I. 85/3
 Svoboda, M. 59/2
 Svoboda, Z. 203/6
 Svobodník, A. 49/2, 98/3, 97/S, 101/S
 Syčová-Milá, Z. 57/2
 Sztokowski, T. 79/S
 Šafářová, M. 131/4
 Šachlová, M. 123/4
 Ščudla, V. 13/1
 Šefr, R. 98/3
 Ševčík, P. 106/3, 114/3
 Šiffnerová, H. 84/S
 Šimíčková, M. 59/2
 Široký, P., 33/1
 Šmardová, J. 91/3
 Šmíd, R. 97/S, 101/S
 Soačková, K. 51/S
 Štěpáníková, O. 123/4
 Štěrba, J. 172/5, 185/6, 88/S
 Sulc, J. 131/4
 Švihálek, J. 101/S
 Tomášek, J. 57/S, 64/S
 Trněný, M. 84/S
 Trojanec, R. 51/S
 Tůma, P. 31/S
 Uhrin, I. 57/2
 Urban, M. 9/1
 Vacek, J. 190/6
 Vagundová, M. 59/2
 Valík, D. 157/5, 185/6
 Vaňová, I. 84/S
 Ventruba, J. 172/5
 Veselská, R. 37/S
 Vlček, J. 85/3, 45/S
 Vlček, P. 85/3, 131/4
 Vlk, D. 27/S
 Voglová, J. 79/S
 Vojtěšek, B. 91/3, 157/5, 190/6
 Volková, Z. 101/3

Vorlíček, J. 64/2, 106/3, 114/3, 180/5, 11/S, 39/S, 57/S, 64/S, 79/S
 Vyřasová, M. 13/1
 Vyzula, R. 157/5, 5/S, 11/S, 39/S, 57/S, 61/S, 64/S
 Wechsler, J. 85/3
 Weinreb, M. 131/4
 Zachoval, R. 9/1
 Záleský, M. 9/1
 Zapletal, O. 172/5
 Zelená, J. 190/6
 Zitterbart, K. 172/5
 Žaloudík, J. 37/1, 59/2, 72/2, 98/3, 143/4, 157/5, 203/6, 5/S, 11/S, 39/S, 57/S, 64/S
 Žikešová, E. 79/S

VĚCNÝ REJSTŘÍK

ACSO 144/4
 Akutní lymfoblastická leukémie 172/5
 Akutní leukémie 79/S, 92/S
 Akutní nádorová bolest 106/3, 114/3
 Anémie 142/4
 Aspergillový absces 172/5
 Autoimunní hemolytická anémie 25/1
 Biomarker 157/5
 Bioterapie 37/1
 Bisfosfonáty 29/2, 180/5, 196/6
 CDNA mikročipy 203/6
 Celotělová scintigrafie 13/1
 Ciphergen 157/5
 Cytokiny 29/1
 Dětské nádory 162/5
 Dětské nádory 88/S, 92/S
 Diagnostika 49/S
 Difúzní velkobuněčný lymfom 25/1
 Doxorubicin 68/2
 DRG 31/S
 Ekonomika 33/1
 Erythropoetin 142/4
 Familární malignity 178/5
 Farmakoeconomika 45/S, 61/S
 Farmakoterapie 114/3
 FASAY 91/3
 Foláty 185/6
 Genová terapie 9/1
 Helicobacter pylori 123/4
 Hematologická toxicita 101/3
 Hematologické malignity 51/S, 68/S, 73/S, 79/S, 84/S
 Hematologický paraneoplastický syndrom 101/3
 Hodgkinova choroba 51/2, 131/4
 Hodnocení zdravotnických technologií 51/S, 11/S, 27/S, 97/S, 101/S
 Hyperkalcémie 29/1
 Chemoterapie 68/2, 136/4, 167/5, 185/6
 Chirurgická léčba 85/3, 96/3
 Chronická nádorová bolest 106/3, 114/3
 Ifosamid 68/2
 Imunohistochemie 91/3
 Imunoterapie 9/1, 37/1, 64/2
 Intravenózní portakater 136/4

ZÁPIS Z JEDNÁNÍ VÝBORU ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI KONANÉHO DNE 27. 9. 2004 V BRNĚ

Přítomni: Vorlíček, Abrahámová, Aschermannová, Cwiertka, Eckschlager, Finek, Jelínková, Příbylová, Stáhalová, Vyzula, Žaloudík.

Omluveni: Petera, Rob, Petruželka, Stankušová, Konopásek.

1. Výbor ČOS projednal další postup popularizace Národního onkologického programu, k němuž se písemně přihlásilo již několik desítek organizací a institucí. Bude uspořádána tisková konference po příští výborové schůzi 23. 11. 2004 v Praze.
2. Výbor se seznámil s články v Lidových novinách a Hospodářských novinách uveřejněných dne 27. 10. 04, které zcela zavádějící formou informují veřejnost o úmrtnosti na zhoubné nádory dýchací soustavy a vyvozují kvalitu zdravotní péče v jednotlivých regionech či dokonce nemocnicích. Proti této nekvalifikované a zavádějící formě používání onkologických údajů výbor ostře protestuje a distancuje se zcela od čísel veřejnosti sdělovaných, neboť jde o údaje nesprávné.
3. Předseda ČOS prof. Vorlíček spolu s místopředsedkyní doc. Abrahámovou, navrženou výborem za předsedkyni Rady NOR požádají o další harmonizační schůzku ředitelku ÚZIS ve věci dalšího vedení a chodu NOR. Půjde zejména o tyto otázky:
 1. vedení NOR
 2. chod registru v nových podmínkách vyhlášky s údaji bez adres
 3. stav přípravy a implementace elektronického HZN
 4. vztah hlásitele HZN k případu - hlásit by mělo pracoviště odpovídající za výsledek léčebného postupu
 5. nakládání s údaji o hlásících zdravotnických zařízeních
 6. financování NOR a odstranění zpoždění plateb
4. Metodika účasti praktických lékařů na plnění NOP navržená výborem ČOS bude projednána s výbory obou relevantních společností všeobecných praktiků, včetně způsobu distribuce.
5. Příprava jednání se Společností patologů - pro jednání o obligátním dvojím čtením histologických preparátů bude ČOS navrhnout tyto onkologické diagnózy: lymfomy, sarkomy kostí i měkkých tkání, germinální nádory, vybrané ovariální nádory, karcinoidy, moly a choriokarcinom, malignity v těhotenství, nádory nejasného origa. Projedná také konzultace z titulu nízké frekvence onkologické diagnostiky na menších patologických pracovištích.
6. Výbor ČOS vzal na vědomí dopis firmy Pliva-Lachema o zrušení registrace preparátu oxaliplatin Pliva-Lachema.
7. O upřesnění podmínek použití prostředků z Běhu T. Foxe bude jednat s organizátory BTF ČR předseda prof. Vorlíček v Praze 19. 11. 2004.
8. Výbor ČOS vzal bez připomínek na vědomí dopis Hepatologické společnosti o standardech léčby hepatocelulárního karcinomu u dospělých nemocných.
9. Výbor se shodl, že umístování aktuálních informací na nové webové stránky ČOS www.linkos.cz budou provádět podle potřeby všichni členové výboru a předsedové sekcí Duda, Eckschlager, Hajdúch a předseda pneumoonkologů (bude zvolen) přímým kontaktem na webmastera RNDr. Petru Novákovou - petra.novakova@roche.com. Všichni ostatní členové ČOS mohou své příspěvky umísťovat na www.linkos.cz po konzultaci s předsedou ČOS.
10. Výbor schválil přijetí nových členů ČOS: Lísová (Olomouc), Turyn (Praha), Zíková (Ostrava), Salmáš (Břeclav), Mach (Frant.Lázně), Lovas (Zvolen), Soumarová (Nový Jičín), Kubátová (Praha), Řiháčková (Brno).
11. Prim. Cwiertka referoval o úspěšném jednání s předsedkyní Svazu žen v Olomouci paní Součkovou, olomoucká organizace žen stojí o úzkou spolupráci při naplňování NOP.
12. Prim. Dr. Ashermannová referovala o dohodovacích řízeních s VZP, projednávat se budou pouze položky na jednáních, v nichž bude pojišťovna vyzývatelem a které projdou příslušnou odbornou komisí. Onkologická žádost ohledně výkonu aplikace cytostatika do portu byla již projednána pracovní skupinou a má být zařazena do příštího dohodovacího řízení.
13. Předseda ČOS požádá přednostu katedry IVPZ prof. Klenera o návrh požadavků a pravidel pro specializační vzdělávání v oboru klinická onkologie v rámci implementace Zák. 95/2004.
15. Prim. Stáhalová navrhla, aby se výbor ČOS zasadil o podporu kurzů komunikace zdravotníků s nemocnými zaměřené na onkologickou péči. Výbor vyhlásí pro 15 členů ČOS granty financující absolvování kurzů tohoto typu.
16. Výbor ČOS schválil rámcový návrh MOÚ témat programu XXIX. Brněnských onkologických dnů, který se uskuteční synchronně ve třech sálech hotelu Voroněž ve dnech 26.-28. 5. 2005:

Čtvrtek 26. 5.
Prevence nádorových onemocnění
Pokroky v biologii nádorů
Meze onkochirurgické radikality
Sekce sester a laborantů

Pátek 27. 5.
Chyby v diagnostice a léčbě nádorů
Informatika a telemedicíny v onkologii
Minimalizace vedlejších účinků radioterapie
Hormonálně aktivní nádory
Sekce sester a laborantů

Sobota 28. 5.
Novinky v klinické onkologii
Zhoubné nádory ledvin
Praktický staging nádorů z pohledu radiologa (kurz IVPZ)
17. Stav účtu ČOS činí k 27. 10. 2004 323 tis. Kč. Inventarizací majetku ČOS byl pověřen prim. Finek.

Další jednání výboru se koná 23. 11. 2004 v 9 hod. v Praze.