

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 SPOLEČNOSTI

### 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  
HÁJEK ROMAN  
KOCÁK IVO  
VALÍK DALIBOR  
VORLÍČEK JIŘÍ  
ŽALOUĐÍK JAN

#### REDAKČNÍ RADA:

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

<b>Přehled</b>	
Straková N., Hermann J., Kolář Z. PPARS & nádory .....	41
<b>Původní práce</b>	
Mysliveček M., Bačovský J., Kamínek M., Koranda P., Vytřasová M., Hušák V., Ščudla V., Nekula J. Prediktivní cena <sup>99m</sup> Tc-mibi scintigrafie u nemocných s mnohočetným myelomem a potenciální úloha metody při jejich sledování po terapii .....	46
Hříb R., Hakl M. Výsledky sledování FEN-PAIN-1 u onkologické bolesti, jejich analýza a komentář .....	51
Očadlíková D., Kovářová L., Penka M., Žaloudík J., Büchler T., Hájek R., Michálek J. Identifikace nádorově-specifických T lymfocytů na základě produkce interferonu gama u mnohočetného myelomu .....	55
Smejkalová J., Vranová V., Kovářová L., Kuglík P., Filková H., Heinigová J., Adam Z., Krejčí M., Büchler T., Kalábová V., Oltová A., Vorlíček J., Penka M., Hájek R. Imunomagnetická separace buněk z kostní dřeně u pacientů s mnohočetným myelomem – stanovení delece 13q14 použitím interfázni fluorescenční in situ hybridizace .....	59
Hrstka R., Müller P., Vojtěšek B., Nenutil R., Štěrba J., Valík D. Analýza změn exprese p53-signálních genů v buňkách akutní lymfoblastické leukémie v závislosti na působení methotrexátu .....	64
Kollárová H., Čížek L., Koutná J., Beška F., Lorenc J., Janout V. Kouření a riziko vzniku karcinomu plic podle histologických typů .....	69
<b>Sdělení</b>	
Žaloudík J. Vino a rakovina prostaty .....	72
<b>Zprávy</b>	
Adámková L., Boudný V. Zpráva z konference „29th ESMO Congress“ pořádané ve Vídni ve dnech 29.10.-2.11.2004 .....	74
<b>Informace</b>	
– Joukalová Z., Puchriková H.: Onkologické informační centrum MOU .....	50
– Setkání mladých onkologů .....	63
– Analytická cytologie III .....	68
– knihy .....	58, 71, 73
<b>Aktualita</b> .....	75
<b>Onkologické společnosti</b> .....	76

---

**CONTENTS**

<b>Reviews</b>	
Straková N., Hermann J., Kolář Z. PPARS & cancer .....	41
<b>Original publications</b>	
Mysliveček M., Bačovský J., Kamínek M., Koranda P., Vytřasová M., Hušák V., Ščudla V., Nekula J. Technetium-99m-mibi scintigraphy in patients with multiple myeloma: role of the examination in the follow-up and its prognostic value .....	46
Hříb R., Hakl M. Results of FEN-PAIN-1 observation in oncological pain: analysis and commentary .....	51
Očadlíková D., Kovářová L., Penka M., Žaloudík J., Büchler T., Hájek R., Michálek J. Identification of tumor-specific T cells based on interferon gamma production in multiple myeloma .....	55
Smejkalová J., Vranová V., Kovářová L., Kuglík P., Filková H., Heinigová J., Adam Z., Krejčí M., Büchler T., Kalábová V., Oltová A., Vorlíček J., Penka M., Hájek R. Immunomagnetic separation of bone marrow cells in multiple myeloma patients – detection of 13q14 deletion using interphase fluorescence in situ hybridization .....	59
Hrstka R., Müller P., Vojtěšek B., Nenutil R., Štěrba J., Valík D. Analysis of changes in expression of p53 signalling genes in acute lymphoblastic leukemia cells after methotrexate treatment .....	64
Kollárová H., Čížek L., Koutná J., Beška F., Lorenc J., Janout V. Smoking and lung cancer risk by histologic type .....	69
<b>Communication</b>	
Žaloudík J. Wine and prostate cancer .....	72
<b>Report</b>	
Adámková L., Boudný V. Report from the „29th ESMO Congress“, Vienna, October 29 - November 2, 2004 .....	74
<b>Notification</b>	
– Joukalová Z., Puchriková H.: Oncological Information Center at Masaryk Memorial Cancer Institute .....	50
– Young Oncologists Meeting .....	63
– Analytical cytology .....	68
– Book .....	58, 71, 73
<b>Actual</b> .....	75
<b>Oncological association</b> .....	76

## PPARs & NÁDORY

## PPARs & CANCER

STRAKOVÁ N., EHRMANN J., KOLÁŘ Z.

LABORATOŘ MOLEKULÁRNÍ PATOLOGIE, ÚSTAV PATOLOGIE LF UP OLOMOUČ

**Souhrn:** PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) jsou jaderné receptory, které patří mezi transkripční faktory a podílejí se na přenosu signálů z cytoplazmy do jádra. PPARs existující v několika isoformách mají charakteristickou strukturu a jsou známy jejich přirozené a syntetické ligandy. PPARs jsou zapojeny do patogeneze nejzávažnějších onemocnění, jako jsou diabetes, ateroskleróza a nádory. V současné době se uvažuje o léčbě některých nádorů prostřednictvím ligandů PPAR, které mohou způsobit např. inhibici proliferace či indukci apoptózy nádorových buněk. Článek podává přehled o nejnovějších poznatcích z oblasti studia role PPARs v karcinogenezi a nastiňuje možné terapeutické implikace.

**Klíčová slova:** PPARs, jaderné receptory, ligandy, karcinogeneze, léčba

**Summary:** PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) are nuclear receptors belonging to transcription factors that participate in the transmission of signals from cytoplasm to nucleus. They have several isoforms with characteristic structure and some of their natural and synthetic ligands have been identified. PPARs contribute to the pathogenesis of serious illnesses such as diabetes, atherosclerosis and tumors. Current thinking centers on the use of PPAR ligand in the treatment of some tumors through modifying the inhibition of proliferation or induction of apoptosis in tumor cells. This review focuses on carcinogenesis and it describes their potential therapeutic implications.

**Key words:** PPARs, nuclear receptors, ligands, carcinogenesis, treatment

### JADERNÉ HORMONÁLNÍ RECEPTORY

Jaderné hormonální receptory jsou ligandem aktivované transkripční faktory, které se podílejí na přenosu signálů z cytoplazmy do jádra. Tyto receptory hrají významnou roli během buněčné signalizace. Lidský genom obsahuje 47 poznaných jaderných receptorů (Yong et al. 2003). Rodina jaderných receptorů zahrnuje receptory pro klasické steroidní hormony, jako jsou estrogeny, androgeny, glukokortikoidy, T3/T4 thyroïdní hormony, retinoidy a vitamin D3. Další skupinu představují receptory aktivované meziprodukty lipidového metabolismu, jako jsou například mastné kyseliny, leukotrieny, prostaglandiny, deriváty cholesterolu, žlučové kyseliny nebo deriváty benzoátu (Privalsky et al. 2004). Receptory pro tyto ligandy jsou označovány jako "adoptované orphan" receptory, protože jejich přirozené nebo syntetické ligandy již byly objeveny (Yong et al. 2003). Příkladem jsou PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), LXRs (Liver X Receptors) a FXRs (Farnesoid X Receptors). Třetí skupinou jaderných receptorů jsou "orphan" receptory (Privalsky et al. 2004; Escriva et al. 2000). Přirozené ligandy těchto receptorů zatím nebyly identifikovány. Pravděpodobně se jedná o produkty intracelulárního metabolismu, které se běžně vyskytují v buňkách (Aranda et al. 2001). "Orphan" receptory byly objeveny zhruba před 10 lety a zahájily éru tzv. reverzní endokrinologie, při níž byly vyhledány nové hormony a jiné účinné látky, jako například 9-cis retinová kyselina, která je ligandem pro některé členy rodiny RXR (Retinoid X Receptor) (Kliwer et al. 1999).

### STRUKTURA JADERNÝCH RECEPTORŮ

Rodina steroidních a retinoidních receptorů se vyznačuje vysokou homologií. Struktura všech jaderných receptorů se skládá z 6 domén: AF-1 (A/B), doména vázící DNA (DBD), oblast čepu, doména vázající ligand (LBD), AF-2. Vývojově nejsta-

bilnější je centrální DBD, která se skládá ze dvou zinkových prstů. Tyto zinkové prsty jsou typickým znakem jaderných receptorů a nejsou přítomny u ostatních proteinů vážících se k DNA (Mangelsdorf et al. 1995). V každé DBD jaderných receptorů lze nalézt devět cysteinů. Spojovací oblasti mezi DBD a C-koncovou doménou receptoru vázající ligand (LBD) je oblast čepu (doména D) (Escriva et al. 2000). Tato oblast čepu je významná pro vazbu kofaktorů a pro udržení konformace receptoru. C-koncová vývojově mírně nestabilní doména (LBD) umožňuje specifickou aktivaci receptoru v přítomnosti ligandu. LBD působí jako molekulární prepínač receptoru do transkripčně aktivního stavu (Mangelsdorf et al. 1995).

### PPAR (PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTOR)

PPAR jsou jaderné receptory, které jsou aktivované proliferátory peroxizomů (Issemann a Green 1990). Peroxizomy jsou malé kulaté buněčné organely lokalizované v blízkosti endoplazmatického retikula, které se účastní syntézy glykolipidů, cholesterolu a žlučových kyselin. Krysí a myší jaterní peroxizomy jsou stimulovány skupinou látek, které se souhrnně označují jako proliferátory peroxizomů (Cimini et al. 2000; Heuvel et al. 1999; Chattopadhyay et al. 2000).

Proliferátory peroxizomů (PP) jsou látky, které nejen zvyšují počet a velikost jaterních peroxizomů, ale také indukují enzymy metabolismu mastných kyselin, jako jsou oxidáza acetylkoenzymu A a cytochrom P450-A1. Pokusy na kryších ukázaly, že PP jsou hepatokarcinogenní látky. Ashby se spolupracovníky (1994) našli významný vztah mezi opakovanou aplikací široké škály asi 70 PP a vznikem nádorů jater u potkanů. PP ovlivňují proliferaci buněk, a tím podporují růst nádoru. PP jsou označovány za negenotoxické karcinogeny neboť tyto látky nevedou k přímému poškození DNA (Reddy et al. 1983). Jedná se o strukturálně různorodou skupinu látek,

které ve své struktuře obsahují dlouhý hydrofobní řetězec a zbytek karboxylové kyseliny nebo jejího esteru. PP jsou látky příbuzné mastným kyselinám (Heuvel et al. 1999). Mezi proliferátory peroxizomů patří hypolipidemika, deriváty ftalátů, herbicidy, plasticidy, některé steroidy, apod. (Rokos et al. 1997).

Receptory, které jsou aktivované právě proliferátory peroxizomů byly označeny jako PPAR (Issemann a Green 1990). PPAR hrají roli v mnoha fyziologických procesech, jako jsou metabolismus lipidů a lipoproteinů, rovnováha glukózy, diferenciace buněk atd. (Blanquart et al. 2003). PPAR $\alpha$  reguluje katabolismus lipidů a PPAR $\gamma$  jejich anabolismus. Aktivace PPAR $\alpha$  proliferátory peroxizomů vede k vývoji nádorů jater u myši a potkanů, ačkoliv u lidí tento proces nebyl pozorován, což je zřejmě dáno jednak nižší hladinou mRNA PPAR v játrech u lidí, než jak je tomu u myši a potkanů a nebo delecí exonu 6 ve frakci lidské mRNA (Collett et al. 2000).

PPAR je jaderným receptorem, který je schopen přenášet signály odvozené od lipofilních faktorů (například hormony, vitaminy, mastné kyseliny) do genomu. Stejně jako ostatní jaderné receptory, také PPAR jsou transkripční faktory aktivované ligandy. PPAR tvoří dimer s RXR a vzniklý komplex PPAR/RXR se váže k „hormon responsabilnímu elementu“ PPRE (Peroxisome Proliferator Response Element). PPRE se nachází například v promotoru genu pro lipoproteinovou lipázu, proto některé ligandy (fibráty, thiazolidindiony) regulují hladinu lipidů právě prostřednictvím LPL (Chinetti et al. 1998). Dále se PPRE nachází v apoE/apoCI, čímž ligandy PPAR regulují expresi apolipoproteinu E. Tím lze vysvětlit antiaterosklerotický efekt TZD (Galetto et al. 2001). Obecně lze říci, že cílovými geny, které jsou regulovány pomocí PPAR, jsou růstové regulátory, geny účastnící se transportu a hromadění lipidů, modulace imunitního systému, zrání buněk, apod. (Bull et al. 2003).

PPAR se vyskytuje ve 3 izoformách  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . Dále pak rozoznáváme subtypy PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3, které se liší svým 5' koncem a jsou kontrolovány svým vlastním promotorem. Isoformy PPAR jsou kódovány různými geny a vyznačují se rozlišnou tkáňovou specificitou. Zvýšená exprese PPAR byla nalezena v mnoha nádorových buněčných liniích, a to v mozkových, plicních a prostatických buněčných liniích, dále pak v liniích odvozených od nádorů mléčné žlázy, žaludku a tlustého střeva (Chattopadhyay et al. 2000; Collet et al. 2000; Mueller et al. 1998; Takahashi et al. 1999; Blanquart et al. 2003).

### PŘIROZENÉ LIGANDY PPAR $\alpha$

Agonisté PPAR jsou faktory zvyšující transkripční aktivitu receptorů. Mezi přirozené ligandy PPAR $\alpha$  patří, mimo výše zmíněných proliferátorů peroxizomů, také esenciální mastné kyseliny (kyselina palmitová, stearová, olejová, arachidonová, linoleová, linolová apod.). Dále pak některé eikosanoidy, jako například 5,8,11,14-eikosatetraenová kyselina (ETYA), 8(S)-hydroxyeikosatetraenová kyselina (8(S)-HETE), prostaglandin A<sub>2</sub> (PGA<sub>2</sub>), leukotrien B<sub>4</sub>, atd. (Ehrmann et al. 2002).

### PŘIROZENÉ LIGANDY PPAR $\gamma$ A PPAR $\delta$

Přirozenými ligandy PPAR $\gamma$  jsou polyneenasycené mastné kyseliny a jejich deriváty jako je 13-hydroxyoktadecadenová kyselina (13-HODE), 15-hydroxyeikosatetraenová kyselina (15-HETE), dále tetradecylthiooctová kyselina (TTA), 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) nebo prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) (Ehrmann et al. 2002). Mezi přírodní ligandy PPAR $\delta$  patří prostacykliny (Chen et al. 2003).

### SYNTECKÉ LIGANDY PPAR $\alpha$

Podobně jako přirozené ligandy, tak i syntetické ligandy aktivují receptory PPAR, to znamená, že převádějí tyto receptory do transkripčně aktivních forem. Nejstudovanější skupinou

ligandů PPAR $\alpha$  jsou fibráty (Willson a Wahli 1997). Dále pak existuje celá řada nových ligandů PPAR $\alpha$ , jako například kyselina pseudolarová (PLAB) (Jaradat et al. 2002), WY 14643 (Heuvel et al. 1999), GW9578 (Miyahara et al. 2000).

### SYNTECKÉ LIGANDY PPAR $\gamma$

Syntetickými ligandy PPAR $\gamma$  jsou například thiazolidindiony (TZD). Jedná se látky, které snižují koncentraci glukózy v krvi, snižují glykosylovaný podíl hemoglobinu a hladinu inzulínu v séru. Tyto účinky zvyšují citlivost k inzulínu. Samotná sekrece inzulínu však jimi není ovlivněna. TZD dále snižují hladinu glukózy v plazmě a snižují krevní tlak. Pro svůj antidiabetický účinek užívalo TZD v roce 2000 víc jak milion pacientů s diabetem II. typu (Houseknecht et al. 2002; Schoonjans a Auwerx 2000). Mezi TZD se řadí ciglitazon, pioglitazon, rosiglitazon, troglitazon, englitazon, darglitazon, isaglitazon (Etgen a Mantlo 2003; Takahashi et al. 1999; Parker 2002). TZD významně ovlivňují metabolismus lipidů. Tuková tkáň je hlavním místem účinku TZD. Tyto látky zvyšují adipogenezi, a tím snižují hladinu volných mastných kyselin v krvi. Jejich pokles blokuje transport tuků do svalů, a tím se zlepšuje citlivost svalových buněk k inzulínu (Schoonjans a Auwerx 2000).

Stejně jak je tomu u PPAR $\alpha$ , tak i v případě PPAR $\gamma$  existuje mnoho dalších nových ligandů, jako například oxidované alkoil-fosfolipidy (Azelaoyl-PAF nebo PAz-PC), GW1929, LY-171833, GI262570 (Gampe et al. 2000), BRL49653 (Miyahara et al. 2000), GW00072, ibuprofen, indometacin. PPAR $\gamma$  má velkou ligand vázící doménu, což vysvětluje široké spektrum ligandů tohoto receptoru (Ricote et al. 1999).

### DUÁLNI AGONISTÉ

Duální agonisté jsou ligandy, které současně aktivují více izoform PPAR. Duální agonisté PPAR $\alpha$ / $\gamma$  nabízejí zajímavé terapeutické využití. Tyto látky mohou jak snižovat hladinu glukózy, tak omezovat vznik a vývoj aterosklerózy. Duálním agonistou, který aktivuje jak PPAR $\alpha$ , tak i PPAR $\gamma$ , je hypolipidemikum WY 14643 (Heuvel et al. 1999; Miyahara et al. 2000).

### ANTAGONISTÉ PPAR

Látky, které blokují účinek agonistů a následně receptorů se označují jako antagonisté. Syntetickými antagonisty PPAR $\alpha$  jsou S.A.0204, GW6471, MK 886 a RU 486 (Margareto et al. 2002). Mezi antagonisty PPAR $\gamma$  patří BADGE (Biphenol A Diglycidil Eter), PD 068235, SR-202, diclofenac, T00T0907, nimesulid a GW9662 (2-chloro-5-nitrobenzimid). Tyto látky blokují indukci transkripční aktivity TZD inhibiční vazby koaktivátorů k receptoru, čímž antagonisté blokují adipogenezi. Antagonisté nám mohou usnadnit vysvětlení významu PPAR u metabolických onemocnění (Rieusset et al. 2002).

### AKTIVACE A DEGRADACE PPAR

Mechanismy, kterými dochází k regulaci transkripční aktivity PPAR jsou fosforylace a ubikvitinace PPAR (Blanquart et al. 2003). Za fosforylaci PPAR jsou zodpovědné MAP (Mitogen Activated Protein kinase) kinázy. Kato se spolupracovníky (1995) prokázali, že MAP kinázy fosforylují ER. Obecně fosforylace receptoru koreluje se zvýšením transkripční aktivity receptoru. Stejně jak je tomu u ER, PR a RXR, tak i u PPAR je fosforylace klíčovým faktorem regulace jejich transkripční aktivity. U PPAR $\gamma$  je tomu opačně. Obecně lze konstatovat, že PPAR $\gamma$  je fosfoprotein, jehož fosforylace vede k poklesu transkripční aktivity (Blanquart et al. 2003). Aktivita jaderných receptorů je dále regulována ubikvitin-proteazomovým degračním systémem. K degradaci proteinů dochází po vazbě ubikvitinu k lyzinovým zbytkům. Takto modifikované proteiny jsou následně degradovány v proteazomech. K ubikvitinaci dochází po změně polohy AF-2 helixu v PPAR $\gamma$ , ke které

dochází po vazbě ligandu a korepresoru, k receptoru (Blanc et al. 2003).

## VÝZNAM PPAR VE FYZIOLOGII A PATOLOGII

Všechny skupiny jaderných receptorů se podílejí na přenosu signálů z cytoplazmy do jádra, čímž zasahují do regulace transkripce klíčových genů (Houseknecht et al. 2002). Existuje řada důkazů, že skupina jaderných receptorů PPAR je zapojena do patogeneze nejzávažnějších onemocnění, jako jsou diabetes, ateroskleróza a nádory (Kersten et al. 2000).

## HEPATOKARCINOGENEZE HLODAVCŮ

Prokázalo se, že PP u hlodavců způsobují oxidativní stres a zvýšenou proliferaci doprovázenou poklesem apoptózy, čímž přispívají k vývoji hepatocelulárního adenomu a karcinomu (Cattley a Popp 1989). Marsman se spolupracovníky (1988) u potkanů prokázali, že vznik karcinomu jater účinkem PP je dán zvýšenou syntézou DNA.

Epidemiologické studie lidí, kteří dlouhodobě užívali PP (například fibráty) neprokázaly zvýšené riziko vzniku nádorů jater. Výjimkou je troglitazon, kde hepatokarcinogenní účinek byl prokázán (Ashby et al. 1994). Poškození jater je pravděpodobně výsledkem hypersenzitivní reakce k troglitazonu. U ostatních TZD nebyla jaterní toxicita prokázána, ale doporučuje se sledování jaterních enzymů před zahájením a v průběhu aplikace léků.

Hepatokarcinogeneze u hlodavců může souviset s tím, že některá hypolipidemika (klofibrát, ciprofibrát) zvyšují transkripci proto-onkogenů c-myc, c-Ha-ras (Cherkaoui Malki et al. 1990). Dalším možným vysvětlením je lokalizace katalázy, enzymu který metabolizuje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Kataláza se u hlodavců vyskytuje v peroxizomech, zatímco u lidí se nachází většinou v cytoplasmě, což u lidí snižuje oxidační stres. Dále hlodavci mají jednak vyšší hladinu mRNA PPAR a navíc se tento receptor u hlodavců váže k DNA s vyšší afinitou (Lake 1995).

Výsledky studií na lidských buněčných liniích odvozených od nádoru jater prokázaly, že 15d-PGJ<sub>2</sub> (15-deoxy-prostaglandin J<sub>2</sub>) a troglitazon snižují syntézu DNA, zastavují buněčný cyklus ve fázi G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a aktivují apoptotickou signální dráhu (Li et al. 2003).

## PPAR A ANGIOGENEZE

PPAR $\gamma$  je exprimován ve vysoké hladině v proliferujícím nádorovém endotelu. Systematické podávání nižších dávek rosiglitazonu snižuje angiogenezi. Rosiglitazon inhibuje angiogenezi jak přímo inhibicí růstu endoteliálních buněk, tak nepřímou, a to poklesem růstových faktorů VEGR (Vascular Endothelial Cell Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor). Navíc rosiglitazon brání invazivnímu růstu nádorových buněk a jejich pronikání do cév, stejně jako inhibuje aktivitu MMP (Matrix Metalloproteinase) (Panigrahy et al. 2002; Tsubouchi et al. 2000). PPAR také antagonizují účinek angiotenzinu II (Schiffirin et al. 2003).

## PPAR A NÁDORY

Ukázalo se, že PPAR jsou také zapojeny do vývoje nádorů (Heuvel 1999). Proto se v současné době uvažuje o léčbě nádorů prostřednictvím ligandů PPAR, které inhibují proliferaci a indukují apoptózu (Elstner et al. 2002). Bylo také zjištěno, že ke vzniku nádorů přispívají somatické mutace PPAR. Jednou z mutací PPAR $\gamma$ , která ovlivňuje diferenciaci epiteliálních buněk, je mutace LBD v kodonu 422 (Gupta et al. 2003). Tyto výsledky svědčí o tom, že PPAR $\gamma$  se chová jako nádorový supresor a jeho ligandy by proto mohly být potenciálně využity v protinádorové terapii. Zjistilo se také, že primární i metastatická ložiska nádorů mléčné žlázy exprimují receptor PPAR $\gamma$ . TZD v těchto buňkách způsobují výraznou akumulaci lipidů, změny exprese genů související s vyšší diferenciací, nižší malignitou a poklesem rychlosti růstu (Mueller et al. 1998). Clay se spolupracovníky (1999) zjistili, že 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibuje

proliferaci, blokuje vstup buněk do fáze S a vede u buněčných liniích odvozených od nádorů mléčné žlázy k indukci apoptózy. Naopak aktivace PPAR $\alpha$  v lidských buněčných liniích odvozených od nádorů mléčné žlázy vede ke stimulaci proliferace buněk (Suchanek et al. 2002). Mehta se spolupracovníky (2000) popsali inhibici proliferace buněčných linií odvozených od nádorů mléčné žlázy po aplikaci troglitazonu spolu s ligandy RXR nebo RAR. Synergický efekt nebyl závislý na expresi p53, Bag-1, Bcl-2 a ER $\alpha$ . Neefektivnější kombinací bylo použití troglitazonu spolu s 9-cis-retinovou kyselinou, a to obzvláště u buněčných linií, které exprimují p27<sup>Kip1</sup> a BRCA1. Apoptóza byla pozorována pouze u linií, které mají vysokou hladinu Bcl-2 (Elstner et al. 2002). Pioglitazon, rosiglitazon a 15d-PGJ<sub>2</sub> snižují invazivitu nádorových buněk mléčné žlázy (Liu et al. 2003). Sarraf se spolupracovníky (1999) prokázali spojení mezi nádory tlustého střeva a mutací PPAR $\gamma$ , která vede ke ztrátě funkce receptoru. Ligandy PPAR $\gamma$  (rosiglitazon, troglitazon a 15d-PGJ<sub>2</sub>) snižují růst nádorových buněk tlustého střeva. U myši s nemutovaným genem pro APC (Adenomatosis Polyposis Coli) funguje PPAR jako nádorový supresor (Bull et al. 2003). Campbell se spolupracovníky (2003) zjistili, že alfa a gama izoforma vitamínu E ( $\alpha$ -tokoferol,  $\gamma$ -tokoferol) zvyšují v lidských buněčných liniích odvozených od nádoru tlustého střeva expresi mRNA i proteinu PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  indukují apoptózu nádorových buněk střeva, snižuje expresi cyklooxygenázy 2 (COX 2), která podporuje vznik nádorů trávicího traktu (Yang a Frucht 2001). Ligandy PPAR $\gamma$  (15d-PGJ<sub>2</sub>, rosiglitazon) inhibují růst karcinomu pankreatu *in vivo* a *in vitro*. K prohloubení účinku dochází při současné aplikaci ligandu PPAR $\gamma$  a RXR $\alpha$  (Dong et al. 2003). Han se spolupracovníky (2003) prokázali, že 15d-PGJ<sub>2</sub> a troglitazon aktivaci dráhy p53 inhibují růst buněk odvozených od nádoru žlučových cest, tím že aktivují dráhu p53. Ligandy PPAR $\gamma$  také indukují apoptózu u transformovaných T-buněk (Harris a Phipps 2002). Hase se spolupracovníky (2002) zjistili, že ligandy PPAR $\gamma$ , jako jsou troglitazon, pioglitazon a 15d-PGJ<sub>2</sub> mají antiproliferační efekt na testikulární nádorové buněčné linie. Exprese PPAR $\gamma$  je u buněk hypofýzy omezena na buňky, které sekretují ACTH (adrenokortikotropní hormon). Nádorové buňky hypofýzy exprimují vyšší hladinu PPAR $\gamma$  než buňky nenádorové. Troglitazon nebo rosiglitazon zastavují buňky ve fázi G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> buněčného cyklu, což nabízí nové možnosti léčby Cushingova syndromu (Heaney et al. 2002). Troglitazon a pioglitazon snižují proliferaci promyelotických leukemických buněčných linií HL60. Analýza buněčného cyklu ukázala, že TZD indukují zástavu cyklu ve fázi G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a vedou k apoptóze. Synergický efekt byl pozorován při současné aplikaci ligandů PPAR $\gamma$  a RXR (Hirase et al. 1999). Bezafibrát a gemfibrozil snižují proliferaci některých lidských leukemických buněčných liniích (Scatena et al. 1999). U 30 % pacientů s nádorem prostaty byla detekována delece v oblasti 3p25, která nese gen pro PPAR $\gamma$  (Rosen a Spiegelman 2001). Kubota se spolupracovníky (1998) zjistili, že troglitazon má na prostatické nádorové buněčné linie závislé na androgenech antiproliferativní efekt a že snižuje hladinu PSA (Prostatický Sérový Antigen), která koreluje s velikostí nádoru prostaty. Hisatake se spolupracovníky (2000) prokázali, že troglitazon inhibuje schopnost androgenů aktivovat promotor genu pro PSA, a tím snižuje jeho hladinu. Troglitazon má tedy antiandrogenový účinek. Účinnějším TZD se jeví být rosiglitazon (Mueller et al. 2000). Experimenty na myším modelu neprokázaly vliv heterozygotní nebo homozygotní delece na vývoj nádorů prostaty (Saez et al. 2003). Collett se spolupracovníky (2000) našli signifikantní vztah mezi dráhou AR a PPAR. Zjistili, že androgeny snižují expresi PPAR. Tento účinek je pak blokovan antiandrogeny, což dokazuje propojení těchto dvou signálních drah. V buněčných liniích odvozených od nádoru prostaty LNCaP dochází vlivem androgenů ke stimulaci lipogenních enzymů, a tím k hromadění kapének lipidů v buňkách. Exprese mRNA PPAR $\alpha$  byla zaznamenána pouze



v cytoplazmě prostatických epiteliálních buněk. U benigních lézí prostaty nebyl PPAR $\alpha$  detekován, nebo jen velmi slabě. Androgenový receptor ovlivňuje dráhu PPAR pravděpodobně přes společné koaktivátory. Kim se spolupracovníky (2003) dokázali, že lidské neuroblastomové buňky exprimují PPAR $\gamma$  a že 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibuje buněčný růst a indukuje apoptózu. Ligandy PPAR $\gamma$ , jako je 15d-PGJ<sub>2</sub> a ciglitazon, snižují proliferaci a indukují apoptózu v lidských buněčných liniích odvozených od melanomu (Placha et al. 2003). Troglitazon zvyšuje expresi genů, které jsou zapojeny do terminální diferenciace adipocytů. U pacientů s liposarkomem po léčbě troglitazonem dochází k indukci buněčné diferenciace a zastavení proliferace buněk (Demetri et al. 1999). Inoue se spolupracovníky (2001) prokázali, že nádorové buňky ledvin nesou receptor PPAR $\gamma$ . Navíc že 15d-PGJ<sub>2</sub>, troglitazon a pioglitazon inhibují růst buněčných linií odvozených od karcinomu ledvin. Novým terapeutickým přístupem může být indukce terminální diferenciace u lidských nádorů pomocí ligandů PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  je vysoce exprimován v nádorových buňkách žaludku a ligandy tohoto receptoru (troglitazon, 15d-PGJ<sub>2</sub>) inhibují růst nediferencovaných nádorových buněk žaludku a indukují jejich apoptózu (Takahashi et al. 1999). Tsubouchi se spolupracovníky (2000) prokázali expresi PPAR $\alpha$  a PPAR $\gamma$  v buněčných liniích odvozených od nádorů plic. K inhibici buněčného růstu a indukci apoptózy dochází v plicních nádorových buňkách pouze účinně

kem troglitazonu, ciglitazonu nebo 15d-PGJ<sub>2</sub> (ligandy PPAR $\gamma$ ), nikoli však účinkem bezafibrátu (ligand PPAR $\alpha$ ) (Tsubouchi et al. 2000). Ciglitazon také podporuje diferenciaci buněk nemalobuněčného karcinomu plic (Wick et al. 2002). Růst neoplastických buněk představuje poruchu rovnováhy mezi proliferací, apoptózou a diferenciací buněk. U normálních buněk je diferenciace provázána zástavou proliferace. Léčba nádorových onemocnění indukci buněčné diferenciace proto může být zajímavou alternativou. V klinické praxi se při terapeutické indukci diferenciace nejčastěji setkáváme s aplikací all-trans retinové kyseliny (ATRA). ATRA je ligandem RAR, který je schopen podpořit diferenciace maligních buněk, např. akutní promyeocytární leukémie (Demetri et al. 1999). Ligandy PPAR $\gamma$  blokují proliferaci a podporují diferenciaci buněk. Tyto látky tedy mohou být využity ke zpomalení proliferace a dediferenciace nádorových buněk regulací aktivity transkripčních faktorů E2F/DP (Heuvel et al. 1999). V současné době existují jasné důkazy o tom, že PPAR $\gamma$  zabraňuje nádorové transformaci buněk a je účinným inhibitorem jejich angiogeneze (Murphy et al. 2000).

**Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/8370-3.** Omlouváme se, že z důvodů limitace literárních odkazů nebylo možné uvést celou řadu zajímavých prací, které se týkají této problematiky.

#### Literatura

1. Yong L., Lambert M.H., Xu H.E. Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure* 11: 741-46 (2003).
2. Privalsky M.L. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* 66: 315-60 (2004).
3. Escriva H., Delaunay F., Laudet V. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 22: 717-27 (2000).
4. Aranda A., Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81: 1269-304 (2001).
5. Kliewer S.A., Lehmann J.M., Willson T.M. Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284: 757-60 (1999).
6. Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-9 (1995).
7. Issemann I., Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347: 645-50 (1990).
8. Cimini A., Cristiano L., Bernardo A., Farioli-Vecchioli S., Stefanini S., Ceru M.P. Presence and inducibility of peroxisomes in a human glioblastoma cell line. *Biochim Biophys Acta* 1474: 397-409 (2000).
9. Vanden Heuvel J.P. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and carcinogenesis. *Toxicol Sci* 47: 1-8 (1999).
10. Chattopadhyay N., Singh D.P., Heese O., Godbole M.M., Sinohara T., Black P.M., Brown E.M. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human astrocytic cells: PPAR $\gamma$  agonists as inducers of apoptosis. *J Neurosci Res* 61: 67-74 (2000).
11. Marsman D.S., Cattley R.C., Conway J.G., Popp J.A. Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-(6-2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res* 48: 6739-44 (1988).
12. Cattley R.C., Popp J.A. Differences between the promoting activities of the peroxisome proliferator WY-14,643 and phenobarbital in rat liver. *Cancer Res* 49: 3246-51 (1989).
13. Ashby J., Brady A., Elcombe C.R., Elliott B.M., Ishmael J., Odum J., Tugwood J.D., Kettle S., Purchase I.F. Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Hum Exp Toxicol* 13 Suppl 2: 1-117 (1994).
14. Reddy J.K., Scarpelli D.G., Subbarao V., Lalwani N.D. Chemical carcinogens without mutagenic activity: peroxisome proliferators as a prototype. *Toxicol Pathol* 11: 172-80 (1983).
15. Rokos C.L., Ledwith B.J. Peroxisome proliferators activate extracellular signal-regulated kinases in immortalized mouse liver cells. *J Biol Chem* 272: 13452-7 (1997).
16. Blanquart C., Barbier O., Fruchart J.C., Staels B., Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 267-73 (2003).
17. Collett G.P., Betts A.M., Johnson M.I., Pulimood A.B., Cook S., Neal D.E., Robson C.N. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is an androgen-responsive gene in human prostate and is highly expressed in prostatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 3241-8 (2000).
18. Chinetti G., Grigolio S., Antonucci M., Torra I.P., Delerive P., Majd Z., Fruchart J.C., Chapman J., Najib J., Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 273: 25573-80 (1998).

19. Galetto R., Albajar M., Polanco J.I., Zakin M.M., Rodriguez-Rey J.C. Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region. *Biochem J* 357: 521-7 (2001).
20. Bull A.W. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colon cancer and inflammatory bowel disease. *Arch Pathol Lab Med* 127: 1121-3 (2003).
21. Mueller E., Sarraf P., Tontonoz P., Evans R.M., Martin K.J., Zhang M., Fletcher C., Singer S., Spiegelman B.M. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1: 465-70 (1998).
22. Takahashi N., Okumura T., Motomura W., Fujimoto Y., Kawabata I., Kohgo Y. Activation of PPAR $\gamma$  inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett* 455: 135-9 (1999).
23. Ehrmann J. J.r., Vavrusova N., Collan Y., Kolar Z. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 146: 11-4 (2002).
24. Chen Y.E., Fu M., Zhang J., Zhu X., Lin Y., Akinbami M.A., Song Q. Peroxisome proliferator-activated receptors and the cardiovascular system. *Vitam Horm* 66: 157-88 (2003).
25. Willson T.M., Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 1: 235-41 (1997).
26. Jaradat M.S., Noonan D.J., Wu B., Avery M.A., Feller D.R., Jardat M.S. Pseudolaric acid analogs as a new class of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Planta Med* 68: 667-71 (2002).
27. Miyahara T., Schrum L., Rippe R., Xiong S., Yee HF Jr., Motomura K., Anania F.A., Willson T.M., Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 275: 35715-22 (2000).
28. Murphy G.J., Holder J.C. PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 21: 469-74 (2000).
29. Houseknecht K.L., Cole B.M., Steele P.J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) and its ligands: a review. *Domest Anim Endocrinol* 22: 1-23 (2002).
30. Schoonjans K., Auwerx J. Thiazolidinediones: an update. *Lancet* 355: 1008-10 (2000).
31. Etgen G.J., Mantlo N. PPAR ligands for metabolic disorders. *Curr Top Med Chem* 3: 1649-61 (2003).
32. Takahashi N., Okumura T., Motomura W., Fujimoto Y., Kawabata I., Kohgo Y. *FEBS Lett* 16: 135-9 (1999).
33. Parker J.C. Troglitazone: the discovery and development of a novel therapy for the treatment of Type 2 diabetes mellitus. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 1173-97 (2002).
34. Gampe RT Jr., Montana V.G., Lambert M.H., Miller A.B., Bledsoe R.K., Milburn M.V., Kliewer S.A., Willson T.M., Xu H.E. Asymmetry in the PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$  crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors. *Mol Cell* 5: 545-55 (2000).
35. Ricote M., Huang J.T., Welch J.S., Glass C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\gamma$ ) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* 66: 733-9 (1999).
36. Margareto J., Rivero I., Monge A., Aldana I., Marti A., Martinez J.A. Changes in UCP2, PPAR $\gamma$ 2, and c/EBP $\alpha$  gene expression induced by a neuropeptide Y (NPY) related receptor antagonist in overweight rats. *Nutr Neurosci* 5: 13-7 (2002).

37. Rieusset J., Touri F., Michalik L., Escher P., Desvergne B., Niesor E., Wahli W. A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity. *Mol Endocrinol* 16: 2628-44 (2002).
38. Kato S., Endoh H., Masuhiro Y., Kitamoto T., Uchiyama S., Sasaki H., Masushige S., Gotoh Y., Nishida E., Kawashima H. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270: 1491-4 (1995).
39. Kersten S., Desvergne B., Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405: 421-4 (2000).
40. Cherkaoui Malki M., Lone Y.C., Corral-Debrinski M., Latruffe N. Differential proto-oncogene mRNA induction from rats treated with peroxisome proliferators. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 855-61 (1990).
41. Lake B.G. Mechanisms of hepatocarcinogenicity of peroxisome-proliferating drugs and chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 483-507 (1995).
42. Li M.Y., Deng H., Zhao J.M., Dai D., Tan X.Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit cell growth and induce apoptosis in human liver cancer BEL-7402 cells. *World J Gastroenterol* 9: 1683-8 (2003).
43. Panigrahy D., Singer S., Shen L.Q., Butterfield C.E., Freedman D.A., Chen E.J., Moses M.A., Kilroy S., Duensing S., Fletcher C., Fletcher J.A., Hlatky L., Hahnfeldt P., Folkman J., Kaipainen A. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 110: 923-32 (2002).
44. Tsubouchi Y., Sano H., Kawahito Y., Mukai S., Yamada R., Kohno M., Inoue K., Hla T., Kondo M. Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 270:400-5 (2000).
45. Schiffrin E.L., Amiri F., Benkirane K., Iglarz M., Diep Q.N. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 42: 664-8 (2003).
46. Elstner E., Williamson E.A., Zang C., Fritz J., Heber D., Fenner M., Possinger K., Koeffler H.P. Novel therapeutic approach: ligands for PPARgamma and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 74: 155-65 (2002).
47. Gupta R.A., Sarraf P., Mueller E., Brockman J.A., Prusakiewicz J.J., Eng C., Willson T.M., DuBois R.N. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated differentiation: a mutation in colon cancer cells reveals divergent and cell type-specific mechanisms. *J Biol Chem* 278: 22669-77 (2003).
48. Hisatake J.I., Ikezoe T., Carey M., Holden S., Tomoyasu S., Koeffler H.P. Down-Regulation of prostate-specific antigen expression by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Cancer Res* 60: 5494-8 (2000).
49. Clay C.E., Namen A.M., Atsumi G., Willingham M.C., High K.P., Kute T.E., Trimboli A.J., Fonteh A.N., Dawson P.A., Chilton F.H. Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 20: 1905-11 (1999).
50. Suchanek K.M., May F.J., Robinson J.A., Lee W.J., Holman N.A., Monteith G.R., Roberts-Thomson S.J. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog* 34: 165-71 (2002).
51. Mehta R.G., Williamson E., Patel M.K., Koeffler H.P. A ligand of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, retinoids, and prevention of preneoplastic mammary lesions. *J Natl Cancer Inst* 92: 418-23 (2000).
52. Liu H., Zang C., Fenner M.H., Possinger K., Elstner E. PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 79: 63-74 (2003).
53. Sarraf P., Mueller E., Smith W.M., Wright H.M., Kum J.B., Aaltonen L.A., de la Chapelle A., Spiegelman B.M., Eng C. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell* 3: 799-804 (1999).
54. Bull A.W. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colon cancer and inflammatory bowel disease. *Arch Pathol Lab Med* 127: 1121-1123 (2003).
55. Campbell S.E., Stone W.L., Whaley S.G., Qui M., Krishnan K. Gamma (gamma) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (gamma) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* 3: 25 (2003).
56. Yang W.L., Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 22: 1379-83 (2001).
57. Dong Y.W., Wang X.P., Wu K., Wu L.Y., Zhang R.L. [Regulatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on the growth of pancreatic carcinoma] *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 42: 479-82 (2003).
58. Han C., Demetris A.J., Michalopoulos G.K., Zhan Q., Shelhamer J.H., Wu T. PPARgamma ligands inhibit cholangiocarcinoma cell growth through p53-dependent GADD45 and p21 pathway. *Hepatology* 38: 167-77 (2003).
59. Harris S.G., Phipps R.P. Prostaglandin D(2), its metabolite 15-d-PGJ(2), and peroxisome proliferator activated receptor-gamma agonists induce apoptosis in transformed, but not normal, human T lineage cells. *Immunology* 105: 23-34 (2002).
60. Hase T., Yoshimura R., Mitsuhashi M., Segawa Y., Kawahito Y., Wada S., Nakatani T., Sano H. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists. *Urology* 60: 542-7 (2002).
61. Heaney A.P., Fernando M., Yong W.H., Melmed S. Functional PPAR-gamma receptor is a novel therapeutic target for ACTH-secreting pituitary adenomas. *Nat Med* 8: 1281-7 (2002).
62. Hirase N., Yanase T., Mu Y., Muta K., Umemura T., Takayanagi R., Nawata H. Thiazolidinedione induces apoptosis and monocyte differentiation in the promyelocytic leukemia cell line HL60. *Oncology* 57 Suppl 2: 17-26 (1999).
63. Scatena R., Nocca G., Sole P.D., Rumi C., Puggioni P., Remiddi F., Bottoni P., Ficarra S., Giardina B. Bezafibrate as differentiating factor of human myeloid leukemia cells. *Cell Death Differ* 6: 781-7 (1999).
64. Rosen E.D., Spiegelman B.M. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 276: 37731-4 (2001).
65. Kubota T., Koshizuka K., Williamson E.A., Asou H., Said J.W., Holden S., Miyoshi I., Koeffler H.P. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58: 3344-52 (1998).
66. Mueller E., Smith M., Sarraf P., Kroll T., Aiyer A., Kaufman D.S., Oh W., Demetri G., Figg W.D., Zhou X.P., Eng C., Spiegelman B.M., Kantoff P.W. Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10990-5 (2000).
67. Saez E., Olson P., Evans R.M. Genetic deficiency in Pparg does not alter development of experimental prostate cancer. *Nat Med* 9: 1265-6 (2003).
68. Kim E.J., Park K.S., Chung S.Y., Sheen Y.Y., Moon D.C., Song Y.S., Kim K.S., Song S., Yun Y.P., Lee M.K., Oh K.W., Yoon do Y., Hong J.T. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activator 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits neuroblastoma cell growth through induction of apoptosis: association with extracellular signal-regulated kinase signal pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 505-17 (2003).
69. Placha W., Gil D., Dembinska-Kiec A., Laidler P. The effect of PPARgamma ligands on the proliferation and apoptosis of human melanoma cells. *Melanoma Res* 13: 447-56 (2003).
70. Demetri G.D., Fletcher C.D., Mueller E., Sarraf P., Naujoks R., Campbell N., Spiegelman B.M., Singer S. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3951-6 (1999).
71. Inoue K., Kawahito Y., Tsubouchi Y., Kohno M., Yoshimura R., Yoshikawa T., Sano H. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in renal cell carcinoma and growth inhibition by its agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 727-32 (2001).
72. Wick M., Hurteau G., Dessev C., Chan D., Geraci M.W., Winn R.A., Heasley L.E., Nemenoff R.A. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediating cyclooxygenase-independent inhibition of lung cancer cell growth. *Mol Pharmacol* 62: 1207-14 (2002).

## PREDIKTIVNÍ CENA $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI SCINTIGRAFIE U NEMOCNÝCH S MNOHOČETNÝM MYELOMEM A POTENCIÁLNÍ ÚLOHA METODY PŘI JEJICH SLEDOVÁNÍ PO TERAPII

### TECHNETIUM- $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI SCINTIGRAPHY IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA: ROLE OF THE EXAMINATION IN THE FOLLOW-UP AND ITS PROGNOSTIC VALUE

MYSLIVEČEK M.<sup>1</sup>, BAČOVSKÝ J.<sup>2</sup>, KAMÍNEK M.<sup>1</sup>, KORANDA P.<sup>1</sup>, VYTRÁSOVÁ M.<sup>2</sup>, HUŠÁK V.<sup>1</sup>, ŠCUDLA V.<sup>2</sup>, NEKULA J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> KLINIKA NUKLEÁRNÍ MEDICÍNY FAKULTNÍ NEMOCNICE A LF UP OLOMOUC

<sup>2</sup> III. INTERNÍ KLINIKA FAKULTNÍ NEMOCNICE A LF UP OLOMOUC

<sup>3</sup> RADIOLOGICKÁ KLINIKA FAKULTNÍ NEMOCNICE A LF UP OLOMOUC

**Souhrn:** *Východiska:* Doposud byl jen ojediněle prezentován prediktivní potenciál  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie a možnost jejího využití při monitorování nemocných s mnohočetným myelomem (MM) po terapii. *Typ studie a soubor:* Cílem naší práce bylo zjistit, zda a jakou prediktivní cenu u pacientů s MM  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie má a zda ji lze využít při jejich sledování po léčbě. Předmětem analýzy byl soubor 29 pacientů s MM, kteří podstoupili dvě  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie; před a po intenzivní chemoterapii. *Metody a výsledky:* Rozhodnutí zahájit chemoterapii bylo založeno výhradně na klinických a laboratorních ukazatelích onemocnění, nikoliv na výsledcích scintigrafie, stejně tak k rozhodnutí provést druhou  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafii vedly změny klinického stavu a laboratorních vyšetření pacientů. V době provedení druhého scintigrafického vyšetření byl prováděn restaging a klinický stav i scintigrafické nálezy byly hodnoceny z hlediska progresse, zlepšení a stability. Mezi  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafii před léčbou a klinickým stavem nemocných po chemoterapii byla zjištěna signifikantní korelace ( $\chi^2 = 14,5$ ;  $P = 0,001$ ) podobně jako mezi scintigrafii a klinickým obrazem pacientů po chemoterapii ( $\chi^2 = 15,29$ ;  $P = 0,004$ ;). Dále byla prokázána korelace změn scintigrafických nálezů se změnami klinického obrazu pacientů před a po chemoterapii ( $\chi^2 = 23,5$ ;  $P < 0,001$ ). *Závěry:* Výsledky naší práce ukázaly, že  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie nemocných s MM lze využít jak v predikci výsledků chemoterapie, tak v monitorování výsledků a průběhu choroby.

**Klíčová slova:** mnohočetný myelom;  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie; prediktivní cena; sledování po terapii

**Summary:** *Backgrounds:* A potential predictive role of  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigraphy and its possible role in monitoring the disease in patients with multiple myeloma after therapy has been presented only infrequently till now. *Design and Subjects:* The aim of our study was to evaluate whether  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigraphy has a predictive value in patients with multiple myeloma and whether it is useful in their follow-up. Twenty-nine patients with multiple myeloma who had undergone two  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigraphic examinations at least 2 months apart were enrolled in the study. All patients received intensive chemotherapy in the interval between the two scintigraphic studies. *Methods and Results:* Variations in clinical status and laboratory data guided the decision to perform a second  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scan. Comparison of clinical status and scintigraphic patterns before and after therapy indicative of progressive, improved or stable disease was performed in each patient. Significant correlations were observed between the baseline scintigraphic patterns and clinical status at follow-up in patients evaluated after chemotherapy ( $\chi^2 = 14,5$ ;  $P = 0,001$ ), and also between the scintigraphic examinations and clinical findings, both after therapy ( $\chi^2 = 15,29$ ;  $P = 0,004$ ). Variation in  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI findings comparing baseline and follow-up evaluations was significantly associated with clinical status ( $\chi^2 = 23,5$ ;  $P < 0,001$ ). *Conclusions:* Our results indicate that  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigraphy could serve both as a prognostic tool and an examination for monitoring the disease in patients with multiple myeloma.

**Key words:** multiple myeloma;  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigraphy; prognostic value; follow-up after therapy

#### Úvod

Využití  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie jako velmi přínosné zobrazovací modalit v diagnostice pacientů s mnohočetným myelomem (MM) bylo v posledních letech publikováno v řadě prací [1-11, 14]. Bylo zjištěno, že celotělová  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie může sloužit jako jednoduchý a senzitivní ukazatel biologické aktivity MM a u jednotlivých typů akumulace  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI pacientů s MM byla nalezena signifikantní korelace se stupněm aktivity onemocnění v kostní dřeni i měkkých tkáních a dále s klinickým stavem onemocnění. Vyšetření umožňuje s vysokou senzitivitou odlišit pacienty v remisi od pacientů s relapsem onemocnění po terapii a metody tedy lze využít k selekci nemocných, u kterých je nutné zahájit léčbu. Na základě  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie lze rovněž stanovit opi-

mální místo pro punkční biopsii a přispět ke zpřesnění výsledků při zjišťování procenta infiltrace plazmatickými buňkami v kostní dřeni nebo extramedulárně.

Jen v ojedinělých studiích byl prezentován prediktivní potenciál metody a možnost jejího využití při monitorování nemocných s MM po léčbě [12]. Cílem naší práce bylo zjistit, jakou má  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie cenu v predikci výsledků chemoterapie u pacientů s MM a zda je metoda užitečná při jejich sledování po léčbě.

#### Soubor nemocných a metody

V období květen 2001 až září 2003 jsme pomocí  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie vyšetřili 194 pacientů. Předmětem analýzy byl v této práci soubor 29 pacientů s MM (14 mužů, 15 žen, průměrný věk



62 let, věkové rozmězi 47 – 79 let), kteří podstoupili dvě  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie; před a po intenzivní chemoterapii. Rozmezí mezi scintigrafickými vyšetřeními bylo 4 – 16 měsíců (průměrně 8 měsíců). Rozhodnutí zahájit chemoterapii bylo založeno výhradně na klinických a laboratorních ukazatelích onemocnění, nikoliv na výsledcích scintigrafie. Diagnóza a staging onemocnění byly stanoveny v souladu se standardními kritérii [13]. Všichni nemocní podstoupili přehledné rtg vyšetření skeletu, biopsii kostní dřevě se stanovením % plazmatické infiltrace (PB), indexu apoptózy PC-AI/CD138, proliferací aktivity plazmocytů PC-PI/CD138, dále byl stanoven paraprotein (MIG) v séru a v moči, C-reaktivní protein (CRP), beta-2-mikroglobulin v séru (B2M), tymidinkináza v séru (sTK), LDH, hemoglobin (HB), kalcium v séru (Ca), marker kostní resorpce (ICTP) a kostní novotvorby (P1CP). K rozhodnutí provést druhou  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafii vedly změny klinického stavu a laboratorních vyšetření pacientů. V době druhého scintigrafického vyšetření byl prováděn restaging onemocnění. Jako progresse MM bylo hodnoceno zvýšení hodnoty paraproteinu a/nebo % plazmatické infiltrace. Za kompletní remisi onemocnění bylo považováno, jestliže hodnota % plazmatických buněk v kostní dřevě dosáhla hodnoty nižší než 5 % a hodnota paraproteinu byla redukována o více než 75 %. Kritéria parciální remise choroby byla dosažena při redukcí hodnoty paraproteinu v rozmezí mezi 50–75 %. Pokud nedošlo k žádné z výše uvedených laboratorních změn, bylo onemocnění klasifikováno jako stabilní.

Celotělová scintigrafie v přední a zadní projekci byla prováděna 10 min. po i.v. aplikaci 800 MBq  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI na scintilační kameře E-CAM, Siemens, se dvěma detektory vybavenými nízkoenergetickými paralelními kolimátory s vysokým rozlišením. Rychlost posunu vyšetřovacího lůžka byla 12 cm/min., bylo použito matice 256 x 1024.

Scintigramy byly klasifikovány podle typu akumulace  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI jako N (normální), D (difuzní), F (fokální) a F+D (kombinované). Dále byly hodnoceny semikvantitativně podle rozsahu postižení (skóre E) a stupně akumulace  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI (skóre I) a bylo stanoveno sumační skóre (SS = E + I). Podrobný popis klasifikace a semikvantitativního hodnocení scintigramů je uveden v naší předchozí práci [14].

U každého pacienta jsme prováděli srovnání  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigramů před a po chemoterapii. Kritériem progresse scintigrafického nálezu byla změna typu scintigramu N na typ D, typu N a D na typy F a F+D nebo zvýšení sumačního skóre u D typu scintigramů. Za zlepšení nálezu byl považován opačný trend scintigrafických změn. Jako stabilní byly hodnoceny scintigramy beze změn před a po intenzivní chemoterapii.

Ke statistickému hodnocení prediktivní ceny první  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie (bazální) před chemoterapií a významu scintigrafie a jejích změn po chemoterapii ve srovnání s klinickým hodnocením nemocných po chemoterapii jsme použili Chi-kvadrát analýzy. Za signifikantní byly považovány hodnoty  $P < 0,05$ .

## Výsledky

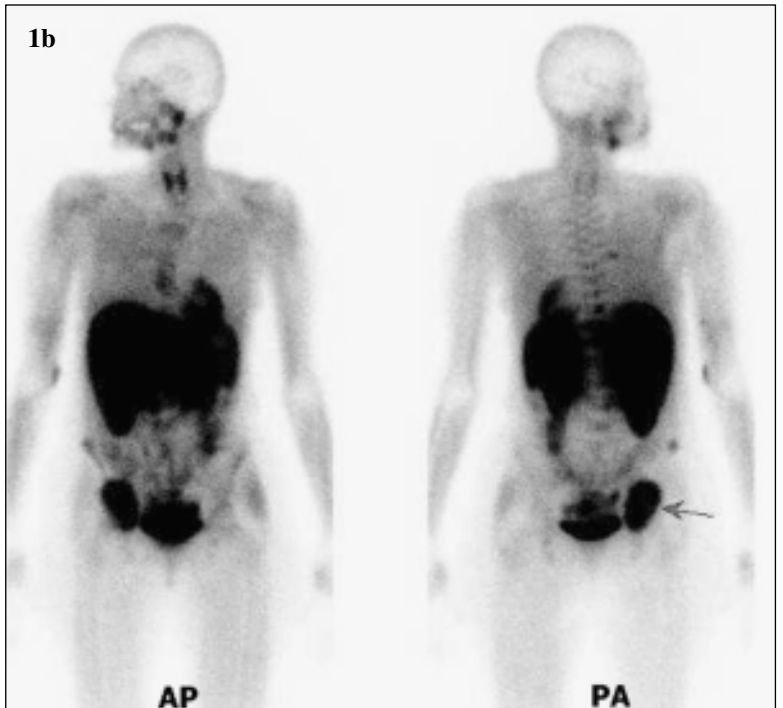
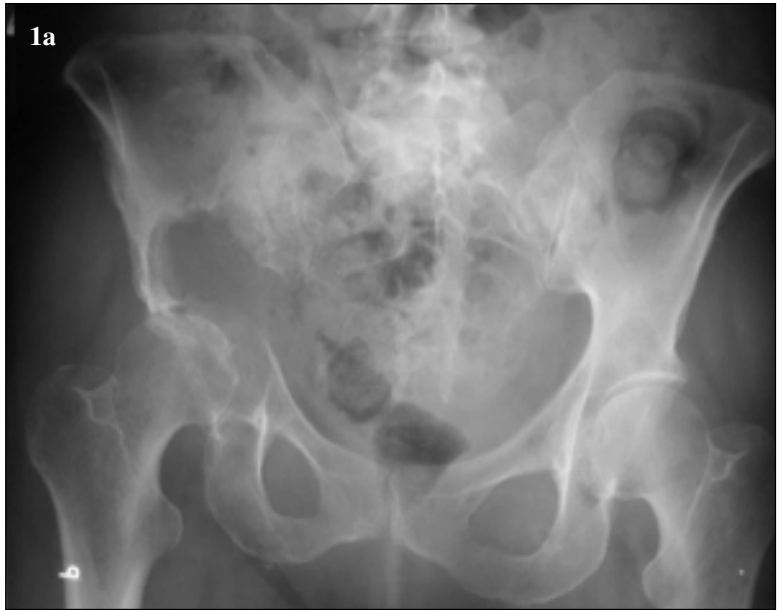
Z 29 pacientů našeho souboru byli 3 v klinickém stadiu I, 16 v klinickém stadiu II a 10 ve stadiu III. V období provedení druhého scintigrafického vyšetření po intenzivní chemoterapii bylo 15 nemocných v klinické remisi (kompletní nebo parciální), 8 mělo stabilní onemocnění a 6 pacientů vykazovalo známky progresse MM.

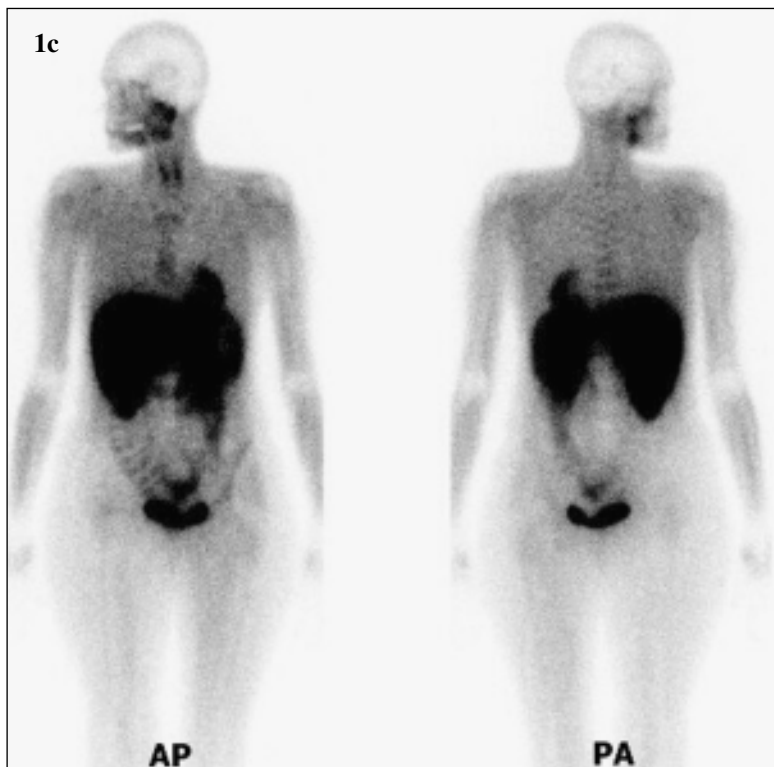
### Obr. 1. Non-sekreční myelom

a) Při rtg vyšetření pánve byla zjištěna rozsáhlá osteolytická léze vpravo. Biopsicky potvrzena dg. mnohočetného myelomu.

b) Na bazálních celotělových scintigramech v přední a zadní projekci lze diferencovat rozsáhlé ložisko patologické akumulace  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI v kostech pánve vpravo, v identické lokalizaci jako osteolytické ložisko při rtg vyšetření. Další menší patologická ložiska jsou v hřebenu kosti kyčelní vpravo a v zadním průběhu žebra vpravo (šipky). Kromě toho je patrná patologická akumulace difuzního typu v kostní dřevě sternu, žeber, páteře, pánve a proximálních epifýz humerů a femorů (aktivní onemocnění před chemoterapií, typ scintigramu F+D).

c) Na celotělových scintigramech po intenzivní chemoterapii vymizela patologická ložiska, lze diferencovat pouze akumulaci  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI difuzního typu a nízké úrovně v kostní dřevě sternu, páteře a kostí pánve (typ scintigramu D, sumační skóre 2, klinicky parciální remise).





Tab. 1. Prediktivní cena bazální <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafie u pacientů po intenzivní chemoterapii (n = 29).

Typ bazální <sup>99m</sup> Tc-MIBI scintigrafie	Klinický stav nemocných po chemoterapii	
	Aktivní onemocnění	Remise
N	0	9
D	5 (SS ≥ 4)	2 (SS = 3)
F a F+D	9	4

$\chi^2 = 14,5, P = 0,001$

Tab. 2. Role opakované <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafie při sledování pacientů po intenzivní chemoterapii (n = 29).

Typ <sup>99m</sup> Tc-MIBI scintigrafie po terapii	Klinický stav nemocných po chemoterapii	
	Aktivní onemocnění	Remise
N	2	13
D	4	1
F a F+D	8	1

$\chi^2 = 15,2, P = 0,0004$

Tab. 3. Korelace změn scintigrafických nálezů před a po chemoterapii s klinickým stavem pacientů v době ukončení chemoterapie (n = 29).

Změny nálezů při <sup>99m</sup> Tc-MIBI scintigrafii po léčbě	Změny klinického stavu nemocných po chemoterapii		
	Remise	Stabilní stav	Progrese
Zlepšení	8	0	0
Stabilní	7	8	2
Progrese	0	0	4

$\chi^2 = 23,5, P < 0,001$

Před zahájením intenzivní chemoterapie mělo 9 pacientů typ scintigramu N, 7 pacientů typ D (2x se SS 3, 5x se SS ≥ 4) a 13 pacientů mělo buď F a nebo F+D typ bazálního scintigramu. Při zjišťování prediktivní ceny bazální <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafie bylo všech 9 pacientů s normálním bazálním scintigramem (typem N) po chemoterapii v klinické remisi. Na druhé straně, z 20 pacientů s bazálním scintigramem typu D, F nebo F+D bylo v klinické remisi pouze 6 pacientů. Ze 7 pacientů s typem D při bazální scintigrafii byli v klinické remisi 2

s hodnotnou SS 3, klinicky aktivní po chemoterapii zůstalo 5 pacientů se SS ≥ 4. Mezi bazální <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafii (před léčbou) a klinickým stavem nemocných po intenzivní chemoterapii jsme zjistili signifikantní korelaci ( $\chi^2 = 14,5; P = 0,001$ ; tab. 1). Obr. 1 a 2 demonstrují nemocné s rozdílnou odpovědí na intenzivní chemoterapii.

Při hodnocení korelace druhé <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafie (po chemoterapii) a klinického obrazu ve stejném období jsme zaznamenali, že z 15 pacientů s normálním scintigramem (typem N) bylo 13 v klinické remisi. Čtyři z 5 pacientů se scintigramem typu D a 8 z 9 s typem F a F+D mělo po chemoterapii klinické známky aktivního onemocnění. Při statistickém hodnocení byla prokázána signifikantní korelace mezi <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafii a klinickým obrazem pacientů po chemoterapii ( $\chi^2 = 15,29; P = 0,004$ ; tab. 2).

Dále jsme hodnotili korelaci změn scintigrafických nálezů se změnami klinického obrazu pacientů s MM před a po chemoterapii. Byla zjištěna statisticky významná korelace ( $\chi^2 = 23,5; P < 0,001$ , tab. 3). Všichni pacienti s progresí scintigrafického nálezu měli i progresi klinického stavu MM. Žádný nemocný se zlepšeným a pouze 2 ze 17 se stabilním scintigrafickým nálezem měli klinickou progresi MM.

## Diskuze

V naší práci byla hodnocena možná role <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafie v predikci a odhadu změn klinického stavu nemocných s MM po intenzivní chemoterapii.

U pacientů, kteří podstoupili chemoterapii byla nalezena signifikantní korelace obou scintigrafických vyšetření s klinickým stavem po léčbě. Normální výsledek <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafie (bazální scintigrafie před chemoterapií) vykazoval vysokou prediktivní přesnost (100%) pro dosažení klinické remise u pacientů s MM po ukončení léčby. Typy scintigramů F a F+D a dále typ D se SS s hodnotou ≥ 4 naopak predikovaly inkompletní odpověď na chemoterapii u 70 % nemocných.

<sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafie provedená u nemocných po chemoterapii (druhá scintigrafie) vykazovala normální nález (typ scintigramu N) u 87 % pacientů, kteří byli po léčbě v remisi a D, F a F+D typy nálezů u 86 % pacientů, u kterých po chemoterapii přetrvávalo aktivní onemocnění. Lze tedy konstatovat, že druhá <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafie velmi přesně odráží klinický stav nemocných po chemoterapii. Tyto nálezy byly potvrzeny i v případě, když všichni pacienti s negativní bazální <sup>99m</sup>Tc-MIBI scintigrafii byli ze statistické analýzy

vyloučení. Vysokou senzitivitu i specificitu  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie v detekci aktivního MM potvrdila řada dalších autorů [2, 6, 11, 14]. Změny scintigrafických nálezů mezi bazálními vyšetřeními a vyšetřeními po léčbě, tedy progresse, stabilní scintigram a zlepšení scintigrafického nálezu, vykazovaly signifikantní souhlas se změnami klinického stavu nemocných po chemoterapii.

Jsme si vědomi některých limitací této předběžné studie. Do souboru byl zařazen relativně malý počet pacientů, což mohlo do jisté míry ovlivnit statistickou analýzu. Pace a spol. [12], kteří publikovali studii s podobnou problematikou se souborem 30 pacientů však dospěli k velmi podobným výsledkům. Protože se nejednalo o prospektivní studii a o termínu druhé  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie rozhodovalo klinické a biochemické posouzení stavu pacientů, rozdíly v čase mezi oběma scintigrafickými vyšetřeními potenciálně mohly ovlivnit výsledky hodnocení: časnější hodnocení nemocných po chemoterapii teoreticky mohlo vykazovat lepší výsledky než hodnocení v delším časovém odstupu.

### Závěr

Výsledky naší práce ukázaly, že  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie vykazuje relevantní potenciální roli u nemocných s MM jak v predikci výsledků chemoterapie, tak v monitorování průběhu choroby.

Při potvrzení našich výsledků na prospektivních studiích a početnějších souborech by mohla být  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI scintigrafie inkorporována do klinického algoritmu jak v diagnostice, tak při sledování pacientů s MM.

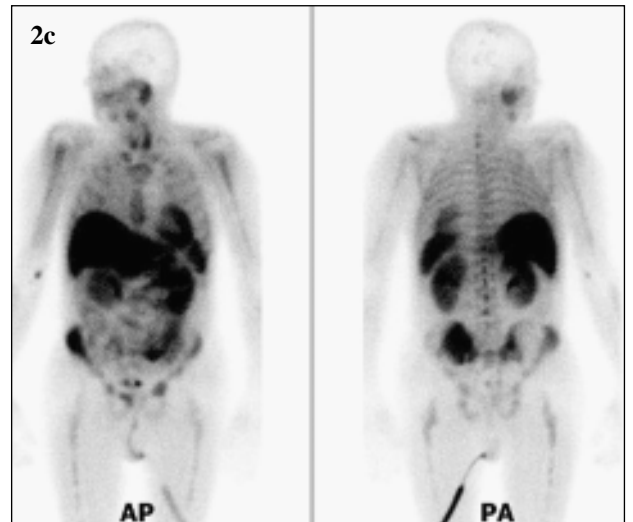
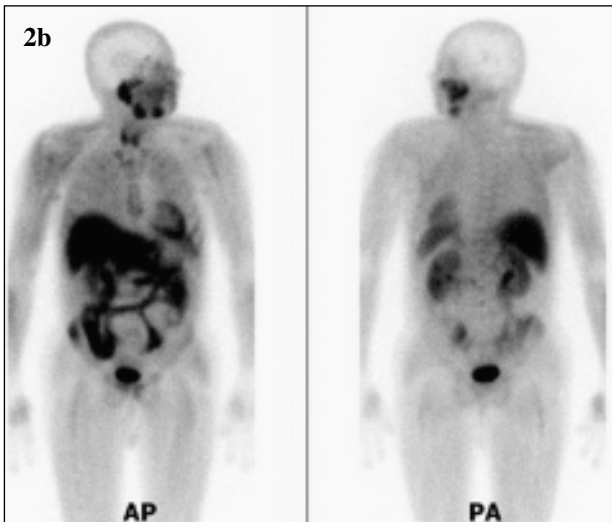
**Tato práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR, NC6724**

### Obr. 2. Mnohočetný myelom, stádium IIIA.

a) Na rtg pánve je patrná osteolytická léze v lopatě kosti kyčelní vpravo.

b) Na bazálních celotělových scintigramech v přední a zadní projekci je v identické lokalizaci ložisko patologické akumulace  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI, další je v SI skloubení vlevo. Patologická akumulace radiofarmaka difuzního typu je také v kostní dřeni sternu, žeber, páteře a proximálních epifýz humerů a femurů (aktivní onemocnění před chemoterapií, typ scintigramu F+D).

c) Na celotělových scintigramech po intenzivní chemoterapii došlo k významné progresi patologického nálezu. Kromě zvětšení již existujících ložisek patologické akumulace  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI se objevila další zejména v kostech pánve, ale i v lebce, femorech a došlo ke zvýšení úrovně a rozsahu difuzní patologické akumulace radiofarmaka v kostní dřeni (typ scintigramu F+D – progresse, klinicky rovněž progresse onemocnění, pacient byl refrakterní k chemoterapii).



## Literatura

1. Durie BGM, Waxman A, Jochelson M, et al. Technetium-99m-MIBI scanning in multiple myeloma (MM) [abstract]. Proc Am Soc Clin Oncol 1994; 13:411.
2. Unlu M, Haznedar R, Atavci S, et al. Detection of bone lesion in multiple myeloma using Tc-99m MIBI scintigraphy [abstract]. Eur J Nucl Med 1995; 22 [Suppl]: 739.
3. Tirovola EB, Biassoni L, Britton KE, et al. The use of 99m-Tc-MIBI scanning in multiple myeloma. Br J Cancer 1996; 74:1815-1820.
4. Adams BK, Fataar A, Nizami MA. Technetium-99m-sestamibi uptake in myeloma. J Nucl Med 1996; 37:1001-1002.
5. El-Shirbiny AM, Yeung H, Imbriaco M, et al. Technetium-99m-MIBI versus fluorine-18-FDG in diffuse multiple myeloma. J Nucl Med 1997; 38:1208-1210.
6. Catalano L, Pace L, Califano C, et al. Detection of focal myeloma lesions by technetium-99m-sestaMIBI scintigraphy. Haematologica 1999; 84:119-124.
7. Fonti R, Del Vecchio S, Zannetti A, et al. Bone marrow uptake of <sup>99m</sup>Tc-MIBI in patients with multiple myeloma. Eur J Nucl Med 2001; 28:214-220.
8. Alexandrakis MG, Kyriakou DS, Passam F, et al. Value of Tc-99m sestamibi scintigraphy in the detection of bone lesions in multiple myeloma: comparison with Tc-99m methylene diphosphonate. Ann Hematol 2001; 80:349-353.
9. Balleari E, Villa G, Garre S, et al. Technetium-99m-sestamibi scintigraphy in multiple myeloma and related gammopathies: a useful tool for the identification and follow-up of myeloma bone disease. Haematologica 2001; 86:78-84.
10. Mysliveček M, Bacovsky J, Kamínek M, et al. Evaluation of multiple myeloma with technetium-99m-MIBI scintigraphy [abstract] World J Nucl Med 2002; 1:S267-268.
11. Pace L, Catalano L, Pinto AM, et al. Different patterns of technetium-99m sestamibi uptake in multiple myeloma. Eur J Nucl Med 1998; 25:714-720.
12. Pace L, Catalano L, Del Vecchio S, et al. Predictive value of technetium-99m sestamibi in patients with multiple myeloma and potential role in the follow-up. Eur J Nucl Med 2001; 28:304-312.
13. Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. Cancer 1975; 36:842-854.
14. Mysliveček M, Bačovský J, Kamínek M, et al. Scintigrafie pomocí <sup>99m</sup>Tc-MIBI v diagnostice mnohočetného myelomu: senzitivní ukazatel biologické aktivity choroby. Klinická Onkologie 2004; 17:13-17.

# informace

## ONKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ CENTRUM MOU V BRNĚ JOUKALOVÁ Z., PUCHRIKOVÁ H.

Česká republika zaznamenává každoročně přibližně padesát pět tisíc nových nádorových onemocnění a figuruje na přední příčce v Evropě, zejména v karcinomu kolorekta, plic a prsu. Podle statistik Národního onkologického registru má každý třetí v ČR onkologické onemocnění a každý čtvrtý na tuto nemoc zemře.

Existuje řada screeningových programů, které jsou zaměřeny na vyhledávání jednotlivých nádorových onemocnění, ale přesto se často zachytí nemoc příliš pozdě.

Včasná diagnostika přitom hraje stěžejní roli a vede k úplnému vyléčení pacientů, a to relativně levně z ekonomického hlediska. Neméně důležitá je dostupnost genetických vyšetření u mladší generace. Je známo, že řadě nádorových onemocnění lze předjít nebo riziko vzniku minimalizovat tím, že dojde ke změně životního stylu. O tom všem a dalších problémech je nutné veřejnost neustále informovat.

Masarykův onkologický ústav (MOU) v Brně je akreditované pracoviště SAK ČR a jediné komplexní onkologické centrum v České republice. Je také vědecko-výzkumným pracovištěm s pre- i postgraduální výukou lékařů a zdravotníků. Ke komplexní onkologické péči patří i informovanost pacientů a veřejnosti, a proto bylo před třemi roky v MOU založeno Onkologické informační centrum (OIC), dosud jediné svého druhu v republice, jehož posláním je šíření a poskytování informací z oblasti onkologie (týkající se prevence, diagnostiky, léčby, genetiky, psychologických a sociálních aspektů) nejen pacientům MOU a jejich rodinným příslušníkům, ale všem občanům České republiky.

Onkologické informační centrum má k dispozici brožury se základními onkologickými diagnózami, letáky o vyšetřeních a jiné informační materiály. Návštěvníci OIC si mohou půjčit knihy o onkologických diagnózách, CD, naučné videoprogramy, pracovat na Internetu, kopírovat lékařské zprávy či odborné články.

MOU provozuje na Internetu dvojice webových stránky: [www.mou.cz](http://www.mou.cz), kde jsou osvětové materiály MOU ke stažení, a [www.prevenenadoru.cz](http://www.prevenenadoru.cz), kde návštěvníci najdou každý měsíc dva nové články o prevenci onkologických onemocnění. Na obou webových stránkách je **on-line poradna**, jejímž prostřednictvím se pacient dozví žádané informace od odborníka MOU nejpozději do 48 hodin. V roce 2004 navštívilo on-line poradnu přes 500 klientů.

Na [www.prevenenadoru.cz](http://www.prevenenadoru.cz), je, mimo jiné, umístěn i **unikátní preventivní program MOU**, vypracovaný na základě údajů Národního onkologického registru, s uvedením nádorových rizik pro určitou věkovou kategorii.

OIC je obsluhováno dvěma zkušebními zdravotními sestrami, které mají na starosti také **bezplatnou nádorovou telefonní linku (800 222 322)** zaměřenou na všechny onkologické diagnózy – díky tomu je jedinou svého druhu v republice – ostatní jsou zaměřeny na jednotlivá onemocnění. Ukázalo se, že spojení všech tří možností kontaktu – osobní návštěva, telefonický rozhovor a zcela anonymní Internet – je ideální. Umožňuje komunikaci se všemi, kteří se chtějí informovat o onkologických onemocněních a přitom jim třeba stud apod. nedovoluje přímý kontakt s lékařem.

Měsíční monitoring OIC umožňuje pružně zlepšovat jeho služby a dává přehled, o které brožury s diagnózami nebo letáky s vyšetřeními je největší zájem, a podle toho se rozhoduje o jejich vydávání nebo objednávání brožur u jiných organizací. Podle potřeb pacientů se nakupuje odborná literatura, kazety a CD, shání se další informace (např. na Internetu atd.), které by zajistily pacientům nejen dobrou informovanost o jejich diagnóze, ale i o změně životního stylu a naučily by pacienta žít komfortně i s onkologickým onemocněním. V OIC jsou pacienti informováni i o kulturních akcích, které pořádá Centrum komunikace s veřejností v MOU, ať jsou to pravidelné vernisáže, které se konají každý první čtvrtek v měsíci v Galerii Žlutý kopec MOU nebo koncerty populární i vážné hudby a umělecká vystoupení. OIC úzce spolupracuje s některými občanskými sdruženími, takže pacienti jsou informováni o jejich aktivitách, rekondičních pobytech atd.

Díky statistice je znám počet klientů, kteří volají na bezplatnou nádorovou linku, zda se jedná o muže či ženu, odkud klient volá, o jakou diagnózu se zajímá a jaké další informace potřebuje znát. Totéž je u návštěvnosti OIC, existuje přehled kolik klientů si přišlo půjčit knihu, kazetu či CD, kolik jich mělo zájem o práci na Internetu, kolik klientů přišlo kopírovat lékařskou zprávu nebo nové informace ke své diagnóze, kolika pacientům z celé ČR se zaslaly brožurky, ale také kolika pacientům bylo doporučeno psychoterapie či návštěva sociálních pracovníků v MOU.

Pro zajímavost – od 1. ledna 2002 do 31. prosince 2004 navštívilo Onkologické informační centrum přes **5000 lidí**, převážně žen, které mají obecně daleko větší zájem o informace, týkající se nejen jejich onemocnění, ale i onemocnění rodinných příslušníků či přátel. Asi polovina příchozích je z Brna. Nejčastější dotazy k diagnóze se týkají nádorového onemocnění prsu, střeva a konečníku, gynekologických a urologických nádorů, plic a nádorů kůže. Dále návštěvníci zajímají informace o výživě, terapii, psychologických, sociálních a právních problémech, genetice a o odvykání kouření.

Co se týká telefonátů, od 1. ledna 2002 do 31. prosince 2004 volalo s prosbou o radu asi **2500 klientů**. Nejčastější telefonické dotazy směřovaly k možnosti vyšetření v MOU. **Do Masarykova onkologického ústavu může přijít každý, kdo má příznaky onkologického onemocnění, bez doporučení praktického lékaře a objednání. K tomuto účelu je tady zřízena konziliární ambulance, která je otevřena každý všední den od 8.00 do 13.00 hodin.** Dále se ptají na placený preventivní program MOU, který probíhá o sobotách, genetické poradenství a psychologické a sociální problémy, výživu a samozřejmě na jednotlivé diagnózy. Nechybí ani otázky týkající se alternativní léčby.

Od 1. března 2003 se začala dělat statistika o počtu rozdaných a zroselých brožur a letáků (ať už byly brožury rozdané či zroselány jednotlivým klientům, exkurzím, na seminářích, při výuce mediců, občanským sdružením, onkologickým oddělením, na různých akcích (konference, BOD, veletrh MEFA atd.). Do 31. prosince 2004 to bylo téměř **90 000 kusů!** Tady je nutno podotknout, že peníze na tuto činnost se získávají z nejrušnějších projektů, které se podávají na MZ ČR, oslovují se sponzoři, kteří jsou ochotni vydávat tiskopisů financovat. Jinak veškerý provoz OIC financuje MOU.

Tři roky provozu OIC v Masarykově onkologickém ústavu naprosto jasně dokázaly potřebnost takového centra, určeného všem generačním skupinám veřejnosti.

# VÝSLEDKY SLEDOVÁNÍ FEN-PAIN-1 U ONKOLOGICKÉ BOLESTI, JEJICH ANALÝZA A KOMENTÁŘ

## RESULTS OF FEN-PAIN-1 OBSERVATION IN ONCOLOGICAL PAIN: ANALYSIS AND COMMENTARY

HŘIB R., HAKL M.

CENTRUM PRO LÉČBU BOLESTI, ANESTEZIOLOGICKO-RESUSCITAČNÍ KLINIKA FAKULTNÍ NEMOCNICE U SVATÉ ANNY V BRNĚ

**Souhrn: Východiska:** Bolesti se vyskytují u více než 1/3 nemocných v časném stadiu, u 70 % pacientů v pokročilém stadiu a u téměř 90% pacientů v terminálním stadiu onkologického onemocnění. Většina onkologických nemocných udává, že výraznější podíl na obavách a strachu z nádorového onemocnění má představa silných bolestí než sama nemoc. **Typ studie a soubor:** Otevřené prospektivní výzkumné šetření, zabývající se léčením silné chronické onkologické bolesti, s nutností nasazení silných opioidů. Ověření účinnosti a bezpečnosti podání transdermálního fentanylu v přípravku Durogesic. Důraz v hodnocení byl kladen na analgezii, kvalitu spánku a výskyt nežádoucích účinků, tedy faktory tzv. kvality života pacienta. Sběr dat prostřednictvím strukturovaného dotazníku, vyplňovaného lékařem. Sledováno bylo 466 pacientů trpících bolestí na základě onkologického onemocnění, podíl žen a mužů byl přibližně stejný. **Metoda a výsledky:** V souboru se vyskytovala převážně nociceptivní bolest, nezanedbatelný byl podíl bolesti neuropatické. Intenzita bolesti byla hodnocena na 10 stupňové analgetické škále (VAS – visual analog scale, 0-10), další parametry byly hodnoceny většinou pětibodovou stupnicí. K nejvýraznějšímu ovlivnění došlo v hlavním sledovaném faktoru, kde intenzita bolesti poklesla v průběhu 2 měsíců sledování o více než 50 %, na VAS menší než 3. Zaznamenáno bylo výrazné vylepšení spánku, výrazné zlepšení denních pracovních i rodinných aktivit pacientů. Spektrum a četnost nežádoucích účinků se nelišily od údajů udávaných výrobcem, tedy nižším četností než při jiné opioidní medikaci. **Závěr:** Naše sledování potvrdilo všeobecně známou informaci, že Durogesic je vynikajícím lékem proti bolesti. Při srovnání s jinými aplikačními formami opioidní medikace vykazuje výrazně nižší výskyt nežádoucích účinků. Proto také dává většina pacientů našeho souboru přednost tomuto způsobu léčby. Durogesic je vhodným způsobem léčby silné chronické onkologické bolesti.

**Klíčová slova:** Bolest, spánek, fentanyl, Durogesic

**Summary: Backgrounds:** Pain appears in more than 1/3 of patients in early stage of cancer, 70% patients in advanced stage and almost in 90% patients in terminal stage. Most of the patients with malignant illnesses state that the fear of severe pain presents the major share of distress caused by cancer rather than the illness itself. **Design and Subjects:** Open-label prospective evaluation regarding the management of severe chronic pain requiring the use of strong opioids. Proving efficacy and safety of transdermal fentanyl (trade name Durogesic). The focus was upon so called Quality of Life factors, such as analgesia, quality of sleep and adverse effects occurrence. Totally, 466 patients suffering from pain caused by malignant disease were included with practically equal proportion of male and female participants. **Methods and Results:** Among this set of patients, nociceptive pain prevailed, however the share of neuropathic pain was inconsiderable, as well. The intensity of pain was evaluated using a 10-point analgesia scale (VAS scale – Visual Analog Scale; 0 to 10), whereas additional parameters were mostly assessed on a 5-point scale. The most pronounced influence was seen in pain intensity, the main evaluated factor, which decreased by 50%, i.e. score less than 3 on VAS, during 2 month evaluation. Clear improvements in sleep and normal daily as well as family activities were recorded. No differences in profile and incidence of adverse effects have been seen compared to the manufacturer's specification, i.e. their less frequent occurrence compared to other opioid products. **Conclusions:** Our research has confirmed a generally known fact that Durogesic is an outstanding analgesic. There are markedly less adverse effects when compared with other pharmaceutical forms of opioid preparations. For this reason, an overwhelming majority of patients from our group preferred this type of treatment. Durogesic is a suitable remedy to treat severe chronic cancer related pain.

**Key words:** pain, sleep, fentanyl, Durogesic

### Úvod

Bolesti se vyskytují u více než 1/3 nemocných v časném stadiu, u 70 % pacientů v pokročilém stadiu a u téměř 90 % pacientů v terminálním stadiu onkologického onemocnění. Každý den na světě trpí více než 4 milióny nemocných bolestmi souvisejícími s nádorovým onemocněním. Bolesti jsou u onkologických nemocných nejčastějším příznakem probíhající choroby.

Většina onkologických nemocných udává, že výraznější podíl na obavách a strachu z nádorového onemocnění má představa silných bolestí než sama nemoc.

Nádorové bolesti bývají obvykle chronické a trvalé, jejich sig-

nální význam (informace o tkáňovém poškození) je však typickou vlastností bolesti akutní. Proto není bolest u onkologických onemocnění definována jako typická chronická bolest, ale jako sled bolestivých syndromů, které se stupňují v závislosti na progresi onemocnění a které se v průběhu času chronifikují.

K léčbě bolestí nádorových i nenádorových má lékař k dispozici celou škálu medikamentů. Jedním z pilířů farmakologické léčby onkologické bolesti jsou opioidní analgetika. Umožňují pacientům trpícím chronickou bolestí zlepšit kvalitu jejich života. Kvalita života je jistě velice široký, těžko přesně definovatelný pojem, stejně jako bolest samotná. Jistými ukazate-



li kvality života jsou určité úrovně bolesti, kvalita a kvantita spánku a množství vedlejších nežádoucích účinků daného způsobu léčby.

Léčbu opioidy ovšem provázejí, stejně jako jinou léčbu, určité nežádoucí účinky. Je snahou každého lékaře, který se léčbou onkologicky nemocných zabývá, omezit tyto nežádoucí účinky. Lze toho docílit racionální léčbou, adjuvantními léky a používáním moderních preparátů. Požadavky na moderní preparát splňuje v algeziologické praxi silné opioidní analgetikum fentanyl v transdermálním systému u preparátu Durogesic. Díky zajištění stabilní hladiny analgetika v krvi předchází výkyvům v analgetickém působení. Komfortní požívání v náplastové formě a výrazně nižší výskyt nežádoucích účinků předurčují možnosti jeho širokého použití. Jelikož je stále častěji používán k léčbě silných bolestí, rozhodli jsme se provést sledování nazvané FEN-PAIN-1, abychom měli možnost jeho žádoucí i nežádoucí účinky zhodnotit.

Cílem studie bylo zhodnocení léčby pacientů, kterým byl podáván přípravek Durogesic.

## Metodika.

Prospektivní dvouměsíční sledování FEN-PAIN-1 bylo prováděno v minulém roce na několika desítkách pracovišť v České republice, zabývajících se silnou opioidní léčbou u indikovaných onkologických pacientů. Nejvíce byla zastoupena pracoviště onkologická, méně algeziologická, v menší míře i pracoviště neurologická a pracoviště ostatních specialistů.

Data byla získávána metodou písemných záznamů o léčbě. Byl vytvořen strukturovaný formulář, který vyplňovali samostatně lékaři, jenž příslušné pacienty léčili. Byla zaznamenána diagnóza, typ bolesti, délka trvání bolesti a předchozí analgetická léčba a její nežádoucí účinky. Po shromáždění dotazníků byla data převedena do elektronické formy a zpracována základními statistickými postupy, které umožňují detailní třídění zpracovávaných informací pro jejich nejlepší interpretaci.

Celkem bylo sledováno 466 pacientů s chronickou onkologickou bolestí. Jejich průměrný věk byl 63,1 roku. Ve skupině mírně převažovali muži (51,7 %) nad ženami (46,8 %).

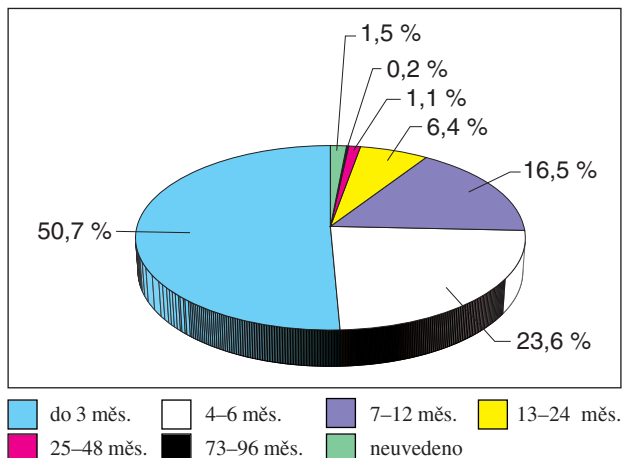
Nejvýrazněji byly zastoupeny diagnózy C15-C26 27,04 %, dále C30-C39 17,6 % a C50 15,45 %, podíl dalších diagnóz nepřevyšil 10 %.

Sledovány byly samozřejmě analgetické účinky, vliv na běžné činnosti, vliv na aktivitu rodiny, ovlivnění nálady, vliv na kvalitu spánku. Dále byl sledován výskyt nežádoucích účinků, vývoj dávky a vztah pacienta k léčbě Durogesicem.

## Výsledky a jejich analýza.

Chronickou onkologickou bolestí v délce trvání do 3 měsíců před nasazením přípravku trpěla téměř polovina pacientů, bolest trvající do 6 měsíců měla téměř 1/4 pacientů (Graf 1).

Graf 1: Doba trvání bolesti před léčbou.



Nejčastěji se vyskytujícím typem bolesti byla bolest nociceptivní, kterou udávaly téměř 2/3 pacientů (61 %), neuropatickou bolestí trpělo 13,5 % pacientů a smíšenou 25 % pacientů. Zajímavé je i rozdělení pacientů podle předcházející analgetické medikace. Léčbu silným opioidem mělo 38,6 % pacientů, slabým opioidem 39,1 % pacientů, 15 % užívalo pouze nesteroidní analgetika.

Jedním z hlavních hodnotících faktorů analgetické léčby je pochopitelně ovlivnění úrovně bolesti. V našem vzorku pacientů došlo k významné úlevě od bolesti již po prvním nasazení preparátu při hodnocení po 1. měsíci od začátku léčby, při další kontrole po 2 měsících již nebyl proti předchozí kontrole pokles úrovně bolesti tak strmý, nicméně průměrná hodnota VAS skóre na 10 stupňové škále (0-10) byla pod hranicí 3. Po dvou měsících podávání Durogesicu došlo k poklesu intenzity bolesti o více než 50 % (Graf 2).

Přitom průměrná dávka Durogesicu při jeho nasazení byla 47,7 µg/hod., po 1. kontrole 64,2 µg/hod a po druhé kontrole 72,9 µg/hod.

Z dalších parametrů bylo hodnoceno ovlivnění (narušení) běžné denní činnosti, ovlivnění (narušení) běžných rodinných aktivit a ovlivnění (zhoršení) nálady vlivem bolesti.

Hodnocení proběhlo v 5 stupních od „vůbec ne“ (1) do „velmi hodně“ (5). Průměrně došlo za 2 měsíce léčby bolestí Durogesicem ke zlepšení parametrů o 1–1,5 stupně (tj. o 20–25 %) (Graf 3).

Dalším důležitým ukazatelem úspěšnosti analgetické léčby je ovlivnění spánku pacienta. Opět byla použita k hodnocení 5 bodová škála, obdobná jako u předchozích otázek. V průběhu sledování došlo k výraznému zlepšení kvality spánku, konkrétně o 1,3 stupně škály. K výraznějšímu zlepšení kvality spánku došlo už po prvním nasazení Durogesicu (Graf 4).

Jako každý lék přináší s sebou i Durogesic nežádoucí účinky. Vyskytovaly se většinou obecné nežádoucí účinky opioidní léčby. Nejčastěji se vyskytovala únava v 35 %, zácpa v 30 %, nechutenství v 30 %, nevolnost v 18 % a zvracení v 10 %, ostatní nežádoucí účinky se vyskytovaly s četností pod 1 % (Graf 5).

Zajímavý je údaj o vývoji celkové četnosti nežádoucích účinků po nasazení Durogesicu. Před nasazením preparátu se vyskytovaly nežádoucí účinky léčby bolestí v 70,6 % případů, při první kontrole u 58 % případů a při druhé kontrole již jen v 53,8 % případů.

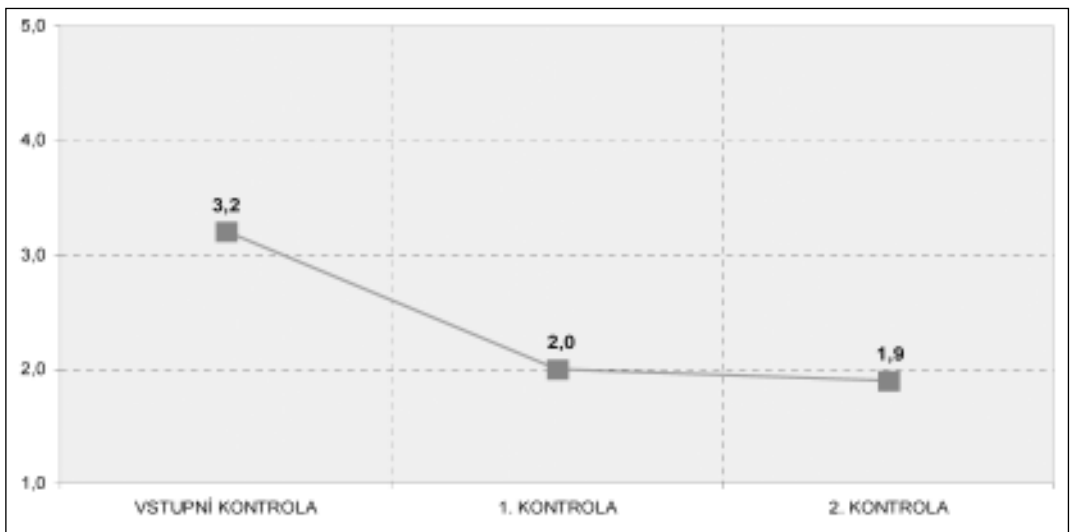
Dále byla hodnocena celková kvalita života. Byla opět hodnocena na 5 stupňové škále (do „velmi dobrá“ až po „velmi špatná“). V průměru došlo ke zvýšení kvality o 20 % u pacientů sledovaného souboru.

Pacientům byl při první i druhé kontrole v rámci sledování položen dotaz, zda by preferovali léčbu formou náplasti nebo perorální léčbu. Léčbu Durogesicem by preferovalo 92,2 % pacientů po první návštěvě, po druhé návštěvě to bylo 88,8 % pacientů. Po první návštěvě ukončilo léčbu Durogesicem 14,9 % pacientů. Téměř polovina z nich mezi první a druhou návštěvou v rámci sledování zemřela, u 11,6 % byla důvodem k ukončení léčby progresse onemocnění a zhoršení stavu, u 10,1 % pacientů bylo důvodem k ukončení léčby zvracení. Další důvody se vyskytovaly méně často.

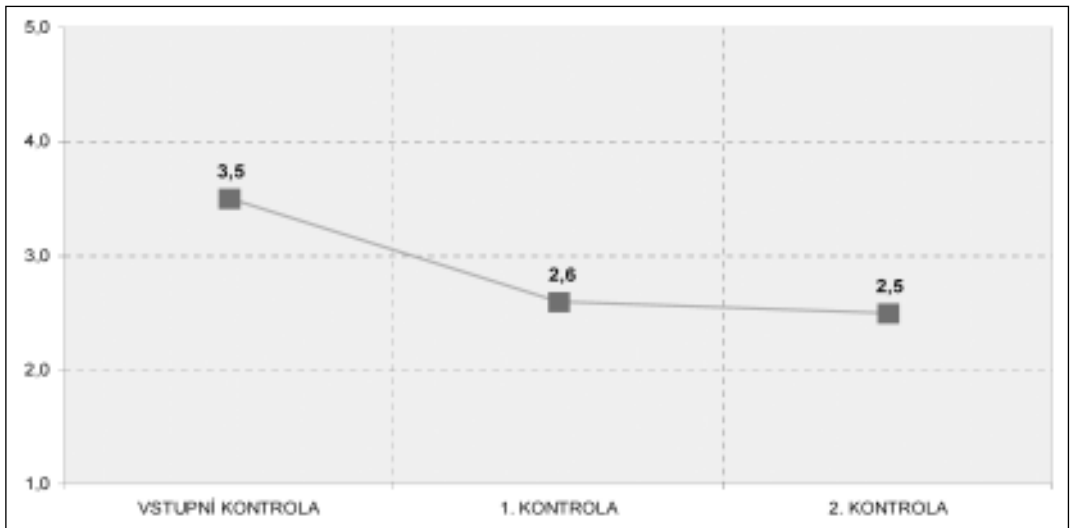
## Diskuse.

Výsledky šetření nejsou nijak překvapivé, potvrzují předpoklad, že Durogesic je výborným analgetickým lékem, komfortní v používání a výrazně šetrnější v nežádoucích účincích. Jeho širší uplatnění brzdí dle našeho názoru rozšířený názor o nákladnosti terapie a určité administrativní omezení. Vzhledem k výrazně menšímu výskytu nežádoucích účinků je nutno počítat i s výrazně nižšími náklady na jejich léčbu, které naopak léčbu jinými preparáty prodražují. Z tohoto hlediska tedy celková terapie Durogesicem není nákladnější než léčba jinými preparáty. Administrativní omezení, tedy kód P, kdy je předpis léku omezen indikací jistě také není nepřekonatelným problémem.

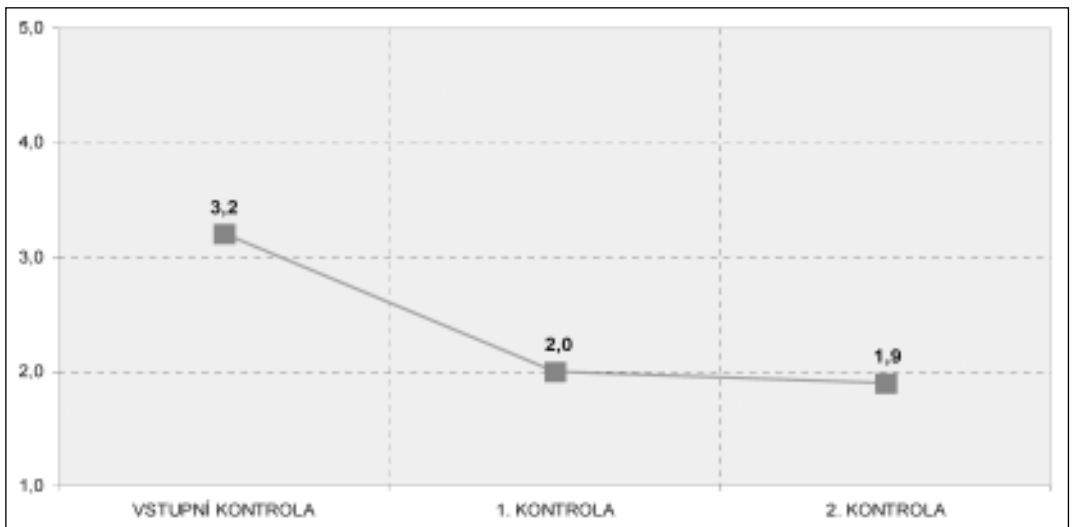
**Graf 2: Intenzita bolesti sledovaná pomocí**



**Graf 3: Vývoj vlivu bolesti na běžné denní činnosti během léčby.**



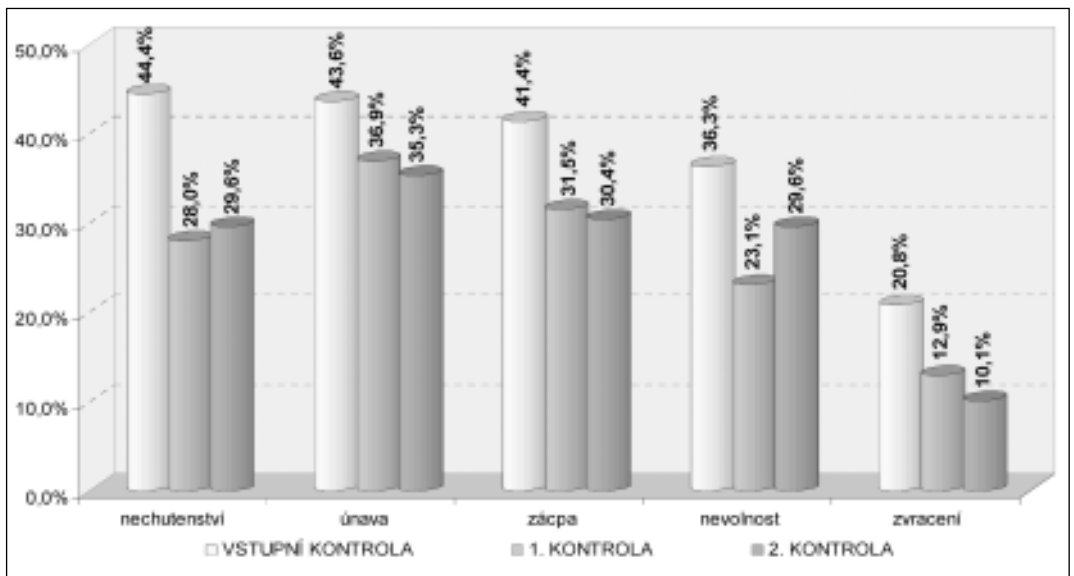
**Graf 4: Vývoj vlivu bolesti na kvalitu spánku během léčby.**



Zarážejícím faktem byl pro nás údaj o délce trvání bolesti před nasazením dostatečné léčby, kdy téměř 40 % pacientů trpělo bolestí více než 1/2 roku. Dále se nám zdála poměrně početná skupina pacientů, kteří měli onkologickou bolest léčenou slabými opioidy (39,1 %), což potvrzuje údaj o určitých rozpacích v nasazení silných opioidů. Zvláště v onkologické boles-

ti není jediného racionálního důvodu k protahování léčby bolesti slabými opioidy, často až nad hranici, kdy je patrný stropový efekt. Tento efekt u TTS fentanylu není a jediným omezením ve velikosti dávky je závažnost případných vedlejších účinků. Pravděpodobně další překážkou v nasazování silných opioidů jsou různé mýty a polopravdy týkající se návy-

**Graf 5: Vývoj výskytu nejčastějších nežádoucích účinků.**



ku a tolerance. Jenom poznamenáváme, že syndrom z odnětí, při náhlém vysazení opioidu bez náhrady je normální fyziologickou reakcí a jeho výskyt při pobytu pacienta ve zdravotnickém zařízení je prakticky vždy zaviněn iatrogeně. Dalším závažným problémem v předpisu všech silných opioidů je neochota mnoha lékařů vyplňovat recepty s modrým pruhem, při jejichž používání je třeba jistých jednoduchých administrativních úkonů.

#### Závěr.

Naše sledování potvrdilo všeobecně známou informaci, že Durogesic je vynikajícím lékem proti bolesti. Při srovnání s jinými aplikačními formami opioidní medikace vykazuje

výrazně nižší výskyt nežádoucích účinků. Pohodlné užívání a jemně vedená analgezie jsou důvodem k významnému zlepšení kvality života pacientů, obzvláště v jejich základních charakteristikách jako jsou snížení bolestivosti a významné vylepšení spánku pacienta. Proto také drtivá většina pacientů našeho souboru dávala přednost tomuto způsobu léčení. Durogesic je vhodným způsobem léčby silné chronické onkologické bolesti.

*Sledování proběhlo za podpory firmy Janssen-Cilag, konzultanty sledování byli MUDr Marek Hakl, MUDr Radovan Hřib, MVDr Petr Matějka, zpracování dat provedla firma Cegedim CZ, Ad-hoc divize.*

#### Literatura

1. Collet, B-J.: Opioid tolerance: the clinical perspective. Br J Anaesth., 1998, vol. 81, p. 58-68.
2. De Conno F, Caraceni A. Manual of Cancer Pain. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1998: 60.
3. Joranson DE, Ryan KM, Gilson AM, Dahl JL. Trends in medical use and abuse of opioid analgesics. JAMA 2000; 283: 1710-1714.
4. Kongsgaard UE, Poulain P. Transdermal fentanyl for pain control in adults with chronic cancer pain. Eur J Pain 1998; 2: 53-62.
5. Ševčík, P., Vorlíček, J. Léčba bolesti. In Vorlíček, J. a kol. Klinická onkologie. Brno, Vydavatelství Masarykovy univerzity, 1995, s. 199-214.
6. Ševčík, P., Vorlíček, J.: Transdermální fentanyl - nová léková forma podávání opioidů. Remedia, 1998, vol. 8, č. 5, s. 289-293
7. Woodruff, R. Cancer Pain. Melbourne, Asperuly Pty Ltd, 1997. 90 pp.

# IDENTIFIKACE NÁDOROVĚ-SPECIFICKÝCH T LYMFOCYTŮ NA ZÁKLADĚ PRODUKCE INTERFERONU GAMA U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

## IDENTIFICATION OF TUMOR-SPECIFIC T CELLS BASED ON INTERFERON GAMMA PRODUCTION IN MULTIPLE MYELOMA

OČADLÍKOVÁ D.<sup>1</sup>, KOVÁŘOVÁ L.<sup>1</sup>, PENKA M.<sup>1</sup>, ŽALOUDEK J.<sup>4</sup>, BÜCHLER T.<sup>1,2</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2,4</sup>, MICHÁLEK J.<sup>1,3,4</sup>

1 LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

2 INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

3 I.DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FN BRNO

4 UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

**Souhrn:** *Východiska:* Mnohočetný myelom je nádorové onemocnění, které je charakterizováno zhoubnou klonální proliferací plazmatických buněk. Incidence jsou 4 nemocní na 100 000 obyvatel. Medián dlouhodobého přežití je 4-5 let. Vedle standardní léčby vysokodávkovanou chemoterapií se rovněž začíná uplatňovat imunoterapie. *Typ studie a soubor:* V in vitro studii byla na souboru zdravých dárců testována možnost aktivace, separace a expanze myelom-specifických T lymfocytů. *Metody a výsledky:* Myelomové buňky linie ARH 77 byly po ozáření přidány k alogenním mononukleárním buňkám periferní krve, které obsahují antigen-prezentující buňky a T lymfocyty. Postupně došlo k aktivaci myelom-specifických T lymfocytů charakterizované produkcí interferonu gama, které byly separovány pomocí imunomagnetických kuliček a expandovány in vitro až do hodnot  $400 \times 10^6$  T lymfocytů během 4 týdnů. *Závěry:* Tato práce ukazuje možnost identifikace a separace protinádorových T-lymfocytů, které je možno expandovat in vitro na množství využitelné v klinické praxi.

**Klíčová slova:** Mnohočetný myelom, imunoterapie, interferon gama, T lymfocyt

**Summary:** *Backgrounds:* Multiple myeloma is a hematological disease caused by clonal proliferation of a malignant plasma cell clone. Its incidence is 4 in 100 000. Median survival is 4-5 years. Besides standard therapy including high-dose chemotherapy new approaches such as immunotherapy are taking place. *Design and subjects:* Identification of myeloma-specific T cells from healthy blood donors has been tested in an in vitro study based on T cell activation, separation and expansion. *Methods and results:* Myeloma cell line ARH 77 has been irradiated and used as apoptotic bodies to stimulate allogeneic mononuclear cells from peripheral blood. Activated myeloma-specific T cells produce interferon gamma, can be captured by immunomagnetic beads and further expanded in vitro up to  $400 \times 10^6$  T cells within 4 weeks. *Conclusion:* This study demonstrates feasibility of identification and separation of tumor-specific T cells that can be expanded in vitro to numbers used in clinical application.

**Key words:** Multiple myeloma, immunotherapy, interferon gamma, T cell

### 1. ÚVOD

Mnohočetný myelom (MM) je nádorové onemocnění, které je charakterizováno zhoubnou klonální proliferací plazmatických buněk. Incidence tohoto onemocnění činí přibližně 4 nemocní na 100 000 obyvatel. Zaujímá 10% z hematologických malignit a 1% ze všech nádorových onemocnění. Neefektivnost standardní chemoterapie při léčbě onemocnění vedla k zavedení vysokodávkované chemoterapie (1, 2). Tato léčebná strategie dosahuje vysokého procenta léčebných odpovědí (80-90%) s maximálním podílem kompletních remisí v rozmezí 30-40%. Parametry dlouhodobého přežití jsou lepší než při použití standardní léčby: medián 3 roky pro dobu do relapsu onemocnění a medián 4-5 let pro celkové dlouhodobé přežití (2, 3). Výsledky randomizované studie potvrdily přínos vysokodávkované léčby oproti standardní chemoterapii pro nemocné s MM (4). Přestože je zařazení autologní transplantace do léčebné strategie pacientů s MM výrazným přínosem, relaps onemocnění je zpravidla neodvratný. I přes dosažení kompletní remise zůstává v organismu pacienta zbytková nádorová populace.

MM je považován za nevléčitelné onemocnění (5, 6), a proto jsou hledány nové cesty, jak zlepšit prognózu pacientů s MM. Jednu z nich představuje protinádorová imunoterapie, která zaznamenala značný úspěch u melanomu a renálního karcinomu, které jsou považovány za více imunogenní. V posledních desetiletí byly podány experimentální důkazy o možnostech

navození imunitní reaktivity i vůči méně imunogenním nádorům včetně MM (7, 8, 9). Imunitní systém může být aktivován specifickými nádorovými antigeny. V případě MM se nabízí využití monoklonálního imunoglobulinu, který je produkován nádorovým klonem plazmatických buněk. Tento tzv. idiotypický protein (Id-protein) může být izolován z plazmy pacientů s MM a použit jako specifický nádorový antigen ke stimulaci cytotoxických T lymfocytů (CTL) schopných lyzovat autologní myelomové buňky in vitro (10, 11). Aktivace T lymfocytů byla prokázána jak in vitro, tak in vivo. Id-protein je však málo imunogenní, a proto vakcíny připravené z Id-proteinu dosáhly jen velmi limitovaných úspěchů (12, 13, 14).

Dalšími příčinami neuspokojivých výsledků imunoterapie u MM jsou mnohočetné defekty imunitního systému pacientů s MM, které zahrnují defekty dendritických buněk (DB) a jejich schopnosti aktivovat T lymfocyty (15, 16), malou imunogennost myelomových buněk (17), defekty imunitního systému pacientů s MM (18) a funkční změny T lymfocytů, NK buněk a B lymfocytů (17).

Ve druhé polovině 90. let bylo s výhodou využito DB naložených nádorovými antigeny, které mají schopnost aktivace protinádorově specifických CTL (19, 20). V současné době jsou tímto způsobem testovány různé druhy potenciálních nádorových antigenů. Bylo prokázáno, že myelomové buňky, u nichž byla navozena apoptóza ozářením a byly využity jako nádorové antigeny a naloženy do DB, indukují odpověď myelom-

specifických CTL in vitro (21). Po opakované stimulaci T lymfocytů apoptickými tělisky nádorových buněk naložených do DB dochází k jejich aktivaci, kterou lze standardně měřit pomocí produkce interferonu gama (IFN- $\gamma$ ) (23, 24, 25). Cílem této studie byla identifikace specifických protinádorových T lymfocytů, které lze separovat a expandovat in vitro.

## 2. MATERIÁL A METODY

### 2.1. Buněčné kultury a příprava antigenů

Mononukleární buňky (MN) byly izolovány z nesrážlivé periferní krve zdravých dárců z transfuzní stanice ve FN Brno po podepsání informovaného souhlasu metodou gradientové centrifugace (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) a kultivovány v kompletním médiu (KM) obsahujícím X-VIVO 15 (50mg/l gentamycin, 2mM L-glutamin, 25mg/ml hepes pufr: BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) s tepelně inaktivovaným 10% lidským AB-sérem (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) při 37 °C v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> a 4,5% O<sub>2</sub>. Buněčnost kultury byla nastavena na 1,0x10<sup>6</sup> buněk/ml KM. Jako zdroj nádorových buněk byla využita myelomová buněčná linie ARH 77 (dar, který byl laskavě poskytnut profesorem B. Barlogiem, University of Arkansas, USA, 1995). Nádorový antigen byl připraven ozářením myelomových buněk dávkou 60Gy. 1.den byl přidán antigen - myelomové buňky (MB) linie ARH 77 ozářené dávkou 60 Gy v poměru MN:MB = 20:1, 8.den byly opět přidány MB v poměru MN:MB = 2:1.

### 2.2. Značení pomocí IFN- $\gamma$ a magnetická separace

Aktivované T lymfocyty produkující IFN- $\gamma$  byly 9. den zhodnoceny pomocí Secretion Assay Cell Enrichment And Detection Kit (MACS Reagens, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo) podle pokynů výrobce (23).

Magnetická separace byla prováděna týž den na koloně umístěné v magnetickém poli přístroje Vario MACS (MACS Reagents, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). Pozitivní frakce byla získána dvojitou separací pro zvýšení čistoty.

### 2.3. Průtoková cytometrie:

T lymfocyty (1x10<sup>6</sup>) z pozitivní a negativní frakce po MACS-separaci byly inkubovány 15 minut s monoklonálními protilátkami anti-CD4 značenými fluoroisothiokyanátem (FITC), anti-CD8 FITC, anti-CD3 phycoerythrin-cyaninem (PE-Cy) (Immunotech, Marseille, Francie) a s anti-IFN- $\gamma$  phycoerythrinem (PE) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Německo). T lymfocyty byly analyzovány na průtokovém cytometru Cyto-mics™ FC 500 (Beckman Coulter, Miami, Florida, USA).

### 2.4. Expanze T lymfocytů in vitro

IFN- $\gamma$  pozitivní T lymfocyty byly expandovány in vitro v KM obohaceném o interleukin 2 (IL-2) v množství 500 IU/ml KM (Proleukin, Chiron, Amsterdam, Holandsko). 1. den expanze byl přidán phytohemaglutinin (PHA) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika) v množství 5 $\mu$ g/ml KM. Po celou dobu expanze byla udržována buněčnost kultury 1-3 x 10<sup>6</sup> T lymfocytů/ml KM. KM včetně IL-2 bylo vyměňováno 2x týdně a 1x týdně byly současně přidávány alogenní MN periferní krve ozářené dávkou 30Gy.

## 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Bylo provedeno celkem 8 experimentů zahrnujících stimulaci, restimulaci, separaci a expanzi myelom-specifických T lymfocytů. MN izolované z periferní krve zdravých dárců obsahující antigen-prezentující buňky a T lymfocyty byly v den 1 stimulovány ozářenými MB v poměru 20:1 (T lymfocyt:MB). V den 7 byla provedena restimulace ozářenými MB v poměru 2:1 (T lymfocyt:MB). Při těchto poměrech byla produkce IFN- $\gamma$  maximální, jak jsme zjistili v předchozích experimentech (25). 24 hod po restimulaci byla provedena identifikace protinádorových myelom-specifických T lymfocytů na prů-

**Tab. 1: Identifikace a separace myelom-specifických T lymfocytů.** Procentuální hodnoty aktivovaných IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> a IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> myelom-specifických T lymfocytů ve vstupní, pozitivní a negativní frakci po magnetické separaci (MACS). Měřeno na průtokovém cytometru 24 hod po restimulaci. Uveden medián, minimální, maximální hodnota (%) a statistická významnost obohacení IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (p<sub>1</sub>) a IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (p<sub>2</sub>) T lymfocytů v pozitivní frakci oproti frakci vstupní. Data byla vyhodnocena pomocí Wilcoxonova testu.

Číslo experimentu	Vstupní frakce		Pozitivní frakce		Negativní frakce	
	CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup>
1.	4,38	3,26	61,94	51,47	2,22	1,71
2.	4,58	1,14	17,25	64,85	2,77	0,93
3.	2,18	1,60	15,14	3,90	1,34	0,34
4.	2,99	1,99	82,98	72,08	2,06	1,46
5.	2,35	1,16	59,70	74,26	1,73	0,96
6.	3,68	3,40	68,69	84,59	2,50	2,12
7.	1,97	1,83	33,61	88,75	1,41	1,36
8.	2,67	2,12	37,47	83,99	1,40	1,16
medián [%]	2,83	1,91	48,59	73,17	1,90	1,26
minimum [%]	1,97	1,14	15,14	3,90	1,34	0,34
maximum [%]	4,58	3,40	82,98	88,75	2,77	2,12
p			p <sub>1</sub> = 0,012	p <sub>2</sub> = 0,012		

kovém cytometru. Aktivované IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T lymfocyty byly měřeny ve vstupní frakci před magnetickou separací. Procentuální zastoupení aktivovaných T lymfocytů (CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup>) ve vstupní frakci bylo 1,97–4,58 % (medián 2,83%) pro CD4<sup>+</sup> a 1,14–3,40 % (medián 2,63%) pro CD8<sup>+</sup> viz Tab. 1. Restimulované aktivované myelom-specifické T lymfocyty byly magneticky separovány na přístroji Vario MACS. Separace IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> frakce byla provedena dvakrát pro zvýšení čistoty. Došlo k obohacení aktivovaných T lymfocytů v pozitivní frakci na 15,14–82,98 % (medián 48,59%) pro CD4<sup>+</sup> a 3,90–88,75 % (medián 73,17%) pro CD8<sup>+</sup> oproti frakci negativní: 1,34–2,77 % (medián 1,90%) pro CD4<sup>+</sup> a 0,34–2,12 % (medián 1,59%) pro CD8<sup>+</sup> viz Tab. 1 a Obr. 1.

Separované myelom-specifické T lymfocyty byly u 5 pokusů expandovány in vitro. Expanze byla prováděna pomocí PHA, IL-2 a alogenních ozářených MN periferní krve zdravých dárců, viz metodická část. Obr. 2 ukazuje expanzi protinádorových T lymfocytů in vitro v čase. Buňky byly počítány každý týden a jejich množství zaznamenáváno po dobu 4 týdnů. Během 4 týdnů došlo k expanzi z počátečních hodnot 0,5–0,6 x 10<sup>6</sup> T lymfocytů na hodnoty 150–420x10<sup>6</sup> (medián 160x10<sup>6</sup>) T lymfocytů.

Naměřené výsledky jsou v souladu s publikovanými pracemi (23, 24), které rovněž ukázaly možnost identifikace a následně expanze protinádorových T lymfocytů. Úspěšná adoptivní T-buněčná imunoterapie byla demonstrována u některých nádorových onemocnění, zejména u melanomu. V tomto sdělení ukazujeme, že i u MM, který je považován za málo imunogenní, lze identifikovat populaci potenciálně myelom-specifických T lymfocytů a expandovat je do klinicky aplikovatelného množství.

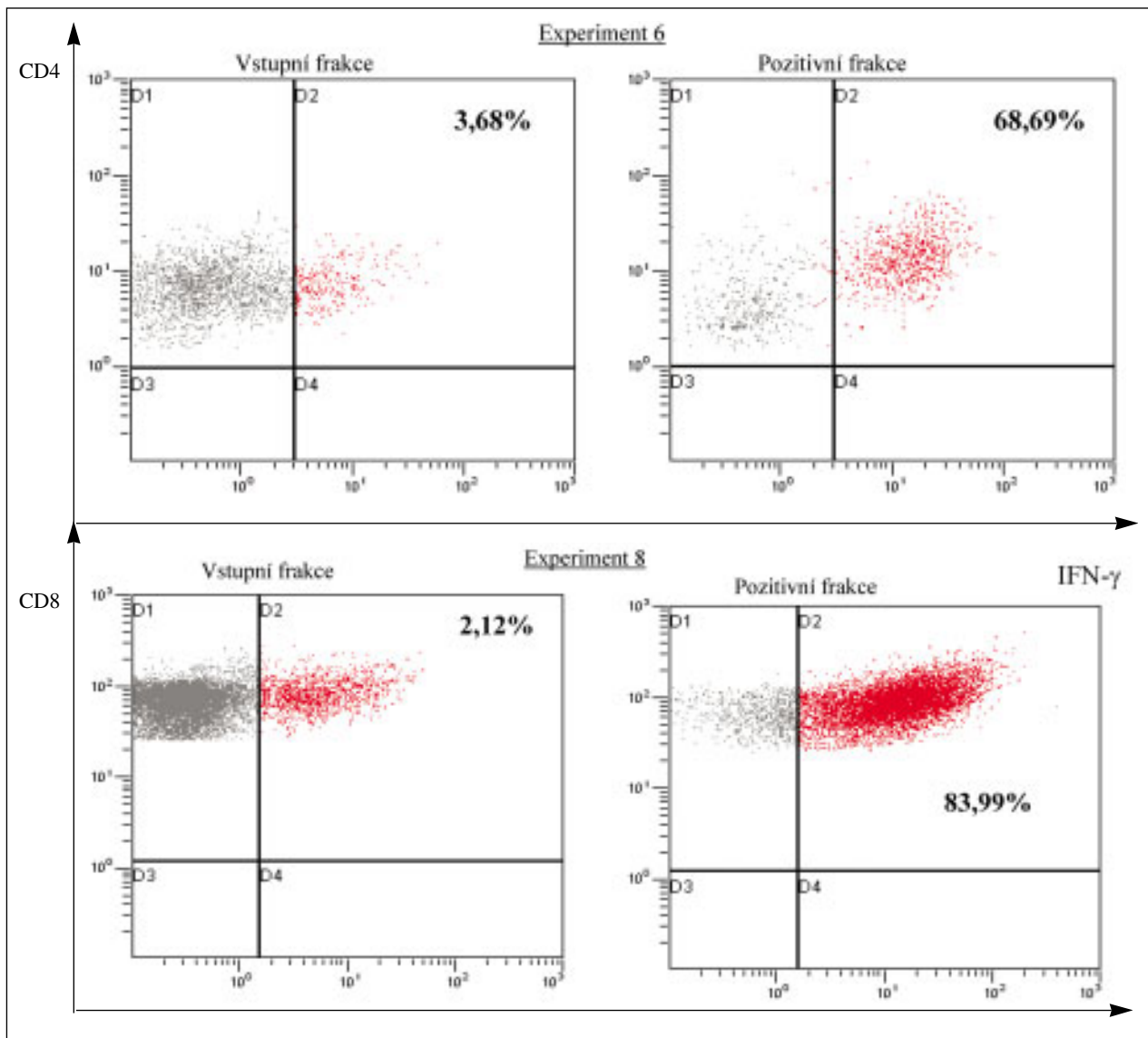
Existují i další metody identifikace antigen-specifických T lymfocytů, například využití komplexu tetramer nebo příprava lymfocytárních linií či klonů (24). Nicméně tyto metody jsou limitovány. V případě komplexů tetramer je významným omezením vazba na určitý hlavní histokompatibilitní antigen (MHC) I. třídy a nutná znalost nádorového antigenu/peptidu. Tetrametry neumožňují izolaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, které zřejmě sehrávají významnou roli při eliminaci nádorových buněk. V případě protinádorových linií či klonů T lymfocytů je zpravidla hlavním omezením limitovaný repertoár antigenních struktur, které jsou těmito buňkami rozpoznávány a eliminovány (24).

Na rozdíl od výše uvedených postupů má identifikace protinádorových T lymfocytů na základě produkce IFN- $\gamma$  výhody, kte-



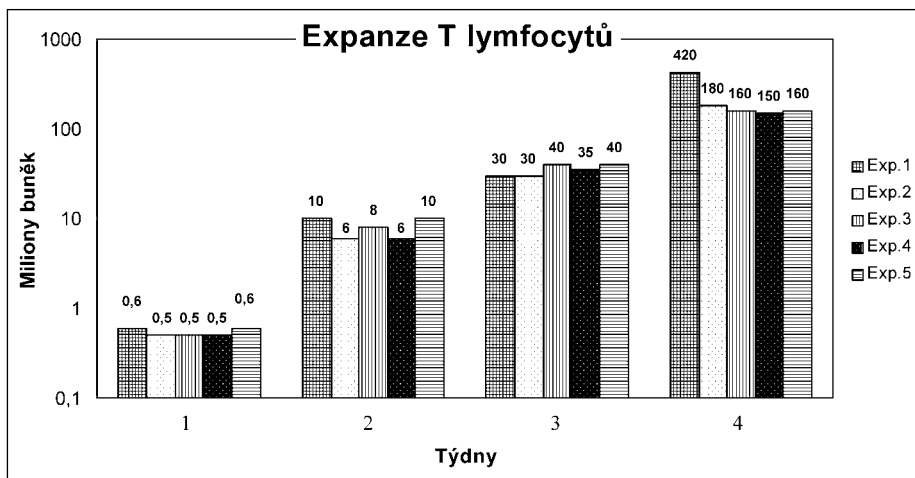
**Obrázek 1: Identifikace a separace myelom-specifických T lymfocytů na průtokovém cytometru.**

Měření aktivovaných T lymfocytů pomocí produkce IFN- $\gamma$  u CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytů 24 hod po restimulaci. T lymfocyty byly separovány v magnetickém poli na přístroji Vario MACS. Červenou barvou je znázorněno procento aktivovaných CD4<sup>+</sup>, resp. CD8<sup>+</sup> T lymfocytů ve vstupní frakci před separací a obohacení v pozitivní frakci po separaci.



**Obrázek 2: Expanze protinádorových T lymfocytů in vitro v čase.**

Graficky jsou zde znázorněny výsledky jednotlivých experimentů (odlišeny různým šrafováním). Počty buněk (v milionech) byly zaznamenávány každý týden po dobu 4 týdnů.



ré spočívají především v možnosti izolace jak CD4 tak CD8 T lymfocytů bez nutné znalosti tumor-asociovaných antigenů a bez omezení v MHC (24, 25). Tento přístup rovněž umožňuje studovat individuální tumor-asociované antigeny v podobě proteinů či peptidů a může napomoci nalezení optimální stimulace protinádorových T lymfocytů pro daného jedince.

Na modelu in vitro se nám podařilo identifikovat a separovat potenciálně myelom-specifické T lymfocyty a expandovat je na hodnoty použitelné klinicky. Dalším předmětem zkoumání bude měření specifické cytotoxicity vůči nádorové populaci myelomových buněk.

## 4. ZÁVĚR

V této studii jsme prokázali, že myelomové buňky indukují odpověď myelom-specifických T lymfocytů in vitro. Po opakované stimulaci T lymfocytů apoptotickými tělísky nádorových buněk dochází k jejich aktivaci, kterou lze standard-

ně měřit pomocí produkce IFN- $\gamma$ . Takto získané T lymfocyty lze dále expandovat in vitro na hodnoty použitelné v klinické praxi.

*Tato práce byla částečně podpořena grantem IGA MZ 7475-3.*

### Literatura

1. Hájek R., Adam Z., Vášová I., Král Z. Evolution of myeloma treatment from melphalan monotherapy to bone marrow transplantation. *Acta Medica Austriaca* 1996, 23, No.3: 85-91
2. Hájek R., Vášová I., Adam Z., Mayer J. New approaches to management of multiple myeloma. *Acta medica Austriaca* 1996, 23: 91-8
3. Barlogie B., Jagannath S., Vesole D.H., Trikot G. Autologous and allogeneic transplants for multiple myeloma. *Semin.Hematol.* 1995, 32: 31-44
4. Attal M., Haroussean J.L., Stoppa A.M. et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N.Engl.J.Med.* 1996, 335: 91-7
5. Adam Z., Vorlíček J., Králová E. et al. Therapy of multiple myeloma. Press:Opsula. Haematologica, Masaryk University Brno 1993: 1-220
6. Adam Z., Hájek R., Mayer J. et al. Mnohočetný myelom a další monoklonální gamopatie. Masarykova univerzita, 1999
7. Yi Q., Österborg A. Idiotype-specific T cells in multiple myeloma: targets for an immunotherapeutic intervention?. *Med.Oncol.* 1996, 13: 1-7
8. Greipp P.R., Witzig T. Biology and treatment of myeloma. *Curr.Opin.Oncol.* 1996, 8: 20-7
9. Barlogie B., Jagannath S., Epstein J. et al. Biology and therapy of multiple myeloma in 1996. *Semin.Hematol.* 1997, 34: 67-72
10. Kwak L.W., Thielemans K., Massaia M. Idiotype vaccination as therapy for multiple myeloma. *Semin.Hematol.* 1999, 36: 34-37
11. Musilová R., Táborská E., Bourková L. et al. Příprava a využití antitumorového antigenu z patologického imunoglobulinu pro pacienty s mnohočetným myelomem. *Transfúze a hematologie dnes* 2002, 3(8): 91-95
12. Kwak L.W. et al. Induction of immune response in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumor. *N.Engl.J.Med.* 1992,327: 1209-1215
13. Österborg A., Yi Q., Henriksson L. et al. Idiotype immunization combined with GM-CSF in myeloma patients induced type I, MHC restricted, CD4- and CD8-specific T-cell responses. *Blood* 1998, 91(7): 2458-66
14. Massaia M., Borrione P., Battaglio S. et al. Idiotype vaccination in human myeloma: generation of tumor-specific immune response after high-dose chemotherapy. *Blood* 1999, 94 (2): 673-83
15. Raje N., Gong J., Chauhan D. et al. Bone marrow and peripheral blood dendritic cells from patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally normal despite the detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus gene sequences. *Blood* 1999, 93(5): 2411-9
16. Brown R.D., Pope B., Murray A. et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood* 2001, 98(10): 2992-8
17. Cook G., Campbell J.D.M. Immune regulation in multiple myeloma: the host-tumor conflict. *Blood Reviews* 1999, 13: 151-162
18. Yi Q. Immunoregulatory mechanisms and immunotherapy. In *Myeloma* (Mehta J. and Singhal S., eds), Martin Dunitz, London 2002: 81-97
19. Hájek R., Butch A.W. Dendritic cell biology and the application of dendritic cells to immunotherapy of multiple myeloma. *Med.Oncol.* 2000, 17: 2-15
20. Büchler T. and Hájek R. Dendritic cell vaccines in the treatment of multiple myeloma. *Med.Oncol.* 2002, 19(4): 213-8
21. Hayashi T., Hideshima T., Akiyama M. et al. Ex vivo induction of multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 2003, 102: 1435-1442
22. Büchler T., Hájek R., Bourková L. et al. Generation of antigen-loaded dendritic cells in a serum-free medium using different cytokine combinations. *Vaccine* 2003, 21: 877-882
23. Brosterhus H., Brings S., Leyendeckers H. et al. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol.* 1999,29(12): 4053-9
24. Becker C., Pohla H., Frankenberger B. et al. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. *Nat Med.* 2001, 7(10): 1159-62
25. Očadlíková D., Kovářová L., Vidláková P. et al. Identifikace myelom-specifických T-lymfocytů na základě produkce interferonu gama. Edukační sborník XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laboranty 26.-28.května 2004, 53: 113-116

## knihy

### MEDICAL THERAPY OF BREAST CANCER

RAYTER Z., MANSI J. (EDS.)

CAMBRIDGE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS 2003

394 s., cena 70,- GBP. ISBN 0-521-49632-2.

V posledních letech došlo k významnému pokroku v diagnostice a léčbě karcinomu prsu. Cílem recenzované knihy, kterou vytvořil kolektiv 21 autorů převážně z Velké Británie, je nabídnout čtenáři nejnovější poznatky v této oblasti v souhrnné formě. Samozřejmě se tak děje v kontextu se skutečnostmi známými již delší dobu a i když je hlavní těžiště informací zaměřeno na medikamentózní léčbu karcinomu prsu, nalezneme zde i informace o léčbě chirurgické a také o prevenci, screeningu a genetických aspektech tohoto závažného onemocnění.

Obsah díla je rozdělen do 14 kapitol. V prvním oddíle je zmíněna historie léčby karcinomu prsu, od prvních dochovaných informací ze starověkého Egypta až po současnost. Opakovaně se tu přesvědčujeme, že chirurgické postupy hrály v historii vždy rozhodující úlohu, zatímco teprve v posledním období jsou zaznamenávány významnější úspěchy medikamentózní léčby. Druhá kapitola popisuje význam preventivní chemoterapie u pacientek s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu. Jde zejména o ženy, které jsou nositelkami mutací genů BRCA1 a BRCA2. Kri-

tickému rozboru jsou zde podrobeny publikované výsledky studií s tamoxifenem a raloxifenem. Následuje 9 stran věnovaných familiárnímu výskytu karcinomu prsu a 20 stran o hormonální terapii. Autoři zde rozebírají zatím neúplné a místy i kontroverzní poznatky o úloze endogenních a exogenních estrogenů, jejich účinků a úlohy v období menopauzy. Další kapitola popisuje roli screeningu, výhody a omezení jednotlivých zobrazovacích metod v něm i věkové hranice, od kterých by měl být screening prováděn. V šesté kapitole nalezneme postupy používané v léčbě in situ karcinomu prsu, včetně chirurgických zachovných operací. Další 8 oddílů, reprezentujících převážnou část knihy, je věnováno nechirurgické léčbě. Nalezneme zde informace o všech významných v současnosti používaných možnostech – adjuvantní systémové terapii, adjuvantní radioterapii, primární chemoterapii včetně vysokodávkové, nových imunologických přístupech, úloze bifosfonátů a paliativní terapii. Rozsáhlý oddíl je věnován možnostem predikce úspěšné terapeutické odpovědi či rezistence na jednotlivé druhy léčby. Každá kapitola končí četnými literárními odkazy.

Ve všech oddílech knihy je patrný kritický přístup k dosud publikovaným informacím a snaha o zařazení nejnovějších poznatků do kontextu již známých a prověřených faktů. Nejde tedy o klasickou učebnici, ale dílo přinášející v souhrnné formě aktuální informace v oblasti léčby karcinomu prsu.

M. H.

# IMUNOMAGNETICKÁ SEPARACE BUNĚK Z KOSTNÍ DŘENĚ U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM – STANOVENÍ DELECE 13q14 POUŽITÍM INTERFÁZNÍ FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE

## IMMUNOMAGNETIC SEPARATION OF BONE MARROW CELLS IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS – DETECTION OF 13q14 DELETION USING INTERPHASE FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

SMEJKALOVÁ J.<sup>1</sup>, VRANOVÁ V.<sup>4</sup>, KOVÁŘOVÁ L.<sup>1</sup>, KUGLÍK P.<sup>4</sup>, FILKOVÁ H.<sup>3</sup>, HEINIGOVÁ J.<sup>1</sup>, ADAM Z.<sup>2</sup>, KREJČÍ M.<sup>2</sup>, BÜCHLER T.<sup>1,2</sup>, KALÁBOVÁ V.<sup>2</sup>, OLTOVÁ A.<sup>3</sup>, VORLÍČEK J.<sup>2</sup>, PENKA M.<sup>1</sup>, HÁJEK R.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO BOHUNICE

<sup>2</sup> INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO BOHUNICE

<sup>3</sup> ODDĚLENÍ LÉKAŘSKÉ GENETIKY, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO BOHUNICE

<sup>4</sup> KATEDRA GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA MU, BRNO

**Souhrn:** *Východisko:* Chromosómalní aberace jako je delece 13q14 jsou důležitým prognostickým faktorem u mnohočetného myelomu. Nízká mitotická aktivita maligních plazmatických buněk a jejich slabý růst v buněčných kulturách snižuje dostupnost cytogenetických informací. K získání co nejpřesnějšího cytogenetického nálezu u myelomových buněk se používají metody, které umožňují selekci této buněčné populace z buněk kostní dřene. Jedná se o imunomagnetickou separaci v kombinaci s interfázní fluorescenční *in situ* hybridizací. *Typ studie a soubor:* Předkládáme výsledky cytogenetického vyšetření u 40 pacientů s mnohočetným myelomem. *Metody a výsledky:* Pro hodnocení vzorků kostní dřene bylo použito G-pruhování chromosomů a interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace na neseparovaných buňkách a na buňkách separovaných metodou imunomagnetické separace pomocí CD 138 specifické protilátky. Metodou interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace byla sledována delece v oblasti q14 na chromosomu č. 13. U neseparovaných vzorků byla delece 13q14 nalezena u 10 pacientů ze 40 (25%), u obohacené buněčné suspenze byla tato delece nalezena u 25 pacientů ze 40 (62.5%). *Závěry:* Naše výsledky potvrzují, že použitím interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace u imunomagneticky separovaných buněk lze zvýšit záchyt delece 13q14 v maligních plazmatických buňkách mnohočetného myelomu.

**Klíčová slova:** Mnohočetný myelom, imunomagnetická separace, interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace, delece 13q14

**Summary:** *Background:* Chromosomal abnormalities, such as 13q deletion, are emerging as important prognostic factors in multiple myeloma. The availability of cytogenetic information has long been hampered by the low mitotic activity of the plasma cells. To obtain a direct assessment of the myeloma cells pathology in high purity cell population, we have used magnetic-activated cell sorting in combination with interphase fluorescence *in situ* hybridization. *Design and subject:* The study included 40 patients with multiple myeloma. *Methods and results:* We used chromosomal G-banding and interphase *in situ* hybridization on CD138+ and CD138- cells after selection by magnetic-activated cell separation. Hybridization was performed to detect the 13q14 deletion in unselected bone marrow cells and, in parallel, in CD138+ enriched samples. The 13q14 deletion was found in 10 of 40 (25%) of bone marrow samples without cell selection and in 25 of 40 (62.5%) of samples with CD138+ enriched myeloma cells. *Conclusions:* Our results confirm that immunomagnetic selection of CD138+ cells increases the probability of detection of the 13q14 deletion in bone marrow samples.

**Key words:** Multiple myeloma, magnetic-activated cell separation, interphase fluorescence *in situ* hybridization, 13q14 deletion

### Úvod

Cytogenetická analýza u mnohočetného myelomu je velice náročná. Důvodem je nízký počet plazmatických buněk v kostní dřeni a jejich nízký mitotický index. Cytogenetické nálezy jsou přítomny ve 20 – 60% a jsou komplexní (1,2).

Mezi specifické strukturální a numerické aberace patří translokace zahrnující těžký imunoglobulinový řetězec na chromosomu 14q32 a monosomie nebo delece chromosomu č. 13. Tyto aberace byly zjištěny jak konvenčním cytogenetickým vyšetřením, tak interfázní fluorescenční *in situ* hybridizací [FISH] (3,4,5). Abnormality chromosomu č. 13 jsou spojovány se špatnou prognózou (6,7,8,9,10).

Intersticiální delece oblasti 13q14 a monosomie chromosomu č. 13 jsou asociovány s agnogení myeloidní metaplázií (AMM), mnohočetným myelomem (MM), chronickou lymfatickou leukémií (CLL), polycytemií vera (PV) a s dalšími hematologickými malignitami (4). Gen RB1 je tumor supresorový gen a má důležitou úlohu v patogenezi solidních nádorů, avšak jeho role

v onkohematologických onemocněních není doposud zcela objasněna. Nicméně jsou sekvence tohoto genu využívány jako DNA sonda při interfázní FISH k určení ztráty části nebo celého chromosomu č. 13.

Studie, které srovnávají záchyt chromosómalních abnormalit při použití klasické cytogenetické metody a metody FISH ukazují, že metoda FISH detekuje abnormality, které nejsou konvenční metodou zachytitelné (7,11,12).

Nízká mitotická aktivita plazmatických buněk a jejich slabý růst v buněčných kulturách snižuje dostupnost cytogenetických informací. Podle Pérez-Simón lze zvýšit záchyt patologických karyotypů tehdy, když jsou buňky kostní dřene inkubovány v přítomnosti interleukinu-3 a interleukinu-6 (7).

K získání co nejpřesnějšího karyotypu myelomových buněk se používají metody, které umožňují selekci této buněčné populace z buněk z kostní dřene. Jedná se o imunomagnetickou separaci (MACS), fluorescenční imunomagnetickou separaci (FACS) v kombinaci s interfázní FISH (13).

Cílem této studie bylo určit, zda metoda interfázni FISH detekující delecí RB1 genu na separovaných myelomových buňkách je více přínosnější než na buňkách neseparovaných. Jedná se o rozšířený soubor pacientů v návaznosti na pilotní práci Fišerová a kol. (13).

## Pacienti a metody

### Soubor pacientů a protokol studie

Kostní dřev byla získána od 40 pacientů s mnohočetným myelomem. Dvacet šest pacientů bylo nově diagnostikovaných, 10 bylo v relapsu onemocnění, 1 pacient vykazoval maximální léčebnou odpověď a 3 pacienti měli doutnající myelom. Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce č. 1. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Jeden ml kostní dřevě byl zpracován standardním postupem pro genetické vyšetření, následovalo G-pruhování chromosomů a vyšetření metodou interfázni FISH.

**Tabulka č. 1: Charakteristika pacientů.**

Počet pacientů	40
Ženy	19
Muži	21
IgA	9
IgG	26
IgM	1
Bence-Jones nesekreční	2
Věk	průměr 54 (7,5) rozptyl 27–71
Stádium	I 3 II 6 III 27 nezařazeno 4

IgA, IgG, IgM, Bence-Jones – typy monoklonálního paraproteinu, stádium – stádium dle Durie-Salmon.

beccova média (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), doplněna 100 UI/ml heparinem a 100 UI/ml DNase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA). Myelomové buňky byly separovány imunomagnetickou separací podle výrobce (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Mononukleární buňky kostní dřevě byly získány densitní gradientovou centrifugací na Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) při 400g, 35 min. Buňky byly 2x promyty v PBS dplněném 2mM EDTA. Po posledním promytí bylo přidáno 20 µl MACS CD 138 (Syn-decan-1) MicroBeads (Miltenyi Biotec) na celkový počet  $10^7$  buněk. Takto označená buněčná suspenze byla přefiltrována přes 30µm filtr v LS koloně (Miltenyi Biotec) umístěné v magnetickém poli separátoru Vario MACS (Miltenyi Biotec). Negativní buňky prošly kolonou, pozitivní buňky byly eluovány po odstranění kolony z magnetického pole. Byl stanoven počet buněk, jejich morfologie a imunofenotypizace.

### Morfologické hodnocení

Z nátěru kostní dřevě obarveného metodou May-Grünwald-Giemsa bylo stanoveno procento myelomových buněk. Ze separovaných buněk metodou MACS byly připraveny cytospinové preparáty a obarveny May-Grünwald-Giemsa. Bylo stanoveno procento plazmatických buněk z 250 jaderných buněk.

### Imunofenotypizace

Vstupní vzorky MBKD (mononukleární buňky kostní dřevě) stejně jako vzorky pozitivní a negativní frakce (v množství  $0,5 \times 10^6$  buněk na zkumavku) byly inkubovány s fluorescenčně značenými monoklonálními protilátkami (Ab) v následujících kombinacích: CD3-FITC/CD14-PE/CD19-PC7 a CD38-FITC/CD138-PE/CD45-PC5 (Immunotech, Marseille, Francie). Po 15. minutách při pokojové teplotě byly resuspendovány v PBS obsahujícím 1% paraformaldehyd pro fixaci. Flow-

cytometrická (FC) analýza byla provedena na přístroji Cyto-mics FC500 (Beckman-Coulter, Fullerton, CA). Analyzována byla populace CD38<sup>++</sup> CD45<sup>-</sup> CD45<sup>dim</sup> CD45<sup>+</sup>, znak CD138 byl hodnocen buď samostatně nebo na této populaci (13).

### Buněčná kultivace a příprava skel pro genetické vyšetření

Vzorky byly připraveny podle stávajících cytogenetických metod. Vzorky byly kultivovány v médiu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) doplněným 20% inaktivovaným fetálním sérem 24 hodin při teplotě 37 °C s 5% CO<sub>2</sub>.

### G-pruhování chromosomů

Sklíčka byla ošetřena trypsinem (Sigma-Aldrich) a obarvena Giemsou (G-pruhování). Chromosomy byly sestaveny v karyotyp podle nomenklatury ISCN 1995 (14). Za abnormální klon byl označen náleží dvou a více metafází se stejnou strukturální abnormalitou nebo se stejnými chromosomy navíc a náleží tří metafází s chybějícím stejným chromosomem.

### Interfázni fluorescenční *in situ* hybridizace

Pro vyšetření pomocí FISH metody byla použita sonda LSI 13/RB-1 Spectrum Orange Probe (Vysis - Abbott), která specificky hybridizuje k sekvencím RB1 genu v oblasti 13q14 chromosomu 13 a referenční sonda LSI 13q34 Spectrum Green Probe (Vysis - Abbott). Obě sondy byly kodenaturovány při 75 °C po dobu 2 minut a hybridizovány při 37 °C přes noc ve vlhké komůrce. Poté byla sklíčka odmyta roztokem 0,4xSSC/0,3 NP-40 při 72 °C po dobu 4 minut, poté jednou v 2xSSC/0,1% NP-40 při pokojové teplotě. Sklíčka byla podbarvena DAPI II Counterstain (Vysis) a zhodnocena pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného příslušnými filtry. Obraz byl snímán CCD kamerou Cohu 9410 a analyzován pomocí software LUCIA G4.61-FISH (Laboratory Imaging, Prague, Czech Rep.). V experimentech bylo hodnoceno 50 až 100 interfázni jader.

### Statistická analýza

Byla provedena popisná analýza (průměr, rozptyl). Hodnoty určující čistotu frakcí při imunomagnetické separaci a četnosti buněk s chromosomálními abnormalitami zjištěnými metodou FISH jsou vyjádřené v procentech.

### Výsledky

#### Imunomagnetická separace

Čistota získaných frakcí je hodnocena morfologicky a flowcytometricky (FS). Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2. Průměrná hodnota čistoty frakce 138+ je 98,5% (0,0–100,0%) hodnocena morfologicky z cytospinových preparátů. Hodnota z FC měření je 26,3% (rozmezí 0,1–99,1%), zde byly nalezeny dvě populace, které znak CD138 exprimovaly buď slabě či silně.

#### G-pruhování a interfázni FISH

Výsledky G-pruhování a interfázni FISH specifickou sondou pro 13q14.3 LSI D13S319 na neseparovaných a separovaných myelomových buňkách jsou uvedeny v tabulce č. 3. Hraniční hodnota pro pozitivitu interfázni FISH (cut off level) byla stanovena na 9% (13).

**Tabulka č. 2. Výsledky imunomagnetické separace.**

Vzorek	Čistota		
	Flowcytometrie	Morfologie	
	CD138+ [%] průměr (rozmezí)	CD38 <sup>++</sup> /45+/138+ [%] průměr (rozmezí)	Plazmatické buňky [%] průměr (rozmezí)
Frakce CD138+	26,3 (0,1–99,1)	23,5 (0,0–97,1)	98,5 (0,0–100,0)
Frakce CD138-	2,8 (0,0–29,9)	2,3 (0,0–27,2)	11,5 (0,0–75,0)

Uvedeny jsou hodnoty čistoty buněk z flowcytometrického měření a morfologického hodnocení.

Tabulka č. 3. Výsledky cytogenetického vyšetření.

Poř. č.	Dg.	MACS del 13q14 (%)	Sign. a/n	KD del 13q14 (%)	Sign. a/n	Karyotyp
1	nová dg.	3,0	n	4,0	n	46,XY(16)
2	nová dg.	40,0	a	10,0	a	nehodnotitelné
3	nová dg.	13,0	a	negat.	n	46,XX(19)
4	nová dg.	6,0	n	negat.	n	nehodnotitelné
5	nová dg.	4,0	n	negat.	n	46,XY(4)
6	nová dg.	47,0	a	18,0	a	46,XY(6)
7	nová dg.	11,0	a	negat.	n	46,XY(3)
8	max.od.	10,5	a	negat.	n	46,XY(7)
9	nová dg.	89,0	a	30,0	a	46,XX(16)
10	nová dg.	15,0	a	7,5	n	nehodnotitelné
11	relaps	32,0	a	negat.	n	46,XX(18)
12	relaps	36,0	a	6,0	n	nehodnotitelné
13	nová dg.	11,0	a	negat.	n	46,XY(20)
14	relaps	10,0	a	negat.	n	46,XY(15)
15	nová dg.	negat	n	negat	n	46,XY(20)
16	nová dg.	61,0	a	negat	n	46,XX(10)
17	relaps	57,0	a	negat	n	46,XY(19)
18	relaps	22,5	a	10,0	a	43,XY,-1,-10,der(11),-13,del(14q)(3)/46,XY(4)
19	nová dg.	56,0	a	negat.	n	46,XY(14)
20	relaps	negat	n	negat	n	nehodnotitelné
21	relaps	73,0	a	60,0	a	41,XX,-X,der(1),-4,der(5),-6,der(6),der(9), der(13),der(15),-22,-22
22	relaps	60,0	a	3,5	n	46,XY(5)
23	nová dg.	5,1	n	2,0	n	46,XY(5)
24	nová dg.	6,0	n	3,0	n	46,XX(5)
25	nová dg.	90,0	a	15,5	a	46,XX(7)
26	nová dg.	55,0	a	21,0	a	45,XX,+3,del(6q),del(10q),-13,-16(3)/46,XX(4)
27	doutn. m.	2,5	n	4,0	n	46,XX(4)
28	nová dg.	7,0	n	1,0	n	46,XX, del(13q)(2)/46,XX(3)
29	nová dg.	80,0	a	7,0	n	46,XX(14)
30	nová dg.	100,0	a	3,5	n	49,XY,+der(1),+der(4),+9,-13,+20(3)/46,XY(13)
31	nová dg.	7,0	n	1,0	n	46,XX(19)
32	relaps	17,0	a	5,0	n	46,XY(3)
33	nová dg.	2,0	n	0,0	n	46,XY(8)
34	doutn. m.	1,0	n	2,0	n	46,XX(9)
35	doutn. m.	negat.	n	negat.	n	46,XX (6), nekl. ztráty (4)
36	nová dg.	negat.	n	negat.	n	46,XX, t(11;14) (2), 46,XX nekl.ztráty
37	relaps	negat.	n	negat.	n	46,XY (15)
38	nová dg.	34,0	a	11,0	a	46,XY (20)
39	nová dg.	61,0	a	23,0	a	46,XX (16)
40	nová dg.	22,0	a	11,0	a	46,XY (20)

Doutn. m. – doutňající myelom, MACS del 13q14, KD del 13q14 – interfázní FISH na separovaných mononukleárních buňkách (MACS del 13q14) a neseparovaných mononukleárních buňkách (KD del 13q14), Sign. ano/ne – signifikace výsledků získaných metodou interfázní FISH, karyotyp – výsledky G-pruhování.

Z celkového počtu 55 vyšetřených pacientů metodou interfázní FISH mělo 40 pacientů reprodukovatelné výsledky.

Analýzou G-pruhování byly zjištěny numerické a strukturní aberace, především se jedná o aneuploidii respektive o derivované a deletované chromosomy.

Interfázní FISH prováděná na neseparovaných buňkách byla pozitivní v 10 případech, což představuje 25,0%. V případě separovaných myelomových buněk byla pozitivita v 25 přípa-

dech, což je 62,5%. U pacientů č. 3, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 19, 22, 29, 30, 32 bylo vyšetření na separovaných buňkách hodnoceno jako pozitivní oproti vyšetření provedeným na neseparovaných buňkách. U pacientů č. 2, 6, 9, 18, 21, 25, 26, 38, 39, 40 byla pozitivita stanovena jak na neseparovaných, tak na separovaných buňkách. U ostatních pacientů bylo vyšetření negativní jak u separované, tak u neseparované kostní dřeně. Z 26 nově diagnostikovaných pacientů bylo 16 pozitivních



v případě separovaných buněk a 8 v případě neseparovaných buněk. U 10 pacientů v relapsu bylo pozitivních 8 v případě separovaných buněk a 2 v případě neseparovaných buněk. Jeden pacient ve stádiu maximální léčebné odpovědi byl pozitivní pro delecí 13q pouze v případě separovaných buněk. Tři pacienti s diagnózou doutnající myelom byli negativní v obou případech.

U pacientů č. 18, 21, 26 se ve vyšetření karyotypu vyskytla změna na chromosomu č. 13, což koreluje s výsledky FISH na separovaných i neseparovaných buňkách. Pacient č. 30 měl v karyotypu nalezeno mimo jiné monozomii chromosomu č. 13, metodou FISH byla potvrzena pouze u separovaných buněk. U pacienta č. 28 se v karyotypu vyskytla delecce chromosomu č. 13, avšak ve vyšetření FISH tato změna byla zaznamenána v nižším procentu než stanovená 9% hranice. Pacient č. 30 měl v karyotypu nalezeno delecce chromosomu č. 13, která byla ve 100% potvrzena metodou FISH na separovaných buňkách, ale na neseparovaných buňkách se vyskytla pod hranicí 9%.

## Diskuse

Čistota pozitivní CD138+ frakce byla při FC hodnocení nižší než při hodnocení cytospinu. Domníváme se, že existuje několik možných vysvětlení tohoto rozdílu: a) vazebná místa pro anti CD138 Ab jsou již obsazena magneticky značenou Ab a tudíž fluorescenčně značená Ab se nemůže navázat; b) v průběhu zpracování vzorku dochází k vymizení znaku CD138, přičemž Jourdan potvrdil, že apoptotické myelomové buňky ztrácejí CD138 (15). Dále Aref zjistil, že hodnoty solubilního sérového sydecanu-1 negativně korelují s jeho buněčnou formou a jejich hladiny v době diagnózy souvisí s prognózou pacientů (16). A také Yang zmiňuje, že „ztracený“, syndecan-1 může být odštěpen prostřednictvím sekretáz a uvolněn do extracelulárního prostoru (17). Bayer-Garner et al. popisuje, že slabá exprese CD138 přináležela vzorkům, jejichž buňky měly porušenou membránu a nacházely se převážně v místech fibrózy (18).

U 40 pacientů s mnohočetným myelomem jsme vyšetřovali metodou interfázní FISH přítomnost monosomie nebo delecce chromosomu č. 13. Předpokládali jsme, že obohacené vzorky kostní dřeně mohou poskytnout více informací o daných cytogenetických změnách, než vzorky připravované klasickým postupem.

U vzorků připravených klasickou technikou jsme delecí chromosomu č. 13 našli ve 25% případech a v 62,5% u separovaných vzorků. V porovnání s pilotní studií Fišerové (13) je záchyt patologie nižší (38,5% respektive 69,2%). Tento rozdíl může být způsoben v našem případě větším souborem pacientů.

Ve většině publikacích se delecce 13q14 vyskytuje kolem 40% (6,12).

Tyto cytogenetické abnormality a abnormality zahrnující chromosom 11 jsou asociovány se zkrácenou dobou přežívání u pacientů, kteří podstoupili autologní transplantaci. Zatím však není znám prognostický význam chromosomových aberací detekovaných FISH u pacientů léčených konvenční chemoterapií (7).

Zaznamenali jsme rozdíly mezi výskytem delecce 13q14 u pacientů v době stanovení diagnózy a ve stádiu relapsu, kdy pacienti s novou diagnózou měli menší záchyt sledované delecce (61,5% resp. 80,0%). Podobné výsledky zaznamenali i Zojer, který publikoval záchyt této delecce použitím sondy pro lokus rb-1 v 13q14 u 46,2% pacientů s novou diagnózou a u 73,3% pacientů v relapsu (19).

Největší záchyt delecce 13q14 měli pacienti ve stádiu II. Zojer uvádí výskyt delecce 13q14 rovněž u pacientů ve stádiu I. Jiné studie potvrzují výskyt této delecce v plazmatických buňkách u pacientů s monoklonální gamapatií nejasného původu. Chromosomální abnormality jsou pozorovatelné už v časně patogenezí maligních chorob postihující plazmatické buňky (19).

Metodou G-pruhování byly nalezeny patologické karyotypy v 6 případech, což představuje 15% sledovaných pacientů. Jednalo se o strukturální a numerické aberace. Sawyer v souboru 200 pacientů zachytil abnormální klony v 32% případů (20). Obecně se u MM abnormální karyotypy zachytí u 40% pacientů. Toto procento je ovlivněno mnoha faktory, záleží na stádiu onemocnění v době diagnózy a zda byl pacient léčen před odběrem kostní dřeně pro cytogenetické vyšetření. Nález předdiploidie je považován za důležitý prognostický faktor, který je provázen špatnou odpovědí na terapii a krátkým celkovým přežitím. Hyperdiploidie je spojována s lepší prognózou, avšak může být asociována s dalšími strukturálními změnami, často se změnami chromosomu č. 13, což vede ke zhoršení prognózy (21). Strukturální přestavby bývají spojovány se špatnou prognózou (22).

Delecce 13q14 je považována za nejsilnější prognostický parametr. Pro detekci chromosomálních abnormalit se používají různé techniky, při použití G-pruhování je zachyceno 10 a více numerických a strukturálních aberací u 40% pacientů s MM. Vzhledem k nízké proliferaci myelomových buněk jsou změny v karyotypu touto metodou zachyceny pouze v 30-40% případů (12). Proto se interfázní FISH jeví jako vhodná metoda pro detekci určitých chromosomálních abnormalit. Při použití selektovaných myelomových buněk vrůstá citlivost této metody.

## Závěr

Cytogenetická analýza u mnohočetného myelomu je velice náročná pro nízký počet plazmatických buněk v kostní dřeni a jejich nízký mitotický index. Cytogenetické nálezy jsou přítomny ve 20 – 60%. Po zavedení moderních molekulárně-cytogenetických metod a zejména interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace se ukazuje, že frekvence chromosomových aberací u nemocných s MM je ve skutečnosti mnohem vyšší. Delecce 13q14 je považována za nejsilnější prognostický parametr. Naše výsledky potvrzují, že použitím interfázní fluorescenční *in situ* hybridizace u imunomagneticky separovaných buněk vrůstá záchyt delecce 13q14.

## Poděkování.

Tato práce je podporována grantem IGA MZ ČR NC 7043 – 3/02 a grantem MSM 143100008.

## Literatura.

1. Nishida B. K., Tamura A., Nakazawa N., at al: The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocation in multiple Myeloma and plasma cell leukemia as detected by *in situ* hybridization. *Blood* 1997, 90(2): 526-534.
2. Freinman R., Sawyer J., Hardin J., at al: Cytogenetics and molecular genetics in multiple myeloma. *Multiple Myeloma* 1997, 11(1): 1-25.
3. Harrison C. J., Mazzulo H., Cheung K.L., at al: Cytogenetics of multiple myeloma: interpretation of fluorescence *in situ* hybridization results. *British Journal of Haematology* 2003, 120: 944-952.
4. Juneau A.L., Kaehler M., Christensen E.R., at al: Detection of RB1 deletions by fluorescence *in situ* hybridization in malignant hematologic disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1998, 103: 117-123.

5. Jarošová M., Ščudla V., Indrák K., at al: Cytogenetické vyšetření u mnohotného myelomu. I. Chromozomální nálezy u 56 nemocných. *Vnitřní lékařství* 1990, 36(11): 1072-1080.
6. Facon T., Avet-Loiseau H., Guillemin G., at al: Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum b2 microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001, 97(6): 1566-1571.
7. Peréz-Simón J.A., Garcia-Sanz R., Tabernero M.D., at al: Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: A FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998, 91(9): 3366-3371.
8. Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J., at al: Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence *in situ* hybridization - defined chromosome 13

- deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II. *British Journal of Haematology* 2003, 120: 44-52.
9. Avet-Loiseau H., Daviet A., Brigaudeau Ch., at al: Cytogenetic, interphase, and multicolor fluorescence in situ hybridization analyses in primary plasma cell leukemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélome and the Groupe Français de Cytogénétique. *Blood* 2001, 97(3): 822-825.
  10. Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J., at al: High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood* 2000, 96(4): 1505-1511.
  11. Gutierrez N.C., Camps J., Hernandez J.M., at al: Multicolor fluorescence in situ hybridization studies in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hematol J.* 2003, 4(1): 67-70.
  12. Liebisch P., Viardot A., Bassermann N., at al: Value of comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization for molecular diagnostic in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2003, 122: 193-201.
  13. Fišerová A., Hájek R., Holubová T., at al: Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. *Neoplasma* 2002, 49(5): 300-306.
  14. Mitelman F., editor. *ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger, 1995.
  15. Jourdan M., Ferlin M., Legouffe E., Horvathova M., at al: The myeloma cell antigen Syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998, 100: 637-46.
  16. Aref S., Goda T., El-Sherbiny M.: Syndecan-1 in multiple myeloma: relationship to conventional prognostic factors. *Hematology* 2003, 8(4): 221-228.
  17. Yang Y., Yaccoby S., Liu W., J. Langford K., at al: Soluble syndecan-1 promotes growth of myeloma tumors in vivo. *Blood* 2002, 100: 610-617.
  18. Bayer – Garner I.B., Sanderson R.D., Dhodapkar M.V., at al: Syndecan-1 (CD 138) immunoreactivity in bone marrow biopsies of multiple myeloma: Shed Syndecan – 1 accumulates in fibrotic regions. *Pathology, Inc.* 14(10): 1052-1058.
  19. Zojer N., Königsberg R., Ackermann J., at al: Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000, 95(6): 1925-1930.
  20. Sawyer J. R., Waldron J. A., Jagannath S., at al: Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995, 82: 41-49.
  21. Smadja N.V., Bastard C., Brigaudeau Ch., at al: Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001, 98(7): 2229-2238.
  22. Fonseca R., Blood E. A., Oken M. M., at al: Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002, 99(10): 3735-3741.

---

## informace

---

### SETKÁNÍ MLADÝCH ONKOLOGŮ

Vážení kolegové, milí přátelé, jak se již stalo tradicí, i letos se koná první červnový víkend **Setkání mladých onkologů**. Proto bychom Vás rádi jménem organizačního výboru pozvali k účasti na této vzdělávací akci, které se v minulém roce zúčastnilo více než 90 lékařů. Setkání se uskuteční ve dnech 3.-5. června 2005 v hotelu Medlov, Fryšava pod Žákovou horou, okres Žďár nad Sázavou. Pro letošní rok jsme pro souhrnné prezentace vybrali dva základní okruhy problémů. Prvním, velmi aktuálním tématem je léčba nádorů hlavy a krku, neboť v souvislosti s nástupem nových radioterapeutických technik i moderních protinádorových léků dochází ke změnám v léčebných přístupech. Druhé téma není většinou onkologů vnímáno jako téma atraktivní – léčba nádorů ve stáří. Ovšem se stoupající střední dél-

kou života a při stále vzrůstajícím podílu osob vyššího věku v populaci nám nezbyvá nic jiného, než se dostatečně a systematicky vzdělávat i v této oblasti onkologie. Program je dále doplněn o další aktuální témata (viz. příloha) a letos poprvé se pokusíme o interaktivní diskusi nad zajímavými případy z klinické praxe. Účastníkům bude v plné výši uhrazeno ubytování i stravování. Zájemci o setkání se mohou přihlásit elektronicky pomocí webového formuláře umístěného na internetové stránce <http://kmo.koc.cz/>. Přijetí přihlášky Vám bude elektronicky potvrzeno.

Za organizátory: **MUDr. Jan Novotný, PhD.**  
**MUDr. Filip Janků**  
 Onkologická klinika VFN a 1. LF UK  
 U nemocnice 2  
 Praha 2, 128 08

# ANALÝZA ZMĚN EXPRESE p53-SIGNÁLNÍCH GENŮ V BUŇKÁCH AKUTNÍ LYMFOLASTICKÉ LEUKÉMIE V ZÁVISLOSTI NA PŮSOBNÍ METHOTREXÁTU

## ANALYSIS OF CHANGES IN EXPRESSION OF p53 SIGNALING GENES IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELLS AFTER METHOTREXATE TREATMENT

HRSTKA R.<sup>1</sup>, MÜLLER P.<sup>1</sup>, VOJTĚŠEK B.<sup>1</sup>, NENUTIL R.<sup>2</sup>, ŠTĚRBA J.<sup>3</sup>, VALÍK D.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ZÁKLADNÁ EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

<sup>2</sup>ODDĚLENÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

<sup>3</sup>KLINIKA DĚTSKÉ ONKOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO, DĚTSKÁ NEMOCNICE, ČERNOPOLNÍ 9, BRNO

<sup>4</sup>ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, ŽLUTÝ KOPEC 7, BRNO

**Souhrn: Úvod:** Mechanismy buněčné odpovědi na inhibici DNA syntézy methotrexátem zůstávají stále do jisté míry ne zcela objasněné. V této práci ukazujeme, že při chemoterapii naivních lymfoblastů izolovaných z kostní dřene od pacientů trpících akutní lymfoblastickou leukémií kultivovaných ex vivo s methotrexátem dochází ke změnám hladiny proteinu p53 i exprese některých genů p53 regulujících i regulovaných. **Metody:** Sledovali jsme indukci proteinu p53 a p53 signálních genů po 24 h ex vivo inkubací s methotrexátem u naivních lymfoblastů izolovaných z kostní dřene. U čtyř pacientů byla provedena imunocytochemická analýza p53 a pomocí cDNA GEArray membrán (www.superarray.com) byly stanoveny změny v expresi genů, které jsou součástí p53 signálních drah. **Výsledky:** Ex vivo experimenty byly prováděny v bezfolátovém mediu, k němuž byl přidán 5-methyltetrahydrofolát na konečnou koncentraci 25 nmol/l, s cílem paralelizovat podmínky lidské plasmu. Celkově bylo zjištěno mírné utlumení transkripční aktivity u ex vivo kultivovaných lymfoblastů po podání methotrexátu. U všech čtyř pacientů, u nichž byla imunocytochemicky pozorovatelná p53 indukce, docházelo prokazatelně ke snížení exprese některých genů uplatňujících se při regulaci buněčného cyklu jako jsou CDC2 (cdk1), SP1, NDRG. Naopak v expresi genů apoptotických drah nebyly detekovány žádné signifikantní změny. V případě genů APEX (Ref-1) a ARF (p16<sup>ink4</sup>), jejichž produkty se uplatňují při interakcích s p53, případně ovlivňují jeho expresi a stabilitu, byly po přidavku methotrexátu rovněž detekovány signifikantní změny v expresi. Z genů, jejichž produkty mají schopnost modifikovat p53, bylo prokázáno snížení exprese po působení methotrexátu, případně roskovitinu, především u genu SIRT1. U dvou pacientů (B-ALL) pak docházelo oproti kontrole k výraznému snížení exprese genu ATM, významného transkripčního faktoru negativně regulujícího buněčný cyklus. Dále byly u všech pacientů zaznamenány inter-individuální změny v expresi genů CSNK1A1, CSNK2, HIPK2 a JNKK2. **Závěr:** Naše výsledky naznačují, že hladina exprese genů se při srovnání B a T typu malignity, i v rámci jednoho typu nemusí přesně shodovat při jinak stejné léčbě za identických podmínek. Determinace změn v expresi p53 signálních genů a indukce samotného proteinu p53 může být důležitou pomůckou při stanovení individuální míry „funkční“ odpovědi na „high-dose“ terapii methotrexátem. Tyto předběžné výsledky by kromě tradičně známého inhibičního vlivu na DHFR měly rozšířit i současné celkové znalosti o působení methotrexátu na buněčné úrovni. Podařilo se nám identifikovat zhruba 11 genů, u kterých docházelo ke změně v expresi u všech sledovaných pacientů. Takto vytipované geny a jejich produkty budou podrobeny další funkční analýze na vhodných modelových systémech s cílem nalézt souvislost mezi expresí daných genů, jimi kódovaných proteinů, typem onemocnění a mechanismem účinku cytostatika.

**Klíčová slova:** p53, genová exprese, methotrexát, akutní lymfoblastická leukémie

**Abstract: Background:** Cellular events occurring downstream from the inhibition of DNA synthesis by methotrexate have remained largely unexplored. Here, we show that chemotherapy-naive lymphoblasts isolated from bone marrow of patients with acute lymphoblastic leukemia cultivated ex vivo with methotrexate resulted in changes in expression of the p53 protein and in upregulation of several p53-regulating genes. **Methods:** We investigated induction of p53 protein and p53-dependent genes after 24 hour ex vivo incubation with methotrexate in chemotherapy-naive, bone marrow lymphoblasts taken prior to any therapy. To date, we completed immunocytochemical analysis of p53 and determined changes in expression of genes involved in p53-dependent biological pathways in four patients using cellular pathway-oriented GEArray membranes (www.superarray.com) enabling analysis of 112 transcripts. **Results:** Ex vivo experiments were performed with folate-free medium to which 5-methyl tetrahydrofolate was added to the concentration 25 nmol/l to parallel serum conditions. GEArray experiments showed overall decrease of mRNA expression in ex vivo cultivated lymphoblasts after methotrexate treatment. In the fourth patient, also with immunocytochemically observable p53 induction, we observed decrease of expression of several cell cycle-regulating genes such as CDC2 (cdk1), SP1, NDRG (n-myc downstream regulated gene) whereas apoptosis-related genes did not change their expression levels. The APEX (Ref-1) and ARF (p16<sup>ink4</sup>), the p53-upstream signaling genes encoding proteins involved in p53 interactions showed variable expression. Genes encoding transcription regulators ATM (2 patients with B-ALL) and SIRT1 (4 patients) participating in p53 interactions showed significant decrease of their expression. Interindividual differences were also observed in genes involved in p53 pathways such as CSNK1A1, CSNK2, HIPK2 and JNKK2 gene. **Conclusions:** We have observed variable induction of p53 and expression of p53-controlled genes. This result may imply that a disorder – though classified as B- or T- type malignancy – may not respond identically to otherwise identical treatment under identical conditions. We suggest that assessment of changes in expression of p53-controlled genes and p53 protein status may be a tool to determine an intraindividual rate of „functional“ response to high-dose methotrexate therapy. These preliminary results may broaden our understanding on the mechanism of methotrexate action at the cellular level going beyond the traditional DHFR inhibition effect. We succeeded in identifying about 11 genes where changes in expression were observed in all patients. Those genes and their products will be subject of additional investigations to find out connections between gene expression, their products, type of disease and mechanism of therapy response.

**Key words:** p53, gene expression, methotrexate, acute lymphoblastic leukemia

## Teoretický úvod

V leukemogenezi hrají pravděpodobně zásadní roli chromozomální přestavby, přesto proteiny exprimované jako důsledek těchto translokací nejsou obvykle dostačující k plnému rozvinutí onemocnění. Stejně jako u solidních nádorů je k plnému rozvoji maligního fenotypu krevní buňky nutných více genetických změn a k jejich vzniku může přispívat především genomová nestabilita. Pro vývoj hematologického onemocnění jsou pak nezbytné další mutace, které se vyskytnou jen u malé podskupiny jedinců (1, 2).

Antagonisté kyseliny listové byly při terapii u dětských hemoblastos poprvé použity v roce 1948 (3). Jejich zavedení do klinické praxe významně přispělo ke zlepšení prognózy u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií. Hlavním a doposud nejvíce používaným antifolátem je methotrexát (4-amino, 10-methylpterin). Methotrexát je strukturálním analogem kyseliny listové, která je esenciálním kofaktorem řady kritických reakcí v eukaryotických buňkách. Je silným inhibíto-

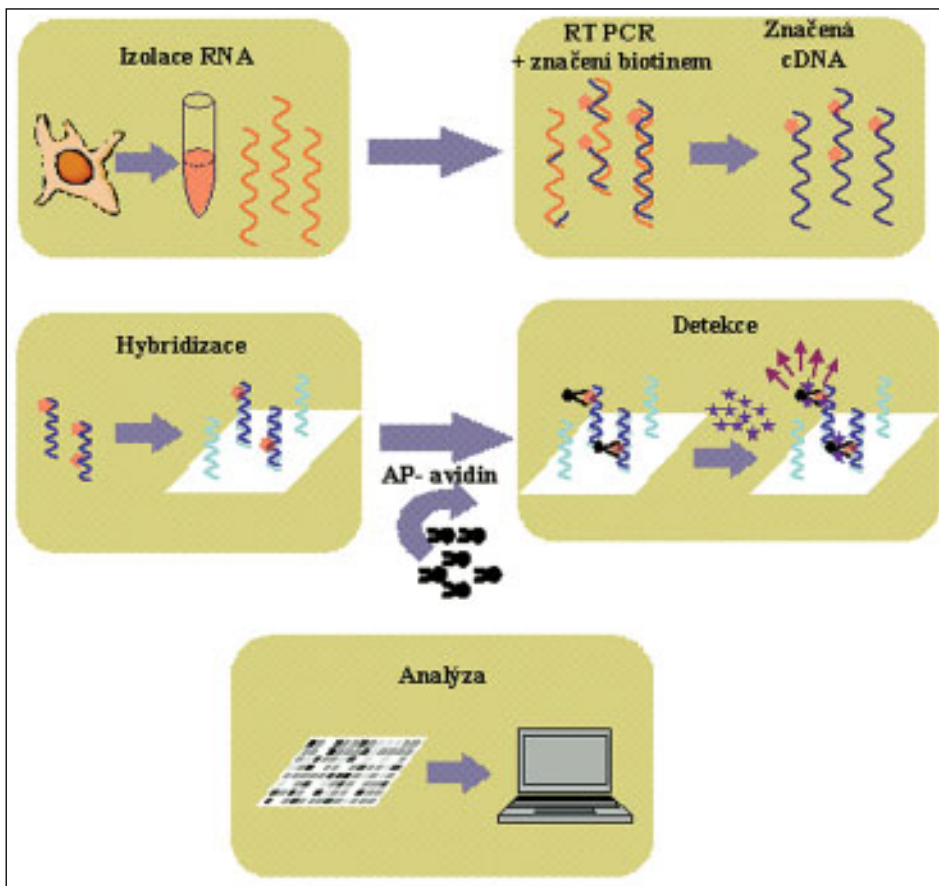
rem enzymu dihydrofolátreduktasy, který se významně podílí na regulaci homeostázy intracelulárních folátů (4, 5). Mechanismus účinku a farmakogenetika antifolátů byly v poslední době shrnuty v řadě přehledných článků (4, 6, 7). Zajímavý se jeví vztah antifolátů k plazmatickým hladinám homocysteinu (7); zdá se, že podávání antifolátů konsistentně zvyšuje hladiny plazmatického homocysteinu. Ačkoli je o antifolátovém účinku methotrexátu známo mnoho, distální účinky folátových antagonistů na buněčné úrovni zůstávají víceméně nejasné. V rámci naší studie předpokládáme, že poškození DNA, vznikající jako následek působení antifolika, vede podobně jako u řady dalších genotoxických vlivů k aktivaci antionkogenu p53. Jeho aktivace může dále vyústit ve dva diametrálně odlišné distální jevy – apoptózu nebo zástavu buněčného cyklu (8-12). Při terapii zhoubného onemocnění je apoptóza žádoucím konečným efektem. Naopak zástava buněčného cyklu pak může vést k vytvoření časového úseku, v němž může docházet k selekci buněčných forem resistantních na podávanou terapii.

## Materiál a metody

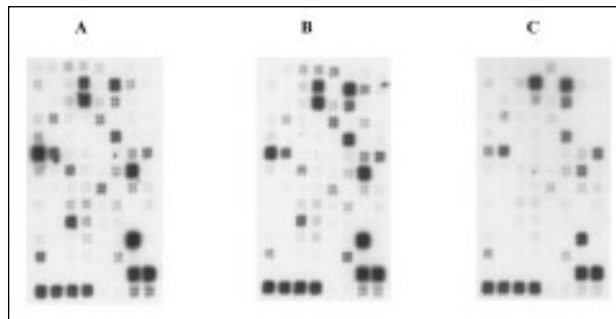
### Klinický materiál

U pacientů léčených na klinice dětské onkologie s diagnózou akutní lymfoblastické leukémie jsme z alikvoty diagnostického vzorku kostní dřeně ihned izolovali naivní maligní blasty pomocí systému Lymphoprep. Blasty byly následně převedeny do bezfolátového media, k němuž jsme přidali 5-methyltetrahydrofolát na konečnou koncentraci 25 nmol/l, abychom paralelizovali podmínky lidské plazmy. Běžná kultivační media totiž obsahují foláty, jednak v různých formách a jednak v cca tisícinásobném přebytku ve srovnání s fyziologickými podmínkami lidské plazmy. Do kultivačního media jsme přidali i) methotrexát na cílovou koncentraci 40  $\mu\text{mol/l}$ , ii) ros-

Obr. 1: Schematické znázornění cDNA GEArray metody zahrnující izolaci RNA, přípravu sond, hybridizaci, chemiluminiscenční detekci a analýzu.



Obr. 2: Ukázka dosažených výsledků u pacienta B1, kdy intenzita jednotlivých tetramerních spotů odpovídá transkripční aktivitě příslušných genů: A) hladina mRNA po 24 h kultivaci v mediu; B) hladina mRNA po 24 h kultivaci v mediu po přidavku methotrexátu; C) hladina mRNA po 24 h kultivaci v mediu po přidavku roskovitinu.



kovitin v koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$ , iii) DMSO jako kontrolu. Blasty jsme kultivovali po dobu 24 hod, abychom paralelizovali in vivo podmínky, za nichž je podáván methotrexát pacientům ve schématu „high-dose“ dle protokolu ALL-BFM95.

### Imunocytochemická detekce proteinu p53

Suspenze lymfocytů pro cytospin byla fixována standardním, komerčně dostupným sprejem CYTO-fixation a uchována na temném suchém místě. Před vlastním barvením byla skla promyta v 50% etanolu 30 minut a následně hydratována v destilované vodě 30 minut. Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována po dobu 15 minut 3% roztokem  $\text{H}_2\text{O}_2$  v PBS (fyziologický roztok pufovaný fosfátem na pH 7,5). Primární monoklonální protilátka DO1 [myší monoklonální protilátka

rozlišující N-koncovou oblast proteinu p53 (sekvenci aminokyselin 20-SDLWKL-25)] (13, 14) byla aplikována na buňky při teplotě 4 °C přes noc. Po trojném promytí v PBS byla nanesena anti-myši sekundární protilátka značená biotinem a ABC reagensie (Vector Elite ABC kit, Vector) přesně dle návodu a doporučení dodavatelem. Peroxidázová aktivita byla vizualizována kitem DAB+ (Dako, Denmark).

### **Analýza exprese p53 signálních genů**

Expres p53-dependentních genů byla monitorována pomocí technologie cDNA GEArray (SuperArray Bioscience Corporation) (obr. 1, 2). Na rozdíl od metody mikročipových arrays, pomocí kterých je možné analyzovat současně tisíce genů, jsou GEArray testy schopny sledovat expresi jen přibližně stovky genů, avšak jejich výraznou výhodou vzhledem k metodě „microarray“ je podstatně nižší finanční nákladnost, jednodušší technické zázemí, dobrá reprodukovatelnost a snazší vyhodnocování. Další nezanedbatelnou výhodou tohoto metodologického přístupu je možnost si pro vlastní analýzu vytipovat vhodnou skupinu genů, která se vztahuje přímo ke studované problematice. V našem provedení je tato metoda principiálně založena na přípravě cDNA práb značených biotinem, které jsou použity k hybridizaci se sondami umístěnými na membránách, jež představují specifické sekvence jednotlivých genů. Po provedení hybridizace a příslušných promývacích kroků se na biotin váže streptavidin konjugovaný s alkalickou fosfatázou a následuje detekce založená na chemiluminiscenci. Spoty představující expresi jednotlivých genů pak byly hodnoceny pomocí programu TotalLab a získané hodnoty byly normalizovány vzhledem k expresi „housekeeping“ genu GAPDH kódujícího glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu. Zde uvádíme přehled všech p53 -signálních genů, jejichž exprese byla touto metodou analyzována.

**p53 rodina:** TP53, TP63, TP73

**p53 upstream signální geny:**

Geny ovlivňující expresi a stabilitu p53: BZRP (pBR), CREBBP (CBP), D5S346 (DP1), E2F1 (E2F), EP300 (p300), MDM2, MTBP, NFKB1, NUMB

Geny modifikující p53: ATM, ATR, CCNH (cyclin H), CDK7 (CAK), CHEK1 (Chk1), CHEK2 (Chk2), CREBBP (CBP), CSNK1A1 (CK1), CSNK2A1, CSNK2A2, CSNK2B, EP300 (p300), HIPK2, KIP2, KIP3, MAP2K4, MAP2K7, MAPK8IP2, PCAF, PML, PRKCA, PRKCB1, PRKCG, PRKCQ, PRKDC (DNA-PK), SIRT1

Geny jejichž produkty se uplatňují při p53 interakcích: APEX (Ref-1), BAP1, BRAP, BRCA1, CDKN2A (p14ARF), E1B-AP5 (E1B55K), E2F1, MDM2, MYC, RASA1 (Ras), RB1 (pRB), TEAD1 (SV40), WRN, WT1

**p53 downstream signální geny:**

Geny regulující buněčný cyklus: ABCB1 (MDR1), ACTA1 (actin), AD022, APR-3, CDC2, CDKN1A (P21Waf1), DAXX, ESR1, FADD, FAF1, GADD45A, GTSE1 (B99), HIF1A, HSPA4 (Hsp70), LRDD, MAP4, NDRG (RTP), PIG8 (E124), PMP22, RELA, REPRIMO, SFN (14-3-3), SP1, STAT5A, TBP, THRA, TNFAIP1, TNFSF6, TP53TGI, TRAF1, TRAF4, TRAF5, WIG1

Regulatory apoptózy: APAF1, BAX, BBC3 (PUMA), BCL2, CASP9 (Caspase-9), CTSD (Cathepsin D), LRDD (PIDD), P53AIP1, PMAIP1 (NOXA), PMP22 (GAS-3), TNF, TNFRSF10B (Killer5/DR5), TNFSF6 (Fas), TP53BP2 (ASPP2)

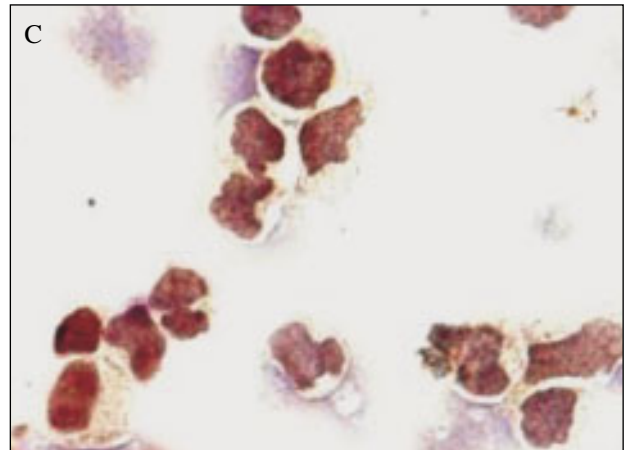
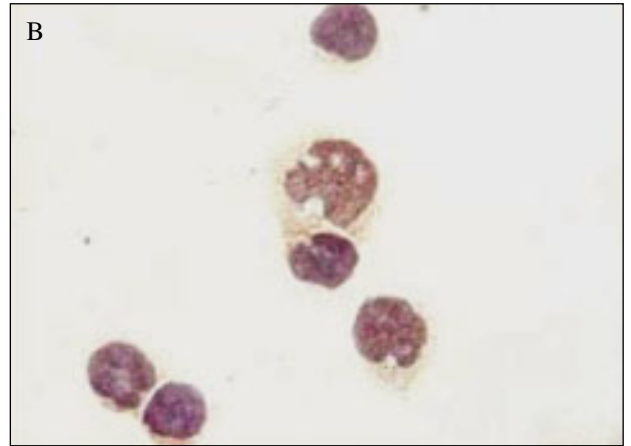
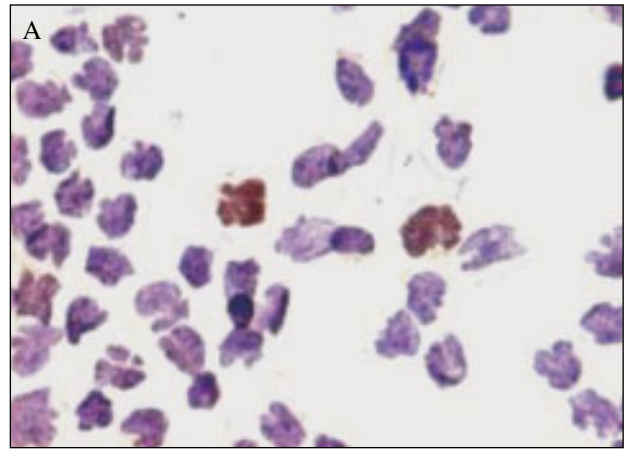
Geny podílející se na DNA opravách: GADD45A, RRM2B (p53R2)

Geny kontrolující angiogenezi a tvorbu metastáz: BAI1, SERPINB5 (Maspin), THBS1 (TSP1)

### **Výsledky a diskuse**

Kromě genů TP53, TP63 a TP73, které se souhrnně označují jako tzv. „p53 rodina“ (15), lze analyzované geny vzhledem

**Obr. 3:** Imunocytochemické stanovení ex-vivo indukce proteinu p53 v naivních blastech pomocí monoklonální protilátky DO1: A) indukce p53 před kultivací; B) indukce p53 po 24 h kultivaci v mediu; C) Indukce p53 po 24 h kultivaci v mediu po přidávku methotrexátu.



k jejich postavení vůči p53 rozdělit do dvou skupin, a to na geny p53 regulující (p53 upstream signal/p53 modifiers) a geny p53 regulované (p53 downstream signal/p53 effectors). Expres p53 signálních genů byla monitorována u 3 pacientů (pracovně označených B1 - B3) s diagnózou akutní lymfoblastická leukémie typu B (B-ALL) a jednoho pacienta (pracovně označeného jako T) s diagnózou akutní lymfoblastická leukémie typu T (T-ALL). U těchto 4 pacientů jsme primárně provedli imunocytochemické barvení a imunochemickou detekci proteinu p53 a zjistili jsme různou úroveň exprese. Příklad imunocytochemické detekce proteinu p53 je uveden na



**Tab.1:** Expres vybraných p53 signálních genů u jednotlivých pacientů. Vlastní exprese daných genů je vyjádřena v procentech vzhledem k expresi „housekeeping“ genu GAPDH. <sup>1</sup>Expres genů u naivních blastů po 24 h kultivaci pouze v mediu, <sup>2</sup>expres genů u naivních blastů po přidavku methotrexátu, <sup>3</sup>expres genů u naivních blastů po přidavku roskovitinu.

Status p53	Unigene ID	GeneBank number	Gen	Pacient B1			Pacient B2			Pacient B3			Pacient T		
				K <sup>1</sup>	Me <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	K	Me	R	K	M	R	K	Me	R
Apoptóza	Hs.87246	NM_014417	<b>BBC3</b>	118	128	82	523	100	184	514	194	259	124	138	102
B-lyk	Hs.318567	NM_006096	<b>NDRG</b>	36	7	20	204	83	69	359	102	268	13	20	3
	Hs.334562	NM_001786	<b>CDC2</b>	21	6	2	11	9	0	83	14	0	29	3	3
	Hs.9460	NM_138473	<b>SP1</b>	25	22	6	486	46	100	314	58	61	20	17	10
Regulace p53	Hs.73722	NM_080649	<b>APEX</b>	16	43	20	80	57	78	50	28	37	32	28	9
	Hs.421349	NM_000077	<b>ARF</b>	54	92	61	378	100	218	183	155	207	33	53	42
	Hs.318381	NM_001892	<b>CSNK1A1</b>	58	30	29	0	21	68	243	83	138	34	19	3
	Hs.73527	NM_001320	<b>CSNK2B</b>	57	60	9	76	31	44	27	16	0	35	11	4
	Hs.110299	NM_145185	<b>MKK7</b>	79	75	82	370	85	143	638	141	153	48	67	36
	Hs.31176	NM_012238	<b>SIRT1</b>	114	106	6	0	10	35	226	40	72	80	12	4
	Hs.397465	NM_022740	<b>HIPK2</b>	85	93	92	113	49	101	304	126	90	59	95	62
	Hs.169476	NM_002046	<b>GAPDH</b>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

obr. 3. V první fázi jsme ověřovali, zda exprese sledovaných genů není ovlivněna kultivací naivních blastů v mediu. Zjistili jsme, že obecně při kultivaci v proklamovaných podmínkách dochází ke statisticky významným změnám v expresi pouze několika genů.

Při sledování exprese všech studovaných genů u pacienta označeného T jsme zaznamenali po podání methotrexátu resp. roskovitinu výrazné snížení celkové exprese. Při analýze významných změn u jednotlivých genů převažoval trend snižování genové exprese po podání výše uvedených látek. U řady genů se pak exprese nezměnila, avšak je třeba zmínit dvojici genů, u kterých naprosto neočekávaně docházelo v porovnání s ostatními geny ke zvýšení exprese. Jedná se o gen BBC3 – kódující protein Puma uplatňující se při p53-regulované apoptóze, kdy vazbou na Bcl2 umožňuje uvolňování cytochromu c z mitochondrií (16). Druhým silně exprimovaným genem je BAP1 – jedná se o BRCA1 asociovaný protein uplatňující se především při negativní regulaci buněčné proliferace (17). U 4 genů pak byla zjištěna zvýšená transkripční aktivita: ARF, HIPK2, ASPP2, WIG1. Oproti kontrolním lymfoblastům došlo u 3 genů ke zvýšení exprese po přidání methotrexátu a naopak ke snížení exprese po přidavku roskovitinu (JNKK2, FAF1 a TP63). U všech 3 pacientů s B-ALL, stejně jako u pacienta T-ALL byla prokázána výrazně silná exprese genu BBC3, která se ovšem zásadně neměnila ani po přidavku methotrexátu resp. roskovitinu.

Při porovnání zastoupení jednotlivých genů a typu změn v jejich expresi se ukázalo, že jednotliví pacienti se mezi sebou lišili, a to jak kvalitativně v genech, u nichž byla prokázána exprese, tak i kvantitativně v hladině exprese po podání methotrexátu nebo roskovitinu. Předpokládáme, že tento jev je způsoben jednak genetickým pozadím analyzovaných jedinců a především pak charakterem buněčné odpovědi na inhibici cílového enzymu dihydrofolátreduktázy. Existuje totiž celá řada více či méně složitých mechanismů, které se podílejí na udržení homeostázy v metabolismu folátů (5). Řada s tímto spojených procesů vykazuje poměrně velkou míru inter-individuální variability a tato variabilita je v řadě případů podmíněna genetickými faktory.

Hlavním cílem naší studie bylo vytipovat geny, jejichž exprese vykazuje společné rysy a mohly by tedy představovat kandidátní geny pro potencionální markery vhodné pro sledování vývoje onemocnění a hlavně odpovědi na terapii. Zaměřili jsme se na hledání těch genů, u nichž docházelo po dávce cytostatika ke změnám exprese u všech pacientů (tab. 1). Z p53 dependentních genů uplatňujících se při regulaci apoptózy nebyl s výjimkou silně exprimovaného genu BBC3 nalezen žádný gen, jehož exprese by byla u všech pacientů obdobná. Oproti tomu se zdá, že geny buněčného cyklu by mohly hrát

mnohem významnější roli, kdy v porovnání s blasty kultivovanými pouze v mediu (s definovanou koncentrací folátu ve formě 5-methyltetrahydrofolátu) prokazatelně u všech pacientů B-ALL docházelo ke změnám v expresi genů CDK1, NDRG a SP1 po působení jak methotrexátu, tak i roskovitinu. Zajímavé poznatky byly získány i při sledování exprese genů, které se uplatňují při interakcích s p53, popřípadě ovlivňují jeho expresi a stabilitu. U genů APEX (Ref-1) a ARF (p16<sup>ink4</sup>) docházelo po přidavku methotrexátu k signifikantní změně exprese, dále pak v případě 2 B-ALL pacientů docházelo po působení methotrexátu ke snížení exprese u genu GAP, který má funkci jako aktivátor p21<sup>RAS</sup>, jenž se uplatňuje při regulaci buněčné proliferace a diferenciace (18). Zbývající, neméně důležitou skupinou, jsou geny, jejichž produkty mají schopnost modifikovat p53. Z těchto genů byla prokazatelně snižovaná exprese po působení methotrexátu, případně roskovitinu, zaznamenána u SIRT1, který se podílí na deacetylaci proteinu p53, čímž ovlivňuje jeho transkripční aktivitu (19). U dvou pacientů (B2 a B3) pak docházelo oproti kontrole k výraznému snížení exprese genu ATM, jehož produkt je významným členem rodiny fosfatidylinositol-3 kináz. Tato kináza má schopnost specificky fosforylovat protein p53 s cílem ho aktivovat a stabilizovat v rámci odpovědi na poškození DNA (20). Dále byly u všech tří pacientů s B-ALL zaznamenány změny v expresi genů CSNK1A1, CSNK2, HIPK2 a JNKK2.

## Závěry

Pomocí cDNA GEArray byly porovnány expresní profily maligních naivních blastů u jednotlivých pacientů po inkubaci s methotrexátem a/nebo roskovitinem, neboť stanovení změn v expresi p53 signálních genů může pomoci při stanovení míry intra-individuální odpovědi na high-dose terapii methotrexátem. Tyto předběžné výsledky by kromě tradičně známého inhibičního vlivu na DHFR měly rozšířit současné celkové znalosti o působení methotrexátu na buněčné úrovni. Podářilo se nám identifikovat celkem asi 11 genů, u kterých docházelo ke změně v expresi u všech sledovaných pacientů. V případě, že bude docházet k expresi těchto genů i u dalších pacientů, mohou sloužit jako potenciální markery onemocnění. Takto vytipované geny a jejich produkty budou podrobeny další funkční analýze na vhodných modelových systémech s cílem nalézt souvislost mezi expresí daných genů, jimi kódovaných proteinů, typem onemocnění a mechanismem účinku cytostatika. Získané výsledky by se pak mohly stát podkladem pro cílenou terapii.

*Práce byla podporována grantovými projekty IGA MZ ČR NC7104-3, NC7131-3 a MZO 00209805.*

## Literatura

1. Hunger S. P. and Cleary M. L.: What significance should we attribute to the detection of MLL fusion transcripts? *Blood* 1998; 92(3):709-11.
2. Falini B. and Mason D. Y.: Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 2002; 99(2):409-26.
3. Farber S., Diamond L. K., Mercer R. D. and al. e.: Temporary remission of acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroylglutamic acid (aminopterin). *N. Engl. J. Med.* 1948; 238(787-93).
4. Kraljic M. and Moghrabi A.: Pharmacogenetics of methotrexate. *Pharmacogenomics* 2004; 5(7):819-34.
5. Demlová R., Radina M., Sterba J. and Valík D.: Folate: fyziologie, metabolismu a mechanismu rezistence na jejich antagonistu. *Klinická onkologie* 2004; 17(6):185-89.
6. Zhao R. and Goldman I. D.: Resistance to antifolates. *Oncogene* 2003; 22(47):7431-57.
7. Valík D., Radina M., Sterba J. and Vojtesek B.: Homocysteine: exploring its potential as a pharmacodynamic biomarker of antifolate chemotherapy. *Pharmacogenomics* 2004; 5(8):1151-62.
8. Lane D. P.: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381):15-6.
9. Lowe S. W., Schmitt E. M., Smith S. W., Osborne B. A. and Jacks T.: p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362(6423):847-9.
10. Lowe S. W., Ruley H. E., Jacks T. and Housman D. E.: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993; 74(6):957-67.
11. Nelson W. G. and Kastan M. B.: DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 1994; 14(3):1815-23.
12. Graeber T. G., Osmanian C., Jacks T., Housman D. E., Koch C. J., Lowe S. W. and Giaccia A. J.: Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379(6560):88-91.
13. Vojtesek B., Bartek J., Midgley C. A. and Lane D. P.: An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods* 1992; 151(1-2):237-44.
14. Stephen C. W., Helminen P. and Lane D. P.: Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. *J Mol Biol* 1995; 248(1):58-78.
15. Ceskova P., Valík D. and Vojtesek B.: What we currently know about the structure and function of the p53 homologue - p73 protein: facts, hypotheses and expectations. *Folia Biol (Praha)* 2003; 49(1):1-8.
16. Yu J., Zhang L., Hwang P. M., Kinzler K. W. and Vogelstein B.: PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001; 7(3):673-82.
17. Jensen D. E., Proctor M., Marquis S. T., Gardner H. P., Ha S. I., Chodosh L. A., Ishov A. M., Tommerup N., Vissing H., Sekido Y., Minna J., Borodovsky A., Schultz D. C., Wilkinson K. D., Maul G. G., Barlev N., Berger S. L., Prendergast G. C. and Rauscher F. J., 3rd: BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* 1998; 16(9):1097-112.
18. Friedman E., Gejman P. V., Martin G. A. and McCormick F.: Nonsense mutations in the C-terminal SH2 region of the GTPase activating protein (GAP) gene in human tumours. *Nat Genet* 1993; 5(3):242-7.
19. Vaziri H., Dessain S. K., Ng Eaton E., Imai S. I., Frye R. A., Pandita T. K., Guarente L. and Weinberg R. A.: hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 2001; 107(2):149-59.
20. Khanna K. K., Keating K. E., Kozlov S., Scott S., Gatei M., Hobson K., Taya Y., Gabrielli B., Chan D., Lees-Miller S. P. and Lavin M. F.: ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* 1998; 20(4):398-400.

---

# informace

---

## ANALYTICKÁ CYTOLOGIE III.

Česká společnost pro analytickou cytologii (ČSAC) pořádá ve dnech 22. – 26. června 2005 již třetí v sérii úspěšných konferencí určených teoreticky, experimentálně i prakticky zaměřeným pracovníkům výzkumných ústavů, klinických pracovišť a vysokých škol, kteří mají zájem o nejrůznější

metodologie z oblasti analytické cytologie. Konference „Analytická cytometrie III“ za účasti předních zahraničních specialistů se bude konat v atraktivním prostředí horského hotelu Červenohorské sedlo v pohoří Hrubého Jeseníku. Další informace budou postupně uveřejňovány na webovské stránce ČSAC: <http://www.ibp.cz/conferences/cytometrie/index.html>

---

## MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV V BRNĚ

pod záštitou

České onkologické společnosti ČLS JEP, Společnosti radiační onkologie, biologie a fyziky,  
České asociace sester, Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Univerzitního onkologického centra,  
Národního centra ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně

pořádá

### XXIX. BRNĚNSKÉ ONKOLOGICKÉ DNY

s

### XIX. KONFERENCÍ PRO SESTRY A LABORANTY

s mezinárodní účastí  
26.–28. května 2005

*Místo konání:* Hotel Voroněž, Křížkovského 47, Brno

*Jednací řeč:* čeština, slovenština, angličtina

*Sekretariát organizačního výboru:* Eva Čechmanová, tel.: 543 132 450, fax: 543 132 455, e-mail: [cechmanova@mou.cz](mailto:cechmanova@mou.cz)



# KOURENÍ A RIZIKO VZNIKU KARCINOMU PLIC PODLE HISTOLOGICKÝCH TYPŮ

## SMOKING AND LUNG CANCER RISK BY HISTOLOGIC TYPE

KOLLÁROVÁ H.<sup>1</sup>, ČÍZEK L.<sup>1</sup>, KOUTNÁ J.<sup>2</sup>, BEŠKA F.<sup>3</sup>, LORENC J.<sup>3</sup>, JANOUT V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ÚSTAV PREVENTIVNÍHO LÉKAŘSTVÍ, LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY PALACKÉHO, OLOMOUČ

<sup>2</sup> ONKOLOGICKÉ ODDĚLENÍ, M-VIA NOVA LTD, ZÁBŘEH

<sup>3</sup> KRAJSKÉ PRACOVÍŠTĚ NÁRODNÍHO ONKOLOGICKÉHO REGISTRU, FAKULTNÍ NEMOCNICE, OSTRAVA

**Souhrn: Východiska:** Kouření je akceptováno jako hlavní rizikový faktor pro vznik karcinomu plic. Kouření se však uplatňuje v různé míře u jednotlivých histologických typů karcinomu plic. Studie analyzuje vztah kouření k jednotlivým histologickým typům karcinomu plic u nemocných z okresu Šumperk. **Typ studie a soubor:** Jednalo se o studii případů a kontrol, ve které byl analyzován vztah kouření k jednotlivým histologickým typům karcinomu plic u 451 případů a 37 769 kontrol. **Metody a výsledky:** Bylo stanoveno odds ratio pro srovnání významu kouření u jednotlivých histologických typů a u mužů a žen. U spinocelulárního a malobuněčného karcinomu byly hodnoty odds ratio 17,9 a 18,6, zatímco u adenokarcinomu a velkobuněčného karcinomu 7,4 a 9,4. **Závěry:** Studie potvrdila výraznější vztah mezi kouřením a spinocelulárním a malobuněčným histologickým typem na rozdíl od adenokarcinomu a velkobuněčného karcinomu.

**Klíčová slova:** karcinom plic, kouření, histologické typy, studie případů a kontrol, odds ratio

**Summary: Backgrounds:** Smoking is accepted as a main risk factor for lung cancer. It has different importance in individual histological types. This study analyses smoking in relation to different histological types of lung cancer cases from the Šumperk district. **Design and Subject:** A case-control study has been used for analysis of smoking in relation to histological types of 451 lung cancer cases and 37.769 controls. **Methods and Results:** Odds ratio has been used to compare the relationship between smoking and histological types of lung cancer both in men and women. Odds ratio 17,9 and 18,6 was found for squamous and small cell types whiles treached 7,4 and 9,4 for adenocarcinoma and large cell types. **Conclusion:** This study confirms that smoking represents a more pronounced risk factor for squamous and small cell carcinoma than for adenocarcinoma and large cell type of lung cancer.

**Key words:** lung cancer, smoking, histological types, case-control study, odds ratio

### Úvod

Nádorová onemocnění celosvětově představují druhou nejčastější příčinu úmrtí zejména v rozvinutých zemích. Mezi nejzávažnější nádorová onemocnění řadíme také karcinom plic, který patří k nejčastějším příčinám úmrtí na nádorová onemocnění. Světová incidence karcinomu plic byla v roce 2002 1 352 132 osob a ve stejném roce zemřelo na toto onemocnění 1 178 918 osob (1).

V České republice má karcinom plic stále mírně stoupající trend, který je výsledkem trvale rostoucího počtu onemocnění u žen (2). Celkově byla incidence na karcinom plic v České republice v roce 2002 6 198 osob z tohoto počtu bylo 4 891 mužů a 1 307 žen a ve stejném roce zemřelo na karcinom plic 5 860 osob z toho 4 500 mužů a 1 272 žen (1).

I když karcinom plic je onemocnění s multifaktoriální etiologií, nejvýznamnějším rizikovým faktorem je kouření, které způsobuje toto onemocnění z 83 až 94% u mužů a z 57 až 80% u žen (3). Kouření se jako rizikový faktor uplatňuje u všech histologických typů karcinomu plic, ale podle údajů v literatuře se jako hlavní rizikový faktor podílí zejména na vzniku spinocelulárního a malobuněčného karcinomu plic (4).

V České republice se histologické typy verifikovaných karcinomů plic sledují od roku 1985 (3). Nejčastějším typem je stále spinocelulární karcinom plic, i když v průběhu let je pozorován mírný pokles, naopak postupně přibývá adenokarcinomů a malobuněčných karcinomů plic. Rozdíly ve spektru histologických typů u mužů a žen jsou pravděpodobně vysvětlitelné především rozdílnými kuřáckými návyky, i když se předpokládá, že jiné faktory než kouření se mohou u žen uplatňovat ve větší míře než u mužů (5).

Karcinom plic má sice řadu histologických typů, ale nejedná se o homogenní jednotku a podle projevu a možnosti léčby se

rozlišují především dvě skupiny, malobuněčný karcinom (SCLC) a nemalobuněčné karcinomy plic (NSCLC). Dle tohoto dělení je karcinomů řazených do skupiny NSCLC asi 75 až 80% a ve skupině SCLC 20 až 25% (6).

Cílem předložené studie bylo zhodnotit vliv kouření na jednotlivé histologické typy karcinomu plic.

### Materiál a metody

Pro vyhodnocení vlivu kouření na vznik jednotlivých histologických typů karcinomu plic byla použita analytická observační studie případů a kontrol z databáze preventivních onkologických prohlídek šumperského regionu, která zahrnuje 49 426 osob sledovaných v letech 1975-1978. Tato databáze se v roce 2002 propojila s nádorovým registrem, kde bylo celkem registrováno 7 699 osob, které měly nádorové onemocnění (7). Z tohoto souboru bylo vybráno celkem 998 osob s karcinomem plic, z nichž u 547 osob sice byla stanovena diagnóza karcinomu plic, ale nebylo provedeno nebo zaznamenáno histologické vyšetření. Pro účely prezentované studie byly tedy použity údaje od 451 nemocných s karcinomem plic, které byly rozděleny podle jednotlivých histologických typů. Kontrolní skupina byla tvořena 37 769 osobami z této databáze, které neměly onemocnění karcinomem plic.

### Výsledky

Celkově bylo hodnoceno 451 případů karcinomu plic, jejichž průměrný věk byl  $46.9 \pm 8.2$  a 37 769 kontrol jejichž průměrný věk byl  $43.6 \pm 9.8$ . Průměrný věk (v době zjišťování expozice) u případů se významně nelišil u jednotlivých histologických typů (spinocelulární 47,5, malobuněčný 47,0, adenokarcinom 48,9) s výjimkou velkobuněčného karcinomu, kde byl 55,5.

Tabulka 1. Základní demografické charakteristiky případů a kontrol.

Věk	Muži				Ženy				Celkem
	Případy		Kontroly		Případy		Kontroly		
	Kuřáci	Nekuřáci	Kuřáci	Nekuřáci	Kuřáci	Nekuřáci	Kuřáci	Nekuřáci	
≤ 34	22	1	2382	1244	4	3	1470	3749	8875
35 - 65	351	20	7777	5513	21	29	1829	13674	29214
≥ 66	0	0	37	40	0	0	0	54	131
<b>Celkem</b>	373	21	10196	6797	25	32	3299	17477	38220

Tabulka 2. Rozdělení případů podle histologického typu a pohlaví.

Pohlaví	Spinocelulární		Adenokarcinom		Malobuněčný		Velkobuněčný		Celkem
	Kuřáci	Nekuřáci	Kuřáci	Nekuřáci	Kuřáci	Nekuřáci	Kuřáci	Nekuřáci	
<b>Muži</b>	202	12	77	5	73	3	20	2	394
<b>Ženy</b>	5	9	9	16	10	5	1	2	57
<b>Celkem</b>	207	21	86	21	83	8	21	4	451

Tab. 3. Rozdělení případů podle histologického typu a rizika kouření.

Histologický typ	Počet	%	OR pro kouření
Spinocelulární	228	50,6	17,9 (11,2 – 28,9)
Adenokarcinom	107	23,7	7,4 (4,5 – 12,4)
Malobuněčný	91	20,2	18,6 (8,7 – 41,6)
Velkobuněčný	25	5,5	9,4 (3,1 – 32,8)
<b>Celkem</b>	451	100,0	

Tabulka 4. Velikost OR podle histologického typu a pohlaví.

Pohlaví	Spinocelulární	Malobuněčný	Adenokarcinom	Velkobuněčný
Muži	11,2	16,0	10,3	6,7
Ženy	2,9	10,6	3,0	2,6
<b>Celkem</b>	17,9	18,6	7,4	9,4

Na tabulce 1 jsou popsány základní demografické charakteristiky u případů a kontrol.

Tabulka 2 ukazuje rozdělení případů karcinomu plic podle histologických typů, pohlaví a kouření. Převážná většina případů byly muži (394 případů), žen bylo pouze 57. Nejvyšší zastoupení v souboru má spinocelulární karcinom (50,6%), dále pak adenokarcinom (23,7%), malobuněčný karcinom (20,2%) a velkobuněčný karcinom (5,5%). Pokud jde o zhodnocení vztahu kouření jako rizikového faktoru pro vznik jednotlivých histologických typů karcinomu plic, jde soubor rozdělit na dvě skupiny. První skupina zahrnuje spinocelulární a malobuněčný karcinom s vysokým odds ratio 17,9 a 18,6 a druhá skupina adenokarcinom a velkobuněčný karcinom s přibližně polovičními hodnotami odds ratio 7,4 a 9,4 (Tabulka 3).

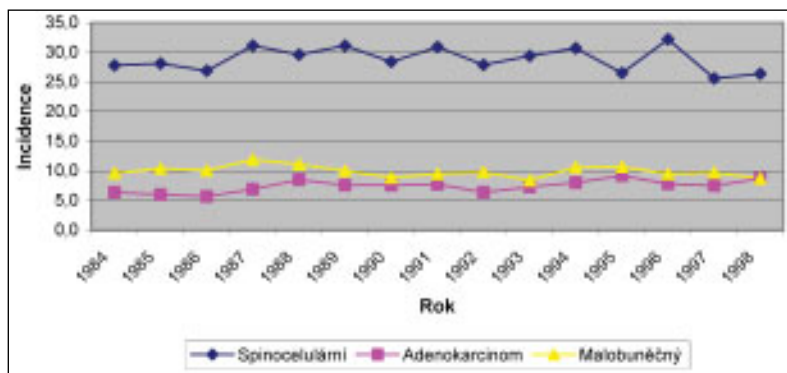
Při odděleném hodnocení případů u mužů a žen (Tabulka 4) je zřejmé, že nejvyšší OR u mužů je u malobuněčného karcinomu (16,0), dále u spinocelulárního (11,2) a adenokarcinomu (10,3) a nejmenší OR je u velkobuněčného (6,7). U žen je vyšší OR jen u malobuněčného karcinomu (10,6) a u ostatních tří typů je okolo 3,0 (2,9 malobuněčný, 3,0 adenokarcinom, 2,6 velkobuněčný).

## Diskuse

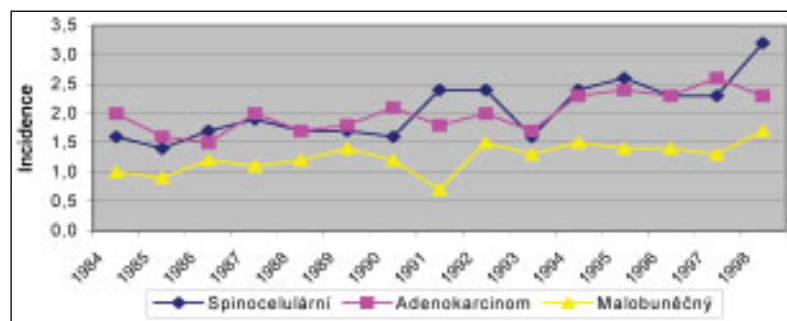
Proporce zastoupení jednotlivých histologických typů karcinomu plic v prezentovaném souboru z okresu Šumperk odpovídá zastoupení, které bylo zjištěno pro region celé Moravy (8). Ačkoliv v řadě zemí je popisován stoupající trend výskytu adenokarcinomu u mužů i žen ve srovnání se spinocelulárním karcinomem (9), situace v České republice (reprezentována výsledky z celé Moravy) ukazuje spíše setvalou proporcí tří hlavních histologických typů karcinomu plic u mužů i žen (jen s nárůstem všech tří typů u žen) v období let 1984 – 1998 (Graf 1, 2). Ale i v České republice se tato situace mění, zejména u žen, kde ve studii prováděné v okrese Olomouc ve spolupráci s IARC v Lyonu, byl adenokarcinom u nových onemocnění v letech 2000-2001 zastoupen v polovině případů (10).

Výsledky předložené studie prokazují těsnou souvislost mezi kouřením a vznikem spinocelulárního a malobuněčného karcinomu, zatímco u adenokarcinomu a velkobuněčného karcinomu

Graf 1. Incidence karcinomu plic na území Moravy u mužů podle morfologie.



Graf 2. Incidence karcinomu plic na území Moravy u žen podle morfologie.



nomu je tento vztah výrazně menší. Adenokarcinom plic nebyl původně podle Kreybergovi teorie (11) ve vztahu ke kouření, ale s postupným narůstáním frekvence tohoto histologického typu se ukázala i zde závislost na kouření, i když menší než v výše jmenovaných typech.

Ve studiích z Evropy a USA se pohybovaly hodnoty rizika u spinocelulárního karcinomu v širokém rozmezí od 7,0 do 37,0, u malobuněčného karcinomu od 7,0 do 43,0 a u adenokarcinomu od 1,0 do 19,0 (9) což ukazuje na velký rozptyl pravděpodobně v důsledku působení celé řady dalších faktorů, které se v etiologii jednotlivých histologických typů karcinomu plic uplatňují. Jedná se jak o faktory spojené s kouřením, jako věk začátku kouření, délka období kuřáctví, celkový počet vykouřených cigaret, průměrný počet cigaret za den, způsob inhalace apod., tak i na příklad o menší expozici periferních částí plic částicím z cigaretového kouře (12). To predis-

ponuje spíše ke vzniku spinocelulárního a malobuněčného karcinomu, které vznikají většinou v centrálním bronchu na rozdíl od adenokarcinomu, který vzniká převážně v periferních částech plic (13).

### Závěr

Studie, provedená u 451 pacientů s karcinomem plic z okresu Šumperk, potvrdila výraznější vztah mezi kouřením a spinocelulárním a malobuněčným histologickým typem na rozdíl od adenokarcinomu a velkobuněčného karcinomu.

Riziko kouření pro vznik adenokarcinomu u mužů se pohybovalo na horní hranici publikovaných nálezů. Naopak u žen zůstalo riziko kouření pro vznik adenokarcinomu v udávaných nižších hodnotách.

*Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NC7286-3/2002.*

### Literatura

1. Globocan 2002, Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, IARC Press, Lyon 2001
2. ÚZIS ČR: Novotvary 1999. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Praha, 2002.
3. Marel M, Melínová L, Štastný B, et al.: Vývoj epidemiologických ukazatelů plicní rakoviny v České republice v letech 1970-1990. Čas. Lék. čes., 135, No 15, s. 487-492, 1996.
4. Jedrychowski W, Becher H, Wahrendorf J, et al.: Effect of tobacco smoking on various histological types of lung cancer, J Cancer Res Clin Oncol., 118: 276-282, 1992
5. Lubin JH, Blot WJ: Assessment of lung cancer risk factors by histologic category, J Natl Canc Inst, 73, 383-389, 1984
6. Kolář Z: Základní poznatky o molekulárních mechanismech vývoje některých epitelových, solidních mesenchymových a neuroektodermových nádorů. Klinická onkologie, 17, 3, 77-84, 2004

7. Máchová L, Janout V, Koutná J, et al.: Preventive oncologic check-ups in the district Šumperk, 1975-1986: the description of a database, Biomed.Papers, 146(2), 99-101, 2002
8. Janout V., Široký P., Novák J., et al.: Lung Cancer Incidence in the Czech Republic: A Time-Trend Study, Onkologie, 27,4,376-379, 2004
9. Sobue T., Yamamoto S., Hara M. et al.: Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer by histologic type in middle aged Japanese men and women: the JPHC Study, Int.J.Cancer, 99,245-251,2002
10. Kollárová H.: Karcinom plic a rizikové faktory životního stylu, Doktorská disertační práce, LF UP Olomouc, 2002
11. Kreyberg L.: Histological lung cancer types: A morphological and biological correlation, Acta Pathol Microbiol Scand Suppl 157, 1-92,1962
12. Morabia A., Wynder EL.: Cigarette Smoking and Lung Cancer Cell Types, Cancer, Nov. 68, 2074-2078,1991
13. Pešek M.: Bronchogenní karcinom, Galén str.17-20, 2002

## knihy

### ORAL CANCER. Fifth Edition

SILVERMAN S. Jr. (Ed.)

BC DECKER, Hamilton 2003

212 s., 252 obr., cena 69,95 USD. ISBN 1-55009-215-4.

Kniha je dalším dílem rozsáhlé edice nakladatelství BC Decker a American Cancer Society, jehož název je American Cancer Society Atlas of Clinical Oncology. V této edici vyšlo od roku 1998 sedmáct monografií, připravováno je dalších 6 dílů. Tím by měla být pokryta prakticky celá onkologická problematika. Podrobné informace o již vyšlých svazcích lze získat na Internetové adrese [www.bcdecker.com](http://www.bcdecker.com). Součástí každé knihy nakladatelství BC Decker je digitální verze díla na CD ROM. Disk obsahuje úplný text a všechny ilustrace jako soubory PDF (Acrobat Reader).

Na tomto díle se autorsky podílelo 21 odborníků ze Spojených států. Obsah knihy rozdělený do 12 kapitol pokrývá celou šíři problematiky karcinomů dutiny ústní: výskyt, etiologii, prevenci, diagnostiku, léčbu i péči o pacienty po terapii včetně rehabilitace. Převážná část kapitol je věnována spinocelulárnímu karcinomu, protože jde o nejčastější malignitu v této lokalizaci. V prvních dvou kapitolách je probírána epidemiologie a etiologie. Je zde rozebrán vliv tabáku, alkoholu, nutričních návyků i virů na vznik karcinomu dutiny ústní. Následuje důležitý oddíl o prekancerózách, které mají velký význam v sekundární prevenci a při odhalování časných forem maligních onemocnění. Čtvrtá kapitola popisuje úlohu zobrazovacích metod v diagnostice karcinomů dutiny ústní. Ta je odlišná od jiných oblastí, protože pacienti v naprosté většině případů přicházejí s již známou diagnózou, obvykle i histologicky potvrzenou

a cílem zobrazování je především posouzení postižení hlubších struktur a regionálních lymfatických uzlin. Největší význam mají v této oblasti CT a magnetická rezonance. Při hodnocení postižení krčních uzlin se u nás i v Evropě významně uplatňuje také sonografie, kterou američtí autoři podceňují. Stážování tumorů a údaje o přežívání nemocných jsou hlavním obsahem následujícího oddílu. Další tři kapitoly rozebírají léčbu a její možné komplikace. Tvoří nejdelší část knihy a postihují všechny možnosti – chirurgickou léčbu, radioterapii, chemoterapii. Samostatný oddíl je věnován rekonstrukčním operacím po rozsáhlých resekcích výkonech a rehabilitaci po provedené terapii. Následující kapitoly popisují jiné maligní procesy než karcinomy – leukémie a lymfomy, maligní nádory slinných žláz a malignity asociované s AIDS.

Srozumitelně napsaný text všech kapitol je doplněn četnými ilustracemi, v převážně většině barevnými, vytištěnými ve vynikající kvalitě. Jejich množství je natolik velké, že lze tuto knihu doporučit i jako srovnávací atlas. Zde se nabízí jedno z jejich možných využití – v ordinacích praktických zubních lékařů, protože jsou to právě oni, kdo se nejčastěji s těmito nádory či prekancerózami setkávají jako první. Kniha však pravděpodobně bude nejvíce používána onkology. Další okruh čtenářů, kterým ji lze doporučit, představují stomatochirurgové, patologové (velké množství obrázků zachycuje mikroskopické preparáty), otorhinolaryngologové, radiologové. Jde o kvalitně vypracované dílo přinášející v přehledné formě všechny důležité informace o maligních onemocněních v oblasti dutiny ústní ve formě textové i obrazové, proti ostatním knihám navíc také v digitální podobě na příloženém kompaktním disku.

M. H.

## VÍNO A RAKOVINA PROSTATY

## VINE AND PROSTATE CANCER

ŽALOUĐÍK J.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV A UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM V BRNĚ

V posledním desetiletí se objevilo značné množství poznatků o příznivých účincích polyfenolických látek obsažených ve vinné révě a víně u zhoubných nádorů a z nich pak zejména u rakoviny prostaty.

Víno je alkoholický nápoj a před těmi lékaři obvykle varují. Někdy i paušálně, aniž odlišují koncentraci alkoholu v nápoji a celkově konzumované dávky. Jako i jinde v medicíně je však třeba účinky jakékoli látky posuzovat právě podle užívané dávky. Vždyť všechny léčebné substance účinkují příznivě pouze v určitých optimálních dávkách. Nízké dávky jsou zpravidla neúčinné, vysoké dávky pak toxické a nebezpečné. To platí také o alkoholu. Kardiologové již běžně doporučují 3-4 dcl vína pro muže a 2 dcl pro ženy denně v prevenci onemocnění srdce a cév.

V souvislosti s rakovinou prostaty je ovšem třeba znovu komentovat možné nebezpečí i těchto dávek alkoholu z vína, které by teoreticky mohly narušovat jaterní metabolismus. Steroidní hormony, které mají prokazatelný vliv na vývoj rakoviny prostaty by tak mohly být poškozenými játry hůře a opožděně odbourávány a podporovat nádorový růst. Tato hypotéza se však v několika velkých studiích nepotvrdila a neexistuje žádný doklad, že by víno svým obsahem alkoholu přispívalo k nádorovému onemocnění prostaty (1-4).

Práce W.M.Schoonena z Hutchinsonova ústavu pro výzkum rakoviny v Seattlu (5), srovnávající pití alkoholických nápojů ve skupinách 753 pacientů s rakovinou prostaty a 703 zdravých mužů přinesla dokonce závěr, že při hodnocení týdenních dávek pravidelně vypitého červeného vína vedla každá další sklenka k redukci rizika rakoviny prostaty o 6%.

Přínos bioaktivních polyfenolických látek obsažených ve víně tedy pravděpodobně značně převyšuje potenciální riziko dávek alkoholu umírněně pitého vína. Nejznámějším z těchto polyfenolů je resveratrol. Jeho obsah je vyšší ve vínech červených než bílých, což souvisí s technologií výroby červeného vína, v němž jsou vyluhovány slupky hroznů, kde se resveratrol a další polyfenoly vyskytují především. Stewart (6) upozorňuje, že resveratrol je pouze jednou z mnoha bioaktivních polyfenolických látek, které představují 5-10% biomasy hroznů. Patří k nim quercetin, katechin, genistein, apigenin, luteolin a jiné. Mnohé další fytoalexiny zůstávají dosud detailně nepopsány. Nejvíce experimentálních poznatků je zatím o účincích resveratrolu, případně o quercetinu a genisteinu.

Tyto látky byly testovány na stabilizovaných liniích nádorových buněk rakoviny prostaty LNCaP, PC3 a DU145 z několika hledisek, která sledují ovlivnění nejdůležitějších projevů nádorového bujení. K nim patří nadměrné dělení nádorových buněk (proliferace), jejich snížené odumírání přirozeným zánikem programovanou buněčnou smrtí (apoptóza), regulace pohlavními steroidními hormony a růstovými faktory. Resveratrol tlumí dělení nádorových buněk (7-11) a podporuje jejich

zánik apoptózou (12-15). Působení resveratrolu vyvolalo změnu u 555 genů z panelu 2400 genů buněk rakoviny prostaty hodnocených metodou DNA microarray (16). Funkce většiny těchto genů je ovšem dosud neznámá a nález svědčí pouze o vysoké biologické aktivitě resveratrolu, který ovlivňuje také genovou expresi. Resveratrol se také váže na hormonální receptory nádorových buněk a omezuje tak jejich stimulaci pohlavními hormony (17-20). Kromě hormonálních receptorů mají některé nádorové buňky na svých membránách i jiné stimulační receptory, na něž se váže například epidermální růstový faktor. Také tato stimulace je resveratrem blokována (21). Resveratrol navíc podporuje i signální dráhu TRIAL spouštějící zánik nádorových buněk apoptózou (22). Resveratrol také snižuje produkci specifického prostatického antigenu PSA nádorovými buňkami (23). PSA je běžně v klinické praxi používán jako marker aktivity nádorového onemocnění prostaty. Tyto experimentální poznatky dávají dobrý základ pro klinické studie, nejen v prevenci, nýbrž i v přídatné léčbě rakoviny prostaty.

Mezi stárnoucími muži, tedy již po padesátce, narůstá nejen riziko srdečních a cévních onemocnění, nýbrž také riziko rakoviny prostaty. Každoročně u nás přibývá více než 3100 nových případů rakoviny prostaty a přes 1300 mužů na rakovinu prostaty umírá. Od konce sedmdesátých let se výskyt rakoviny prostaty i úmrtnost na toto onemocnění zhruba ztrojnásobily. Přitom neznáme účinná preventivní opatření nebo preparáty, které by riziko karcinomu prostaty snížily. Nepochybně tedy nelze ignorovat uvedené poznatky o účincích látek obsažených ve víně již proto, že taková pomocná a současná chemoprevence kardiovaskulárních onemocnění i rakoviny prostaty bude pro muže přijatelná a přirozenější než jakékoli umělé preparáty v tabletách. Víno poměrně ideálně naplňuje požadavky kladené na chemoprevenci (24). Je v doporučených dávkách netoxické, dostupné a relativně levné, konzumovatelné perorálně jako nápoj, obecně pro širokou veřejnost přijatelné, má příznivý efekt u více častých onemocnění a jsou známy mechanismy jeho působení i uvedených příznivých účinků.

V této fázi poznání je možno dát tři následující doporučení. Doporučení lékařům, aby vzali experimentální poznatky o příznivých účincích bioaktivních látek ve víně vážně a začali organizovat klinické studie ověřující tento protinádorový efekt u rakoviny prostaty v praxi. Doporučení vinařům, aby se pokoušeli při výrobě vína hledat technologie zvyšující obsah polyfenolických bioaktivních látek jako je resveratrol a další. Možná se dočkáme doby, kdy bude na popisu láhve vína uváděno nejen procento alkoholu, ale i obsah těchto zdravých prospěšných látek. A doporučení konzumentům, aby víno pili se zájmem o jeho kvalitu i účinky na zdraví, umírněně a kulturně a přistupovali k němu s respektem jako k přírodnímu léku.

## Literatura

1. Albertsen K, Gronbaek M.: Does amount or type of alcohol influence the risk of prostate cancer? *Prostate*. 2002 Sep 1;52(4):297-304.
2. Sesso HD, Paffenbarger RS Jr, Lee IM.: Alcohol consumption and risk of prostate cancer: The Harvard Alumni Health Study. *Int J Epidemiol*. 2001 Aug;30(4):749-55
3. Schuurman AG, Goldbohm RA, van den Brandt PA.: A prospective cohort study on consumption of alcoholic beverages in relation to prostate cancer incidence (The Netherlands). *Cancer Causes Control*. 1999 Dec; 10(6): 597-605.
4. Tavani A, Negri E, Franceschi S, Talamini R, La Vecchia C.: Alcohol consumption and risk of prostate cancer. *Nutr Cancer*. 1994;21(1):24-31.
5. Schoonen WM, Salinas CA, Kiemeny LA, Stanford JL.: Alcohol consumption and risk of prostate cancer in middle-aged men. *Int J Cancer*. 2004 Aug 25 [Epub ahead of print]
6. Stewart JR, Artime MC, O'Brian CA.: Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention. *J Nutr*. 2003 Jul;133(7 Suppl):2440S-2443S.
7. Kobayashi T, Nakata T, Kuzumaki T.: Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer Lett*. 2002 Feb 8;176(1):17-23.
8. Kampa M, Hatzoglou A, Notas G, Damianaki A, Bakogeorgou E, Gemetzi C, Kouroumalis E, Martin PM, Castanas E.: Wine antioxidant polyphenols inhibit the proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutr Cancer*. 2000;37(2):223-33.
9. Sala G, Minutolo F, Macchia M, Sacchi N, Ghidoni R.: Resveratrol structure and ceramide-associated growth inhibition in prostate cancer cells. *Drugs Exp Clin Res*. 2003;29(5-6):263-9
10. Sgambato A, Ardito R, Faraglia B, Boninsegna A, Wolf FI, Cittadini A.: Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutat Res*. 2001 Sep 20;496(1-2):171-80.
11. Kim YA, Rhee SH, Park KY, Choi YH.: Antiproliferative effect of resveratrol in human prostate carcinoma cells. *J Med Food*. 2003 Winter;6(4):273-80.
12. Cardile V, Scifo C, Russo A, Falsaperla M, Morgia G, Motta M, Renis M, Imbriani E, Silvestre G.: Involvement of HSP70 in resveratrol-induced apoptosis of human prostate cancer. *Anticancer Res*. 2003 Nov-Dec;23(6C):4921-6.
13. Morris GZ, Williams RL, Elliott MS, Beebe SJ.: Resveratrol induces apoptosis in LNCaP cells and requires hydroxyl groups to decrease viability in LNCaP and DU 145 cells. *Prostate*. 2002 Sep 1;52(4): 319-29.
14. Lin HY, Shih A, Davis FB, Tang HY, Martino LJ, Bennett JA, Davis PJ.: Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *J Urol*. 2002 Aug;168(2): 748-55.
15. Hsieh TC, Wu JM.: Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res*. 1999 May 25;249(1):109-15.
16. Narayanan BA, Narayanan NK, Stoner GD, Bullock BP.: Interactive gene expression pattern in prostate cancer cells exposed to phenolic antioxidants. *Life Sci*. 2002 Mar 1; 70 (15):1821-39.
17. Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Hobisch A.: Androgen receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2002 Sep;9(3):155-70.
18. Gao S, Liu GZ, Wang Z.: Modulation of androgen receptor-dependent transcription by resveratrol and genistein in prostate cancer cells. *Prostate*. 2004 May 1;59(2):214-25.
19. Ho SM.: Estrogens and anti-estrogens: key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *J Cell Biochem*. 2004 Feb 15;91(3):491-503.
20. Mitchell SH, Zhu W, Young CY.: Resveratrol inhibits the expression and function of the androgen receptor in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res*. 1999 Dec 1;59(23):5892-5.
21. Stewart JR, O'Brian CA.: Resveratrol antagonizes EGFR-dependent Erk1/2 activation in human androgen-independent prostate cancer cells with associated isozyme-selective PKC alpha inhibition. *Invest New Drugs*. 2004 Apr;22(2):107-17.
22. Fulda S, Debatin KM.: Sensitization for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Cancer Res*. 2004 Jan 1;64(1):337-46.
23. Hsieh TC, Wu JM.: Grape-derived chemopreventive agent resveratrol decreases prostate-specific antigen (PSA) expression in LNCaP cells by an androgen receptor (AR)-independent mechanism. *Anticancer Res*. 2000 Jan-Feb;20(1A):225-8.
24. Aziz MH, Kumar R, Ahmad N.: Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms (review). *Int J Oncol*. 2003 Jul;23(1):17-28.

---

# knihy

---

## CLINICAL ONCOLOGY - BASIC PRINCIPLES AND PREVENTION, THIRD EDITION

NEAL, A. J., HOSKIN, P. J.

Arnold, A member of the Hodder Headline Group, London 2003  
294 str., 149 obr., 28 tab., ISBN 0-340-76409-0, cena 19,99 GBP.

Tato úspěšná kniha představující výtečně napsaný úvod do klinické onkologie sestává z 23 kapitol s touto tematikou: patogenéze zhoubných nádorů, principy diagnostiky a stážování zhoubných nádorů, rozhodování a komunikace, základy chirurgické onkologie, principy radioterapie, principy systemické léčby, rakovina plic a mesotheliom, nádory prsu, nádory GI traktu, urologické nádory, gynekologické nádory, nádory CNS, hlavy a krku, endokrinní nádory, sarkomy, lymfomy, hematologické malignity, maligní tumory u dětí, kožní tumory, tumory související s AIDS, karcinomy s neznámým primárním místem, náhlé onkologické příhody, paliativní péče.

V první kapitole jsou vysvětlovány genetické, chemické, fyzikální, virové, imunologické a endokrinní faktory, jež mohou hrát roli při vzniku zhoubných nádorů. Ve druhé kapitole se pojednává o stanovení diagnózy jednoduchou biopsií i více invazivními metodami (např. laparotomií nebo kraniotomií) a dále o stanovení velikosti a rozsahu nádoru za pomoci vyšetřovacích metod – snímkováním, sonografií, scintigrafií, CT, MRI, pozitronovou tomografií aj. Obsahem třetí kapitoly je komentář ke graficky prezentovanému rozhodovacímu schématu, jež sestává ze tří úrovní; na první úrovni rozhodnutí zahájit léčbu či nikoliv, na druhé rozhodnutí o radikální nebo paliativní léčbě, na třetí rozhodnutí o pri-

mární nebo adjuvantní léčbě. Čtvrtá kapitola o chirurgické onkologii je velmi stručná s důrazem na zásahy v případě primárních nádorů, kombinaci chirurgie s radioterapií, chirurgii regionálních lymfatických uzlin a paliativní chirurgii. Obsahem páté kapitoly je stručný výklad radioterapeutických přístupů s doplňky o biologických účincích ionizujícího záření a vedlejších účincích radioterapie. V šesté kapitole je probrána chemoterapie, její účinnost a toxicita, rezistence k chemoterapii, hormonální, biologická a experimentální chemoterapie. Uspořádání následujících kapitol o různých druzích nádorů je obdobné, text je členěn do odstavců o epidemiologii, etiologii, patologii, přirozené historii, příznacích, vyšetřeních, stážování, léčbě, komplikacích vztahujících se k nádorům, komplikacích spojených s léčbou, screeningu a prevenci.

Kniha je výtečně graficky upravena, uspořádání textu je mimořádně přehledné, důležité části a tabulky jsou odděleny od ostatních částí textu modrým podkladem, v některých kapitolách jsou kasuistiky, množství snímků je kvalitně reprodukováno, je připojen velmi podrobný rejstřík. V knize není citována žádná odborná literatura. Z učebnice původně napsané pro lékařské fakulty se v důsledku neustálého zlepšování a aktualizace v průběhu přípravy dvou dalších vydání (první vydání je z r. 1997) stala výtečná pomůcka nejen pro studenty, ale také pro mladé lékaře, středně zdravotnický personál i jiné pracovníky ve zdravotnictví, kteří chtějí získat přehled o tom, co je v oblasti současné klinické onkologie nejdůležitější. Adresa nakladatelství: Arnold, a member of the Hodder Headline Group, 338 Euston Road, London NW1 3BH UK ([www.arnoldpublishers.com](http://www.arnoldpublishers.com)). V. H.

## ZPRÁVA Z KONFERENCE "29<sup>TH</sup> ESMO CONGRESS" POŘADANÉ VE VÍDNI VE DNECH 29.10.-2.11.2004

ADÁMKOVÁ L., BOUDNÝ V.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Ve dnech 29.10.-2.11.2004 se konala ve Vídni v Rakousku mezinárodní konference nazvaná „29th ESMO Congress“ a pořádaná společností ESMO (European Society for Medical Oncology). Konference probíhala v Austria Center Vienna, což je rozsáhlá čtyřpatrová budova čítající čtyři velké a několik menších sálů umožňujících paralelní průběh několika přednášek a seminářů. Bohatý program konference byl rozdělen do tematických bloků v jejichž rámci přednášeli vybraní řečníci svá sdělení. Nedílnou součástí konference byla také posterová sekce. Námí byl prezentován poster „STAT 1 PHOSPHORYLATION INDUCED BY INTERFERONS IN HUMAN MALIGNANT MELANOMA“ autorského kolektivu Boudný V.<sup>1</sup>, Adámková L.<sup>1</sup>, Kovařík A.<sup>2</sup>, Fojtová M.<sup>2</sup>, Lauerová L.<sup>1</sup>, Kocák I.<sup>3</sup>, Kovařík J.<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Základna experimentální onkologie, <sup>3</sup>Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, Brno 656 53; <sup>2</sup>Biofyzikální ústav AV ČR, Královopolská 135, Brno 612 65).

Současný stupeň znalostí molekulární podstaty signálních drah, které zprostředkovávají biologické efekty cytokinů a růstových hormonů a podílí se na kontrole fyziologických procesů buňky, jako je růst, diferenciace, senescence a apoptóza, vymezuje tři hlavní skupiny proteinů, které zprostředkovávají přenos vnějších signálů z povrchu membrány k cílovým genům v jádře. Mezi tyto proteiny patří Janus tyrosinkinázy (JAK), signální transduktory a aktivátory transkripce (STAT) a jejich endogenní inhibitory z rodiny SOCS. Jejich nesprávná funkce a defektní vzájemná komunikace souvisí s několika lidskými chorobami.

Hromadící se důkazy ukazují na to, že poruchy v těchto proteinech mohou souviset s patogenezi lidských malignit a mohou sloužit jako nové nádorové markery a slibné cíle pro nádorovou terapii. Navíc se předpokládá, že defektní dráhy JAK/STAT/SOCS spojené s nádorovým onemocněním mohou negativně ovlivnit léčebnou odpověď na interferony a jiné cytokiny.

Klíčová úloha v komplexních signálních procesech je připisována proteinům rodiny JAK (např. JAK 1, JAK 2, JAK 3, TYK 2) a dosud poznaným sedmi členům rodiny STAT. Avšak jejich fyziologická a patologická funkce *in vivo* nebyla dosud zcela objasněna. JAK/STAT signální paradigma bylo velmi dobře charakterizováno pro mnoho ligandů. Po vazbě ligandu receptor dimerizuje. Důsledkem molekulárních procesů, které následují po interakci ligandu s receptorem, je iniciace aktivity proteinkináz rodiny JAK spojených s receptorem prostřednictvím jejich autofosforylace na tyrozinových zbytcích. Aktivované JAK proteiny fosforylují konzervovaný tyrozin na cytoplazmatickém konci receptoru, čímž vzniká "docking site" pro STAT proteiny. Tyto receptorové tyrozinové struktury jsou rozpoznávány SH2 doménami STAT proteinů, čímž zprostředkovávají přijetí příslušných STATů do receptorového komplexu. Nefosforylované STATy navázané na receptor jsou fosforylovány proteiny JAK na tyrozinových zbytcích. Aktivované STAT proteiny se poté uvolňují z receptorů a dimerizují díky interakci SH2 domény jednoho STAT proteinu s fosfotyrozinem druhého. Dimery jsou translokovány do jádra, kde se váží na specifické DNA sekvence v promotorech responzivních genů a následně ovlivňují jejich expresi. Ačkoli fosforylace STAT proteinů na tyrozinu se zdá být klíčovou pro přenos signálu, výzkum mechanismů regulujících aktivitu transkripce zprostředkovanou STATy ukázal, že fosforylace

STAT 1, STAT 3 a STAT 5 na serinových zbytcích se také aktivně podílí na signálních drahách potenciací transkripční aktivity a expresí cílových genů.

Jednotlivé STAT proteiny se liší fyziologickými důsledky své aktivity. Konečný výsledek závisí především na typu vnějšího signálu a skupině cílových genů, které jsou přepisovány. Například výsledek STAT 1 nebo STAT 3 aktivity může být pozitivní či negativní v závislosti na podnětu a buněčném typu, zatímco STATy 4, 5 a 6 byly popsány převážně jako přenašečji pozitivní růstové signály. Studie na myších s deficientními STAT proteiny a na modelech se STAT 1 proteinem vyřazeným z funkce ("STAT 1 knock-out") poskytly přesvědčivé důkazy o prvořadě úloze, kterou hrají STAT proteiny v přenosu buněčné odpovědi na interferony (IFN).

V souvislosti se studiem regulace signální funkce STAT proteinů bylo v nedávné době identifikováno několik nových proteinů, které působí jako negativní supresory JAK/STAT signalizace a které za fyziologických podmínek inhibují STAT aktivaci a připravují tak buňku pro odpověď na následující signál. Nyní již existují důkazy nejméně o třech hlavních rodinách přirozených inhibitorů: (1) supresory cytokinové signalizace (SOCS); (2) proteinové inhibitory aktivovaných STATů (PIAS); a (3) fosfatázy obsahující SH2 doménu (SHP).

Proteiny SOCS představují největší a zřejmě i nejdůležitější skupinu faktorů v klasické negativní zpětnovazební smyčce, které regulují JAK/STAT signalizaci iniciovanou nejméně 35 různými polypeptidovými ligandy včetně cytokinů. Transkripce většiny, ne-li všech genů kódujících SOCS proteiny, je indukována nebo regulována samotnými cytokiny, pravděpodobně přes aktivované STAT proteiny. SOCS proteiny obsahují centrální SH2 doménu, C-terminální box a N-terminální oblast velmi proměnlivé délky. Ačkoli bylo popsáno 20 členů této rodiny, které kódují běžný "SOCS box", pouze ty podskupiny obsahující zároveň C-terminální SOCS box a centrální Src homologní doménu (SH2), byly zahrnuty do signální dráhy cytokinových signálů.

Je známo více než 100 genů, které jsou zapojeny v JAK/STAT/SOCS signálních drahách nebo jsou těmito proteiny indukovány. Národně mohou být rozděleny do následujících tří skupin: a) geny, které jsou integrovány součástí JAK/STAT/SOCS signálních kaskád (včetně genů kódujících receptory, které interagují s příslušnými kinázami); b) geny kódující transkripční faktory interagující se STAT proteiny; c) geny indukované (aktivované) STATy. Třetí, zjevně největší kategorie, obsahuje geny, které dohlížejí na základní fyziologické procesy a udržují buněčnou homeostázu. Různé STATy jsou, i když ne zcela absolutně, nutné k regulaci genové exprese *cdc2*, cyklinů A a B, inhibitorů cyklin-dependentních kináz *p21<sup>WAF1/CIP1</sup>* a *INK4*, kaspáz nebo molekul *Fas* a *FasL*. Navíc transkripce mnoha, ne-li všech interferonů regulovaných genů (IRG) zodpovědných za imunomodulační a proliferativní odpovědi, je také pod kontrolou STAT proteinů. Jako příklad můžeme uvést geny kódující MHC I. třídy, beta 2-mikroglobulin, transaktivátor třídy II (CIITA), intracelulární adhezivní molekulu 1 (ICAM-1), interferon-regulační faktor 1 (IFR1), polypeptid 2 s nízkou molekulovou hmotností (LMP2) a přenašeč spojený se zpracováním antigenu 1 (TAP1). Cílem naší studie byl výzkum inducibility aktivity (fosforylace) proteinu STAT 1 pomocí interferonů  $\alpha$  a  $\gamma$  v buňkách maligního melanomu. Byly použity buňky 21 stabilizovaných melanomových linií a 59 primárních kultur odvozených z melanomových metastáz. Ke zjištění hladiny STAT1 proteinu a inducibility jeho aktivovaných forem jsme využili metodu Western blotu.

Studie poskytla jasný důkaz o tom, že funkční abnormality STAT1 proteinu souvisí s lidským maligním melanomem. Poruchy STAT1 převažovaly jak u stabilizovaných buněčných linií tak i u primokultur maligního melanomu.

## ZRCADLO

Máme starosti s body 4 a 5 Národního onkologického programu: 4) *Pojmenovat síť center komplexní diagnosticko-léčebné onkologické péče, akreditovaných ČOS na principu čtyř kompetencí: kvalifikace, vybavení, sebeevaluace a komunikace. Vytvořit Radu onkocenter České republiky jako nástroj pro koordinaci práce.*

5) *Prosazování ekvity čili pokrytí populace srovnatelnými onkologickými službami a přístupů k informacím o prevenci, diagnostice a léčbě onkologických onemocnění.*

Možná mají starosti i v jiných medicínských oborech. Jen je mnohde zatím nepopsali do jakéhosi programu. Starost by ovšem měli mít hlavně zřizovatelé, Ministerstvo zdravotnictví a krajské úřady. Zatím to netuší a nevědomost hříchu nečiní. Leckam sluníčko ještě nezasvítilo. Především však náleží starost zdravotním pojišťovnám, tedy distributorům zdravotní daně. Nakolik si starost a vykročení k trvalejší udržitelnému rozvoji připouštějí ukáže rok 2006 a nové smlouvy. Problém struktury a (i) relevance sítě zdravotní péče pro oněch stálých deset milionů klientů, coby praotec současného stavu blahorovné bezradnosti zůstává mnohými za to placenými nerozpoznán či z myslí vytěšňován. Klientů je už od habsburských dob stálých deset milionů. Jsou snad i zdravější, ale zase žijí poněkud déle. Jsou poněkud náročnější, což zvyšuje potřebu i spotřebu.

Vcelku by se umělo i zdůvodnit, že už to podle toho programu všechno jaksi trochu skoro máme. Jen nebyť těch čtyř kompetencí v bodě 4. Vlastně jen té jedné. Sebeevaluace. Kvalifikování jsme až hrůza, vybavování jsme pořád a spokojeni s tím stejně nikdy nebudeme, komunikujeme rádi a bez ustání. Jen co s tou sebeevaluací. Musíme promyslet, co s tím, abychom to pojali vstřícně, ale aby nás ta vstřícnost nedostala. Než to promyslíme, raději si zatím povídejme pohádky. Lépe po částech, protože promýšlet budeme raději dlouho, říkají si mnozí přátelé. Ať nám pohádky vydrží. Takže teď pohádka o zrcadle jako úvodní kapitola z Šípkové Růženky, která se zatím třeba sama nabodne a nadlouho usne.

Bylo nebylo. Či spíše bylo a je.

Pověz mi zrcadlo, kdo je na světě nejkrásnější. Jsem úžasná královna, myslím to upřímně, vládu světu kam až oko dohlédne. To je podle terénu a raronizace zhruba dvacet až třicet kilometrů na každou stranu, v horách i více, v městské zástavbě naopak jen nějaký ten kilometr. Starám se o lid, dělám co můžu a dělám to krásně, protože jsem krásná. Tak co na to zrcadlo říkáš? Jasně, jsi nejkrásnější a děláš to dobře, opácí zrcadlo už ze zvyku. Královna z vděčnosti zrcadlo vyleští věříc, že to tak bude pořád.

Zrcadlo visící na viditelném postu však vnímá jak se v něm zrcadlí měnící se svět kolem.

V komnatě královny se objevil počítač s internetem, rádio a televize už dávno, občas zaskočí na návštěvu cizozemec, občas leží na stole fotografie z královských cest. Zrcadlo, visíc v nadhledu to zpracovává a syntetizuje. Je ostatně dlouho broušeným zrcadlem a nikoli přihlouplým okenním sklem, aby vše co na něj dopadne jen tak propouštělo. Je zvyklé reflektovat, ale královniny stereotypy už omrzely.

Takže zase jednou standardní otázka, pověz mi zrcadlo, kdo je na světě nejkrásnější. No, dosud to vypadalo tak, že ty královno, a dost jsi mi to vnucovala, ale mám podezření, že kus

dál za kopcem by jistá Šípková Růženka mohla být taky pěkná holka. Co to říkáš, zrcadlo, ty jsi se snad pominulo? No, já nevím, nechci jít do konfliktu, už proto, že jsem křehké strukturou i náturou. Ale vždyť se holky sejdete, hodte se do plavek, částečně ty rozdíly poznáte samy a ať se taky někdo referenční vyjádří a uvidíte, která je spíše miss. Odrážím jen, co na mě dopadá, a tudle na mě odkudsi dopadla slůvka benchmarking, ekvita a efektivita, a taky HTA, teda health technology assessment, jak tomu říká anglická šlechta. Já tomu moc nerozumím, jsem vybroušené ještě za Rusů, azbuky ubylo, snažím se zorientovat, ale vím, že nemůžu odrážet, co není, jsem-li odpovědné zrcadlo. Aby mě pak nepoplivali, že jsem lhala.

Královna zamyšlena odešla, poprvé nemajíc důvod z vděčnosti zrcadlo přeleštit. Raději by je nakopla, leč zachovala úroveň a léty nacvičenou laskavou tvář. Zkusí problém obejít. Co tak zrcadlo vyhodit, napadlo ji. Ale patří k tomu nejlepšímu, co doma má. Co ho tak jakoby náhodou rozbít? Jenže bude hluk, střepy, ostuda a zůstane viset ten rámeček, co zase někdo bude chtít zasklít. Co ho tak zamazat a pošpinit, aby neodráželo? Ale pozvete zahraniční šlechtu do komnaty se špinavým zrcadlem, které navíc léta chválila jak je moudré. Jasně je, že zrcadlo příště nevolit až se budou volit i zrcadla. Ale to ještě potrvá a my monarchisté jsme přece na volby nikdy moc nedali. Nejlépe bude zrcadlo natřít. A to na bílo. Konstruktivně a optimisticky. Takové nové netradiční umění, tvůrčí rozmar a třeba se chytí. Že nic nebude odrážet nevdí, rádi popíšeme, co by odrážet mělo a vždyť přece všichni vědí, kdo byl celá léta nejkrásnější. Proč to dokola opakovat. Co zrcadlo neodrazí, ukomunikujeme. Zůstaneme k zaslepenému zrcadlu přátelštěji, budeme si ho vážit a ukazovat o to více, že jsme ho natřeli na bílo, což nikdo nemá. Natřeme ho jen vápnem. Kdyby bylo potřeba v budoucnu něco zvlášť odpudivého odjinud objektivizovat, tak ho pro potřebnou reflexi kousiček umyjeme. Ano, to je nápad. Vždyť my monarchisté jsme vlastně demokraté a zrcadla neničíme, dokonce je natíráme na bílo. Za benchmarkingem vyjedeme spíše někam do zahraničí zatleskat mu v anonymitě auditoria. Lépe do exotických zemí, ať nejsme také jen bílí a při pobytu se opálíme. A ten počítač, internet, televize musejí z komnaty pryč. Jsou nepovznášející, zavádějící, nekulturní, vždyť je v nich i ta skandální obnažující pornografie.

Přizveme obchodníky cizozemce. Obdarovávají přece malými jiskřivými zrcátky, v nichž uvidíme jen to, co máme vskutku krásného, třeba uzel na kravatě. Řekneme si k nim ještě o reprodukční zařízení na baterky s nahrávkou: Ty královno, ty jsi vskutku na světě nejkrásnější. Byznysmeni to pochopí a zařídí. Zavedeme zase koncerty smyčcového kvarteta jen pro známé. Vždyť jsou to milí lidé a také si, inspirování i poděšení, svá vlastní zrcadla třeba nabílí. Budeme si vzájemně chodit na koncerty a odrážet realitu si budeme my sami namísto zrcadel. Ano, svět bude opět krásný.

Jen aby nám to dlouho vydrželo. Aby vydržely slábnoucí baterie a rebelové nezlobili. Baterie vyměnit, rebely polapit, popravit. Nerušíme si ty krásné večery s koncerty v sametových mollových tóninách a v prostředí hyporeflexních zrcadel natřených na bílo.

*Prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.,  
vědecký sekretář České onkologické společnosti  
Masarykův onkologický ústav v Brně*



## ZÁPIS Z JEDNÁNÍ VÝBORU ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI KONANÉHO DNE 15. 3. 2005 V PRAZE

*Přítomni:* Vorlíček, Abrahámová, Aschermannová, Cwiertka, Eck-schlager, Jelínková, Konopásek, Petera, Příbylová, Petruželka, Rob, Stáhalová, Stankušová

*Omluveni:* Fínek, Vyzula, Žaloudík

1. Diskutovány priority výboru ČOS. Výbor je před polovinou funkčního období, proto je třeba provést inventuru aktuálních problémů, které jsou a budou v popředí zájmu ČOS.
  - a) je třeba věnovat pozornost stavu naplňování jednotlivých bodů NOP. Prim. MUDr. Aschermannová cítí potřebu popularizovat NOP v laické veřejnosti, informovat je více o problémech v onkologii a zainteresovat sdělovací prostředky;
  - b) pozornost je třeba obrátit na postgraduální vzdělávání, zejména na vzdělávání specialistů v oborech (MUDr. Stankušová);
  - c) prof. Vorlíček v této souvislosti informoval o tom, že je ustavena komise při MZD, která má zpracovat návrh způsobu realizace nového systému postgraduálního specializačního vzdělávání. Jde zejména o vyjasnění kompetencí pro pregraduální studium akreditovaných LF a FN na straně jedné a IPVZ na straně druhé. Nový zákon ovšem neřeší řadu problémů, mezi jiným zejména otázku finanční (např. hrazení pobytu atestanta na akreditovaném pracovišti a další);
  - d) ČOS se musí nadále zabývat léčebnými standardy v onkologii (doc. Abrahámová). Doc. Rob naléhavě upozornil, že označení „standardy“ není vhodné, jde o „guidelines“ nebo ještě lépe „navržené léčebné postupy“. Tyto navržené postupy je třeba novelizovat po určitém časovém úseku, např. za 1-2 roky. Viz ještě bod 13.
2. Prof. Vorlíček informoval o projektu Abreast, který zaslala ČOS firma Sanofi – Aventis. Výbor bere informaci na vědomí. Pracoviště, které se chce studie účastnit, bude kontaktovat uvedenou firmu.
3. Proběhla diskuse týkající se onkologické sítě. Podkladem pro pokračující diskusi byl tentokrát materiál vypracovaný členy KOC Praha. Sít by měla respektovat regionální aspekt a je třeba vytvořit model oblastí a zajistit rovnovážné rozdělení (doc. Konopásek, prim. Aschermannová, prof. Vorlíček). Bylo diskutováno o možných kompetencích. Doc. Petera upozornil na poměrně velký počet radiačních center s nehodnotitelnou kvalitou. Konstatováno, že neexistují pravomoci na řízení a event. podřízenost či nadřízenost pracovišť vzájemně. Nutné jsou nepochybně smluvní dohody na vytvoření týmů s regionální působností tak, aby nebyla popírána svobodná volba lékaře. Pro nás by mohl být vhodný model belgický či skotský. Doc. Petruželka nabídl uspořádání semináře s odborníkem ze Skotska. Organizaci sítě je třeba dát do souladu s pojišťovnami, které nepochybně podpoří vytváření velkých center. Konstatováno, že ne všichni onkologičtí nemocní mají u nás adekvátní léčebnou péči. S vytvářením onkologické sítě souvisí i organizace paliativní onkologické péče a vytváření týmů paliativní péče v nemocnicích. Prof. Vorlíček informoval, že ve FN Brno na pracovišti v Bohunicích bude letos zřízeno v rámci Interní hemat-onkologické kliniky oddělení paliativní péče, které může sloužit jako modelové pro další možná podobná zařízení. Toto oddělení paliativní péče nemůže fungovat podle zásad platných pro zařazení následné péče, ale také ne jako akutní lůžko. Společně s VZP bude hledán jiný model financování. Na příští schůzi budou diskutovány podmínky pro onkologická centra I., II. a III. typu – návrh zašle doc. Petruželka.
4. Prof. Vorlíček informoval o jednání v kategorizační komisi. Přípravují se opatření, která výhledově povedou ke zrušení kategorie X a převedení dotčených lékových přípravků do kategorie P s navýšeným paušálem ve zdravotnických zařízeních, nejspíše až v roce 2006 spolu s novými smlouvami s pojišťovnami. Problém může být mimo jiné zavádění nových, zvláště drahých léků. Definování center onkologické péče je i zájem zdravotních pojišťoven.

5. Prof. Vorlíček informoval o schůzce s prezidentem republiky Václavem Klausem na téma podpory Národním onkologickému programu dne 24. 2. 2005, které se zúčastnil i vědecký sekretář prof. Žaloudík. Pan prezident přislíbil, že NOP autoritou hlavy státu podpoří a na toto téma uspořádá tiskovou konferenci.
6. Diskutováno o screeningových programech. Mamární screening je nepochybným úspěchem. Výbor ČOS odpověděl předsedovi ČLS JEP na základě podnětu paní ministryně a za screening se jednoznačně postavil s podrobným vysvětlením důvodů podpory, včetně citací z věstníků MZD ČR z roku 2002 a 2004, kde jsou pravidla screeningu uvedena, a odkazu na [www.mamo.cz](http://www.mamo.cz), kde je uvedena komplexní veřejnosti přístupná informace. Dopis obdrželi pro informaci mailovou poštou všichni členové ČOS. Jeden z kritiků mamárního screeningu chirurg Dr. Šťastný posílá předsedovi ČOS dopisy s kritickými podněty. Rozhodnuto pozvat Dr. Šťastného a Doc. Daneše, zástupce Komise mamodiagnostiků a Komise pro screening nádorů prsu na některou z příštích schůzí výboru ČOS.
7. Pokračuje jednání týkající se cervikálního screeningu. Minulý měsíc se setkali ke společnému jednání patologové, gynekologové a onkologové. Doc. Rob vysvětlil stanovisko ke klasické cytologii, vakcinaci a profylaktické vakcinaci dívek. Prof. Žaloudík, ač nepřítomen na schůzi výboru ČOS, se ozval e-mailem: *v České republice se diskutuje o přijatých zákonech, vyhláškách a metodických opatřeních, jakoby neplatily a zpochybňují je sami vydavatelé, především ministerstvo (viz mamární screening). Pravidla pro cervikální screening jsou stanovena metodickými opatřeními, které vyšlo ve Věstníku MZD již v červenci 2004. V něm se hovoří třeba o minimu 15 000 vyšetření pro cytologické laboratoře, která se účastní ve screeningu. Stačilo by bez dalších diskusí pouze naplnit toto existující metodické opatření MZD.* Dne 13. 4. 2005 se bude konat v hotelu Corinthia Towers v Praze seminář věnovaný připravovaným vakcínám pro HPV jako prevenci cervikálního karcinomu.
8. Schůzka Rady NOR se nekonala, ale přípravy elektronické hlášenky zhoubného novotvaru pokračují (doc. Abrahámová).
9. Společnost všeobecného lékařství požádala ČOS o oponování jejich programu týkajícího se možnosti včasného zachytu rakoviny prsu. Do této spolupráce se zapojí as. Dr. Příbylová.
10. Prim. Dr. Aschermannová jako členka revizní komise informovala, že zpráva o stavu účtu bude k dispozici v dubnu t. r.
11. Dne 26. 4. 05 se bude konat v Motole schůze onkologynkologických center, organizuje doc. MUDr. L. Rob, CSc.
12. Výbor ČOS schválil přijetí nových členů: Dr. Dulřáková (Nová Ves pod Pleší), Dr. Šmakal (Nová Ves pod Pleší), Dr. Vydra (Nová Ves pod Pleší), DIS Beštová (Plzeň), Ing. Jelínková (Praha), Dr. Benešová (Praha), Dr. Minárik (Praha), Dr. Srovnal (Olomouc).
13. Na závěr se jednání stočilo ještě jednou k tématu doporučených léčebných postupů. Do příští schůze si všichni připraví své názory a poznámky k jednotlivým nádorovým lokalizacím, event. pošlou své návrhy e-mailem předem. Budeme diskutovat, zda je vhodné a kam se vlastně v této oblasti ubírat. Minulý výbor ČOS vydal v nakladatelství Galen publikaci s doporučenými diagnosticko-léčebnými nepodkročitelnými pravidly. Prof. Vorlíček požádá reditele Houdka o elektronický přepis. Novější guidelines visí na webu [www.mou.cz](http://www.mou.cz), stačí se vyjádřit co je špatně, případně se můžeme pak domluvit na korigování a dát potom odkaz na [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz), kde to pak bude k dispozici stále a všem.
14. Všechny informace o ESMO Breast Cancer Course 25. až 28. května 2005 v Bratislavě jsou na [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz). Informace podá také Danica Brendlová tel. 421 517 745 934 nebo doc. MUDr. Mária Wagnerová, Košice.

*Příští schůze výboru ČOS se bude konat 19. 4. 05 v Mostě, kde se organizace ujme prim. MUDr. Alena Jelínková.*

Sledujte [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz) - denně nové informace nejen o onkologii.