

VYDÁVÁ
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ
IČO 444359

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

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

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

Grafická a technická úprava:
Bohuslav Havlíček

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

Vychází 6krát ročně
Roční předplatné 180 Kč
pro studenty LF 90 Kč

Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce

Ministerstvo kultury ČR
MK ČR 5158
ISSN 0862-495 X

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

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO
REDAKTORA: KOZA IVAN
VÝKONNÝ REDAKTOR: FAIT VUK

REDAKTOŘI:

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

REDAKČNÍ RADA:

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

Přehled	
Vícha A, Eckschlager T. Molekulární biologie neuroblastomu	159
Hajtmanová E., Zámečník L., Abouharb A, Kostková L., Záborská Z, De Riggo J, Péc Intersticiální brachyterapia recidivujících high - grade gliómov	166
Pour L, Hájek R, Adam Z. Výběr bisfosfonátu k léčbě kostního postižení u pacientů s prokázanou malignitou	172
Dudová S., Michálek J., Hájek R. RNA nádorové vakcíny na bázi dendritických buněk	178
Cibula D, Babjuk, M, Mareš, P, 1Svárovský, J, Gürlich, R, Ungár, L, Pešková, M, Freitag, P, Dundr, P.,Martan A. Exenterace pánve	184
Původní práce	
Šusová S., Novotný J., Vodička P., Souček P. Úloha genetických polymorfismů biotransformačních enzymů v rozvoji kolorektálního karcinomu	188
Sdělení	
Žaloudík J. Chybí onkopreventivní program po orgánových transplantacích	194
Zprávy	
Šlampa P. Klinický audit kvality IAEA radioterapie v MOÚ	195
Informace	
Onkologické společnosti	

CONTENTS

5 / 2005

Reviews	
Vícha A, Eckschlager T. Molecular biology of neuroblastoma	159
Hajtmanová E., Zámečník L., Abouharb A, Kostková L., Záborská Z, De Riggo J, Péc M. Interstitial brachytherapy of recurrent high grade gliomas	166
Pour L, Hájek R, Adam Z. The right choice of bisphosphonates for treatment of cancer patients with metastatic bone disease	172
Dudová S., Michálek J., Hájek R. RNA cancer vaccines based on dendritic cells	178
Cibula D, Babjuk, M, Mareš, P, 1Svárovský, J, Gürlich, R, Ungár, L, Pešková, M, Freitag, P, Dundr, P.,Martan A. Pelvic exenteration	184
Originál publication	
Šusová S., Novotný J., Vodička P., Souček P. Role of polymorphisms of biotransformation enzymes in colorectal cancer	188
Communications	
Žaloudík J. Lack of an onco-prevention program after organ transplantations	194
Report	
Šlampa P. Clinical audit of IAEA in the Department Radiation Oncology of MMCI	195
Notification	
Oncological associations	

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE NEUROBLASTOMU

MOLECULAR BIOLOGY OF NEUROBLASTOMA

VÍCHA A., ECKSCHLAGER T.

KLINIKA DĚTSKÉ HEMATOLOGIE A ONKOLOGIE, UK 2.LF A FN MOTOL, PRAHA

Souhrn: Neuroblastom je maligní embryonální nádor dětského věku odvozený z nezralých a nediferencovaných buněk neurální lišty osídlujících paravertebrální sympatická ganglia, dřev nadledviny a paraganglií. Je pro něj charakteristická značná biologická variabilita. Nádory nízkého rizika často samovolně regredují, případně spontánně či při léčbě diferencují. Vysoce maligní forma se vyznačuje mimořádně agresivním průběhem s neovlivnitelnou progresí, nádor rychle roste a časně metastazuje. Existují prognostické znaky, které umožňují zařazení pacientů do rizikových skupin: věk v době stanovení diagnózy, histologická klasifikace, exprese receptorů *trk*, DNA ploidie, amplifikace genu *N-myc*, delecce 1p36 a řada dalších delecí a zmnožení (delecce 2q, 3p, 9p, 11q, 13q a 14q a zmnožení 17q).

Na modelu neuroblastomu lze demonstrovat význam predikce průběhu a použití individualizované terapie. Na druhé straně lze ukázat i provázanost a korelaci řady prognostických faktorů z nichž pouze některé přinášejí skutečně nezávislou informaci. K posouzení skutečného prognostického významu komplexu faktorů je proto vždy nezbytná multifaktoriální analýza údajů získaných v rámci rozsáhlé multicentrické studie.

Klíčová slova: neuroblastom, DNA ploidie, amplifikace genu *N-myc*, delecce 1p36, CGH.

Neuroblastoma is a malignant embryonal childhood tumor originating from immature and undifferentiated neural crest-derived cells which colonize paravertebral sympathetic ganglia, adrenal medulla and paraganglia. The clinical hallmark of neuroblastoma is heterogeneity. Low-risk tumors undergo spontaneous regression or spontaneous- or therapy-induced differentiation. There is characteristic aggressive progression with fast growth and early metastases in high-risk tumors. Several parameters have been proposed to predict biological behavior: age at the time of diagnosis, histological classification, expression of *trk* receptors, DNA ploidy, *N-myc* amplification, 1p36 deletion and many other deletions and gains (2q, 3p, 9p, 11q, 13q, and 14q deletion and 17q gain).

We can demonstrate the importance of disease course prediction and risk adapted therapy using the neuroblastoma model. On the other hand, it is also possible to show correlations of many prognostic factors from which only some bring independent information. Multifactorial analyses of data from a large multicentric study are necessary for evaluation of prognostic significance of a complex of factors.

Key words: neuroblastoma, DNA ploidy, *N-myc* amplification, 1p36 deletion, CGH

Neuroblastom je maligní embryonální nádor dětského věku odvozený z nezralých a nediferencovaných buněk neurální lišty osídlujících paravertebrální sympatická ganglia, dřev nadledviny a paraganglií. Příčina jeho vzniku není známa. Je to nejčastější extrakraniální solidní nádor dětského věku s incidencí, která se udává v rozmezí 7 - 10%. V Evropě a severní Americe je nádor ročně diagnostikován u 8 - 9 dětí na 1 milion dětí mladších patnácti let. Průměrný věk v době stanovení diagnózy se pohybuje kolem dvou let (36% pacientů je mladších 1 roku, 79% mladších 4 let a 97% pacientů onemocní do 10. roku života), velmi vzácně se neuroblastom vyskytne i u dospělých. Některé studie prokazují bifázickou distribuci v závislosti na věku s prvním vrcholem do 1 roku a druhým mezi 2.- 4. rokem života. [1] Věk vzniku onemocnění je i významným prognostickým faktorem. [2] Asi 70% primárních nádorů vzniká v dutině břišní, z nich polovina vychází z dřev nadledviny a polovina z paraganglií a sympatických ganglií v břiše, 5% je lokalizováno do pánevní oblasti a zbývajících 25% vyrůstá z ganglií krční a hrudní oblasti. [1]

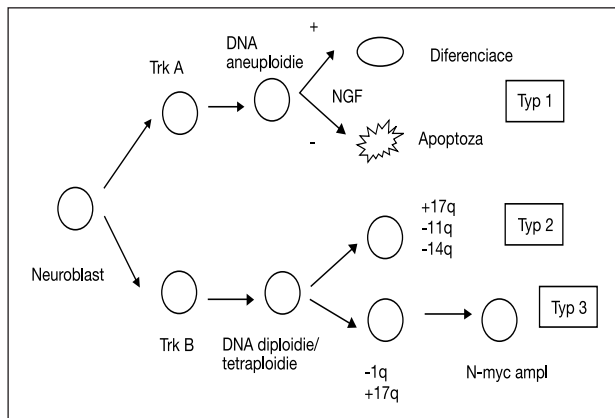
Pro neuroblastom je charakteristická značná biologická variabilita. Nádory nízkého rizika často samovolně regredují, případně se spontánně či při léčbě diferencují v ganglioneuroblastom a dokonce i v benigní ganglioneurom. Vysoce maligní forma se vyznačuje mimořádně agresivním průběhem s neovlivnitelnou progresí, nádor rychle roste a časně metastazuje - především do kostí, kostní dřev, mízních uzlin a u nejmenších dětí do kůže a jater. V době stanovení diagnózy mají dvě třetiny pacientů metastázy, které jsou mnohdy prvním příznakem. [3] Zvláštností stágingu tohoto nádoru je klinické stadium IVS charakterizované nevelkým primárním nádorem, metastázami pouze v kostní dřev, játrech a/nebo kůži a manifestací se do jednoho roku. Pro stadium IVS je charakteristická dobrá prognóza (přežívá více než 90 - 95% dětí) a častá regrese nebo vyzrávání. [1, 4]

Vzhledem k rozdílnému biologickému chování nádoru je zřejmé, že existují prognostické znaky, které umožňují zařazení pacientů do rizikových skupin. Prognostický význam věku pacienta v okamžiku stanovení diagnózy (u kojenců je přízni-

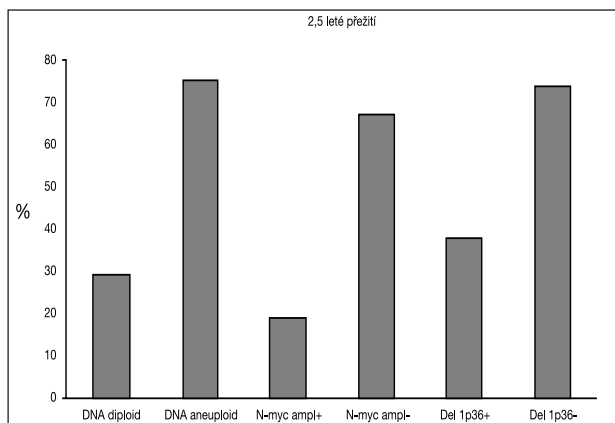
vější průběh), klinického stadia a tradiční histopatologické klasifikace (ganglioneurom, ganglioneuroblastom a neuroblastom) byl znám již v sedmdesátých letech minulého století. V osmdesátých a devadesátých letech byly identifikovány další prognostické znaky: 1/ markery detekovatelné v periferní krvi, kostní dřeni nebo v moči: poměr hladiny kyseliny vanilmandlové k homovanilové v moči (poměr pod 1 je známkou horší prognózy), sérová hladina ferritinu, laktátdehydrogenázy a neuronspecifické enolázy - vysoké hodnoty korespondují s nepříznivou prognózou [5], přítomnost CD10+ buněčné populace v kostní dřeni je příznivým prognostickým faktorem [6], snížený počet lymfocytů v periferní krvi je známkou méně příznivé prognózy [7], 2/ histopatologická klasifikace (stupeň diferenciace, přítomnost nebo absence stromatu a kalcifikací, počet mitóz, karyorektický a vaskulární index, exprese CD44 aj.) nejužší jsou hodnocení podle Shimady nebo Joshioho, které rozlišují neuroblastom vysokého a nízkého rizika [8, 9, 10], 3/ genetické faktory nádoru: DNA index, počet kopií onkogenu *N-myc*, delece krátkého raménka 1. chromozómu, index proliferčního nukleárního antigenu (PCNA), exprese P-glykoproteinu (produkt genu multidrug resistance, vysoká exprese snižuje účinnost chemoterapie), exprese některých neurotrofních faktorů (NGF, Nerve Growth Factor) a receptorů pro NGF (*trkA*, *trkB*, *trkC*). [11, 12]

Expresce receptorů

Nedávno byl rozpoznán význam několika receptorů pro NGF-*trkA*, *trkB*, *trkC* (geny receptorů tyrozin kinázy). Nejvíce prozkoumaný je *trkA*. Vysoká exprese se nachází u neuroblastomu klinického stadia I, II a IVS bez amplifikace *N-myc*. Extrémně nízká exprese tohoto receptoru bývá u nádorů s amplifikací *N-myc*. S expresí *trkA* pozitivně koreluje exprese onkogenu *H-ras*. [13]



Obr. 1. Hypotetický vývoj neuroblastomu.



Obr. 2. 2,5 leté přežití podle jednotlivých prognostických znaků. Data KDHO UK 2.LF a FN Motol, Praha.

Stupeň exprese *trkA* pozitivně koreluje s prognózou přežití. Pětileté přežívání pacientů s vysokou expresí *trkA* je 86% ve srovnání se 14% u pacientů s nízkou expresí. [14] Stupeň exprese *trkA* a amplifikace *N-myc* určuje naději na vyléčení. Vysoká exprese *trkA* je spojena s výbornou prognózou, nízká exprese *trkA* bez *N-myc* amplifikace signifikantně snižuje šanci na vyléčení. *TrkA* při nepřítomnosti NGF, jehož zdrojem jsou Schwannovy buňky přítomné ve stromatu nádoru, indukuje apoptózu a při chybění tohoto neurotrofního faktoru vyvolává diferenciaci. [15, 16] Předpokládá se i antiangiogenní účinek *trkA*. Funkce *trkB* a *trkC* jsou u neuroblastomu méně prostudované. Plně exprimovaná forma *trkB* koreluje s amplifikací *N-myc* a nezralými formami neuroblastomu. Naproti tomu vysoká exprese *trkC* se nachází u nádorů nízkého klinického stadia a obdobně jako *trkA* nebývá u nádorů s amplifikací *N-myc*. [14] Další markery neuronální diferenciace jsou chromogranin A a neuropeptid Y, které mohou sloužit jako ukazatel diferenciace a jako senzitivní nádorový marker. [17, 18] Diskutovanou problematikou zůstává význam exprese receptorů *trk* jako nezávislých prognostických faktorů. Zdá se, že při znalosti dosud užívaných prognostických faktorů informace o expresi těchto receptorů nemění prognózu pacientů. [19]

Amplifikace N-myc

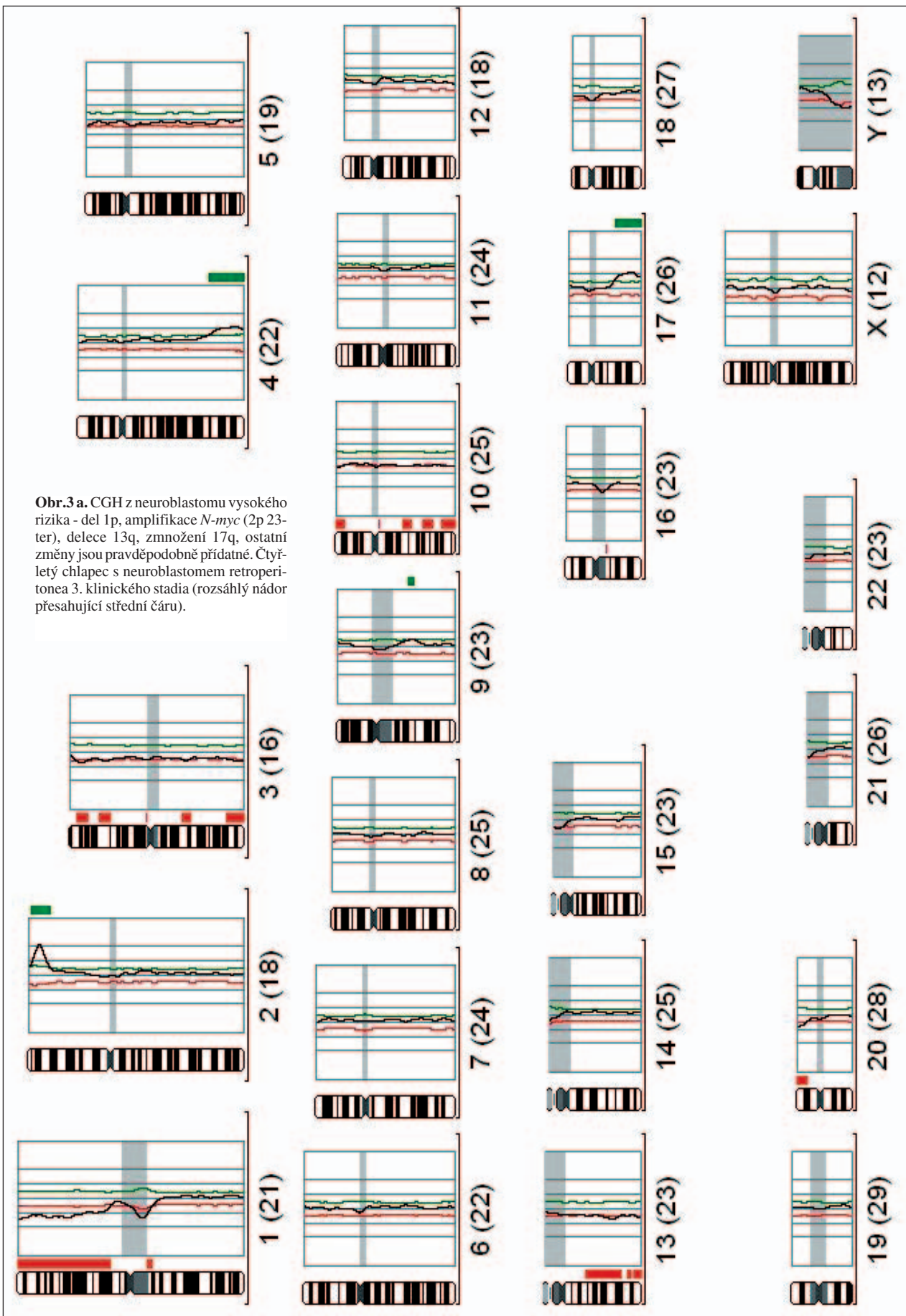
Onkogen *N-myc* leží na 2. chromozómu (2p23-24) a obsahuje tři exony. Jeho produktem je, stejně jako ostatních genů rodiny *myc*, jaderný fosfoprotein s vazebnou afinitou k DNA ovlivňující transkripci a replikaci DNA. [20] Gen *N-myc* hraje důležitou roli během vývoje a diferenciace neuroektodermu. Jeho nadměrná exprese výrazně přispívá k malignímu potenciálu buňky. *N-myc* amplifikuje v časném stadiu vývoje nádoru a v dalším průběhu onemocnění se nemění. Prakticky vždy je tato amplifikace provázána delecí 1p nebo zmožením 17q. [21] Vyskytuje se ve dvou formách: 1/ extrachromozomální acentrické fragmenty (dmin, Double Minute Chromatin Bodies); 2/ intrachromozomální, homogeně se barvící oblasti (HSRs, Homogenously Staining Regions). Mnoho studií potvrdilo, že amplifikace *N-myc* genu u neuroblastomu koreluje s agresivním růstem a velmi nepříznivou prognózou bez ohledu na klinické stadium. [22] Amplifikaci prokazujeme u I., II. a IVS klinického stadia pouze výjimečně (5 - 10%) a naopak často je zastížena u pokročilých forem neuroblastomu (III. a IV. klinické stadium).

Amplifikovaný onkogen *N-myc* je v neuroblastomových buňkách přítomen zpravidla ve 3 - 300 kopiích. Přesný počet není z klinického hlediska důležitý, neboť je jednoznačně ověřeno, že nádorové buňky, obsahující více než 8 kopií, jsou vždy agresivní. Změnu počtu kopií genu *N-myc* rozdělujeme na dvě skupiny - gain, zmožení nejvýše o trojnásobek a amplifikaci pokud je počet kopií zmožen nejméně o čtyřnásobek. Gain se vyskytuje zřídka a jeho význam pro prognózu není zatím zcela jasný. Předběžné výsledky napovídají, že i nízké amplifikující nádory mají horší prognózu. Rovněž se v poslední době velmi intenzivně sleduje fokální amplifikace *N-myc*. Průkaz tohoto typu amplifikace, kde pouze malé množství nádorových buněk obsahuje amplifikovaný gen *N-myc*, je v posledních letech sledován biologickou skupinou ESIO Neuroblastoma, na jejíž činnosti aktivně participuje i naše klinika.

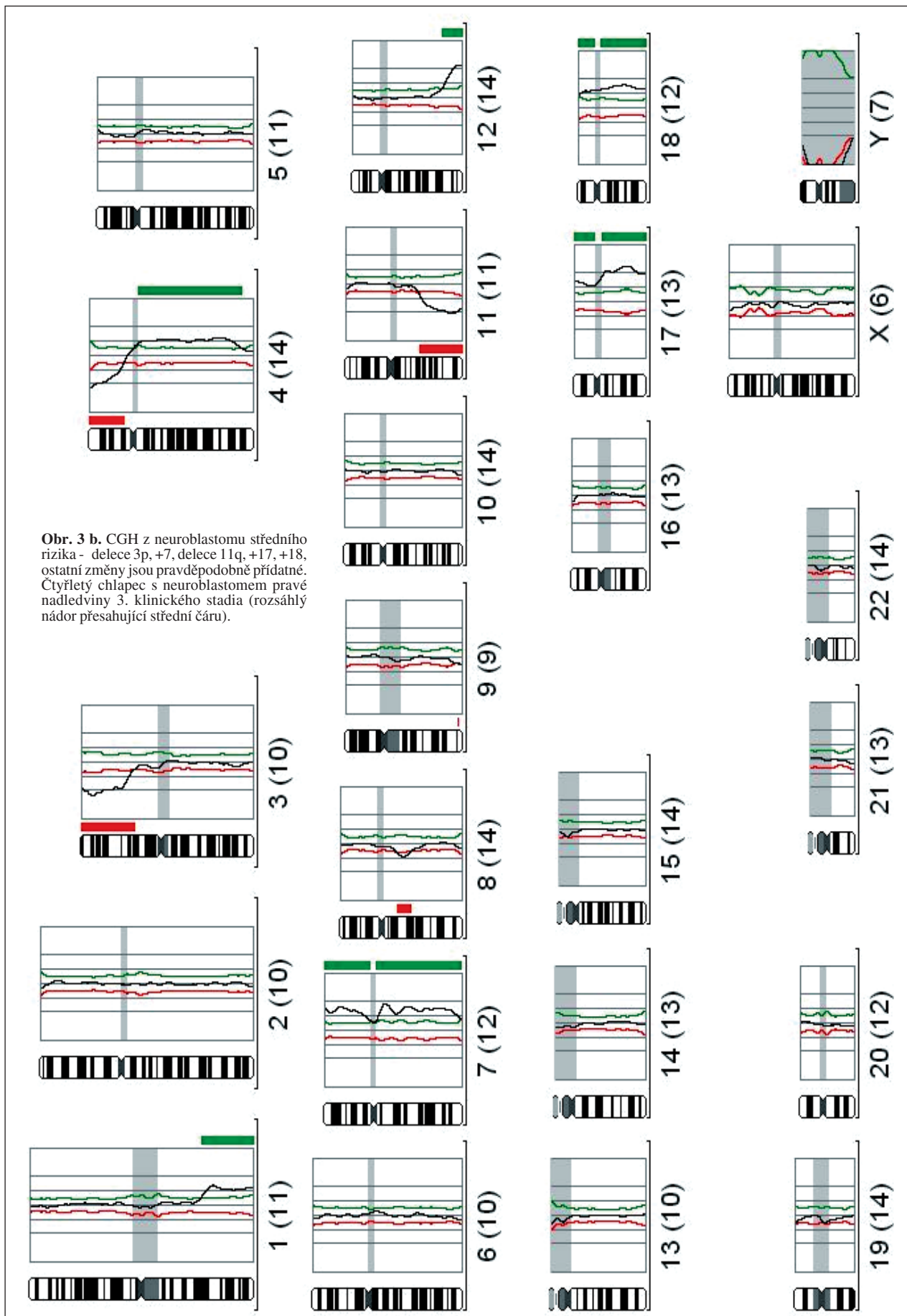
U 40 - 60 % neuroblastomů s amplifikací *N-myc* je koamplifikován onkogen *DDX1* a ještě častěji gen *NAG*. Předpokládá se, že koamplifikaci těchto genů by mohla přispívat k vysoce maligní povaze neuroblastomu s amplifikací *N-myc*. [23]

Ztráta alely

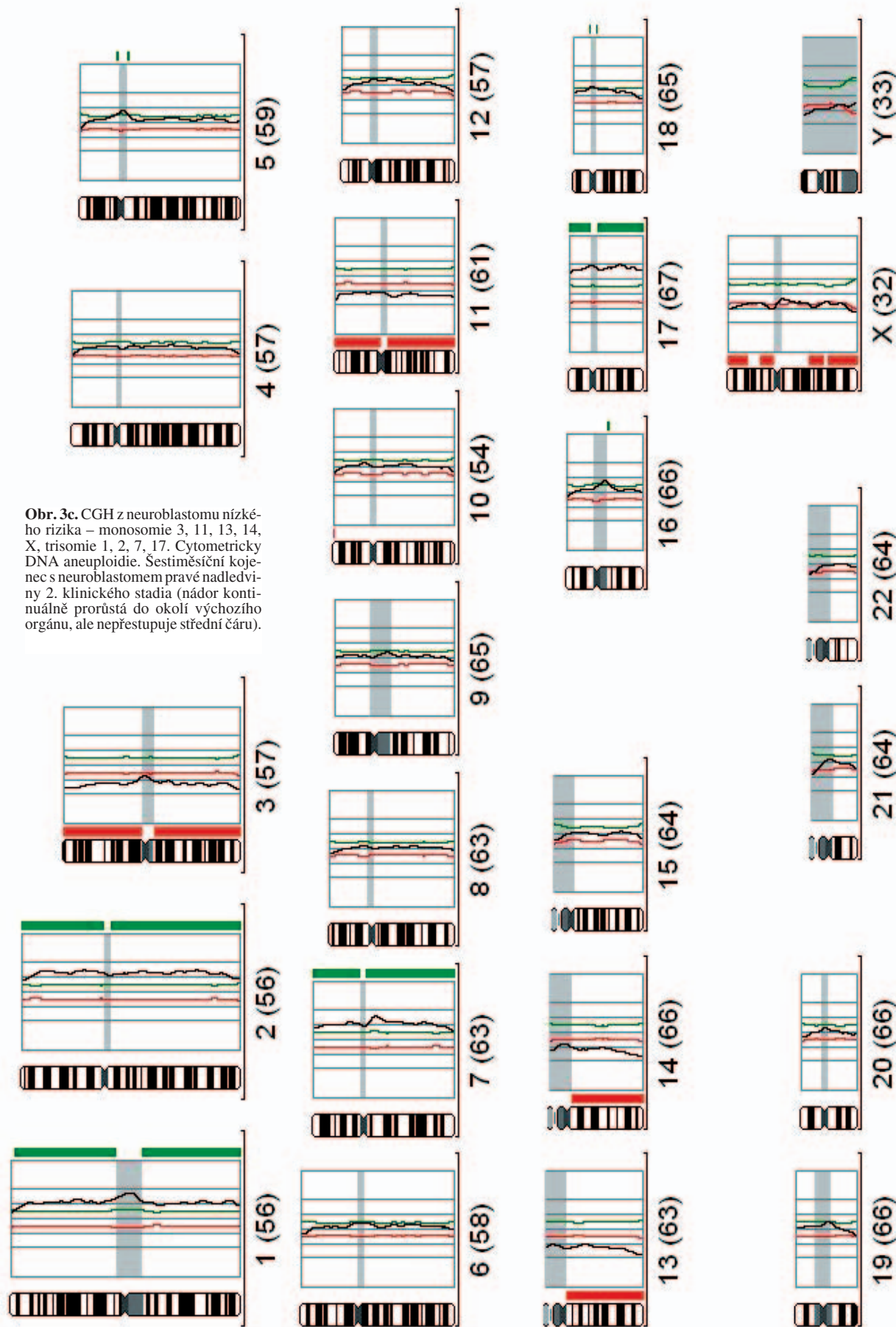
Všeobecně se uznává, že 70 - 80% diploidních neuroblastomů má deleci krátkého raménka 1. chromozómu. Tento nález je spojen s pokročilým onemocněním nepříznivé prognózy. [24] I když jsou deleční změny ve svém proximálním úseku variabilní, podařilo se technikou polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP, Restriction Fragment Length



Obr.3 a. CGH z neuroblastomu vysokého rizika - del 1p, amplifikace *N-myc* (2p 23-ter), delece 13q, zmoženie 17q, ostatní změny jsou pravděpodobně přídatné. Čtyřletý chlapec s neuroblastomem retroperitonea 3. klinického stadia (rozsáhlý nádor přesahující střední čáru).



Obr. 3 b. CGH z neuroblastomu středního rizika - delece 3p, +7, delece 11q, +17, +18, ostatní změny jsou pravděpodobně přídavné. Čtyřletý chlapec s neuroblastemem pravé nadledviny 3. klinického stadia (rozsáhlý nádor přesahující střední čáru).



Obr. 3c. CGH z neuroblastomu nízkého rizika – monosomie 3, 11, 13, 14, X, trisomie 1, 2, 7, 17. Cytometricky DNA aneuploidie. Šestiměsíční kojeneček s neuroblastomem pravé nadledviny 2. klinického stadia (nádor kontinuálně prorůstá do okolí výchozího orgánu, ale nepřestupuje střední čáru).

Polymorphism) nalézt podoblast konzistentní delece 1p36 se ztrátou heterozygoty (LOH, Loss Of Heterozygosity). Tento region zahrnuje jeden či více supresorových genů důležitých pro maligní transformaci a progresi. O řadě genů se uvažuje jako o kandidátních nádorových supresech na 1p36, které se uplatňují u neuroblastomu s delecí této oblasti. Jsou to *p73*, který je homologem *p53*, *CDC2L1*, transkripční faktory *HKR3*, *DNA*, *PAX7*, *ID3* a *E2F*, transkripční elongační faktor *TCEB3* a dva geny z rodiny receptorů *TNFR2* a *DR3*. [25]

Je možné, že na patogenezi neuroblastomu a jeho malignizaci se podílí více supresorových genů, protože jsou popsány ztráty alely i na 2q, 3p, 9p, 11q, 13q a 14q. [25] Ztráty na 2q jsou lokalizovány na 2q33 a provázejí je ztráta exprese genu pro kaspázu 8. [26] Delece 3p25.3- p14.3 postihuje gen *RASSF1A* (Ras-associated domain family 1). Tento gen inhibuje funkci onkogenní H-ras GTPázy a kromě delece je též často inaktivován hypermetilací u neuroblastomu i řady jiných nádorů. [27] Ztráty na 9p jsou zřídka nacházeny u klinicky zjevných nádorů, ale poměrně často u nádorů nalezených při hromadném screeningu. [28]

Změny na 11q zahrnují balancované translokace postihující 11q21 a 11q22, delece 11q23, inverze 11q21- q23 a nejčastěji ztrátu alely. Ztráta alely je

v 15- 40 % nádorů a je nepřímou vázána s amplifikací *N-myc*, ale je přesto známkou horší prognózy. [29] Delece na 3p je asociována s delecí 11q a s nepřítomností amplifikace *N-myc*. [29]

Podle většiny autorů je zmožení 17q, často vyvolané nebalancovanou translokací s 1p nebo 11q, provázeno horší prognózou. [30] Toto zmožení je nacházeno až u 80 % neuroblastomů. [30] Podle některých autorů je nezávislý prognostický význam zmožení 17q průkazný u nádorů bez amplifikace *N-myc* a bez delece 1p nebo 11q. [30] Němečtí autoři neprokazují vztah prognózy a zmožení 17q. [31] Pravděpodobnými geny, které se uplatňují na nepříznivém průběhu u zmožení 17q, jsou nm23-H1, nm23-H2 a/nebo survivin. [32]

DNA analýza

Již od roku 1984 je známé, že neuroblastomy s triploidním nebo hyperdiploidním obsahem DNA dobře reagují na chemoterapii a mají příznivou prognózu. Neuroblastomy s diploidním nebo skoro diploidním obsahem DNA (většina) mají prognózu nepříznivou a zařazují se do skupiny s vysokým stupněm rizika. [1, 11, 33] Zajímavé je srovnání amplifikace genu *N-myc* a DNA ploidie. Z 298 pacientů zařazených do studie severoamerické skupiny dětské onkologie POG mělo 101 pacientů (34%) diploidní nádorové buňky, 194 (65%) hyperdiploidní klonální abnormality a 3 pacientů (1%) hypodiploidní obsah DNA. Kojenci s hyperdiploidním nádorem měli velmi dobrou prognózu oproti špatné prognóze s neuroblastomy diploidními a obdobný výsledek byl i ve skupině pacientů ve věku 1 - 2 let. U pacientů starších dvou let, zařazených do IV. klinického stadia, nebyl prokázán vztah mezi ploidii a prognózou. [34] Tyto poznatky svědčí o existenci tří genetických podtypů neuroblastomu, které mají značný prediktivní význam a určují klinické chování nádoru. Tyto podtypy se liší počtem kopií *N-myc*, karyotypem, DNA ploidii, abnormalitami 1p, věkem pacienta a klinickým stadiem onemocnění. V roce 1997 Brodeur a spol. navrhli klinicko- genetickou klasifikaci neuroblastomu na základě rozsáhlé retrospektivní analýzy dat zejména ze severoamerické skupiny dětské onkologie CCG. Tuto Brodeurovu klasifikaci ukazuje tabulka č. 1. Z ní vychází dělení do tří rizikových skupin zařazených do léčebných protokolů všech světových pracovišť což umožňuje optimalizovat léčebná schémata. [11] Pacienti

Vlastnosti	Typ 1	Typ 2	Typ 3
N-myc gen	Normální		amplifikovaný
karyotyp nebo DNA ploidie	hyperdiploidní nebo triploidní	diploidní nebo tetraploidní	
1p LOH	< 5%	20-50%	80 - 90%
14q LOH			< 5%
trkA exprese	vysoká	nízká	nízká nebo chybí
trkB exprese	nízká nebo chybí		vysoká
trkC exprese	vysoká	nízká nebo chybí	
věk	obvykle 1 rok	obvykle > 1 rok	obvykle 1 - 5 let.
klinické stadium	obvykle 1, 2, 4S		obvykle 3, 4
3 leté přežití	95%	25 - 50%	< 5%

Tabulka č. 1: Klinicko-genetická klasifikace neuroblastomů. Upraveno podle Brodeura [11]

	Amplifikace více než 10 kopií	Amplifikace méně než 10 kopií
% DNA aneuploidie	15	58

Tabulka č. 2: Vztah mezi DNA aneuploidií a amplifikací *N-myc* onkogenu. Vazba mezi amplifikací *N-myc* a DNA ploidií byla statisticky významná na 5 % hladině (počítáno testem 2 s Yatesovou korekcí).

enti s nejpříznivější formou neuroblastomu jsou léčeni pouze chirurgicky bez adjuvantní chemoterapie a přesto mají nejlepší léčebné výsledky. U pacientů s neuroblastomem nejvyššího rizika je indikována nejintenzivnější chemoterapie, chirurgická léčba, megachemoterapie s autologní transplantací hematopoetických progenitorových buněk, radioterapie a bioterapie. Předpokládáný vztah jednotlivých genetických změn s vývojem jednotlivých forem neuroblastomu podle Marise a Mathaye zobrazuje obrázek 2. [25]

Výsledky vyšetření 56 pacientů s histologicky verifikovaným neuroblastomem nebo ganglioneuroblastomem léčených na našem pracovišti jsou ve shodě s literárními údaji o prognostickém významu DNA ploidie, amplifikace *N-myc* a delece 1p36. Přežití 2,5 roku znázorňuje obrázek č. 1. Rovněž jsme potvrdili vazbu mezi jednotlivými molekulárně biologickými i klinickými prognostickými znaky (viz tabulka č. 2).

V současné době lze většinu prognostických znaků u neuroblastomu detekovat metodou srovnávací genomové hybridizace (CGH z anglického comparative genomic hybridization), které se stává i doporučeným vyšetřením evropského protokolu ESIOP Neuroblastoma. Normální = kontrolní a vyšetřovaná DNA jsou každá označena jiným fluorochromem (kontrolní červeně a nádorová zeleně) a jsou současně hybridizovány na normální lidské chromozomy v metafázi. Fluorescence se snímá kamerou a vyhodnocuje počítačem. Poměr intenzit fluorescencí podél jednotlivých chromozomů určí místa s chyběním nebo nadbytkem vyšetřované DNA. Tato metoda je ideální ke zjišťování ztráty nebo zmožení chromozomů či jejich částí, nelze jí však využít k detekci balancovaných translokací. [35] Výhodou je, že k vyšetření se používá izolovaná DNA a není nutné získat dělicí se buňky. DNA lze izolovat i z materiálu fixovaného parafinem. *Obrázky 3a, b a c* ukazují výsledky vyšetření CGH u pacientů s neuroblastomy jednotlivých prognostických skupin.

Závěrem lze shrnout, že neuroblastom je patrně nejvariabilnějším nádorem a různé chromozomální změny, nejčastěji delece či amplifikace, provází jednotlivé formy průběhu. Detekce těchto změn má velký význam pro klinickou praxi. Na modelu neuroblastomu lze asi nejlépe demonstrovat význam predikce průběhu a použití tak zvané „terapie šité na

míru“ (risk adapted therapy). Na druhé straně lze ukázat i provázanost a korelaci řady prognostických faktorů z nichž pouze některé přináší skutečně nezávislou informaci. K posouzení skutečného prognostického významu komplexu faktorů

je proto vždy nezbytná multifaktoriální analýza údajů získaných v rámci rozsáhlé multicentrické studie.

Práce vznikla za finanční podpory IGA grant č. NC/7441-3.

Literatura:

1. Brodeur GM, Maris JM.: Neuroblastoma. in:Pizzo PA, Poplack DG (eds.) Principles and practice of pediatric oncology. Lippincot, Williams and Wilkins, Philadelphia, 2002
2. Breslow N, McCann B. Statistical estimation of prognosis for children with neuroblastoma. *Cancer Res*, 1971; 31: 2098-2103
3. Weinstein JL, Katzenstein HM, Cohn SL. Advances in the diagnosis and treatment of neuroblastoma. *Oncologist*. 2003;8:278-92
4. Pritchard J, Hickman JA: Why does stage 4S neuroblastoma regress spontaneously. *Lancet*, 1994; 344: 869- 870
5. Riley RD, Heney D, Jones DR et al.: A systematic review of molecular and biological tumor markers in neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 2004;10: 4-12
6. Mandel M, Rechavi G, Neumann Y et al.: CD10+ cell population in the bone marrow of patients with advanced neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 1994; 22:115- 118
7. Eckschlager T.: Lymphocyte count as a prognostic factor in childhood cancer. *Pediatr Hematol Oncol*, 1992; 9: 99- 105,
8. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP et al.: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*, 1999; 86:364-372
9. Shimada H: The International Neuroblastoma Pathology Classification. *Pathologica*, 2003; 95:240-241
10. Joshi VV: Peripheral neuroblastic tumors: pathologic classification based on recommendations of international neuroblastoma pathology committee (Modification of Shimada classification). *Pediatr Dev Pathol*, 2000; 3:184- 199
11. Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ et al.: Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol*, 1997;19: 93-101
12. Goto S, Umehara S, Gerbing RB et al.: Histopathology (International Neuroblastoma Pathology Classification) and MYCN status in patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*, 2001; 92:2699- 2708
13. Tanaka T, Sugimoto T, Sawada T. Prognostic discrimination among neuroblastomas according to Ha-ras/trk A gene expression: a comparison of the profiles of neuroblastomas detected clinically and those detected through mass screening. *Cancer*, 1998; 83:1626- 1633
14. Brodeur GM, Nakagawara A, Yamashiro DJ et al.: Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas. *J Neurooncol*, 1997; 31:49-55
15. Watson, F.L., Heerssen, H.M., Bhattacharyya et al.: Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat. Neurosci*, 2001; 4: 981- 988.
16. Ambros, I.M., Attarbaschi, A., Rumpler et al.: Neuroblastoma cells provoke Schwann cell proliferation in vitro. *Med Pediatr Oncol*, 2001; 36: 163-168
17. Ferrari L, Seregni E, Bajetta E et al.: The biological characteristics of chromogranin A and its role as a circulating marker in neuroendocrine tumours. *Anticancer Res*, 1999; 19: 3415- 3427
18. Labdenne P, Heikinheimo M: Clinical use of tumor markers in childhood malignancies. *Ann Med*. 2002;34: 316-323
19. Shimada H, Nakagawa A, Peters J et al.: *TrkA* Expression in Peripheral neuroblastic Tumors. Prognostic Significance and Biological Relevance. *Cancer*, 2004; 101: 1873- 1881
20. Lu X, Pearson A, Lunec J: The MYCN oncoprotein as a drug development target. *Cancer Lett*. 2003;197:125-130
21. Cohn SL, Tweedle DA: MYCN amplification remains prognostically strong 20 years after its „clinical debut“. *Eur J Cancer*, 2004; 40: 2639-2642
22. Schwab M. MYCN in neuronal tumours. *Cancer Lett*. 2004; 204:179- 187
23. Westermann F, Schwab M: Genetic parameters of neuroblastoma. *Cancer Letters*. 2002; 184: 127- 147
24. Maris JM, White PS, Beltinger CP et al.: Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma. *Cancer Res*, 1995; 55: 4664- 4669
25. Maris M, Matthay KK: Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 1999; 17: 2264- 2279
26. Teitz T, Wei T, Valentine MB et al.: Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas amplification of MYCN. *Nat Med*, 2000; 6: 529-535
27. Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N et al.: Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res*, 2002; 62: 5897- 5901
28. Takita J, Hayashi Y, Kohno T.: Allelotype of neuroblastoma. *Oncogene*, 1995; 11: 1829- 1834
29. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F: Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clin Cancer Res*, 2003; 9: 52- 58
30. Lastowska M, Nacheva E, McGuckin A et al.: Comparative genomic hybridization study of primary neuroblastoma tumors. United Kingdom Children's Cancer Study Group. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997; 18: 162- 169
31. Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F.: Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancor Res*, 2003; 9: 4835-4840,
32. van Noesel MM, Versteeg R: Pediatric neuroblastomas: genetic and epigenetic „Danse Macabre“. *Gene*, 2004; 325: 1-15
33. Eckschlager T, Pilát D, Kodet R et al.: DNA ploidy in neuroblastoma. *Neoplasma*, 1996; 41: 23-26
34. Marshall T, Rutledge JC: Flow cytometry DNA applications in pediatric tumor pathology. *Pediatr Dev Pathol*, 2000; 3: 314-334
35. Gebhart E: Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res*, 2004; 104: 352- 358

INTERSTICIÁLNA BRACHYTERAPIA RECIDIVUJÚCICH HIGH - GRADE GLIÓMOV

INTERSTITIAL BRACHYTHERAPY OF RECURRENT HIGH GRADE GLIOMAS

HAJTMANOVÁ E., ZÁMEČNÍK L., ABOUHARB A., KOSTKOVÁ L., ZÁBORSKÁ Z., DE RIGGO J., PÉČ M.

ONKOLOGICKÉ CENTRUM, NEUROCHIRURGICKÉ ODDELENIE MARTIN,
ÚSTAV LEKÁRSKEJ BIOLÓGIE, JESSENOVA LEKÁRSKA FAKULTA UK MARTIN

Súhrn : Primárne malígne tumory mozgu predstavujú 1,5% zo všetkých zhubných nádorov. Pacienti s malígnym gliómom sú liečení chirurgicky a/alebo externou rádioterapiou. Napriek tomu nastáva takmer vo všetkých prípadoch recidíva. Až v 90% prípadov sa rekurencia nachádza v 2 cm leme okolo primárneho tumoru. Príčinou je hlavne obmedzená rádiosenzitivita gliómov a senzitivita normálneho mozgového tkaniva. Brachyterapia ponúka zaujímavú alternatívu šetrenia zdravého mozgového tkaniva prostredníctvom rapidného poklesu dávky žiarenia mimo tumoru.

Kľúčové slová: brachyterapia, intersticiálna aplikácia, rekurencia.

Summary: Primary tumours of the brain represent about 1,5% of all cancers. Patients presenting with malignant glioma will undergo local excision and/or external radiation therapy. Despite this therapy, nearly all tumours will recur. Moreover, it has been shown that 90% of recurrences occur within 2 cm of the initial tumour. This is mainly due to the poor radiosensitivity of gliomas, and to the fragility of normal brain tissue. Brachytherapy may represent an interesting therapeutic alternative, since its rapid dose fall-off offers an opportunity to spare normal brain tissue.

Key words: brachytherapy, interstitial implants, recurrence.

Úvod

Brachyterapia (BRT) je liečebná metóda radiačnej onkológie, umožňujúca zvýšenie dávky žiarenia v tkanive. Dávku žiarenia v nádore limituje tolerancia okolitých štruktúr. V prípade recidívy zhubného ochorenia po predchádzajúcom ožarovaní, táto skutočnosť významne obmedzí, až znemožní ďalšiu liečbu žiarením. Zdroje rádioaktívneho žiarenia sú pri intersticiálnej brachyterapii (IBRT) zavedené priamo do nádorového tkaniva. Dosiahne sa tým vysoká dávka žiarenia v oblasti aplikácie, s jej prudkým poklesom v okolitom zdravom tkanive (1,2,3,4). Svojím charakterom je táto metóda ideálnou možnosťou liečby relapsov malígnych tumorov v už ožiarenom teréne.

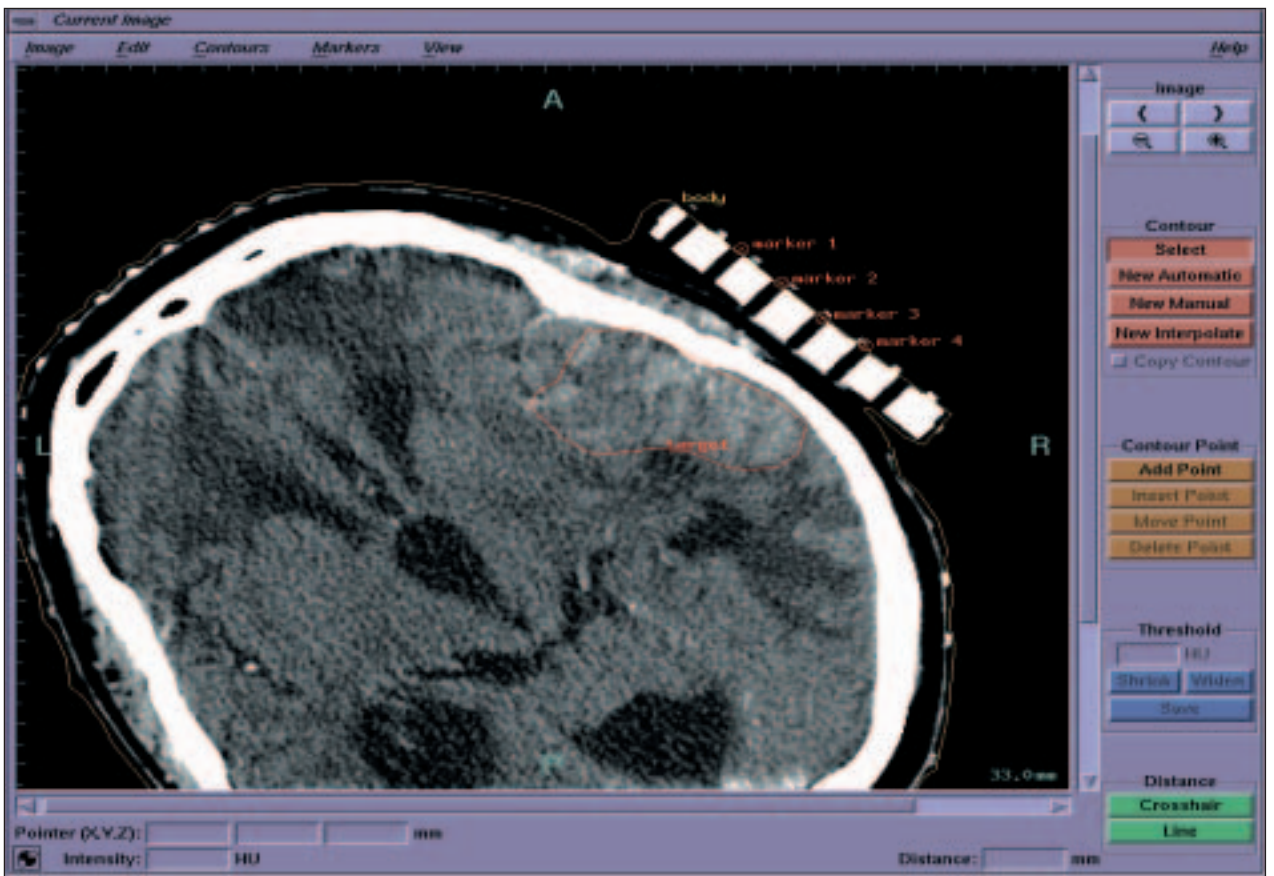
Gliómy sú neuroepiteliálne nádory rôzneho stupňa diferenciácie. Podľa World Health Organization Classification of Tumours z roku 2000, patria do skupiny Astrocytic tumors, do podskupiny Diffusely infiltrating astrocytomas, ktorá sa ďalej delí na: Diffuse astrocytomas - WHO grade II., Anaplastic astrocytomas - WHO grade III. a Glioblastoma multiforme - WHO grade IV. Difúzne infiltrujúce astrocytomy tvoria viac ako 60% zo všetkých primárnych mozgových nádorov (5).

Anaplastické astrocytomy (AA) sú charakterizované fokálnou alebo disperznou anapláziou. Vznikajú z low-grade astrocytómov. Vyskytujú sa najčastejšie u pacientov vo 4. dekáde života. Sú lokalizované v mozgových hemisférach. Typickým znakom je rekurencia po resekcii low-grade astrocytómov. Rýchly rast nádoru spôsobuje včasný posun stredových štruktúr mozgu so vzostupom intrakraniálneho tlaku (5). Difúzne infiltratívny rast výrazne obmedzuje možnosť radi-

kálnej chirurgickej resekcie. Glioblastoma multiforme (GBM) je najmalígnejšou variantou astrocytárných tumorov. Najčastejšie sa vyskytujú u pacientov v piatej dekáde života. Sú väčšinou lokalizované subkortikálne, v bielej hmote mozgových hemisfér. Výskyt v oblasti temporálnych hemisfér je 31%, v parietálnych lalokoch 24%, frontálnych 23% a v okcipitálnej oblasti 16%. Častá je aj fronto-temporálna infiltrácia. Infiltratívny proces sa obvyčajne šíri do príslušného kortexu, bazálnych ganglií a do kontralaterálnej hemisféry. GBM mozgového kmeňa sa vyskytuje hlavne u detí. Lokalizácia v mozočku a mieche je vzácná. GBM sa delia na primárne a sekundárne. Primárne GBM sa vyskytujú u pacientov s priemerným vekom 55 rokov a s predchorobím kratším ako 3 mesiace. Sekundárne GBM vznikajú malígnou progresiou difúzných astrocytómov WHO grade II. alebo anaplastických astrocytómov WHO grade III. Sú typické u mladších pacientov, s priemerom veku do 45 rokov. Časový interval malígnej progresie je približne 4 – 5 rokov. Sekundárne GBM sú prognosticky priaznivejšie ako primárne (5).

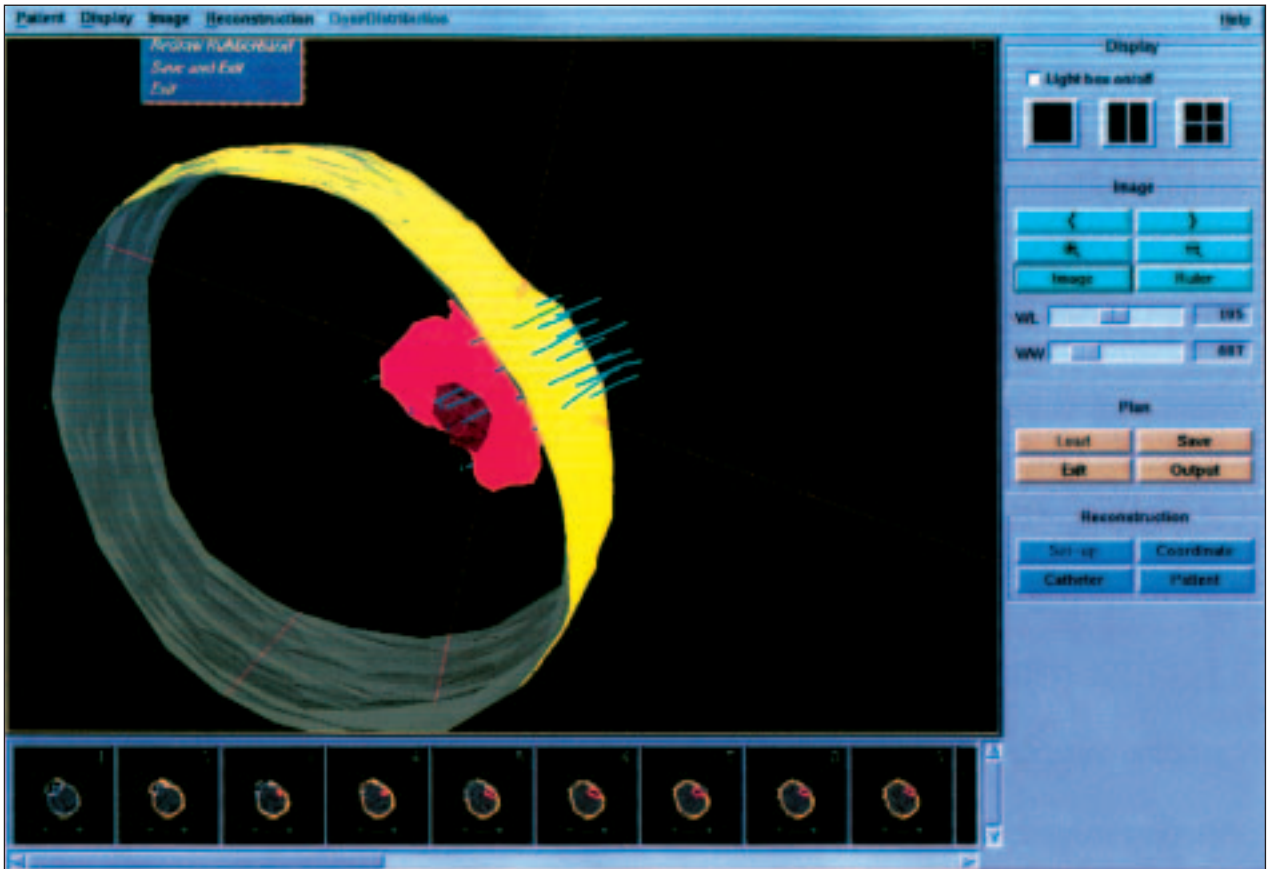
Multicentrický nález AA a GBM sa uvádza všeobecne u 3-5% chorých. Metastázy mimo CNS sú vzácne (6,7).

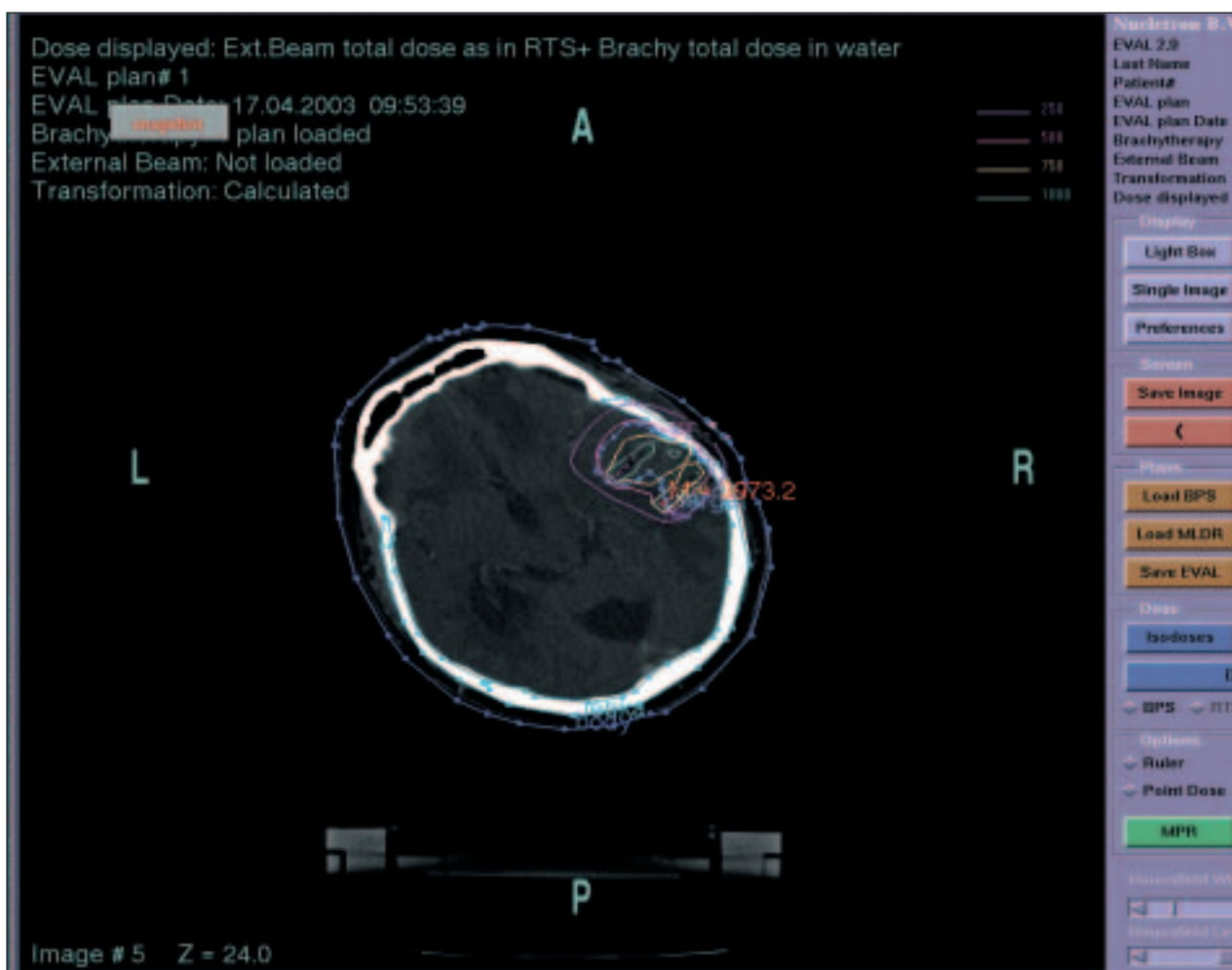
Medián prežívania pacientov s diagnostikovaným AA alebo GBM je po chirurgickej liečbe 3 – 5 mesiacov. Postoperačná konvenčná externá rádioterapia predlžuje prežívanie chorých s glioblastoma multiforme na 9 – 12 mesiacov a s anaplastickým astrocytómom na 36 mesiacov. Medián prežívania pacientov s rekurentným GBM po intersticiálnej brachyterapii je 29 až 50 týždňov a 42 týždňov u pacientov s rekurenciou AA (1,6,8,9,10).



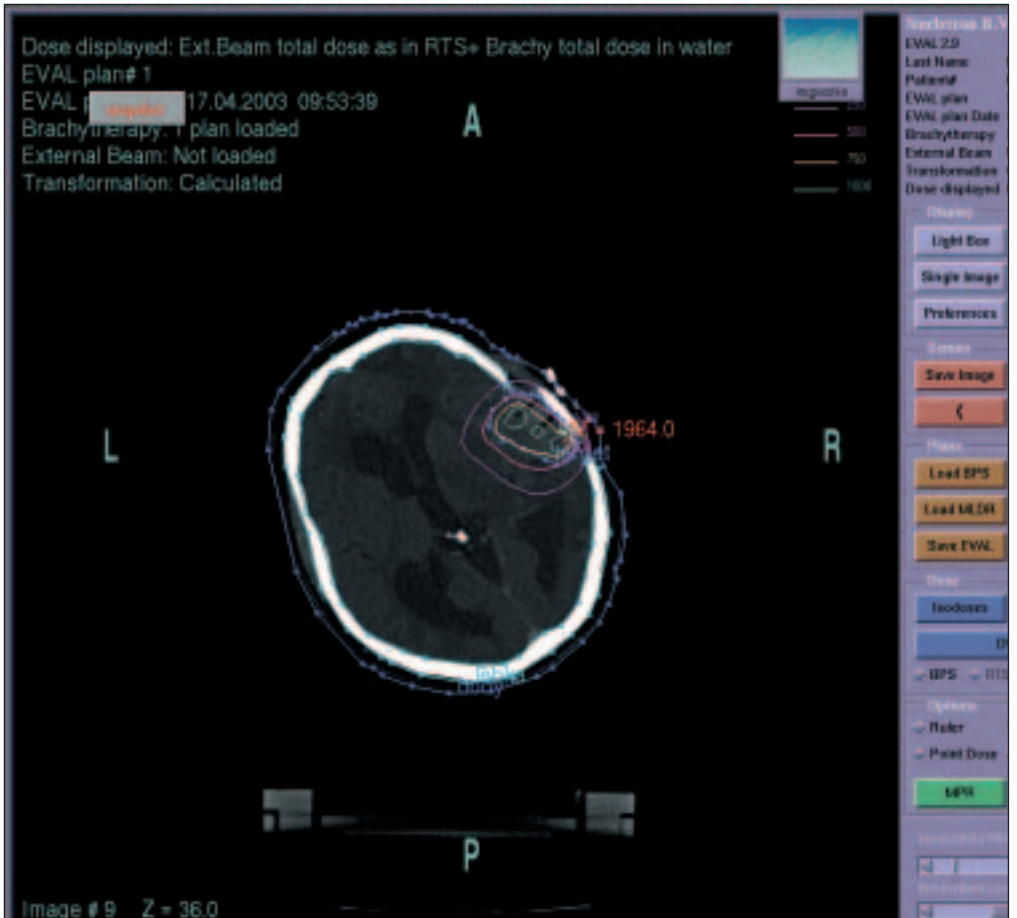
Obr. 1: Zakreslenie cieľového objemu v CT reze.

Obr. 2: Priestorová 3D rekonštrukcia cieľového objemu a katétrov.





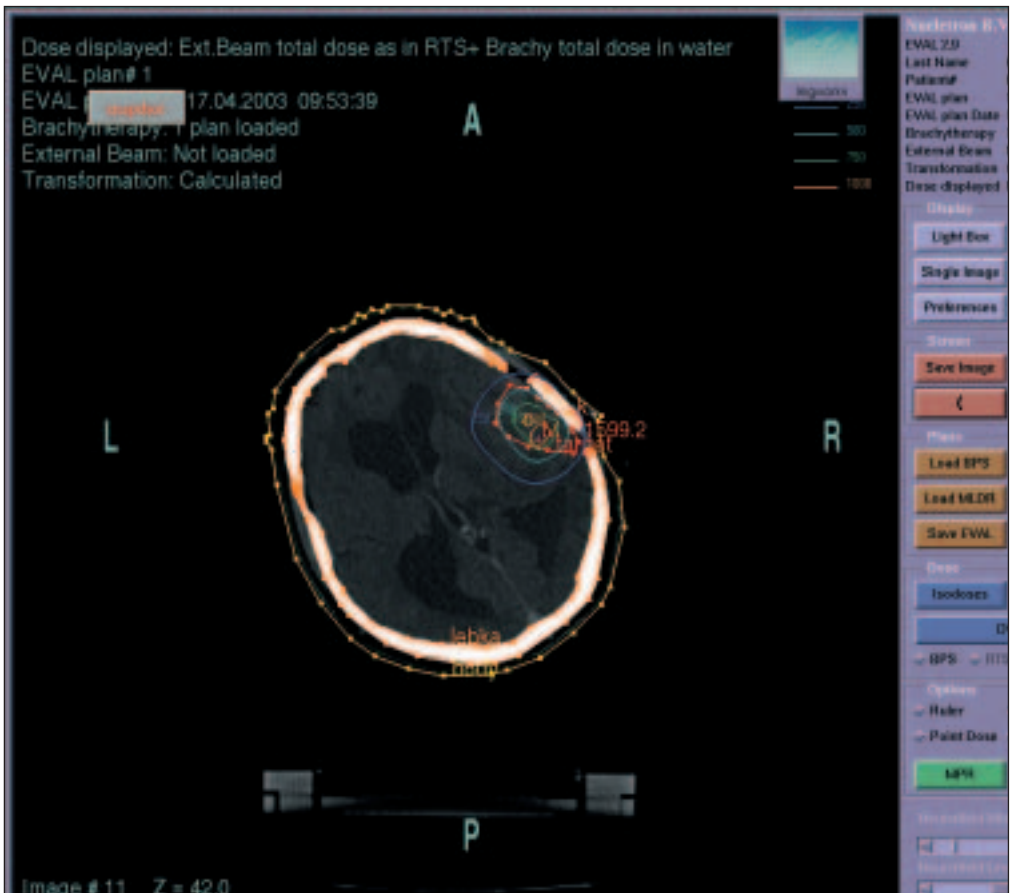
◀ **Obr. 3:** Rekonštrukcia cieľového objemu a katétrov v tranzverzálnych CT rezoch.



Obr. 5 ▶

◀ **Obr. 4:**

Dávková distribúcia v tranzverzálnych CT rezoch.



Obr. 6 ▶

Zvýšenie primárnej dávky žiarenia ERT od 45 do 60 Gy predlžuje prežívanie chorých s malígnym gliómom. Zvýšenie TD od 60 do 70 Gy nepredlžuje všeobecne prežívanie (11). Jednou z príčin môže byť i signifikantne zvýšené riziko vzniku rádionekrózy, ktorá vzniká až u 18% po aplikácii TD 65 Gy. Konvenčná ERT s dávkou do 60 Gy však predstavuje riziko lokálnej recidívy (2,5,8,11).

Z hľadiska liečebnej stratégie je významná charakteristická lokalizácia rekurencie gliómov v mieste pôvodného ložiska. Uvádza sa až 90% rekurencií lokalizovaných v 2 cm periférnom leme nádorového tkaniva (1,2,6).

Aktuálnym trendom radiačnej onkológie je konformita, t.j. prispôbovanie tvaru ožarovaneho objemu nepravidelnému tvaru nádorového ložiska – cieľového objemu. Eškalácia dávky žiarenia v cieľovom objeme technikou konformnej rádioterapie zvýši lokálnu kontrolu ochorenia a súčasne významne zníži akútnu a pozdnú toxicitu v okolitom tkanive. Brachyterapia je svojim princípom takmer dokonalou konformnou rádioterapiou. Jej špecifickou výhodou je minimalizácia radiačnej záťaže personálu a plánovanie dávkovej distribúcie po implantácii bez časovej tiesne.

IBRT je u malígnych gliómov indikovaná ako boost s konvenčnou ERT, alebo ako samostatná paliatívna liečba rekurentných HG gliómov a solitárnych metastáz (2,7,9,12,13).

Materiál a metódy

V Martinskej fakultnej nemocnici používame intersticiálnu brachyterapiu na liečbu recidív mozgových nádorov od roku 2003. Používame high dose rate (HDR) afterloading Micro-Selectron firmy Nucletron, so zdrojom žiarenia ¹⁹²Ir a plánovací systém Plato - verzia BPS 13.7.

Pacienti s rekurentným, histologicky verifikovaným GBM a AA, v minulosti už absolvovali chirurgickú liečbu s následnou postoperačnou konvenčnou ERT (TD do 60 Gy).

Liečba je indikovaná a realizovaná v tímovej spolupráci radiačného onkológa, neurochirurga a rádiofyzika.

Všeobecným medikálnym kritériom je Karnofského výkonnostný status (KPF) viac ako 60 a schopnosť pacienta dať informovaný súhlas s liečbou. Základné vstupné kritériá sú: histologicky verifikovaná rekurencia GBM alebo AA, unifokálna lézia lokalizovaná supratentoriálne, dobre ohraničený reziduálny TU, menší vo všetkých rozmeroch ako 6 cm, nepresehujúci stredovú čiaru. Chorým s väčšími, difúzne rastúcimi TU, infiltrujúcimi corpus callosum alebo s nádormi so subependymálnym šírením, nie je liečba indikovaná pre ich sklon k diseminácii. Pacienti s tumormi, infiltrujúcimi cerebellum, mozgový kmeň alebo bazálne gangliá, nie sú vhodní na intersticiálnu brachyterapiu pre nízku biologickú rezervu v prípade vzniku postradiačnej nekrózy (1,11).

Intersticiálna BRT si vyžaduje presné definovanie jednotlivých cieľových objemov podľa medzinárodných doporučení ICRU Reportu 50, 58 a 62 (15,16,17). Rozsah nádorového objemu je určený diagnostickými zobrazovacími metódami – CT, MR vyšetrením, v sporných situáciách i MR angiografickým a MR spektroskopickým vyšetrením.

Nádorové tkanivo high grade (HG) gliómov je na CT charakterizované zmiešaným signálom vysokej a nízkej denzity (18,19). GBM sa zobrazuje ako hypodenzné ložisko spravidla s mass-efektom. Po podaní kontrastnej látky sa u viac ako 90% pacientov zobrazí hyperdenzný prstenec, tzv. ring sign. Hypodenzné centrum je spôsobené nekrozou a peritumorálnu hypodenznú oblasť tvorí edém (20,21). Je to oblasť nízkej denzity, v ktorej boli u neliečených pacientov post mortem histologicky verifikované nádorové bunky. Napriek tomu je určenie hraníc nádoru v CT obraze zaťažené subjektívnou chybou (6,7). Pre MR obraz je charakteristický T1 signál, korešpondujúci s ring sign na CT. V T2 váženom zobrazení zodpovedá periférna, hyperintenzívna oblasť s prstovitými výbežkami parenchýmu, infiltrovanému nádorovými bunkami spolu s edémom (6,7,20,21).

Komplikovanejšie je určenie cieľového objemu u anaplastických astrocytómov, kde na CT obraze väčšinou chýba enhancement – zvýraznenie po podaní kontrastnej látky. Nádorové tkanivo je väčšinou izodenzné s okolitým mozgovým tkanivom. Pre určenie cieľového objemu je preto nutné vychádzať z MR zobrazenia. Pre maximálne zvýraznenie detailov sa pri MR vyšetrení podáva i.v. kontrastná látka na báze Gadolína. MR obraz na rozdiel od CT, nie je ovplyvnený blízkosťou kostných štruktúr, hlavne v temporálnej oblasti a fossa posterior. Všeobecne platí, že čím je vyššia malignita, tým je väčší i mass efekt. Na odlišenie vitálneho nádorového tkaniva od nekrotického, používame MR spektroskopické a niekedy i MR angiografické vyšetrenie (5,14,18,20,23,24). Táto metodika umožňuje skĺbením morfológických informácií s informáciami funkčnými, resp. metabolickými, čo najpresnejšie ohraničenie cieľového objemu – tzv. contouring (28). Dalším prínosom v detailnejšom popise štruktúrnej patológie, bude v blízkej dobe spustenie fúzie separovane vykonaných CT a MR vyšetrení.

Gross tumor volume (GTV) je definovaný ako oblasť kontrastného zvýraznenia na CT, alebo oblasť T1 na MR zobrazení. Clinical target volume (CTV) predstavuje oblasť kontrastného zvýraznenia na CT obraze s hypodenznou perifokálnou zónou, alebo oblasť vysokého signálu T2 vážená na MR zobrazení s pridaním 2 – 3 cm lemu. Planning target volume (PTV) je pri brachyterapii totožný s CTV, čo je ďalšou výhodou tejto liečebnej metódy (6,17).

Simulácia ožarovaneho objemu je realizovaná v ožarovacej polohe pacienta s hlavou fixovanou Orfitovou maskou. Maskou sa fixuje zároveň aj plexi-template s navrtanými otvormi. Tie umožňujú udržať smer a konštantné rozmiestnenie – geometriu implantovaných katétrov. CT vyšetrenie sa robí v 3 mm vrstvách, korešpondujúcich s radmi otvorov na plexi-template. Contouring cieľového objemu – CTV/PTV v jednotlivých CT rezoch je výsledkom spolupráce rádiofyzika, radiačného onkológa a neurochirurga (Obr.1). Plánovací systém umožní v zobrazenom cieľovom objeme tzv. predplánovanie – „preplanning“ - virtuálnu rekonštrukciu katétrov v rôznych rovinách s určením ich rozmiestnenia a dĺžky, podľa pravidiel Parížskeho systému. Operatér, vzhľadom na umiestnenie cieľového objemu a anatomické pomery v lebečnej dutine, si virtuálne koriguje teoreticky naplánovanú schému implantácie s operačnou technikou. Nylonové katetre implantuje neurochirurg do mozgového tkaniva s pomocou plexi-template cez predvrtané otvory v kalve a fixuje ich ku koži špeciálnymi plastovými prstencami.

Bezprostredne po implantácii katétrov nasleduje lokalizačné CT viacrovinné vyšetrenie, potrebné na reálnu 3D rekonštrukciu implantácie a plánovanie dávkovej distribúcie (Obr.2). Pred samotným plánovaním sa v závislosti od cieľového objemu určia aktívne (dwell) pozície pri transporte irídiového zdroja žiarenia (Obr. 3). Hoci geometria katétrov je určená podľa uvedeneho Parížskeho systému, rozloženie dávky je normalizované k CTV/PTV, čo spolu s geometrickou optimalizáciou zabezpečí zlepšenie indexu konformity a strmý spád dávky v okolitých normálnych tkanách (Obr. 4, 5, 6). Dávková distribúcia sa vyhodnocuje pomocou dávkovo-objemového histogramu. Plánovaná celková TD 30 – 50 Gy je rozložená do troch alebo štyroch dní. Denne sú aplikované dve frakcie v dávke 5,0 – 7,0 Gy na frakciu, interval medzi aplikáciami je minimálne 6 hodín. Počas liečby žiarením sú pacienti hospitalizovaní na Neurochirurgickej klinike, čím je zabezpečená urgentná starostlivosť v prípade možných komplikácií. Počas aplikácie BRT dostávajú pacienti glukokortikoidy, antibiotiká a antiepileptiká.

Po aplikácii liečebnej dávky sú katetre z mozgového tkaniva odstránené. Pacienti sú kontrolovaní v dvojmesačných intervaloch podľa doporučení SOMA/LENT skórovacieho systému (23). Na odlišenie zdravého mozgového tkaniva od postradiačnej nekrózy, recidívy resp. perzistencie nádorového

tkaniva, využívame MR spektroskopické vyšetrenie (12,24,25,26,27). V literatúre doporučované PET vyšetrenie v našich podmienkach štandardne nevykonávame.

Diskusia

Na internetových stránkach National Cancer Institut – Brain tumours adult: Treatment –Health Professional Information {Cancer.gov.} je odporúčená intersticiálna brachyterapia, ako jedna z liečebných modalít recidivujúcich mozgových tumorov dospelých.

Zamboglou et al (9) aplikovali intersticiálnu BRT u pacientov s recidivujúcim GBM. Všetci pacienti mali diagnostikovanú recidívu GBM od 6 do 60 mesiacov po primárnej liečbe externou rádioterapiou v dávke 60 Gy. Druhou skupinou boli pacienti so solitárnymi mozgovými metastázami. Vek pacientov bol od 23 do 73 rokov (priemer 54,2 rokov) a priemerný objem nádorového ložiska 67 cm³ (rozsah 20 – 114 cm³). Na udržanie konštantnej geometrie bol použitý Perspex template, bez stereotaktického rámu. Každý pacient absolvoval 2 frakcie BRT denne, s dávkou 5 Gy na frakciu, o celkovej TD 30-40 Gy, počas 3 - 4 dní. Priemerné prežívacie bolo 42 týždňov pre 31 pacientov s AA a 29 týždňov u 21 pacientov s GBM. Medián prežívania pacientov so solitárnymi metastázami bol 50 týždňov. Komplikácie boli zaznamenané u 3 pacientov, z toho 2 pľúcne embólie a jedna meningitída.

V rokoch 1993 až 1997 bolo v Salpêtriere Hospital (1) 42 pacientom s rekurentným glioblastómom implantované iridium 192 formou dočasnej implantácie. Pravdepodobnosť 6 mesačného prežívania bola u 80% pacientov, z toho 48% preživalo jeden rok a 11% dva roky. Medián prežívania bol 50 týždňov. U 10 pacientov bola vykonaná následne reoperácia pre zhoršenie stavu s evidentným mass-efektom. Histologicky bol potvrdený u 5 pacientov nádor a nekroza, u troch len samo-

statná nekroza. Prežívanie pacientov nebolo ovplyvnené reoperáciou. Potvrdil sa významný vplyv veľkosti nádoru do 30 cm³ a Karnofského skóre nad 70, na predĺženie prežívania a kvalitu života pacientov .

Záver

Liečba malígnych nádorov mozgu je komplexná. Chirurgická liečba ostáva základným liečebným postupom aj napriek tomu, že akýkoľvek radikálny operačný výkon nevedie k trvalému vyličeniu. Radikálna operácia vo vzťahu k prognóze je tiež spochybňovaná (7). Dôvodom postoperačnej rádioterapie je skutočnosť, že aj po makroskopicky totálnej extirpácii tumoru takmer vždy vznikne recidíva. Vplyv postoperačnej rádioterapie na predĺženie prežívania nie je spochybňovaný. RT nezabráni vzniku lokálnej recidívy, avšak spomalí priebeh choroby (20). U pacientov s recidívami AA a GBM nemá reoperácia všeobecne vplyv na prežívanie pacientov. Benefit bol zaznamenaný len u skupiny chorých s Karnofského skóre nad 90 (28). Intersticiálna brachyterapia okrem uvádzaných výhod skraca dobu liečby žiarením a predlžuje prežívanie pacientov s pozitívnym vplyvom na kvalitu života. Splňa tým podmienky efektívnej paliatívnej liečby. Za jednu z hlavných príčin nepriaznivej liečebnej odpovede mozgových nádorov na žiarenie považujeme nejednotnosť názorov vo vymedzení ožarovaného objemu. Využitím možnosti špičkovej diagnostiky v Martinskej fakultnej nemocnici chceme optimalizovať algoritmus vyšetrení s dôrazom na obmedzenie liečebného objemu novodiagnostikovaných i recidivujúcich mozgových nádorov. Zhodnotenie výsledkov liečby IBRT na našom pracovisku si vyžaduje väčší súbor pacientov a dlhší časový interval sledovania. Zatiaľ možno konštatovať, že doba prežívania našich pacientov a benefit pre ich kvalitu života sú zhodné s pozitívnymi výsledkami, publikovanými v literatúre.

Literatúra

1. Mazon, J.J.: Brain tumours. In: Gerbaulet, A., Potter, R., Mazon, J.J., et al.: The GEC ESTRO handbook of brachytherapy. ACCO, Leuven, Belgium, 2002, 585-591
2. Suh, J.H., Barnett, G.H.: Brachytherapy for brain tumor. Hematol Oncol Clin North Am, 1999; 13: 635-650
3. Aird, E.G., Williams, J.R., Rembowski, A.: Brachytherapy. In: Williams, J.R., Thwaites, D.I.: Radiotherapy Physics in Practice. Oxford University Press, New York, second edition 2000, 247-288
4. Steel, G.: Basic clinical radiobiology, 3rd edition. Arnold, London, 2002, 192-204
5. Kleihues, P., Cavenee, W.K.: Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. IARC Press, Lyon, 2000, 9-52
6. Jansen, E., Dewit, L., van Herk, M., et al.: Target volumes in radiotherapy for high-grade malignant glioma of the brain. Radiother Oncol, 2000; 56: 151-156
7. Kala, M.: Malígné nádory mozku dospelého veku. Galén, Praha, 1998, 9-53
8. Štampa, P. a kol.: Radiační onkologie v praxi. Masarykův onkologický ústav, Brno, 2004, 143-155
9. Zamboglou, N., Kolotas, Ch., Baltas D., et al.: Clinical evaluation of CT based software in treatment planning for interstitial HDR brachytherapy. In: Speiser, B.L., Mould, R.F.: Brachytherapy for the 21st century. Nucletron B.V., Veenendaal, 1998, 321-327
10. Simon, J.M., Cornu, P., Boisserie, G., et al.: Brachytherapy of glioblastoma recurring in previously irradiated territory: predictive value of tumor volume. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2002; 53: 67-74
11. Sneed, P.K., Gutin, P.H.: Brachytherapy in central nervous system tumors. In: Leibel, S.A., Phillips, T.L.: Textbook of radiation oncology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1998, 371-382
12. Gross, M.W., Webwe, W.A., Feldmann, H.J., et al.: The value of F-18-fluorodeoxyglucose PET for the 3-D radiation treatment planning of malignant gliomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1998; 41: 989-995
13. Nori, D., Parikh, S.: Intraoperative brachytherapy. In: Speiser, B.L., Mould, R.F.: Brachytherapy for the 21st century. Nucletron B.V., Veenendaal, 1998, 292-299
14. Vaniček, J., Krupa, P.: Využití zobrazovacích metod pro diagnostiku maligních chorob. In: Adam, Z., Vorlíček, J., Koptíková J.: Obecná onkologie a podpůrná léčba. Grada, Praha, 2003, 155-186

15. International Commission on Radiation Units and Measurement: ICRU Report 50. Prescribing, recording and reporting photon beam therapy. Bethesda, Maryland, 1993.
16. International Commission on Radiation Units and Measurement: ICRU Report 62. Supplementum to ICRU 50. Bethesda, Maryland, 1999
17. International Commission on Radiation Units and Measurement: ICRU Report 58. Dose and volume specification for reporting interstitial therapy. Bethesda, Maryland, 1997.
18. Brada, M., Bidmead, M.: Geometric uncertainties in radiotherapy of the brain. In: Geometric uncertainties in radiotherapy treatment planning. Published by The British Institute of Radiology, London, 2003, 109-125
19. Khoo, V., S., Dearnaley, D.P., Finnigan, D.J., et al.: Magnetic resonance imaging (MRI): considerations and applications in radiotherapy treatment planning. Radiother Oncol, 1997; 42: 1-15
20. Cejpek, P., Krupa, P., Štourač, P. a kolektiv.: Malígné nádory mozku. In: Adam, Z., Vorlíček, J., Vaniček, J. a kolektiv.: Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob, vydání druhé. Grada, Praha, 2004, 13-26
21. Schiffer, D.: Brain tumors biology, pathology and clinical references. Springer-Verlag, Berlin, 1997, 137-213
22. Slobodníková, J., Durkovský, A.: Radiodiagnostické metody v onkologii. In: Kaušitz, J., Altaner, Č.: Onkologie. Veda, Bratislava, 2003, 155-174
23. Schultheiss, T.E., Kun, L.E., Ang, K.K., et al.: Radiation response of the central nervous system. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995; 31: 1093-1112
24. Chang, J., Thakur, G., Perera, G., et al.: Image-fusion of MR spectroscopic images for treatment planning of gliomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys, supplement 1, 2004; 60: S223-S224
25. Vigneron, D., Bollen, A., McDermott, et al.: Three-dimensional magnetic resonance spectroscopic imaging of histologically confirmed brain tumors. Magnetic resonance imaging, 2001; 19: 89-101
26. Pirzkall, A., Li, X., Oh, J., Chang, S., et al.: 3D MRSI for resected high-grade gliomas before RT. Tumor extent according to metabolic activity in relation to MRI. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004; 59: 126-137
27. Pirzkall, A., McKnight, T.R., Graves, E.E., et al.: MR-spectroscopy guided target delineation for high-grade Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001; 50: 915-928
28. Pinsker, M., Lumena, C.: Experiences with reoperation on recurrent glioblastoma multiforme. Zentralbl. Neurochir., 2001; 62: 43-47

VÝBĚR BISFOSFONÁTU K LÉČBĚ KOSTNÍHO POSTIŽENÍ U PACIENTŮ S PROKÁZANOU MALIGNITOU

THE RIGHT CHOICE OF BISPHOSPHONATES FOR TREATMENT OF CANCER PATIENTS WITH METASTATIC BONE DISEASE

POURL., HÁJEK R., ADAM Z.

INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO,

Souhrn: Bisfosfonáty jsou poměrně širokou skupinou léků, již od roku 1980 užívané pro léčbu onemocnění spojených s resorpcí kostí. Chemicky se jedná o analoga pyrofosfátů, kde je centrální atom kyslíku nahrazen uhlíkem, vzniká tedy charakteristická vazba P-C-P. Tato vazba je velmi odolná působení hydrolytických enzymů a tedy velice stabilní, zároveň centrální atom uhlíku dovoluje vazbu postranních řetězců a tím získání důležitých biologických vlastností. Bisfosfonáty existují v perorální i parenterální formě. Jejich užívání dnes patří mezi standardní léčebné postupy u metastáz nádorů do kostí včetně mnohočetného myelomu, Pagetovy choroby a osteoporózy. Jejich významnou indikací je rovněž maligní hyperkalcémie. V následujícím textu se pokusíme popsat a porovnat jednotlivé bisfosfonáty a pomoci tak s výběrem bisfosfonátu pro onkologickou indikaci.

Klíčová slova: bisfosfonáty, metastatické kostní postižení, hyperkalcémie

Summary: Bisphosphonates have been used for treatment of bone resorption related diseases since the year 1980. These substances are analogues of pyrophosphates with the characteristic chemical P-C-P bond. This chemical bond is very stable and it allows bonding of another molecules, thus acquiring important biological qualities. Bisphosphonates are available in parenteral and oral pharmaceutical forms. Using of bisphosphonates is a standard treatment in cancer with bone metastases, multiple myeloma, Paget's disease and osteoporosis. They are used in treatment of malignant hypercalcemia as well. In this review we attempt to compare various bisphosphonate forms to facilitate selection of bisphosphonates for oncological patients.

Key words: bisphosphonates, metastatic bone disease, hypercalcemia

Úvod

Bisfosfonáty jsou poměrně širokou skupinou léků, již od roku 1980 užívané pro léčbu onemocnění spojených s resorpcí kostí. Chemicky se jedná o analoga pyrofosfátů, kde je centrální atom kyslíku nahrazen uhlíkem, vzniká tedy charakteristická vazba P-C-P. Tato vazba je velmi odolná působení hydrolytických enzymů a tedy velice stabilní, zároveň centrální atom uhlíku dovoluje vazbu postranních řetězců a tím získání důležitých biologických vlastností. Bisfosfonáty existují v perorální i parenterální formě. Jejich užívání dnes patří mezi standardní léčebné postupy u metastáz nádorů do kostí včetně mnohočetného myelomu, Pagetovy choroby a osteoporózy. Jejich významnou indikací je rovněž maligní hyperkalcémie. V následujícím textu se pokusíme popsat a porovnat jednotlivé bisfosfonáty a pomoci tak s výběrem bisfosfonátu pro onkologickou indikaci.

Základní farmakologické vlastnosti bisfosfonátů

Podle navázaných radikálů na centrálním atomu uhlíku jsou bisfosfonáty děleny některými autory na I., II. a III. generaci (2,33). Zařazení novějších bisfosfonátů není však jednotné, proto práce neuvádí generaci u jednotlivých bisfosfonátů. Novější bisfosfonáty mají v postranním řetězci navázan atom dusíku a skupinu OH, tyto změny v chemické struktuře zvyšují biologickou účinnost novějších preparátů až stonásobně oproti prvním užívaným bisfosfonátům (2,13,33). Pevně se vážou na molekulu hydroxyapatitu na povrchu kostí a protože vazba P-C-P je velmi stabilní mají bisfosfonáty velice dlou-

hý biologický poločas. Vazbou na hydroxyapatit je blokováno odbourávání vápníku z kostí (2,13,33). Bisfosfonáty mají kromě tohoto fyzikálně chemického účinku na kostní tkáň i přímý účinek na osteoklasty, tedy buňky kostní jenž kost resorbují, bisfosfonáty snižují počet aktivních osteoklastů, indukují v nich apoptózu a brzdí vyžívání jejich progenitorů (2). Na molekulární úrovni je mechanismus inhibice osteoklastů vysvětlován dvěma mechanismy, 1. bisfosfonáty obsahující dusík v postranním řetězci blokují postranní úpravu proteinů inhibicí tvorby farnesyl- a geranyl-difosfátu, 2. jednoduché bisfosfonáty bez dusíku v postranním řetězci zasahují rušivě do metabolismu ATP (2, 9,13). V poslední době se objevují práce, které popisují přímý inhibiční vliv bisfosfonátů na maligní buňky, jedná se o studie laboratorní s přímou inhibicí nádorových linií, v těchto in vitro studiích však byly použity podstatně vyšší koncentrace než je maximální koncentrace v plazmě (54). Autoři těchto pokusů hypotetizují, že tak vysoké koncentrace se může dosáhnout v místě osteolytické metastázy uvolněním navázaného bisfosfonátu z kosti, ale to je pouze spekulace, neboť nikdo nezměřil koncentraci bisfosfonátů v lidské kosti s metastázou v okolí metastatické buňky. Obecně se bisfosfonáty velmi špatně vstřebávají z trávicího traktu. Bisfosfonáty nejsou metabolizovány a jsou vylučovány v nezměněné podobě močí, proto je třeba opatrnosti při podávání bisfosfonátů u renální insuficience (2, 21, 33). Společné nežádoucí účinky bisfosfonátů – Perorální podávání bisfosfonátů může být doprovázeno příznaky z oblastí horních etáží gastrointestinálního traktu, tedy nevolností, zvr-

cením, bolestmi žaludku a pálením žáhy. Tyto nežádoucí účinky lze částečně eliminovat zapitím léků množstvím (alespoň 300ml) vody. Při vysoké koncentraci bisfosfonátů jsou tvořeny nerozpustné komplexní sloučeniny, které mohou působit poškození ledvin. Proto jsou doporučeny rychlosti infuzí i přípustné koncentrace u každého bisfosfonátu. U renální insuficience je doporučeno snížit dávky léků (2,21).

Aminobisfosfonáty mohou při prvním podání vyvolat flu-like syndrom, který většinou velmi často odezní a nebývá důvodem k přerušení léčby. Hypokalémie při podávání bisfosfonátů je téměř standardní efekt. Bisfosfonáty totiž inhibují uvolňování vápníku z kostí. Vznik hypokalémie není příznivý neboť se aktivuje sekrece parathormonu a tím i osteolýza, proto je některými autory doporučena substituce kalcia i vitamínu D (2).

Jednotlivé bisfosfonáty

Informace o dávkování a podávání jednotlivých léků které nejsou označeny číslem citace vycházejí z firemního doporučení pro jednotlivé preparáty, získané z příbalových letáků a AISLP.

Alendronat a risendronat

Oba preparáty jsou v ČR určeny pouze pro léčbu osteoporózy. Jsou krátce zmíněny pouze pro úplnost. Alendronat - patří do skupiny aminobisfosfonátů. Vyráběny jsou 10mg tablety jenž se užívají 1x denně a 70mg tablety užívané 1x týdně. Randomizované studie prokázaly zvýšení kostní density u pacientů s osteoporózou (73). Mezi nejčastější a nejvýznamnější nežádoucí účinky patří problémy typu horního dyspeptického syndromu, které lze velmi dobře eliminovat preventivními opatřeními. Risendronat - další ze skupiny aminobisfosfonátů, používány jsou 5mg a 35 mg tablety, užívají se jedenkrát denně či týdně. Prokázáno bylo zvýšení kostní density oproti pacientům užívajícím placebo (43).

Klodronat

Patří do skupiny bisfosfonátů bez molekuly dusíku v postranním řetězci, dostupný je v perorální a intravenózní formě. Doporučenou dávkou podávanou perorálně je 1600mg denně ve formě kapslí, užívá se na lačno a to nejméně 2h před jídlem, neboť alkalizace žaludečního sekretu významně snižuje procento vstřebané látky, které se již tak pohybuje okolo 3% (2,17). Doporučená injekční dávka je 1600mg měsíčně, aplikace se obvykle provádí jedenkrát za 14 dní v dávce 900mg v 500ml injekčního roztoku v 3-4 hodinové infuzi (2). U pacientů s výraznou osteolýzou je možné i podávání dávek vyšších, doporučeno je až 3200mg denně perorálně a 3000mg měsíčně intravenózně (27). Klodronat se užívá k léčbě hyperkalémie v dávce 1500mg denně v pomalé nitrožilní infuzi (minimálně 4hodiny) (7).

U tohoto bisfosfonátu jsou k dispozici dlouhodobé výsledky a publikována byla řada výsledků randomizovaných studií. V databázi MEDLINE bylo nalezeno celkem 10 odkazů na randomizované studie kdy byl dlouhodobě podáván klodronat v onkologické indikaci porovnáván s placebem. Hodnocené parametry však nebyly vždy posuzovány stejně ani ve stejném časovém intervalu.

Ve studii s největším počtem pacientů (1069) bylo prokázáno snížení počtu kostních metastáz ve skupině užívajících klodronat (12 pacientů s novým postižením kostí) oproti placebo (28 pacientů s novým postižením kostí) tento příznivý trend však platil pouze při užívání klodronatu po jeho vysazení již nebyl signifikantní rozdíl v počtu kostních metastáz u obou skupin (76, 77). Rovněž další studie u žen s karcinomem prsu bylo opakovaně potvrzeno snížení tvorby kostních metastáz ve skupině s klodronatem při jeho užívání (28, 44, 47, 61). U pacientů s mnohočetným myelomem bylo prokázáno zvýšení kostní density i snížení počtu patologických fraktur (65, 88). Výsledky týkající se působení klodronatu na snížení počtu metastáz solidních tumorů v ostatních orgánech jsou odlišné. Studie německých

autorů provedená na celkem 302 pacientkách prokázala snížení výskytu viscerálních metastáz ve skupině s klodronatem (13 případů, tj. 8%) oproti skupině s placebem (27 případů tj. 19%) (28). U studie finských autorů provedené na celkem 282 pacientech, která sledovala pacienty celkem 3 roky, bylo prokázáno zvýšení počtu viscerálních metastáz ve skupině s klodronatem (60 pacientů tj. 43% s novými metastázami) oproti placebo (36 pacientů tj. 25%) (85), ostatní studie neprokázaly statisticky signifikantní rozdíl v obou skupinách jak u karcinomu prsu tak karcinomu prostaty (13, 14, 15). Celkové přežití bylo hodnoceno jako stejné u většiny studií kde bylo cílem jeho hodnocení. U zmíněné studie finských autorů bylo dokonce horší ve skupině s klodronatem (19). U mnohočetného myelomu nebyl prokázán vliv na dlouhodobé přežití, kromě podskupiny celkem 153 pacientů ze studie anglických autorů, tyto pacienti neměli vstupně postižený skelet detekovatelným osteolytickým ložiskem. Přežití u skupiny pacientů užívajících klodronat bylo 1362 dní oproti 1094 dnům u pacientů užívajících placebo (65). Redukce bolesti hodnocena podle dotazníků byla potvrzena ve všech studiích, kde to bylo jedním z cílů studie (6, 22, 31, 49, 51, 79, 87). Nežádoucí účinky klodronatu jsou charakteristické pro tuto skupinu léků. Nežádoucí účinky typu horního dyspeptického syndromu se u perorální formy vyskytují až v 14% a u některých pacientů mohou vést k přerušení léčby, nebo je nutno zaměnit za intravenózní lék (53, 68).

Pamidronat

Patří do skupiny aminobisfosfonátů. Pamidronat je registrován pouze v intravenózní formě. Doporučené dávka pro pacienty s osteolytickým postižením skeletu je 90mg po 21 dnech. Podává se v minimálně v 500ml infusním roztoku alespoň 2 hodiny. Stejnou dávkou je doporučeno léčit hyperkalémií, podává se za stejných pravidel 1x denně až do poklesu kalcémie (2,10). Publikované randomizované studie (celkem 4 v databázi MEDLINE) hodnotily efekt pamidronatu oproti placebo při dlouhodobém podávání onkologickým pacientům. Ve studii u pacientek s karcinomem prsu provedené u celkem 751 pacientů byl prokázán vliv pamidronatu na snížení kostních komplikací oproti placebo (50% kostních komplikací vs 64%) (56), podobně u mnohočetného myelomu ve studii u 90 pacientů byl prokázána redukce vzniku nových osteolytických ložisek ve skupině s pamidronatem oproti placebo (40% vs 80%) (10, 11). Zvýšená byla rovněž kvalita života u pacientů užívajících pamidronat) Nebyl však prokázán příznivý vliv na celkové přežití u solidních nádorů ani mnohočetného myelomu (10, 25, 40, 56, 69). Při první aplikaci pamidronatu se asi u 10% pacientů může objevit krátkodobě trvající flu-like syndrom, bez klinického významu (2,33). Při rychlé aplikaci velkého množství léku dochází k tvorbě komplexů a poškození ledvin, proto je důležité dodržet výše uvedená doporučení. Při renální insuficienci není doporučeno redukovat dávku pamidronatu, ale prodlužuje se doba aplikace na minimálně 4 hodiny a je doporučeno snížit koncentraci léku 1x (33) Perorální forma léku není pro vysokou incidenci nežádoucích účinků používána (4, 57).

Ibandronat

Biologicky druhý nejúčinnější bisfosfonát podávaný v miligramových dávkách, existuje jak v perorální tak intravenózní formě. Výrobce doporučena dávka pro intravenózní podání je 6mg měsíčně a perorálně se užívá 50mg denně.

Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v účinnosti ekvivalentních dávek enterální a parenterální formy léku (15,16). Ibandronat lze úspěšně využít pro léčbu nádorové hyperkalémie, kdy je kalcémie normalizována většinou do 2 dnů (38). Doporučeno je aplikovat 6mg denně intravenózně, další dávkování se řídí aktuální hladinou kalcémie. Podává se až do úpravy stavu, podle hladiny sérového kalcia (33). Randomizované studie u onkologických pacientů (celkem 4 v databázi MEDLINE) porovnávaly efekt ibandromatu oproti placebo. Studie u celkem 466 pacientek s karcinomem prsu

prokázala prodloužení doby do další události vyžadující intervenci na skeletu u pacientů užívajících 6mg ibandronatu měsíčně oproti placebo (50,6 týdnů vs 33,1 týdnů) (15). Podobné výsledky měla i studie provedená u 564 pacientů s karcinomem prsu, která hodnotila účinnost perorálního ibandronatu 50mg denně (16). U mnohočetného myelomu byla publikována jediná randomizovaná studie, kde bylo pacientům aplikováno 2mg intravenózního ibandronatu 1x měsíčně nebo placebo. Nebyl prokázán rozdíl ve vzniku nových kostních komplikací mezi oběma skupinami (67). Studie s vyššími dávkami ibandronatu u nemocných s mnohočetného myelomu nebyly doposud publikovány. Obě formy ibandronatu zvyšují kvalitu života a snižují bolest u kostních metastáz solidních tumorů i mnohočetného myelomu (15, 16, 26, 37, 38, 60).

Nežádoucí účinky typu horního dyspeptického syndromu jsou nižší než u perorálních preparátů nižší generace, vyskytují se asi u 10% pacientů. Zásadní informace je, že nedochází k zvýšené incidenci poškození ledvin oproti placebo u pacientů užívajících intravenózní ibandronat dlouhodobě (15,16). Při podávání menších dávek nedochází k tak výrazné tvorbě komplexů jako u preparátů nižší generace. Při závažném poškození ledvin (clearance kreatininu pod 30ml/min) je výrobcem doporučena redukce intravenózní dávky na 2mg měsíčně a perorální až na 50mg týdně (39). Neexistují však data potvrzující biologickou účinnost této dávky. Celkově je možné na základě dostupných dat konstatovat, že se jedná o lék s velmi dobrou účinností, tolerancí a nízkou toxicitou

Zolendronat

Biologicky nejúčinnější bisfosfonát, se dvěma molekulami dusíku v postraním řetězci. Doporučená dávka je 4mg zolendronatu v patnácti minutové infuzi 1x měsíčně. Zolendronat lze užít i pro léčbu hyperkalcémie v dávce 4mg denně až do normalizace kalcémie.

Zolendronat jako jediný bisfosfonát byl porovnáván v randomizované studii nejen oproti placebo ale i oproti bisfosfonátu (pamidronatu). Studie byla provedena u pacientů s karcinomem prsu a mnohočetným myelomem. Hlavní cíl studie bylo potvrzení skutečnosti, že zolendronat není méně účinnější než pamidronat. Studie byla provedena u celkem 1114 pacientů v celém souboru pacientů nebyl statisticky signifikantní rozdíl mezi pamidronatem a zolendronatem. U pacientek s karcinomem prsu byl u pacientek užívajících zolendronat signifikantně snížen počet kostních komplikací oproti skupině s pamidronatem (48 % vs 58%), u zolendronatu byla také delší doba do výskytu kostní komplikace (310 vs 174 dní). U mnohočetného myelomu nebyl prokázán rozdíl mezi oběma bisfosfonáty (80, 81).

Byly provedeny i randomizované studie (publikovány celkem 2), které porovnávaly účinek zolendronatu oproti placebo. Studie provedená na celkem 744 pacientech s kostními metastázami solidních tumorů (kromě karcinomu prsu a prostaty) prokázala snížení incidence kostních komplikací u pacientů užívajících zolendronat oproti placebo (kostní komplikace u 35% pacientů vs 44%) (82). Existují přesvědčivá laboratorní data o přímém protinádorovém působení u karcinomu prostaty, prsu a mnohočetného myelomu (12).

Podle doporučení výrobce je nutné pečlivě monitorovat funkce ledvin, zolendronat by neměl být podáván u pacientů se sérovým kreatininem vyšším než 256mmol/l a při elevaci kreatininu o 10%. Hodnota kreatininu by měla být známa před každým podáním zolendronatu.

Srovnání jednotlivých bisfosfonátů pro podpůrnou léčbu v onkologii

Hodnocení bisfosfonátů v randomizovaných studiích Prospektivní randomizované studie, nejlépe dvojitě zaslepené, resp. jejich výsledky, jsou základem pro doporučené léčebné postupy a každý nový lék musí před svým schvá-

lením projít „sítím“ těchto studií. Nejinak tomu bylo i u všech bisfosfonátů. Výsledky nejdůležitějších randomizovaných studií jsou uvedeny ve staticích u jednotlivých bisfosfonátů, uveden je také počet randomizovaných studií publikovaných v databázi MEDLINE. Nejvíce randomizovaných studií bylo provedeno s klodronatem, což souvisí s dlouhodobým používáním klodronatu v klinické praxi. Účinek klodronatu, pamidronatu a ibandronatu byl hodnocen v randomizovaných studiích pouze oproti placebo. Jen jedna randomizovaná studie porovnávala účinek dvou bisfosfonátů navzájem. Tato studie porovnávala účinnost zolendronatu a pamidronatu. V celém souboru pacientů nebyl statisticky signifikantní rozdíl v obou preparátech. U karcinomu prsu byl zolendronat hodnocen výrazně lépe (80, 81). Více viz odstavce o jednotlivých preparátech. Porovnání jednotlivých bisfosfonátů je v současné době nemožné, protože hodnocená kritéria v jednotlivých randomizovaných studiích nejsou totožná, bisfosfonáty byly podávány po různě dlouhou dobu a nebylo použito stejné metodiky pro hodnocení studií.

Prodloužení života při léčbě bisfosfonáty

Data týkající se vlivu bisfosfonátů na dlouhodobé přežití jsou k dispozici hlavně u klodronatu. Výsledky jsou však neprůkazné, pouze jediná studie prokázala prodloužení celkového přežití ve skupině s klodronatem oproti placebo (29) studie finských autorů dokonce prokázala horší přežití u pacientů užívajících klodronat oproti placebo (85). Nejvíce studií neprokázalo vliv klodronatu na prodloužení přežití (6, 22, 31, 49, 51, 79). U pamidronatu nebyl prokázán žádný vliv na celkové přežití (10, 25, 40, 56, 69). Hlavním cílem studií s ibandronatem a zolendronatem nebylo hodnocení dlouhodobého přežití (80, 81). Na základě dostupných dat se autoři kloní k názoru, že bisfosfonáty nemají zásadní vliv na délku přežití u onkologicky nemocných, ale vzhledem k pozitivnímu ovlivnění kvality života patří do podpůrné léčby nemocných s metastatickým postižením skeletu.

Aplikační cesta bisfosfonátů

Bisfosfonáty se velmi špatně vstřebávají z gastrointestinálního traktu. Maximální se resorbuje 10% účinné látky. Procento vstřebané látky se výrazně snižuje současným požitím jídla (2). Existují perorální varianty klodronatu a ibandronatu. Bylo prokázáno, že doporučené denní dávky těchto preparátů mají stejnou účinnost jako intravenózní formy obou léků (2,33). Zkoušel se i perorální pamidronat ale pro nežádoucí účinky typu horního dyspeptického syndromu byl stažen (57). Všechny zmíněné bisfosfonáty pro onkologickou indikaci existují v injekční podobě.

Hlavní výhody perorálních forem bisfosfonátů jsou: 1) Snadná „neinvazivní“ aplikace; 2) Pacient nemusí navštěvovat zdravotnické zařízení. Mezi nevýhody perorálního podání patří: 1) Možné nežádoucí účinky na GIT a s tím spojená nutnost dodržovat preventivní opatření (užití na lačno, zapít množstvím vody a jiné); 2) Nutnost vysoké compliance při užívání léku což může být problém hlavně pro starší pacienty. Hlavní výhody intravenózních forem bisfosfonátů jsou: 1) Dlouhý interval mezi jednotlivými aplikacemi léku a tím možné podání i hůře spolupracujícím pacientům; 2) Žádné nežádoucí účinky na GIT. Mezi nevýhody intravenózního podání patří: 1) Návštěva zdravotnického zařízení a s tím spojené další výdaje včetně obsazení lůžka na stacionáři; 2) Flu-like syndrom při prvním podání aminobisfosfonátů; 3) Invazivní zákrok.

Při volbě aplikační cesty bisfosfonátů je důležité přihlídnout ke všem výhodám i nevýhodám jednotlivých forem léku vzhledem k individualitě pacienta. Platí, že podstatným faktorem ve výběru lékové formy by mělo být i přání pacienta.

Tabulka č. 1

Dávkování a redukce dávky u jednotlivých bisfosfonátů

Název léku	Aplikační cesta	Doporučená dávka	Redukce při renální insuficienci	Monitorace ledvinných funkcí
Klodonat	p.o	1600mg denně	Ano, redukce o 25-50% dle clearance kreatininu	Není doporučeno
Klodonat	i.v.	1800mg měsíčně ve dvou dávkách	Ano, redukce o 25-50% dle clearance kreatininu	Je vhodné
Pamidronat	i.v	90mg 1x za tři týdny	Ne, zvýšit dobu podávání až na 4 h, snížit koncentraci léku 1x	Není doporučeno ale je vhodné
Ibandronat	p.o	50mg denně	Ano, 50mg denně	Není doporučeno
Ibandronat	i.v	6mg měsíčně	Ano, 2mg měsíčně	Ano je doporučeno
Zolendronat	i.v	4mg měsíčně	Při kreatinu nad 256mmol/l podání kontraindikováno	Doporučena před každým podáním

Dávkování bisfosfonátů při poškození některých orgánů

Hlavním eliminačním orgánem pro bisfosfonát jsou ledviny, proto je dávkování bisfosfonátu při poškození ledvin věnována značná pozornost. Pro přehlednost je vytvořena tabulka, kde je uvedeno dávkování při renální insuficienci. Pamidronat jako jediný nemá firemní doporučení k redukci dávek při poškození ledvin. Vhodné je však prodloužit dobu infuze a snížit koncentraci léku v infuzi jak je uvedeno (2, 33). Klodonat může způsobit renální insuficienci, případně zhoršit stávající pokud je podáván například v kombinaci s nesteroidními antiflogistiky. Redukce dávek při renální insuficienci je vhodná. Neexistují však jednotná doporučení, respektive je doporučena 25-

50% redukce dle clearance kreatininu. Dlouhodobě užívaný ibandronat signifikantně nezvyšuje incidenci renální insuficience oproti placebo (58). Nicméně firemní doporučení nabádá k opatrnosti při renální insuficienci a současném podávání ibandronatu a případnou redukci dávky při závažném poškození ledvin až na 50%. Zolendronat může způsobit renální insuficienci nebo případně zhoršit stávající. Je nezbytné nutně pečlivě monitorovat funkce ledvin při jeho podávání. Zolendronat by neměl být podáván u pacientů se sérovým kreatininem vyšším než 256mmol/l a při elevaci kreatininu o 10% by mělo být zastaveno jeho podávání (80). Podrobněji viz tabulka 1. Nebyl popsán negativní vliv na jaterní parenchym u žádného bisfosfonátu, u jaterního selhání však platí obecná doporučení pro farmakoterapii tohoto stavu. Při dlouhodobé terapii některými bisfosfonáty (pamidronatem a zolendronatem) byl popsán ojedinělý vznik avaskulární nekrozy čelisti při dlouhodobé terapii. Incidence nebyla vyšší než 1/10tis pacientů, u všech pacientů s tímto nežádoucím efektem předcházela nekroze jiný patologický stav, nejčastěji resekce zubu, nebo jiné poranění čelisti. U těchto stavů je proto třeba dbát zvýšené opatrnosti při používání bisfosfonátů (36, 63). U žádného bisfosfonátu nebyl prokázán přímý negativní efekt na kardiovaskulární systém.

Typ kostního postižení a volba bisfosfonátu

Všechny publikované randomizované studie používají bisfosfonáty u poškození skeletu solidním tumorem nebo mnohočetným myelomem, kde jsou rovněž tvořena osteolytická ložiska. (viz výše). Výjimku tvoří studie s karcinomem prostaty, ty však byly designovány převážně na ověření analgetického účinku bisfosfonátů. Toto využití vyplývá s podstaty farmakologického účinku, kdy bisfosfonáty přímo tlumí buňky resorbující kost-osteoklasty. V těchto studiích nebylo jednoznačně verifikováno jedná-li se o osteolytické či osteoblastické poškození skeletu. Existuje jediná práce kdy je bisfosfonát, konkrétně zolendronat, úspěšně použit pro léčbu verifikova-

Tabulka č. 2

měsíční náklady na léčbu dle číselníku VZP

Firemní název léku	Navrhnutá měsíční dávka	Úhrada pojišťovnou
Bonefos 800mg cps	2 tablety každý den	5938 Kč (tbl obd 60x800mg)
Lodronat 520mg tbl obd	3 tablety každý den*	5938 Kč** (tbl obd 60x520mg)
Bonefos inj	1800mg měsíčně ve 2 dávkách	2817 Kč (inf conc 6x300mg)
Pamitor 90mg inj	90 mg v intervalu tři týdnů	5637 Kč** (inf conc 1x90mg)
Bondronat 6mg	6mg měsíčně v jedné dávce	10212 Kč (inf conc 1x6mg)
Bondronat 50mg cps	50mg denně	prozatím neurčeno
Zometa 4mg	4mg měsíčně v jedné dávce	8150 Kč** (inf conc 1x4mg)

* Na základě studií existují pochybnosti o dostatečné účinnosti pouze 2 tablet denně.

** U těchto preparátů se orientační cena a maximální úhrada v číselníku VZP 1/2005 liší, a platí, že cena je odlišná v různých regionech i lékárnách a doplatek pacienta je minimalizován a nebo se nedoplácí nic. Z tohoto důvodu neuvádíme doplatek pacienta.

ných osteoblastických kostních lézí (56). Tento poznatek o působení zolendronatu musí být potvrzen randomizovanou studií. Nelze zatím doporučit paušální mimostudiové použití zolendronatu u osteoblastického postižení skeletu.

Farmakoekonomika

Ceny uvedené v tabulce 2 jsou převzaty z posledního platného číselníku VZP u nekategorizovaných preparátů jsou pouze orientační na základě firemních informací. Uvedeny jsou náklady na měsíc udržovací léčby. Kromě pamidronatu a zolendronatu neexistuje přímé srovnání účinnosti jednotlivých preparátů, proto při výběru bisfosfonátu hraje farmakoekonomické hledisko důležitou roli. Pouhá cena léku, ale není jediný náklad související s jeho podáním. K nákladům na lék je nutno připočítat 1) práci zdravotnického personálu 2) použité materiální vybavení 3) nezanedbatelné jsou rovněž náklady na transport nemocných jdoucích ze zdravotního pojištění. Tyto náklady zcela postrádají perorální preparáty. .

Dostupnost jednotlivých bisfosfonátů

U všech zmíněných bisfosfonátů existuje indikační omezení, léčbu těmito preparáty může indikovat onkolog, hematolog, internista a ortoped, u zolendronatu navíc i pneumolog. Přehledně v tabulce 2.

Klodonat je registrován v intravenózní formě jako Bonefos, hrazen je v plně vyšší jako zvlášť účtovaný léčivý přípravek v ambulantní péči nebo v rámci lékového paušálu, jde-li o poskytování ústavní péče. V perorální formě jsou registrovány dva přípravky Bonefos (Schering) a Lodronat (Roche). Bonefos je plně hrazen pojišťovnou. Lodronat je hrazen pouze částečně. Orientační cena z číselníku VZP a maximální úhrada pojišťovnou se liší cca o 700Kč na balení 60x520mg tbl. Na základě srovnávací studie však existují odůvodněné pochybnosti zda dávkování Lodronatu (2x520mg) je dostatečné, respektive srovnatelné s doporu-

čenou dávkou 2x800mg u Bonofosu a obecně klodronatu (52). Pamidronat je registrován v intravenózní formě jako Aredia (Novartis), ale tento firemní preparát je od roku 2004 v ČR nedostupný, respektive jeho výroba byla ukončena. Dalším preparátem je Pamitor (Torrex Pharma) účtován jako zvlášť účtovatelný léčebný preparát v případě ambulantní péče a v rámci lékového paušálu při ústavní péči. Orientační cena z číselníku VZP a maximální úhrada pojišťovnou se liší cca o 3000 tisíce na měsíční dávku.

Ibandronat je registrován v intravenózní formě jako Bondronat (Roche), je hrazen plně jako zvlášť účtovaný léčivý přípravek v ambulantní péči nebo v rámci lékového paušálu, jde-li o poskytování ústavní péče. Perorální forma Bondronatu je registrovaná, ale k lednu 2005 není kategorizovaná. Zoledronat je registrován jako Zometa (Novartis). Orientační cena z číselníku VZP a maximální úhrada pojišťovnou se liší cca o 6000 tisíc na měsíční dávku. Finanční údaje vycházejí z aktu-

álně platného číselníku VZP, doplatky vycházejí pouze z odečtení orientační ceny a maximální úhrady, aktuální doplatek se většinou jistým způsobem liší podle regionu a lékárny a doplatky jsou minimalizovány nebo neexistují.

Závěr

Bisfosfonáty jsou léky používané od 80-let minulého století. Jejich standardní indikací je osteoporóza, solidní tumory metastazující do kostí a mnohočetný myelom i bez prokazatelných kostních metastáz (2,33). Lze konstatovat, že bisfosfonáty mají velice příznivý vliv na kvalitu života těchto nemocných, ale vliv na celkovou dobu přežití u nádorových onemocnění zůstává zatím nejasný. Navíc chybí srovnání účinnosti jednotlivých bisfosfonátů, kromě zoledronatu a pamidronatu. Platí tedy že volba bisfosfonátu je plně závislá na lékaři, s přihlédnutím k výhodám a nevýhodám jednotlivých preparátů a s přihlédnutím k jedinečnosti pacient.

Literatura:

1. Adam, Z., Vorlíček, J.: Jaká je optimální dávka klodronatu pro pacienty s maligní osteolýzou?. *Klin Onkol*, 17, 2004, 169-175.
2. Adam, Z., Vorlíček, J., Táborský, E., et al.: Farmakologie a klinický efekt léků inhibujících osteolýzu v Farmakologická léčba chronické bolesti a patologických osteolytických procesů. *MU Brno*, 2000; 15-50.
3. Adam, Z.: Bisfosfonáty v léčbě mnohočetného myelomu. *Osteol. Bull.*, 6, 2001, 3, s. 95.
4. Adami, S., Zamberlan, N.: Adverse effects of bisphosphonates : a comparative review. *Drug Saf.* 14, 1996, 158-170.
5. Aranko, K., Hanhijarvi, H., Humpresys, M. et al.: Beneficial effects of oral clodronate in the management of osteolysis and hypercalcaemia. *Bone*, 16, 1995, 275-278.
6. Arican, A., Jeli, F., Akbulut, H. et al.: The effect of two different doses of oral clodronate on pain in patients with bone metastases. *Med. Oncol.*, 16, 1999, 204-210.
7. Atula, S. T., Tahtela, R. K., Nevalainen, J. I., et al.: Clodronate as a single dose intravenous infusion effectively provides short-term correction of malignant hypercalcaemia. *Acta Oncol.*, 7, 2003, 735-740.
8. Atula, S., Powles, T., Paterson, A. McCloskey, E.: Extended safety profile of oral clodronate after long-term use in primary breast cancer patients. *Drugs Safety*, 26, 2003, 661 - 671.
9. Beek, E. R., Cohen, L. H., Leroy, I. M. et al.: Differentiating mechanism of antiresorptive action of nitrogen containing bisphosphonates. *Bone* 33, 2003, 805-811.
10. Berenson, J. R., Lichtenstein, A., Porter, L. et al.: Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 334, 1996, 488-493.
11. Berenson, J. R., Lichtenstein, A., Porter, L. et al.: Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma reduces skeletal events. *Myeloma Aredia Study Group*, *J. Clin. Oncol.*, 16, 1998, 593-602.
12. Berenson, J. R., Rosen, L. S., Howel, A. et al.: Zoledronic acid reduces skeletal-related events in patients with osteolytic metastases. *Cancer*, 91, 2001, 1191-11200.
13. Bertram G, Katzung H, *Základní a klinická farmakologie*, H+H, Praha 1994
14. Body J. J., Tripathy, D., Bergström, B.: Relief from metastatic bone pain with standard and intensive ibandronate dosing. *Bone*, 34, 2004, Suppl. 1, S. 83
15. Body, J. J., Diel, I. J., Lichinitser, M. R. et al.: Intravenous ibandronate reduces the incidence of skeletal complications in patients with breast cancer and bone metastases. *Ann. Oncol.*, 14, 2003, s. 1399-1405
16. Body, J. J., Diel, I. J., Lichinitser, M. R. et al.: Oral ibandronat reduces the risk of skeletal complications in breast cancer patients with metastatic bone disease: results of two randomized placebo-controlled phase III studies. *Brit. J. Cancer.*, 90, 2004, 1133-1137
17. Body, J. J., Diel, I., Bell, R.: Profiling the safety and tolerability of bisphosphonates. *Semin Oncol.*, 31, 2004, 5, Suppl 10, 73-8.
18. Body, J. J., Mancini, I.: Bisphosphonates for cancer patients: why, how, and when? *Support. Care Cancer*, 10, 2002, 399 - 407.
19. Bounameaux, H. M., Schifferli, J., Montani, J. P.: Renal failure associated with intravenous diphosphonates. *Lancet*, 1983, 1, 471-476.
20. Brychta, M.: Bisfosfonáty v onkologii - analgetický efekt u kostních metastáz karcinomu prsní žlázy. *Bolest*, 4, 2001, 3, s. 160-163.
21. Conte, P., Guarneri, V.: Safety of intravenous and oral bisphosphonates and compliance with dosing regimens. *Oncologist*, 9, 2004, Suppl 4, 28-37.
22. Dearnaley, D. P., Sydes, M. R., Mason, M. D., et al.: A double blind placebo-controlled randomized trial of oral sodium clodronate for metastatic prostate cancer. *J. Natl. J. Cancer Inst.*, 95, 2003, s. 1300-1311.
23. Denissen, H., Montanari, C., Martinetti, R. et al.: American Society of Clinical Oncology guidelines on the role of bisphosphonate in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 18, 2000, 1378 - 1391.
24. Dhodapkar, M. V., Sing, J., Mehta, J. et al.: Pamidronate in asymptomatic multiple myeloma. *Brit. J. Haematol.*, 103, 1998, 530-532.
25. Diamond, T. H., Winters, J., Smith, A., et al.: The antiosteoporotic efficacy of intravenous pamidronate in men with prostate carcinoma receiving combined androgen blockade: a double blind, randomized, placebo-controlled crossover study. *Cancer*, 92, 2001 s. 1444-50.
26. Diel, I. J., Body, J. J., Lichinitser, M. R. et al.: Improved quality of life after long term treatment with the bisphosphonate ibandronate in patients with metastatic bone disease due to breast cancer. *Eur. J. Cancer*, 40, 2004, 1704-1712.
27. Diel, I. J., Marschner, N., Kindler, M. et al.: Continuous oral versus intravenous interval therapy with bisphosphonates in patients with breast cancer and bone metastases. *J. Clin. Oncol.*, Suppl. ASCO, 1999, abs. 488.
28. Diel, I. J., Solomayer, E. F., Costa, S. D. et al.: Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N. Engl. J. Med.*, 339, 1998, s. 357-363.
29. Diel, I. J.: Bisphosphonate in the adjuvant therapy of breast cancer, *Gynecol. Geburtshilfliche Rundsch.*, 38, 1998, 64-71.
30. Djulbegovic, B., Wheatley, K., Ross, J. et al.: Bisphosphonate in multiple myeloma. *Cochrane Database System Rev.*, 2, 2003; CD003188
31. Elomaa, I., Kylmala, T., Tammela, T. et al.: Effect of oral clodronate on bone pain. A controlled study in patients with metastatic prostatic cancer. *Int. Urol. Nephrol.*, 24, 1992, 159-166.
32. Ernst, D. S., Brasher, P., Hagen, N. et al.: A randomized controlled trial of intravenous clodronate in patients with metastatic bone disease and pain. *J. Pain Symptom Manage.*, 13, 1997, 319-326.
33. Fleisch, H.: *Bisphosphonate in bone disease*. Academic press, San Diego, San Francisco, 2000, 212 s.
34. Green, J. R.: Bisphosphonate in cancer therapy. *Curr. Opin. Oncol.*, 14, 2002, 609 - 615.
35. Green, R. G.: Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer*, 97, 2003, Suppl, 3, 840-847.
36. Greenberg, M. S.: Intravenous bisphosphonates and osteonecrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 98, 2004, 3, 259-60.
37. Heidenreich, A., Elert, A., Hofmann, R.: Ibandronate in the treatment of prostate painful osseous metastases. *Prostate Cancer, Prostatic Diseases*, 5, 2002, 231-235.
38. Heidenreich, Ohlmann, C., Olbert, P.: et al.: High dose ibandronat is effective and well tolerated in the treatment of pain and hypercalcaemia due to metastatic urologic cancer. *Eur. J. Cancer.*, 2003, Suppl. 5, S 271
39. Hillner, B. E., Ingle, J. N., Berenson, J. R. et al.: American Society of Oncology Guideline on the role of bisphosphonate in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 18, 2000, 1378 - 1391.
40. Hultborn, R., Gundersen, S., Ryden, S. et al.: Efficacy of pamidronate in breast cancer with bone metastases: a randomized, double-blind placebo-controlled multicenter study. *Anticancer Res.*, 19, 1999 s. 3383-92.
41. Ibrahim, A., Scher, N., Williams, G. et al.: Report of FDA, Approval samary for zoledronic acid for treatment of multiple myeloma and cancer bone metastases. *Clin. Cancer Res.*, 9, 2003, 2394-2399.
42. Jagdev, S. P., Purohit, O. P., Heatley, S. et al.: Comparison of the effect of intravenous pamidronate and oral clodronate in symptoms and bone resorption in patients with metastatic bone diseases. *Ann. Oncol.*, 12, 2001, 1433-1438.
43. Jenšovský, J.: Bisfosfonáty 3. generace v léčbě osteoporózy: risedronát sodný. *Prakt. Gynec. ČR*, 2003, 5, s. 13-15 a *Postgrad. Med. (Praha)*, 4, 2002, 7, s. 751-756.

44. Kanis, J. A., Powles, T., Paterson, A. H. et al.: Clodronate decrease the frequency of skeletal metastases in woman with breast cancer, *Bone*, 19, 1996, 663-667.
45. Kim, S. H., Lim, S. K., Hahn, J. S. et al.: Effect of pamidronate on new vertebral fractures and bone mineral density in patients with malignant lymphoma receiving chemotherapy. *Am. J. Med.* 116, 2004, s. 524-8.
46. Klener P: Kostní metastázy. Patogeneze, diagnostika a léčba. *Klin Onkol*, 2004, 17, 29-32.
47. Kristensen, B., Ejlersten, B., Groenvold, M., et al.: Oral clodronate in breast cancer with bone metastases: a randomised study. *J. Intern. Med.*, 246, 1999, 67-74.
48. Kutilek, Š., Bayer, M.: Vyskočil, V.: Možnosti léčebného použití bisfosonátů v dětském a dorostovém věku. *Osteol. Bull.*, 8, 2003, 3, s. 96.
49. Kymala, T., Taube, T., Tammela, T. L. et al.: Concomitant i.v. and oral clodronate in the relief of bone pain. A double placebo controlled study in patients with prostate cancer. *Brit. J. Cancer.*, 76, 1997, 939-342.
50. Laakso, M., Lahtinen, R., Virkkunen, P. et al.: Subgroup and cost-benefit analysis of the Finnish multicentre trial of clodronate in multiple myeloma. *Finisch Leukaemia Group. Brit. J. Haematol.*, 87, 1994, s. 725-729.
51. Lahtinen, R., Laakso, M., Palva, I., et al.: Randomised, placebo controlled multicentre trial of clodronate in multiple myeloma. *Finnish leukemia Group. Lancet*, 1992, 340, s. 1049-1052.
52. Lapham, G., Aranko, K., Hanhijarvi, H. et al.: Bioavailability of two clodronate formulations. *Brit. J. Hospital Medicine*, 56, 1996, 231 - 233.
53. Laštůvková, I., Adam, Z.: Dotazníkový průzkum tolerance a nežádoucích účinků clodronatu (preparátu Bonefos) u pacientů s mnohočetným myelomem. *Vnitřní Lék.*, 48, 2002, 1049-1053.
54. Lee, M. V., Fong, E. M., Singer, F. R. et al.: Bisphosphonate treatments inhibit the growth of prostate cancer cells. *Cancer Research*, 61, 2002, 2602-2608.
55. Lipton, A., Theriault, R. L., Hortobagyi, G. N. et al.: Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast carcinoma and osteolytic bone metastases: long term follow-up of two randomized, placebo-controlled trials. *Cancer*, 88, 2000, 1082-90.
56. Lipton, A., Zheng, M., Seaman, J.: The new bisphosphonate, Zometa (zoledronic acid), decreases skeletal complications in both osteolytic and osteoblastic lesions. *Cancer Invest.*, 20, 2002, 45-54
57. Lufkin, E. G., Argueta, R., Thitaker, M. D. et al.: Pamidronate: an unrecognized problem in gastrointestinal tolerability. *Osteoporosis Int.*, 4, 1994, 320-322.
58. Lyubimova, B. V., Kushlinsky, N. E., Kucubutserm N et al.: Renal safety of intravenous ibandronat in breast cancer. *Clin. Drug Invest.*, 23, 2003, 707-716.
59. Major, P., Lortholary, A., Horn, J. et al.: Zoledronic acid is superior to pamidronate in the treatment of hypercalcaemia of malignancy: A pooled analysis of two randomized, yntrolled clinical trials. *J. Clin. Oncol.*, 19, 2001, 558-567.
60. Mancini, I., Dumon, C., Body, J. J.: Efficacy and safety of ibandronate in the treatment of opioid resistant bone pain. associated with metastatic bone disease. *Bone*, 30, 2002, Suppl.3, s.51 Abstr. B56. a *J. Clin. Oncol.*, in press.
61. Mardiak, J., Bohunicky, L., Chovanec, J. et al.: Adjuvant clodronate therapy in patients with locally advanced breast cancer. Long term results of double blind randomized Trial. *Neoplasma*, 47, 2000, 177- 180.
62. Martín, A., García-Sanz, R., Hernández J. et al.: Pamidronate induces bone formation in patient with smouldering and indolent myeloma with no significant anti-tumor effect. *Brit. J. haematol.*, 118, 2002, 239-242.
63. Marx, R.E.: Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J. Oral. Maxillofac. Surg.*, 61, 2003, 9, 1115-7.
64. Matoušková, M., Hanuš, M.: Bisfosfonáty a jejich místo v uroonkologii. *Ces. Urol.*, 7, 2003, 3, s. 46.
65. McCloskey, E. V., Dunn, J. A., Kanis, J. A. et al.: Long-term of a prospective, double-blind placebo-controlled randomised trial of clodronate in multiple myeloma. *Brit. J. Haematol.*, 113, 2001, 1035-1043.
66. McCloskey, E. V., MacLennan, I.C., Drayson, M. T. et al.: A randomized trial of the effect of clodronate on skeletal morbidity in multiple myeloma. MRC Working Party on Leukemia in Adults. *Brit. J. Haematol.*, 100, 1998, s. 317-325.
67. Menssen, H. D., Sakalova, A., Fontana, A., et al.: Effects of long-term intravenous ibandronate therapy on skeletal-related events, survival, and bone resorption markers in patients with advanced multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.*, 20, 2002 s. 2353-9.
68. Miam, M., Beghe, F., Caprio, A et al.: Tolerability and safety of clodronate therapy in bone diseases. *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, 11, 1991, 107-114.
69. Musto, P., Falcone, A., Sanpaolo, G. et al.: Pamidronate reduces skeletal events but does not improve progression free survival in early stage untreated myeloma: results of a randomised trial. *Leukemia Lymphoma*, 44, 2003, 1545-1548.
70. Novotný, J., Petřelka, L.: Zometa opravdový krok vpřed?. *Klin Onkol*, 17, 2004, 139-142.
71. O'Rourke, N. M., McCloskey, E., Houghton, F. et al.: Double-blind, placebo-controlled, dose response trial of oral clodronate in patients with bone metastases. *J. Clin. Oncol.*, 13, 1995, 29-34.
72. Paterson, A. H., Powles, T. J., Kanis, J. A. et al.: Double-blind controlled trial of oral clodronate in patients with bone metastases from breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 11, 1993, s. 59-65.
73. Papapoulos, SE., Quandt, SA., Liberman, UA.: Meta-analysis of the efficacy of alendronate for the prevention of hip fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2004.
74. Pavlakis, N., Stockler, M.: Bisphosphonates for breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2, 2003: CD003474
75. Pospíšilová, Y.: Metabolická a endokrinní komplikace nádorových onemocnění a jejich léčba. *Vnitř. Lék.*, 45, 1999, s. 645-651
76. Powles, T., Peterson, S., Kanis, J. A.: Randomized placebo controlled trial of clodronate in patients with operable breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 20, 2002, 3219-3224.
77. Powles, T. J., McCloskey, E., Paterson, A. H. et al.: Oral clodronate and reduction in loss of bone mineral density in women in operable primary breast cancer. *N. Natl. Cancer. Inst.*, 90., 1998, s. 704-708..
78. Rizzoli, R., Forni, M., Sxhaad, M. A. et al.: Effects of oral clodronate on bone mineral density in patients with relapsing breast cancer. *Bone*, 18, 1996, s. 531-537.
79. Robertson, A. G., Reed, N. S., Ralston, S. H.: Effect of oral clodronate on metastatic bone pain: a double-blind placebo controlled study. *J. Clin. Oncol.*, 13, 1995, 2427-2430.
80. Rosen, L. S., Gordon, D. H., Dugan, W. Jr. et al.: Zoledronic acid is superior to pamidronate for the treatment of bone metastases in breast carcinoma patients with at least one osteolytic lesion. *Cancer*. 100, 2004, s. 36-43.
81. Rosen, L. S., Gordon, D., Kaminski, M. et al.: Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma: a randomized, double-blind, multicenter, comparative trial. *Cancer*, 98, 2003 s.1735-44.
82. Rosen, L. S., Gordon, D., Tchekmedyan, N. S. et al.: Zoledronic acid versus placebo in the treatment of skeletal metastases in patients with lung cancer and other solid tumors: a phase III, double-blind, randomized trial—the Zoledronic Acid Lung Cancer and Other Solid Tumors Study Group. *J. Clin. Oncol.*, 15, 2003 s. 3150-3157.
83. Růžičková, O., Bayer, M., Pavelka, K.: Doporučení pro prevenci a léčbu glukokortikoidy indukované osteoporózy u pacientů s revmatickým onemocněním (Společné stanovisko České reumatologické společnosti a Společnosti pro metabolická onemocnění skeletu) *Ces. Revmatol.*, 12, 2004, s. 163-174
84. Saad, F., Gleason, D. M., Murray, R. et al.: Zoledronic Acid Prostate Cancer Study Group. A randomized, placebo-controlled trial of zoledronic acid in patients with hormone-refractory metastatic prostate carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 94, 2002 s. 1458-68.
85. Saarto, T., Blomquist, C., Virkkunen, P. et al.: Adjuvant clodronate treatment does not reduce frequency of skeletal metastases in node positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 19, 2001, 10-17.
86. Small, E. J., Smith, M. R., Seaman, J. J., et al.: Combined analysis of two multicenter, randomized, placebo-controlled studies of pamidronate disodium for the palliation of bone pain in men with metastatic prostate cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21, 2003, s. 4277-84.
87. Strang, P., Nilsson, S., Brandstedt, S., et al.: The analgesic efficacy of clodronate compared with placebo in patients with painful bone metastases from prostatic cancer. *Anticancer Res.*, 17, 1997, 4717-1721.
88. Tomiska, M., Adam, Z., Prokeš, B. et al.: Bone mineral density in multiple myeloma after intravenous clodronate therapy. *Acta Med. Austriaca*, 28, 2001, s. 38-42.
89. Tripathy, D., Budde, M.: Assessing the efficacy of ibandronate for the prevention of skeletal related events in metastatic bone Diseases. *Bone*, 34, 2004, Suppl.1 S 83.
90. Tripathy, D., Lichinitzer, M., Lazarev, A. et al.: Oral ibandronate for the treatment of metastatic bone disease in breast cancer: efficacy and safety results from a randomized double blind placebo controlled trial. *Ann. Oncol.*, 15, 2004, s. 743-750.
91. Tubiana-Hulin, M., Beuzebob, P., Mauriac, L. et al.: Double-blind controlled study comparing clodronate versus placebo in patients with breast cancer bone metastases. *Bull. Cancer.*, 88, 2001., 701- 707.
92. Villikka, P., Perttunen, K., Rosnell, J. et al.: The absolute bioavailability of clodronate from two different oral doses. *Bone*, 31, 2002, s. 418 - 421.
93. Vyskočil, V., Kutilek, Š.: Bisfosfonáty u metabolických onemocnění skeletu. *Remedia*, 14, 2004, 1, s. 75-80.
94. Vyskočil, V.: Bisfosfonáty. *Prakt. Gynek. ČR, Suppl.*, 2003, 2, s. 19-23.
95. Žák, J., Sedláček, R., Rosenkrancová, J. et al.: Bisfosfonát pamidronát ovlivňuje krevní průtok kostí a mechanickou odolnost v ohybu. *Diabet. Metabol. Endokrin. Výž.*, Suppl., 4, 2001, 3, s. 58-59.
96. Žák, J., Povýšil, C.: Přehled o patofyziologii, diagnostice a léčbě kostních. *Čas. Lék. čes.*, 138, 1999, s. 363 - 365.

RNA NÁDOROVÉ VAKCÍNY NA BÁZI DENDRITICKÝCH BUNĚK

RNA CANCER VACCINES BASED ON DENDRITIC CELLS

DUDOVÁ S.¹, MICHÁLEK J.^{1,2,3}, HÁJEK R.^{1,3,4}

¹ LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE PŘI ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

² I. DĚTSKÁ INTERNÍ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

³ UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

⁴ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Souhrn: V posledních letech se objevují nové přístupy pro stimulaci nádorově specifické imunity s využitím dendritických buněk naložených nádorovými antigeny. Dendritické buňky (DB) jsou výkonné antigen prezentující buňky, které mají schopnost aktivace CD4+ a CD8+ naivních T-lymfocytů a podílí se tak na vzniku primární imunitní odpovědi *in vitro* a *in vivo*. Bylo prokázáno, že DB transfekované ribonukleovou kyselinou (RNA) kódující tumor asociované antigeny nebo celkovou nádorovou RNA aktivují T-buněčné odpovědi u různých typů nádorové tkáně. Některé z metod se prokázaly být natolik účinné a bezpečné, že byly zahájeny klinické zkoušky I/II fáze. Tento článek porovnává různé formy antigenů, které mohou být vneseny do dendritických buněk. Dále se zaměří na metody transfekce RNA určené pro přípravu protinádorových vakcín a zmíní některé z dosavadních výsledků klinických studií.

Klíčová slova: dendritické buňky, antigen, RNA, elektroporace, transfekce

Summary: Over the last decade, new strategies for induction of tumor specific immunity using dendritic cells loaded with tumor antigens have emerged. Dendritic cells (DCs) are potent antigen-presenting cells that have the unique capability of activating CD4+ and CD8+ naive T lymphocytes and thus participate in the induction of primary immune response *in vitro* and *in vivo*. It was shown that DCs transfected with ribonucleic acid (RNA) coding for a tumour-associated antigen or whole tumour RNA are able to induce T-cell responses in various tumor tissues. Several approaches have proved to be successful and safe enough to lead to the initiation of clinical phase 1/2 trials. This review compares various forms of antigens that can be transferred into dendritic cells. Furthermore, it focuses on different methods of RNA transfection intended for the preparation of anticancer vaccines and notices some recent results of clinic studies.

Key words: dendritic cells, antigen, RNA, electroporation, transfection

1. Úvod

Pole nádorové imunoterapie se v posledních letech rozrostlo také o využití dendritických buněk (DB) naložených nádorovými antigeny (tumor associated antigene, TAA), což představuje vhodnou strategii pro vyvolání protektivní imunitní reakce. Dendritické buňky jsou jedinečné antigen prezentující buňky (APB) díky své schopnosti nabídnout pohlcené a zpracovaný antigen nejen paměťovým, ale i naivním T-lymfocytům, a zároveň jsou klíčovými modulátory imunitní odpovědi ovlivňující diferenciaci T-lymfocytů směrem k Th1 nebo Th2 odpovědi (1, 2). Metody pro přípravu protinádorových vakcín mohou být rozděleny do dvou kategorií: antigen-specifické, ve kterých nádorové antigeny byly identifikovány a izolovány a buněčné nebo-li antigen-nespecifické metody, u kterých antigeny nejsou dosud známy, ale předpokládá se jejich přítomnost v materiálu použitém pro přípravu vakcín.

2. Druhy antigenů a jejich zpracování

Antigeny mohou být do DB dodány ve formě peptidů, purifikovaných proteinů, extraktů z nádorových buněk, apoptických tělísek nebo nukleových kyselin (DNA nebo RNA) (tab. 1). Tento materiál je v konečné fázi dendritickou buňkou rozštěpen na krátké oligopeptidy, které jsou poté exprimovány na povrchu buňky ve spojení s molekulami hlavního histokompa-

tilního komplexu (HLA) a nabídnuty receptoru T-lymfocytů (TCR, T-cell receptor), což představuje první aktivační signál. DB tvoří s T-lymfocyty shluky za přispění různých adhezivních molekul, především CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-3) a CD58 (LFA-3), které jsou exprimované ve vysoké míře na aktivovaných DB. Druhý signál důležitý pro spuštění imunitní odpovědi představuje interakce kostimulačních molekul na povrchu DB s odpovídajícími ligandy T-buněk. Zprostředkovan je povrchovými molekulami CD80 (B7-1), CD86 (B7-2) na povrchu DB a CD28 v membráně T-lymfocytů. Při nedostatečném druhém signálu je indukována anergie T lymfocytů. Úspěšná vakcína by měla indukovat jak antigen-specifické CD4+, tak CD8+ buňky. CD4+ T-lymfocyty jsou nutné pro vznik a udržení CD8+ T-buněčných odpovědí a mohou přímo nebo nepřímo přispět ke zničení nádorových buněk. Významnost CD8+ T-buněk v imunitní odpovědi spočívá v inhibici tumorového růstu a eradikaci nádorových buněk (3). Forma, v jaké je antigen doručen do DB ovlivňuje cestu prezentace antigenu a její účinnost, ale také následnou kvalitu aktivace T-buněk (4). Je známo, že zralé DB exprimují vyšší hladiny HLA a kostimulačních molekul, a proto jsou schopnými stimulatory T-lymfocytů *in vivo* (5). Naproti tomu nezralé DB exprimují nízké hladiny maturačních markerů, jejich stimulace T-buněk není účinná a tak spíše tolerují než imunizují (6). Obecně se

pro transfekci používají nezralé DB, které jsou až následně maturovány přidáním různých cytokinů. Byly ovšem popsány i postupy opačné, tj. transfekce již zralých DB (7, 8).

2.1. Peptidové a proteinové antigeny

Bylo potvrzeno, že peptidem nebo proteinem naložené DB jsou schopnými induktory antigen-specifické protinádorové odpovědi nejen na zvířecích modelech, ale i u onkologických pacientů (9, 10). Strategie založené na využití peptidů mají své nevýhody, jako jsou například přechodná prezentace antigenních epitopů T-buňkám kvůli rychlému odbourávání vytvořených peptid/HLA komplexů nebo variabilita vazebných afinit syntetických peptidů. Naložení DB peptidem vyžaduje aminokyselinnou sekvenci kompatibilní s individuálním HLA typem pacienta (nejčastěji zastoupený je typ HLA-A2). Při aplikaci některých HIV proteinů byl navíc zjištěn přímý efekt na imunitní funkce buněk (11). Naložení proteinů o plné délce jako antigeny umožňuje vznik imunitní odpovědi vůči jeho různým epitopům.

Klinické odpovědi na vakcíny s využitím proteinů a peptidů jsou minimální, a pokud se objeví, obvykle nekorelují s velikostí měřené T-buněčné odpovědi (12). Nižší odpovědnost odráží preferenční indukci T-buněk s nízkou aviditou, které potom nerozeznávají nižší hustotu epitopu na nádorových buňkách po zpracování endogenně exprimovaného antigenu a současnou ztrátu vysoce afinitních T-lymfocytů (13). Účinnost peptidové strategie může být také snížena disociací peptidu z molekul HLA třídy I nebo rychlým odbouráváním a výměnou povrchových molekul HLA třídy I, což ústí ve zkrácenou dobu prezentace antigenu (14).

2.2. Nádorové buňky a extrakty

Jako antigeny mohou být využity i nádorové buňky ve formě lyzátu, apoptických tělísek či fúzní hybridom nádorové a dendritické buňky. Takto připravené vakcíny však obsahují i jiné molekuly, které nejsou antigenní a mohou negativně ovlivnit imunitní odpověď. Další překážkou může být zisk požadovaného množství nádorových buněk (15, 16, 17, 18, 19).

2.3. Genetický materiál

Použití genetického materiálu (DNA nebo RNA) umožňuje produkci celých proteinů, které po zpracování mohou poskytnout množství různých epitopů obou HLA tříd, I i II. Genetický materiál je dostupnější než proteiny, může být upraven přidáním dalších sekvencí, které zlepšují translaci a expresi proteinu (polyadenylace), sekvencí, které směřují protein k požadované HLA molekule (signál pro vazbu k endolysozomu

Tabulka č. 1. Výhody a nevýhody antigenů vnášených do DB

Forma antigenu	Výhody	Nevýhody
Peptid/protein	specifická komerční výroba příprava vakcíny proti jednomu konkrétnímu antigenu bezpečnost	nutnost znát HLA typ pacienta rychlé odbourávání peptid/ HLA komplexů omezené množství identifikovaných peptidů a proteinů izolace a čistota proteinů závislá na množství nádorové tkáně krátká životnost
Lyzáty nádorových buněk, apoptická tělíska	celkový imunogenní materiál nádorové buňky	obsahují i neantigenní molekuly, které mohou ovlivnit imunitní odpověď
DNA	snadná příprava stabilita možnost přidání signálních sekvencí amplifikace materiálu	riziko nežádoucího začlenění DNA do genomu buňky vznik senzitivní imunitních buněk vůči vlastní DNA nízká účinnost transfekce a exprese trans genu
RNA	bezpečnost vnese více molekul RNA najednou možnost přidání signálních sekvencí přímá translace do proteinu v cytoplazmě amplifikace materiálu	citlivost menší stabilita krátká životnost tranzientní transfekce

Tabulka č. 2. Srovnání metod transfekce RNA

Metody transfekce RNA	Výhody	Nevýhody
Virové vektory	vysoká účinnost přenosu vysoká exprese trans genu	riziko rekombinace požadavky na vybavení laboratoře imunodominance riziko exprese virových proteinů spolu s vnášenými antigeny
Kationické lipidy	nenáročnost	toxická omezené množství vnášené RNA nízká účinnost
Pasivní transfekce	nenáročnost	nízká účinnost
Elektroporace	vysoká exprese trans genu	mortalita buněk

LAMP-1, invariantní řetězec Ii) nebo zvyšují imunogenicitu kódovaných epitopů (20, 21, 22).

2.3.1. Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

Použití deoxyribonukleové kyseliny (DNA) má také svoje nevýhody – nižší účinnost transfekce primárních buněk a možný vznik stabilních transfektantů (23). Nevirové DNA transfeční metody nejsou účinné, obzvláště u nedělicích se buněk, protože do jádra, kde dochází k transkripci, je transportováno pouze

omezené množství DNA (24). Při studiu transfekce HeLa buněk bylo pozorováno, že 95% buněk obsahuje vnášený plazmid v cytoplazmě, ale pouze jejich část (30%) exprimuje kódovaný protein (25).

2.3.2. Ribonukleová kyselina (RNA)

Bylo zjištěno, že neviróv přenos RNA je ve srovnání s DNA účinnější (26). Po elektroporaci dendritických buněk mRNA kódující eGFP (enhanced green fluorescent protein) byla nejvyšší exprese naměřena druhý den po transfekci a bylo dosaženo 76ti-násobného zvýšení

fluorescence, kdy 95% buněk bylo transfekováno. Vysoká exprese byla zachována nejméně po pět následujících dní. Naopak při použití plazmidové eGFP DNA bylo získáno pouze 15% transfekovaných buněk a 28mi-násobný nárůst fluorescence (4).

Celková buněčná RNA nebo mRNA představují soubor všech genů aktuálně exprimovaných v buňce. Dendritické buňky transfekované jak celkovou RNA, tak mRNA, která představuje pouze 1-5% buněčné RNA, byly schopny vyvolat tumor-specifickou odpověď *in vitro* bez rozdílů v cytotoxické aktivitě T-lymfocytů (27). Transfekcí RNA lze na rozdíl od použití DNA obejít problémy s regulací transkripce a RNA tak má po vstupu do buňky přímý přístup k translaci. Výhodou při použití RNA je transfekce do cytoplazmy, zatímco DNA vyžaduje přístup přímo do jádra buňky (4). Pro klinické aplikace je použití RNA bezpečnější z důvodu její omezené schopnosti způsobovat permanentní genetické změny v hostiteli (28).

Jako další výhoda RNA metod se uvádí, že do buňky může být vneseno více různých molekul mRNA najednou. Takováto polyvalentní vakcína snižuje pravděpodobnost úniku nádoru imunitnímu systému a indukuje CTL odpovědi namířené proti přirozeně zpracovaným a prezentovaným imunodominantním nádorovým antigenům (27). Vnesení mRNA může být maturačním signálem pro DB, vedoucí k zvýšené expresi aktivačních markerů CD83 a CD86, což je spojeno s vyšší schopností stimulace T buněk a získkem migračních vlastností (29). Při transfekci gag mRNA z viru HIV zůstává po transfekci většina proteinu produkovaná nezralými DB uvnitř buňky, na rozdíl od jiných linií. Intracelulárně vytvořený protein je rozštěpen proteazomovým systémem na peptidy a naložen na molekuly HLA třídy I v endoplazmatické retikulu. Část gag proteinu je secernována a následně pohlcena dendritickou buňkou pomocí endocytózy, což představuje způsob naložení na HLA molekulu třídy II. Naložení antigenu na HLA molekul třídy I i II bylo po transfekci potvrzeno aktivací a expanzí antigen-specifických CD4+ a CD8+ T-buněk (30).

K produkci většího množství mRNA je vhodná metoda amplifikace pomocí PCR přes komplementární DNA (cDNA) a následná transkripce *in vitro* (31). Pro amplifikaci byla použita mRNA izolovaná z nádorových linií, stejně jako z primárních nádorových buněk získaných mikrodisekcí (32). Nativní RNA byla účinnější při stimulaci CTL odpovědi než amplifikovaná mRNA (27). Při manipulaci s RNA existují i nevýhody, jako je například její krátká životnost a stabilita či větší citlivost. Dendritické buňky naložené RNA

Tabulka č. 3. Sledované typy antigenů transfekovaných do DB

	Typy antigenu	Použitá nádorová tkáň
Antigen specifická RNA	katalytická jednotka telomerázy (hTERT)	melanom, thymom (4, 36)
	ovalbumin (OVA)	melanom (51, 66)
	karcinembryonální antigen (CEA)	adenokarcinom (21, 57, 63, 64)
	VEGFR-2, Tie, VEGF	melanom, žlučník (63)
	prostatický antigen (PSA)	prostata (28, 40)
	survivin	AML (39)
	MAGE-3	Mnohočetný myelom, melanom (20)
	Melan-A	Melanom (35)
Celková RNA		B-CLL (65)
		nádor prsu (62)
		myelom (62)
		CNS (54)
		urotelální karcinom (55)
		karcinom žaludku (52)
		renální karcinom (27, 40)

kódující velké množství antigenů jsou využívány ke stimulaci T-buněčných protinádorových odpovědí *in vitro*. CTL odpovědi byly indukovány z mononukleárních buněk periferní krve zdravých dárců a pacientů s nádory proti reportérovému proteinu eGFP, různým antigenům virového původu, jako například influenza virus matrix protein, HPV E6 a E7, gag proteinu HIV viru (21, 33, 34, 35), stejně jako normálním omezeně exprimovaným genovým produktům, které mohou sloužit jako nádorové antigeny – prostatický antigen (PSA), telomerázová reverzní transkriptáza (TERT), survivin, onkofetální antigen (OFA), karcinembryonální antigen (CEA), Melan-A (36, 37, 38, 39).

3. Metody transfekce RNA do dendritických buněk

Pro RNA transfekci se vedle virových vektorů používají většinou fyzikální metody. I když tyto neviróvé metody ústí v tranzientní genovou expresi, bylo zjištěno, že i nízké hladiny exprese antigenu jsou dostatečné pro stimulaci T-buněčné odpovědi (32, 40) (Tab. 2).

3.1. Virové vektory

Antigeny mohou být do DB vneseny

pomocí rekombinantních virů, jako jsou například retroviróvé nebo adenovirové vektory, vakcína, influenza viry či pox-viry (41, 42, 43, 44). Použití virových vektorů s sebou ovšem nese riziko v tom, že mohou ovlivňovat funkci DB (45). I když je touto metodou dosahováno vysoké exprese transgenů, překážku představuje především riziko integrace virové DNA do hostitelské buňky a také buněčná imunita namířená proti virovým proteinům, která může vést až k destrukci geneticky modifikovaných DB a závažným toxickým vedlejším účinkům (11, 46, 47, 48).

3.2. Kationické lipidy

Jednou z možností naložení dendritických buněk RNA jsou kationické lipidy, jako je například lipofekční činidlo *N*-(1-(2,3-diioleoyloxypropyl)-*N,N,N*,-trimethylammonium methylsulfate (DOTAP). Nevýhodou jsou ale jeho toxické účinky na dendritické buňky a omezené množství RNA, které je schopen na sebe navázat. Reagencie na lipidové bázi vedou k nízké účinnosti RNA transfekce do DB, přičemž účinnost transfekce je ovlivněna typem použitého lipidu nebo poměrem nukleové kyseliny k lipidům. (49, 34, 50, 37). Boczkowski a kol. transfekovali myši DB kultivované z kostní dře-

ně mRNA pro kuřecí ovalbumin (OVA). Tyto buňky byly poté schopny stimulovat OVA-specifické cytotoxické T-lymfocyty *in vitro*. CTL odpovědi mohou být indukovány celkovou RNA, RNA transkribovanou *in vitro* z OVA cDNA templátu nebo poly-A+, nikoli však poly-A- frakcí izolovanou z OVA-exprimujících buněk. Myši po vakcinaci dendritickými buňkami modifikovanými RNA z OVA-exprimujících EL-4 nádorových buněk byly chráněny vůči těmto nádorovým buňkám. Při použití slabě imunogenní melanomové nádorové linie B16/F10.9 bylo u myši vakcinovaných DC-RNA pozorováno snížené metastázování v plicích (51).

Koido a kolektiv sledovali imunitní odpověď po vakcinaci DB transfekovanými MUC1 RNA. Byla prokázána exprese MUC1 peptidů a kostimulačních molekul na buněčném povrchu. Po injekci do báze ocašku byly transfekované DB detekovány v tříselných lymfatických uzlinách. Vakcinace kontrolních myši těmito DB vedla k anti-MUC1 imunitní odpovědi vůči MUC1-pozitivním MC38/MUC1, ale ne MUC1-negativním nádorovým buňkám. Žádná nebo velmi malá anti-MUC1 imunita byla indukována s transfekovanými DB v MUC1 transgenních myších. Tato rezistence byla zvrácena při podání transfekovaných DB spolu s IL-12 (52).

Imunitní odpověď může být indukována i pro virové antigeny. DB naložené M1 RNA (kódující influenza virus matrix protein) jsou schopné stimulovat M1-specifické naivní a paměťové cytotoxické T-lymfocyty. DB transfekované M1 RNA stimuluje produkci INF- γ ve vysokých koncentracích, podobně jako po naložení peptidem. Naproti tomu, DB modifikované DNA stimuluje pouze malé množství CTL produkujících INF- γ . DB ošetřené neantigenním materiálem – GFP RNA/lipozomy, GFP DNA/lipozomy, samotnými lipozomy, nebo DB či CTL samotnými neprokázaly aktivaci odpovědných buněk (34).

Zájem vědců se zaměřuje také na identifikaci dalších nádorových antigenů. Jeden z nich, survivin, patří do rodiny inhibitorů apoptózy. Survivin specifické CTL lyzovaly řadu hematopoetických maligních buněčných linií a primární nádorové buňky izolované z pacientů s akutní myeloidní leukémií. Vakcinace myši se survivin exprimujícími DB měla za následek dlouhodobou rezistenci po vystavení lymfomovým buňkám (39). Podobně jako katalytická podjednotka telomerázy má použití survivinu jako antigenu pro vakcinační účely tu výhodu, že snížení exprese nebo ztráta antigenu jako mechanismus imunitního úniku zabraňuje další progresi nádoru (36, 39).

3.3. Pasivní transfekce

Jako další způsob vnášení antigenů do nezralých DB byla využita samotná mRNA v mediu, tzv. pasivní transfekce, která je dostatečná k vyvolání specifické CTL odpovědi. Pasivní transfekce byla použita úspěšně nejenom v preklinických, ale i klinických studiích (28, 33, 34, 36).

DB koinkubované s RNA izolovanou z renální nádorové tkáně jsou schopny indukovat nádorově-specifickou T-lymfocytární odpověď *in vitro*. CTL lyzují allogení nádorové buňky, ale ne allogení buňky normálních tkání. Tímto způsobem se podařilo připravit imunitní odpověď nejen vůči primárním, ale i metastatickým tumorům (53). Na základě tohoto přístupu byly provedeny klinické zkoušky I fáze, do které bylo zařazeno 10 pacientů s renálními tumory. Vakcína byla nejen bezpečná, ale také schopna stimulovat expanzi tumor specifických polyklonálních T-buněk u imunizovaných pacientů (29).

Imunoterapeutické přístupy se používají i v léčbě mozkových tumorů, i když je zde riziko vzniku experimentální alergické encefalitidy (EAE) při použití nádorového materiálu z CNS jako zdroje antigenů. Australská skupina v čele s D. A. Carusem provedla klinické zkoušky I. fáze podáním DB naložených nádorovou RNA dětským pacientům s mozkovými nádory. U žádného z pacientů nebyly pozorovány symptomy EAE nebo jiné autoimunitní odpovědi. U tří ze sedmi pacientů, kteří dostávali vakcínu se objevila klinická odpověď na vakcina-

ci: u jednoho částečná imunitní odpověď a u dvou stabilní onemocnění. Vakcinace nevyvolala robustní tumor-specifickou imunitní odpověď, ale zvýšila buněčnou odpověď na další nespecifické stimuly (54).

Dalším typem nádorové tkáně, pro kterou byl využit postup přípravy nádorově specifických CTL je uroteliální karcinom. Tumor infiltrující lymfocyty (TIL) nezabíjejí autologní nádorové buňky *in vitro*, ovšem po jednorázové aktivaci autologními DB naloženými nádorovou mRNA byly TIL schopny indukovat lýzu autologních karcinomových buněk. Tento efekt nebyl pozorován po inkubaci TIL s netransfekovanými DB (55).

Dendritické buňky pasivně transfekované mRNA kódující prostatický antigen (PSA) stimuluje CTL odpovědi, které nevykazují zkříženou reakci na kallikrein, protein, který je homologní s PSA. Protože u zdravých žen nedochází k významné PSA expresi, zatímco zdraví muži nebo pacienti s tumorem prostaty jsou vystaveni vyšším hladinám cirkulujícího PSA proteinu, byl u těchto skupin předpokládán rozdíl ve schopnosti indukce CTL vůči PSA. Bylo ovšem potvrzeno, že PSA RNA transfekované DB ze zdravých dárců, mužů i žen, nebo nádorových pacientů jsou stejně účinné ve stimulaci PSA-specifických CTL (40).

Polyvalentní nádorové vakcíny, které používají celé antigenní spektrum nádorové buňky představují výhodnější terapeutickou strategii pacientů s nádory než vakcíny namířené proti jednotlivým antigenům. I když polyklonální CTL odpovědi vzniklé s použitím RNA amplifikované z mikrodisekovaných nádorových buněk prostaty zahrnují jako komponentu odpověď vůči prostatickým antigenům (PSA), stejně jako vůči telomerázové reverzní transkriptáze (hTERT), tumor specifické CTL byly efektivnější než samotné PSA nebo hTERT CTL v rozeznávání a lýze cílových buněk. Navíc CTL lyzují nejenom buňky primárního nádoru, ale i metastázy (31, 53).

Někteří autoři ovšem popisují pasivní transfekce jako neúčinnou metodu (23, 34, 51). Koinkubace DB v roztoku s RNA vedla v těchto případech k nízké expresi antigenu. M1 mRNA naložené a nenaložené DB nejevily významný rozdíl v cytotoxicitě jimi aktivovaných CTL. Vyšší exprese mRNA v CD34+-DB byla pozorována pouze při pasivní transfekci neantigenní eGFP mRNA. Rozdíl může být způsoben použitím jiných prekurzorů dendritických buněk a následnou kultivací či odlišností ve vnášené RNA. Možným důvodem dosažené nízké účinnosti touto metodou je, že zahrnuje prodlouženou inkubaci labilní RNA s buněčnou kulturou, přičemž RNA vstupující do buněk endocytózou může být úspěšně degradována, speciálně u nezralých dendritických buněk, které jsou zaměřené na příjem a degradaci okolního materiálu (4).

3.4. Elektroporace RNA

Elektroporace představuje fyzikální metodu vnášení transgenů, která využívá pulzů o vysokém napětí k otevření pórů v membráně buňky, což umožňuje průchod molekulám DNA nebo RNA. Elektroporace nevyžaduje další reagentie a může být použita i pro klinické studie. Optimalizace a stanovení úspěšnosti elektroporace je většinou prováděno pomocí analýzy exprese transgenů eGFP (enhanced green fluorescent protein) (56). Měření povrchových markerů typických pro zralé DB jako jsou CD83, CD80 a CD86 nebyl zjištěn vliv elektroporace na maturaci DB ani na stimulaci T-lymfocytů (23, 57). Elektroporace představuje účinnější postup vnášení antigenní RNA do DB než pasivní transfekce či lipofekce (49). Nevýhodou elektroporační metody je mortalita buněk způsobená špatným uzavřením pórů po aplikaci elektrického pulzu. Při použití definovaných antigenů bylo zjištěno, že DB elektroporované mRNA jsou efektivnější ve schopnosti indukovat antigen-specifickou CTL odpověď *in vitro* než DB naložené peptidy nebo dokonce DB po transdukcii rekombinantními virovými vektory (21, 43, 51). Německá skupina z Tübinge-

nu v čele s Grunebachem porovnávala procenta úspěšnosti transfekce s využitím mRNA pro eGFP protein u následujících způsobů naložení DB: elektroporace, lipofekce a na CD71-receptor vázané dodání Ag. Elektroporace se prokázala jako nejvíce účinná s 30% eGFP pozitivních buněk, zatímco systém využívající transferinový receptor poskytoval méně než 1% eGFP exprimujících buněk. Dodáním RNA pomocí lipozomů bylo získáno 17,5% eGFP pozitivních buněk v závislosti na množství RNA. Když tyto přístupy byly použity pro transfekci DB s RNA izolovanou z eGFP exprimující linie renálního karcinomu N43 a následnou přípravu tumor-specifických CTL, všechny způsoby transfekce byly schopné navodit cytotoxickou odpověď, i když bylo použito malé množství RNA (27). Jiná skupina potvrdila srovnatelnost exprese transgenů po elektroporaci s transdukci retrovirovými (RV) nebo adenovirovými (AdV) vektory (26).

Nicméně bylo prokázáno, že antigen-specifické T-buňky mohou vznikat po stimulaci RNA transfekovanými DB i když nebyla detekována exprese transgenů na proteinové úrovni (32, 40). Nižší koncentrace peptidů na povrchu DB po RNA transfekci ve srovnání s koncentracemi dosaženými po exogenním naložení peptidy nesnižuje účinnost indukce CTL a může upřednostňovat vznik vysoce afinitních cytotoxických lymfocytů a tak ústít ve vysoce specifickou nádorovou cytotoxicitu. Při srovnání mRNA a plazmidové DNA vnášené do DB pomocí elektroporace byla mRNA účinněji transfekována a s nižší buněčnou toxicitou než DNA (37). Elektroporaci lze dosáhnout vysoké účinnosti s vysokými hladinami exprese vnášeného genu až po dobu 14 dní (58). DB byly transfekovány eGFP mRNA nebo celkovou buněčnou RNA izolovanou z eGFP exprimující linie K562. I když intenzita eGFP exprese v DB transfekovaných celkovou RNA byla nižší ve srovnání s expresí v DB transfekovaných s IVT eGFP mRNA, určitá cytoplazmatická syntéza eGFP byla potvrzena v DB transfekovaných celkovou RNA (59).

Tuyaerts a spolupracovníci porovnávali transgenní expresi mRNA v DB po elektroporaci a mRNA spontánně pohlcenou DB. Výsledky prokázaly vyšší expresi mRNA u elektroporovaných dendritických buněk, což se projevilo i jejich vyšší schopností vyvolat antigen-specifickou T-buněčnou odpověď vůči antigenu (35). DB elektroporované s mRNA kódující Melan-A silně aktivovaly Melan-A-specifické cytotoxické T-lymfocytární klony a byly účinnější než DB naložené mRNA lipofekcí nebo volně smíchané s RNA (37).

U většiny myších a lidských nádorů je telomerázový ribonukleový komplex (TERT) reaktivován, zatímco v normálních tkáních je neaktivní. DB naložené myši TERT RNA aktivují CTL, které rozeznávají myši melanomové a thymomové buňky. Ve shodě s předcházejícími pozorováními bylo zjištěno, že DB transfekované celkovou RNA připravenou z TERT-pozitivního nádoru poskytují větší protinádorovou ochranu než DB naložené pouze TERT RNA. TERT pravděpodobně není imunodominantní antigen u myši (53). Naopak u lidí byla mRNA telomerázové kataly-

tické podjednotky hTERT po elektroporaci do DB schopna vyvolat stimulaci cytotoxických T-lymfocytů (4).

Metoda elektroporace DB celkovou nádorovou RNA se ukázala jako vhodná ke stimulaci odpovědi i vůči méně imunitním malignitám, jako je například rakovina prsu. CTL odpovědi stimulované celkovou RNA mohou mít selektivní specifitu pro část prezentovaných peptidů, ale nerozeznávají všechny epitopy exprimované na nádorové buňce (60). Podobně bylo dosaženo CTL odpovědi i u myelomu s použitím linií LP-1 a U266. Milazzo a kolektiv připravili CTL schopné lyze těchto linií antigen-specifickým a HLA I. třídy omezeným způsobem. LP-1 specifické CTL neprokazovaly specifitu na idiotypový protein izolovaný z této linie. U myelom-asociovaného antigenu, mucinu 1 (MUC1) byla potvrzena specifická reakce CTL indukovaných DB transfekovanými RNA z U266 myelomové linie (61).

V poslední době se zájem zaměřuje i na kombinaci nádorové imunoterapie a antiangiogenní terapie. Pro inhibici angiogeneze byly myši imunizovány DB, které byly elektroporovány mRNA kódující produkty exprimované během neoangiogeneze: receptor-2 pro vaskulární endotelový růstový faktor (VEGFR-2) a Tie2, exprimované v proliferujících endotelových buňkách, a vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) exprimovaný v angiogenním stromatu a nádorových buňkách. Vakcinace myši stimulovala CTL odpovědi a vedla k částečné inhibici angiogeneze spolu s inhibicí růstu tumorů u nádorových modelů B16/F10.9 melanomových metastáz a MBT-2 nádoru žlučníku. Imunizace nádorovou RNA (B16/F10.9 nebo MBT-2) stimuluje tumor specifickou protektivní imunitu a takto ovlivňuje nádorové buňky přímo, zatímco použití VEGFR-2 nebo Tie2 ovlivňuje vaskularizační proces. Současné podání DB naložených VEGFR-2 nebo Tie2 a celkové nádorové RNA vykazovala synergistický protinádorový efekt, který byl pozorován i po společné imunizaci různými kombinacemi definovaných tumor exprimovaných antigenů, TERT nebo TRP-2, a VEGF nebo VEGFR-2 (62). Některé z výsledků preklinických a klinických studií jsou shrnuty v tabulce 3.

4. Závěr

Kromě alogenního přístupu nenašla doposud buněčná imunoterapie pevné místo v klinické praxi. Jde však o dynamicky se rozvíjející perspektivní výzkumný směr, který dnes nabízí širokou škálu experimentálních klinických aplikací včetně využití RNA vakcín. RNA vakcíny jsou bezpečné a schopné vyvolat CD4+ i CD8+ imunitní odpověď. Bude však nutná další optimalizace metod vnášení antigenního materiálu do dendritických buněk. Jedním ze způsobů zlepšení imunitní odpovědi je modifikace RNA sekvence ke zlepšení její stability a účinnosti translace a také sekvencí, které ovlivňují zpracování peptidu a tak zvyšují antigenicitu. V neposlední řadě rozvoj moderních metod detekce imunitních odpovědí na tyto vakcíny usnadní a urychlí další rozvoj.

Literatura

1. Banchereau J., Steinman R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998, 392(6673):245-52
2. Reid S. D., Penna G., Adorini L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Current Opinion in Immunology* 2000, 12(1): 114-121
3. Melief C. J., Kast W. M. T-cell immunotherapy of tumors by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes and by vaccination with minimal essential epitopes. *Immunol Rev*. 1995, 145: 167-77
4. Saeboe-Larsen S., Fossberg E., Gaudernack G. mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). *J Immunol Methods*. 2002, 259(1-2):191-203
5. Dhodapkar M. V., Steinman R. M., Sapp M. et al. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest*. 1999, 104(2): 173-80
6. Dhodapkar M. V., Steinman R. M., Krasovsky J. et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001, 193(2): 233-8
7. Liao X., Li Y., Bonini C. et al. Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Mol Ther*. 2004, 9(5): 757-64
8. Schaft N., Dorrie J., Thumann P. et al. Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation. *J Immunol*. 2005, 174(5): 3087-97

9. Nestle F. O., Alijagic S., Gilliet M. et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998, 4(3): 328-32
10. Thurner B., Haendle I., Roder C. et al. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med.* 1999, 190(11): 1669-78
11. Chirmule N., Pahwa S. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiol Rev.* 1996, 60(2):386-406
12. Rosenberg S. A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature.* 2001, 411(6835): 380-4
13. Yee C., Savage P. A., Lee P. P. et al. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J Immunol.* 1999, 162(4): 2227-34
14. Wang R. F., Wang H. Y. Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat Biotechnol.* 2002, 20(2): 149-54
15. Albert M. L., Sauter B., Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 1998, 392(6671): 86-9
16. Asavaroengchai W., Kotera Y., Mule J. J. Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99(2): 931-6
17. Pospisilova D., Borovickova J., Rozkova D. et al. Methods of dendritic cell preparation for acute lymphoblastic leukemia immunotherapy in children. *Med Oncol.* 2005, 22(1): 79-88
18. Marten A., Renoth S., Schmidt-Wolf I. G. Increase of the stimulatory effect of dendritic cells by pulsing with apoptotic bodies transfected with the MHC class II gene. *Mol Immunol.* 2002, 39(7-8): 395-8
19. Zhang J. K., Li J., Zhang J. et al. Antitumor immunopreventive and immunotherapeutic effect in mice induced by hybrid vaccine of dendritic cells and hepatocarcinoma in vivo. *World J Gastroenterol.* 2003, 9(3): 479-84
20. Bonehill A., Heirman C., Tuyaerts S. et al. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting Mage-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J Immunol.* 2004, 172(11): 6649-57
21. Nair S. K., Boczkowski D., Morse M. et al. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol.* 1998, 16(4):364-9
22. Wu T. C., Guarnieri F. G., Staveley-O'Carroll K. F. et al. M. Engineering an intracellular pathway for major histocompatibility complex class II presentation of antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92(25):11671-5
23. Zarei S., Arrighi J. F., Ongaro G. et al. Efficient induction of CD8 T-associated immune protection by vaccination with mRNA transfected dendritic cells. *J Invest Dermatol.* 2003, 121(4):745-50
24. Luo D., Saltzman W. M. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol.* 2000, 18(1): 33-7
25. Tseng W. C., Haselton F. R., Giorgio T. D. Transfection by cationic liposomes using simultaneous single cell measurements of plasmid delivery and transgene expression. *J Biol Chem.* 1997, 272(41):25641-7
26. Lundqvist A., Noffz G., Pavlenko M. et al. Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection. *J Immunother.* 2002, 25(6):445-54
27. Grunebach F., Muller M. R., Nencioni A., Brossart P. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Ther.* 2003, 10(5):367-74
28. Heiser A., Coleman D., Dannull J. et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest.* 2002, 109(3):409-17
29. Su Z., Dannull J., Heiser A. et al. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res.* 2003, 63(9): 2127-33
30. Weissman D., Ni H., Scales D. et al. HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *J Immunol.* 2000, 165(8): 4710-7
31. Heiser A., Maurice M. A., Yancey D. R. et al. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol.* 2001, 166(5):2953-60
32. Boczkowski D., Nair S. K., Nam J. H. et al. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res.* 2000, 60(4):1028-34
33. Thornburg C., Boczkowski D., Gilboa E., Nair S. K. Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy. *J Immunother.* 2000, 23(4): 412-8
34. Strobel I., Berchtold S., Gotze A. et al. Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther.* 2000, 7(23):2028-35
35. Tuyaerts S., Michiels A., Corthals J. et al. Induction of Influenza Matrix Protein 1 and MelanA-specific T lymphocytes in vitro using mRNA-electroporated dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* 2003, 10(9):696-706
36. Nair S. K., Heiser A., Boczkowski D. et al. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med.* 2000, 6(9):1011-7
37. Van Tendeloo V. F., Ponsaerts P., Lardon F. et al. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood.* 2001, 98(1):49-56
38. Siegel S., Wagner A., Kabelitz D. et al. Induction of cytotoxic T-cell responses against the oncofetal antigen-immature laminin receptor for the treatment of hematologic malignancies. *Blood.* 2003, 102(13):4416-23
39. Zeis M., Siegel S., Wagner A. et al. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol.* 2003, 170(11):5391-7
40. Heiser A., Dahm P., Yancey D. R. et al. Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. *J Immunol.* 2000, 164(10):508-14
41. Brossart P., Goldrath A. W., Butz E. A. et al. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J Immunol.* 1997, 158(7):3270-6
42. Kaplan J. M., Yu Q., Piraino S. T. et al. Induction of antitumor immunity with dendritic cells transfected with adenovirus vector-encoding endogenous tumor-associated antigens. *J Immunol.* 1999, 163(2):699-707
43. Kim C. J., Prevetie T., Cormier J. et al. Dendritic cells infected with poxviruses encoding MART-1/Melan A sensitive T lymphocytes in vitro. *J Immunother.* 1997, 20(4):276-86
44. Butterfield L. H., Jilani S. M., Chakraborty N. G. et al. Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transfected with a MART-1 adenovirus. *J Immunol.* 1998, 161(10):5607-13
45. Korst R. J., Mahtabifard A., Yamada R., Crystal R. G. Effect of adenovirus gene transfer vectors on the immunologic functions of mouse dendritic cells. *Mol Ther.* 2002, 5(3): 307-15
46. Jenne L., Hauser C., Arrighi J. F. et al. Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function. *Gene Ther.* 2000, 7(18): 1575-83
47. Jonuleit H., Tuting T., Steitz J. et al. Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity. *Gene Ther.* 2000, 7(3): 249-54
48. Woods N. B., Muessig A., Schmidt M. et al. Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood.* 2003, 101(4): 1284-9
49. Kalady M. F., Onaitis M. W., Padilla K. M. et al. Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy. *J Surg Res.* 2002, 105(1):17-24
50. Turanek J., Toman M., Novak J. et al. Adjuvant effect of liposomes and adamantylamide dipeptide on antigenicity of entrapped synthetic peptide derived from HIV-1 transmembrane region glycoprotein gp41. *Immunol Lett.* 1994, 39(2): 157-61
51. Boczkowski D., Nair S. K., Snyder D., Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 1996, 184: 465-472
52. Koido S., Kashiwaba M., Chen D. et al. Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J Immunol.* 2000, 165(10): 5713-9
53. Heiser A., Maurice M. A., Yancey D. R. et al. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res.* 2001, 61(8):3388-93
54. Caruso D. A., Orme L. M., Neale A. M. et al. Results of a phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer. *Neuro-oncol.* 2004, 6(3): 236-46
55. Schmitt W. E., Stassar M. J., Schmitt W. et al. In vitro induction of a bladder cancer-specific T-cell response by mRNA-transfected dendritic cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2001, 127(3): 203-6
56. Ponsaerts P., Van den Bosch G., Cools N. et al. Messenger RNA electroporation of human monocytes, followed by rapid in vitro differentiation, leads to highly stimulatory antigen-loaded mature dendritic cells. *J Immunol.* 2002, 169(4):1669-75
57. Eppler E., Horig H., Kaufman H. L. et al. Carcinoembryonic antigen (CEA) presentation and specific T cell priming by human dendritic cells transfected with CEA-mRNA. *Eur J Cancer.* 2002, 38(1):184-93
58. Ueno H., Tcherepanova L., Reygobellet O. et al. Dendritic cell subsets generated from CD34+ hematopoietic progenitors can be transfected with mRNA and induce antigen-specific cytotoxic T cell responses. *J. Immunol. Methods.* 2004, 285(2):171-80
59. Takahashi M., Narita M., Ayres F. et al. Cytoplasmic expression of EGFP in dendritic cells transfected with in vitro transcribed mRNA or cellular total RNA extracted from EGFP-expressing leukemia cells. *Med Oncol.* 2003, 20(4): 335-48
60. Muller M. R., Grunebach F., Nencioni A., Brossart P. Transfection of dendritic cells with RNA induces CD4- and CD8-mediated T cell immunity against breast carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. *J Immunol.* 2003, 170(12): 5892-6
61. Milazzo C., Reichardt V. L., Muller M. R. et al. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood.* 2003, 101(3):977-82
62. Nair S. K., Boczkowski D., Moeller B. et al. Synergy between tumor immunotherapy and antiangiogenic therapy. *Blood.* 2003, 102(3): 964-71
63. Morse M. A., Nair S. K., Boczkowski D. et al. The feasibility and safety of immunotherapy with dendritic cells loaded with CEA mRNA following neoadjuvant chemoradiotherapy and resection of pancreatic cancer. *Int J Gastrointest Cancer.* 2002, 32(1):1-6
64. Kalady M. F., Onaitis M. W., Emani S. et al. Dendritic cells pulsed with pancreatic cancer total tumor RNA generate specific antipancreatic cancer T cells. *J Gastrointest Surg.* 2004, 8(2):175-81
65. Muller M. R., Tsakou G., Grunebach F. et al. Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells. *Blood.* 2004, 103(5): 1763-9
66. Van Meirvenne S., Straetman L., Heirman C. et al. Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA. *Cancer Gene Ther.* 2002, 9(9): 787-97

EXENTERACE PÁNVE

PELVIC EXENTERATION

¹CIBULA D., ³BABJUK M., ⁶MAREŠ P., ¹SVÁROVSKÝ J., ⁴GÜRLICH R., ²UNGÁR L., ⁴PEŠKOVÁ M., ¹FREITAG P., ⁵DUNDR P., ¹MARTAN A.,

¹GYNEKOLOGICKO-PORODNICKÁ KLINIKA I. LF UK A VFN V PRAZE

²NEMOCNICE ST. STEPHEN, BUDAPEŠŤ, MAĎARSKO

³UROLOGICKÁ KLINIKA I. LF UK A VFN V PRAZE

PŘEDNOSTA Prof. MUDr. J. DVOŘÁČEK, DrSc

⁴I. CHIRURGICKÁ KLINIKA I. LF UK A VFN V PRAZE

⁵ÚSTAV PATOLOGIE I. LF UK A VFN V PRAZE

⁶ONKOLOGICKÁ KLINIKA I. LF UK A VFN V PRAZE

Souhrn: Autoři podávají přehled a zhodnocení publikovaných dat zabývajících se problematikou exenteračních operací pánve. Tyto výkony patří mezi standardní výkony v onkochirurgii. Nejčastější indikací je recidiva / progresse karcinomu děložního hrdla, vulvy nebo pochvy po primární radioterapii. Základní podmínkou pro provedení výkonu je absence vzdálených metastáz. Mortalita výkonů se v současné době pohybuje od 5 % do 10 %, časná i pozdní závažná pooperační morbidita je velmi častá (40 – 60 %). Suprlevatorický rozsah výkonu umožňuje provedení nízké kolorektální anastomózy a ortotopické náhrady močového měchýře s využitím uretry k derivaci moči. Hlavními argumenty pro provádění exenteračních výkonů jsou příznivé dlouhodobé výsledky – celkové 5leté přežití se pohybuje mezi 50 – 60 %. Pro výsledek operace i prognózu onemocnění je zásadní časná diagnostika progresse nádoru a časné provedení výkonu.

Klíčová slova: pánevní exenterace, karcinom děložního hrdla

Summary: The authors offer review and critical assessment of published data concerning pelvic exenterations. Those are standard procedures in onco-surgery. The most frequent indications are recurrences or progressions of cervical, vulvar or vaginal cancers. A basic condition for the procedure is an absence of distant metastasis. Currently presented mortality reaches 5 % to 10 %, early and late postoperative morbidity is frequent (40 - 60 %). Suprlevator type of procedure might be followed by low colorectal anastomosis and ortotopic pouch creation using urethra for urinary diversion. The most significant arguments justifying the procedure are favorable follow-up results – 5-years overall survival reaches 50 – 60 %. Early diagnosis of recurrence and early procedure are fundamental for both procedure outcome and prognosis.

Key words: pelvic exenteration, cervical cancer

Úvod

Exenterační operace pánve patří k nejrozsáhlejším výkonům v onkochirurgii, jsou prováděny závažnou morbiditou a ve většině případů zhoršují významně kvalitu dalšího života. Jsou proto často považovány za neadekvátně rozsáhlé, především na pracovištích s menší zkušeností s radikální chirurgií. Jedná se však o výkony, které mají stále platné indikace. Ve velkých onkochirurgických centrech jsou exenterace pánve standardně prováděnými výkony.

První zprávu o 22 provedených pánevních exenteracích publikoval v roce 1948 Brunschwig [1]. Operace byly indikovány jako paliativní výkony u lokálně pokročilých karcinomů děložního hrdla, pochvy, vulvy, dělohy a tlustého střeva. Mortalita v tomto souboru dosáhla 23 %. První přehledová práce v roce 1967 zpracovala 932 v té době publikovaných případů, u kterých byla zjištěna celkově 17 % mortalita a 5leté přežití 21 % [2].

Během 50 let se podařilo snížit morbiditu a mortalitu, významně snížit průměrnou krevní ztrátu, rozvinula se technika rekonstrukce pánevního dna, pochvy a derivace moče, zpřesnil se

výběr indikovaných pacientek a zkvalitnila se pooperační intenzivní péče. Původní paliativní význam operace je dnes využíván sporadicky. Většina operací je prováděna s primárním kurativním záměrem. Lepší výsledky umožnily v posledních 15 letech rozšířit indikační spektrum. V české odborné literatuře se recentně zabývaly problematikou exenteračních pánevních výkonů autoři z brněnského pracoviště [3; 4]. Naše pracoviště publikovalo podrobnější přehled problematiky v posledních dvou letech [5-7]. V tomto období jsme indikovali 15 pacientek a provedli 8 exenteračních výkonů.

Klasifikace

Pánevní exenterace je někdy mylně považována za výkon, který nutně odstraňuje všechny orgány z pánve a jehož nezbytným důsledkem je derivace moči a stolice pomocí stomií. Existuje však několik typů výkonu, jejichž volba má zásadní význam pro kvalitu dalšího života.

Z hlediska rozsahu lze výkon rozdělit na přední, zadní a totální exenteraci (tabulka 1). Přední či zadní exenterace umožňuje zachovat fyziologickou derivaci moči či stolice. Každý

Tabulka č. 1: Klasifikace a rozsah pánevních exenterací z hlediska rozsahu výkonu

Typ exenterace	Rozsah výkonu
Přední	močový měchýř, uretra, distální část ureterů, děloha, pochva, paracolpium, parametrium, pánevní peritoneum, lymfatická pánevní tkáň
Zadní	rektum, děloha, pochva, paracolpium, parametrium, pánevní peritoneum, lymfatická pánevní tkáň
Totální	rektum, močový měchýř, uretra, distální část ureterů, děloha, pochva, paracolpium, parametrium, pánevní peritoneum, lymfatická pánevní tkáň

Tabulka č. 2: Přehled nejčastějších časných a pozdních pooperačních komplikací

	Časné komplikace	Pozdní komplikace
Intestinální	retrakce kolostomie	peristomická hernie
	protrahovaný ileus	obstrukční ileus
	perineální hernie	enterální píštěl
	enterální píštěl	perineální hernie
	dehiscence anastomózy	
Urologické	netěsnost anastomóz	obstrukce vývodných cest
	ischemie klíčky stěvní	litiáza
	retence moče	infekce, sepse
	stenóza vývodných cest	
Vaskulární	krvácení	hluboká žilní trombóza
	trombóza ilických cév	
	plicní embolie	
Ostatní	infekce rány	pánevní absces
	pánevní absces	deprese
	pneumonie	
	deprese	

volně upraveno dle [23; 27; 29; 32; 33]

z těchto typů lze navíc provádět v rozsahu supra- či infralevatorickém. Supralevatorická exenterace je indikována u tumorů lokalizovaných nad úrovní mm. levatores ani. Při výkonu jsou zachovány svaly dna pánevního, distální část rektu se svěračem, distální 1/3 pochvy, uretra a eventuálně část krčku močového měchýře. Zachovaná část rektu je využita k provedení nízké kolorektální anastomózy v jedné době, rozsah výkonu připouští i volbu ortotopické náhrady močového měchýře, kde je kontinence zajištěna svěračem ponechané uretry. Důsledkem supralevatorického výkonu tak nemusí být provedení stomie. Naopak infralevatorický rozsah exenterace neumožňuje ponechat žádný z výše jmenovaných orgánů. Rozsah výkonu musí na prvním místě zajistit dostatečnou onkologickou radikalitu výkonu.

Indikace

Ačkoliv původním cílem exenteračních výkonů v 50. a 60. letech byla paliativní léčba lokálně pokročilých nálezů, je dnešní pohled na indikace zcela odlišný. Většina autorů uznává pouze terapeutické indikace s cílem vyléčení pacientky. Výjimečně jsou výkony prováděny i z indikací paliativních pro nehojící se abscesy, špatně zvladatelnou bolest, neztišitelné krvácení či píštěle [8].

Nejčastější indikací pánevní exenterace je v současnosti progresse či recidiva zhoubného nádoru v páni po primární radio- či chemoradioterapii. V posledních letech jsou exenterace zvažovány i v primární léčbě lokálně pokročilého onemocnění. V těchto případech je alternativou chirurgické léčby radioterapie. Limity radiační léčby musí být zhodnoceny individuálně a u pacientky, u kterých by vzhledem k velikosti či lokalizaci nádoru měla radioterapie s velkou pravděpodobností pouze paliativní efekt, zvažován exenterační výkon [9-10]. Upuštění od radioterapie má velký význam pro morbiditu chirurgického výkonu, která je signifikantně vyšší u pacientek po předchozí radiační léčbě. Exenterační výkony mají svoje opodstatnění především u lokálně pokročilých karcinomů vulvy a pochvy.

Tabulka č. 3: Přehled mortality, morbidity a 5letého přežití v publikovaných souborech pacientek s provedenou pánevní exenterací

Studie	No	Mortalita (%)	Morbidita ^{&} (%)	5leté přežití (%)
Goldberg, 1998 [34]	154	14	47	
Hockel, 1996 [35]	48	0	33	44
Matthews, 1992 [36]	63	11,1	76	46
Anthopoulos, 1989 [37]	20	5	84	58
Morley, 1989 [29]	100	2	49	61
Rodríguez Cuevas, 1988 [38]	252	17,4	45,2	49,6
Lopez, 1994 [39]	232	14	45	42
Plukker, 1993 [40]	20	0	55	30
Hida, 1998 [41]	50	6	22	64
Meterissian, 1997 [42]	40	0	-	49
Shirouzu, 1995 [43]	26	8	31	25
Wanebo, 1994 [18]	47	8,5	88	33
Yeung, 1993 [44]	30	6,6	-	10
Hafner, 1992 [45]	75	6	43	
Jakowatz, 1985 [24]	104	8,7	76,9	27
Shepherd, 1994 [31]	62	4,9	52,5	44
Shingleton, 1989 [30]	143	6,3	-	50
Ketcham, 1970 [46]	162	7	-	38
Brunschwig, 1970 [47]	581	8	-	19,9
Symmonds, 1975 [14]	198	8,1	-	33
Rutledge, 1977 [32]	296	13,5	-	42,1
Averette, 1984 [23]	92	23,9	-	37
Sharma, 2005 [15]	48	4,2	27	40

[&] morbidita peroperační a časná pooperační

Z velkých souborů pacientů po exenteračních výkonech v páni je zřejmé, že více než 50 % operací je provedeno pro karcinom děložního hrdla, dalších 30 % indikací tvoří karcinomy vulvy, pochvy a endometria a dalších 20 % karcinomy močového měchýře, rektu a vzácně prostaty [11-15].

Výběr pacientek

Vzhledem k závažné morbiditě je nutná velkou pozornost věnovat pečlivému výběru pacientek. Plně indikováno je využití všech dostupných zobrazovacích metod ke zhodnocení operability v páni a především k vyloučení vzdálených metastáz. Absence metastáz včetně negativity paraaortálních uzlin, u kterých se přesvědčujeme peroperačně, je základní podmínkou pro doporučení výkonu.

Relativní podmínkou je centrální lokalizace nádoru. Z dostupných literárních zkušeností vyplývá, že i laterální lokalizace či dosah k pánevní laterální stěně pouze vzácně přesahuje nervový plexus lumbosacralis a infiltruje stěnu pánevní [15]. Mnohem častější je fixace ke kosti křížové, především u karcinomu rektu. Možným řešením je zvýšení radicality výkonu kombinací exenterace s resekci kosti křížové [17-20] nebo zvýšení laterálního rozsahu exenteračního výkonu [21-22].

Významnou podmínkou je celkový dobrý stav pacientky. Samotný výkon, ale především pooperační období, představují závažnou zátěž pro organismus. V mnoha případech operace nemůže být provedena pro nezískání souhlasu pacientky. Po předcházející náročné léčbě musí být pacientka plně informována o pokračování nemoci, o špatné prognóze, o limitacích dalších léčebných modalit, o možnosti exenteračního chirurgického výkonu, který je však provázen reálnou mortalitou, vysokou morbiditou a ve většině případů trvalým zhoršením kvality života v důsledku řešení derivace stolice a derivace moče. Získání souhlasu často vyžaduje několik konzultací, ponechání dostatečného času na zvážení souhlasu a informování obou partnerů. Informovaný souhlas by měl být sestaven pečlivě, s popisem celého rozsahu výkonu, uvedením reálných informací o mortalitě a morbiditě.

Zásadní pro morbiditu výkonu, možnosti rekonstrukce derivace moči a stolice i dlouhodobé výsledky je časná indikace k operaci. Cílem sledování pacientek po skončení radioterapie by měla být především časná diagnostika progresse či reci-

divy onemocnění. Některá centra provádí u všech žen s pokročilým stádiem karcinomu děložního hrdla po ukončení primární radioterapie standardně biopsii parametria pod laparoskopickou či ultrazvukovou kontrolou pomocí punkce tenkou jehlou [23]. Na našem pracovišti sledujeme pacientky po skončení radioterapie pomocí ultrazvuku s využitím barevného doppleru. Biopsii tenkou jehlou pod ultrazvukovou kontrolou indikujeme v případě nálezu suspektní vaskularizace či zvětšení objemu nádoru.

Morbidita a mortalita

Především vývoj operační techniky, časné pooperační péče a lepší výběr pacientek umožnil významné snížení mortality exenteračních výkonů. Zkušenosti z jednoho pracoviště dokládají vývoj mortality v 5letých intervalech z 28,5 % v letech 1966-1971, 33,3 % v letech 1971 – 1976 na 10,4 % v posledním období 1976 – 1981 [24].

V současné době se mortalita ve velkých souborech pohybuje mezi 3 a 15 % (tabulka 3). Až na výjimečná sdělení, většinou na menších počtech výkonů, udává každý autor několik úmrtí v přímé souvislosti s výkonem. Hlavní příčinou pooperační mortality je nezvladatelné krvácení, mortalita v pooperačním období je většinou důsledkem intestinálních komplikací.

Frekvence závažné morbidity je vysoká, pohybuje se většinou okolo 60 – 70 %. Přehled nejčastějších časných i pozdních komplikací podává tabulka 2. V časném pooperačním období jsou nejčastější komplikace urologické, většinou jsou však dobře řešitelné. Mnohem závažnější důsledky mají komplikace intestinální [24]. Jejich vysoká frekvence je způsobena mnoha faktory: 1) zhoršené hojení při celkovém vyčerpání organismu zhoubným nádorem, předchozí léčbou a samotným výkonem; 2) rozsáhlý adhezivní proces v pánvi při velké rané ploše; 3) postradiační změny tkání včetně střeva; 4) špatná podpora klíček střevních v pánvi po odstranění svalů dna pánevního; 5) dislokace klíček hluboko do pánve po exenteraci rozsáhlého objemu tkáně; 6) nutnost resekcí a anastomóz na střevě (součástí exenterace nebo rekonstrukce derivace moče). Nejčastější příčina úmrtí v souvislosti s exenterací je dehiscence anastomózy střeva nebo vytvoření enterální píštěle. Incidence enterálních píštělí se u exenteračních výkonů pohybuje mezi 12 – 32 %, mortalita mezi 36 – 53 % [24-28]. Nejdůležitějším faktorem zvyšujícím morbiditu je předchozí radioterapie pánve.

Prognostické faktory

Řada autorů se v minulosti zabývala prognostickými faktory u pacientek indikovaných k exenteračním výkonům v pánvi. V roce 1989 Morley publikoval podrobný rozbor 100 provedených výkonů [29]. Nejčastější indikací byl spinocelulární karcinom děložního hrdla, medián věku pacientek 53 let, mortalita 2 %, časná morbidita 49 %. Celkové přežití 3leté dosáhlo 66 %, 5leté 61 %. Prognosticky nejvýznamnějším parametrem

ovlivňujícím celkové přežití bylo metastatické postižení lymfatických uzlin. Z dalších parametrů byly významné velikost nádoru (< 4 cm >), interval od stanovení diagnózy (> 10 let; 1 – 10 let; < 1 rok), a u karcinomu děložního hrdla histotyp (spinocelulární karcinom vs adenokarcinom).

Jiná práce z roku 1989 hodnotila prognózu u 143 pacientek po exenteraci pro recidivu karcinomu děložního hrdla [30]. Pacientky byly rozděleny do třech skupin na základě následujících parametrů: interval od ukončení radioterapie (< 1 rok >), velikost tumoru (< 3 cm >), fixace ke stěně pánevní. Celkové 5leté přežití se významně lišilo, ve skupině s nízkým rizikem dosáhlo 82 %, se středním rizikem 46 % a s vysokým rizikem 0 %.

Přestože zkušenosti jednotlivých pracovišť nejsou zcela konzistentní, je zřejmé, že pro další prognózu po provedeném výkonu jsou nejdůležitějšími parametry velikost nádoru, interval od ukončení léčby, event. od stanovení diagnózy a dosažení dostatečné onkologické radikality chirurgického výkonu.

Follow-up

Provedení rozsáhlého exenteračního výkonu s významnou morbiditou a se zhoršením kvality života je opodstatněné dobrými dlouhodobými výsledky. Je třeba zdůraznit, že medián přežití pacientek, indikovaných k těmto výkonům, se bez léčby pohybuje okolo 6 – 7 měsíců [31]. Celkové 5leté přežití pacientek po exenteračních výkonech se ve velkých souborech pohybuje nejčastěji mezi 50 – 60 % (tabulka 3). Nejčastějším místem recidivy je malá pánev. Špatnou prognózu mají pacientky s pozitivitou pánevních uzlin nebo s dosahem tumoru do okrajů chirurgického řezu preparátu při exenteraci.

Závěr

Exenterační výkony v pánvi jsou standardní součástí spektra onkochirurgických výkonů. V některých indikacích jsou jedinou alternativou s možností kurativního efektu. Nejčastější indikací je recidiva či progresse karcinomu děložního hrdla. V posledních letech je výkon zvažován i v primární léčbě lokálně pokročilých zhoubných nádorů v pánvi.

Zásadní podmínkou pro provedení výkonu je absence vzdálených metastáz. Mortalita výkonu se pohybuje mezi 3 % a 10 %, závažná morbidita mezi 50 % a 60 %. Celkové 5leté přežití pacientek dosahuje ve velkých souborech 50 – 60 %, u pacientek s karcinomem děložního hrdla mezi 60 – 70 %.

Výkon klade velké nároky na výběr pacientek, erudici chirurgického týmu, pooperační péči i další sledování po výkonu. Zásadní význam pro výsledky exenteračních operací má včasné zjištění progresse nádoru a včasné provedení výkonu. Dobré výsledky lze očekávat pouze při důsledné centralizaci výkonů a dobré mezioborové spolupráci (gynekolog, urolog, chirurg, anesteziolog, onkolog, radioterapeut, ošetřující personál). Důležitá je připravenost celého týmu nejen na rozsáhlý operační výkon, ale i na řešení častých a závažných komplikací.

Literatura

1. Brunschwig, A.: Complete excision of pelvic viscera for advanced carcinoma. A one-stage abdominoperineal operation with end colostomy and bilateral ureteral implantation into the colon above the colostomy. *Cancer*, 1948, 1, s. 177-83.
2. Kiselow, M., Butcher, H.R., Bricker, E.M.: Results of the radical surgical treatment of advanced pelvic cancer. *Ann. Surg.*, 1967, 166, s. 428-437.
- 3) Rovný, A., Rovný, I., Filipenský, P.: Totální pánevní exenterace u pokročilých nádorů pánve. *Čes. slov. gastroent., Suppl.*, 1999, 53, s. 97-98.
4. Rovný, A., Kotek, V., Řehořek, P., Šabacký, I.: Příspěvek k problematice derivace moče po pánevní exenteraci. *Urologia*, 2000, 6, s. 31.
5. Cibula, D., Freitag, P., Fischerová, D., Jančárková, N., Sláma, J., Živný, J.: Exenterace pánve. *Čes. gynek.*, 2005, 70, s. 44-50.
6. Cibula, D., Freitag, P., Fischerová, D., Jančárková, N., Pavlišta, D., Živný,

- J.: Možnosti zvýšené radikality u exenterací pánve. *Čes. gynek.*, 2005, 70, s. 50-53.
7. Cibula, D., Svárovský, J., Ungár, L., Babjuk, M., Pešková, M., Gürlich, R., Živný, J., Freitag, P., Dunder, P., Mareš, P.: První zkušenosti s exenteračními výkony v pánvi. *Čes. gynek.*, 2005, 69, s. 483-88.
8. Kamat, A.M., Huang, S.F., Bermejo, C.E., et al.: Total pelvic exenteration: effective palliation of perineal pain in patients with locally recurrent prostate cancer. *J. Urol.*, 2003, 170, s. 1868-71.
9. Íjaz, T., Eifel, P.J., Burke, T., Oswald, M.J.: Radiation therapy of pelvic recurrences after radical hysterectomy for cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 1998, 70, s. 241-46.
10. Ito, H., Shigematsu, N., Kawada, T., et al.: Radiotherapy for centrally recurrent cervical cancer of the vaginal stump following hysterectomy. *Gynecol. Oncol.*, 1997, 67, s. 154-61.

11. Barakat, R.R., Goldman, N.A., Patel, D.A., Venkatraman, E.S., Curtin, J.P.: Pelvic exenteration for recurrent endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.*, 1999, 75, s. 99-102.
12. Chi, D.S., Barakat, R.R.: Surgical management of advanced or recurrent endometrial cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2001, 81, s. 885-896.
13. Ike, H., Shimada, H., Yamaguchi, S., Ichikawa, Y., Fujii, S., Ohki, S.: Outcome of total pelvic exenteration for primary rectal cancer. *Dis. Colon Rectum*, 2003, 46, s. 474-80.
14. Symmonds, R.E., Pratt, J.H., Webb, M.J.: Exenterative operation: Experience with 198 patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1975, 121, s. 907-18.
15. Sharma, S., Odunsi, K., Driscoll, D., Lele, S. Pelvic exenterations for gynecological malignancies: twenty-year experience at Roswell Park Cancer Institute. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2005, 15, s. 475-82.
16. Höckl, M.: Laterally extended endopelvic resection. Novel surgical treatment of locally recurrent cervical carcinoma involving the pelvic side wall. *Gynecol. Oncol.*, 2003, 91, s. 369-77.
17. Wanebo, H.J., Koness, R.J., Turk, P.S., et al.: Composite resection of posterior pelvic malignancy. *Ann. Surg.*, 1992, 215, s. 685-95.
18. Wanebo, H.J., Koness, R.J., Vezeridis, M.P., et al.: Pelvic resection of recurrent rectal cancer. *Ann. Surg.*, 1994, 220, s. 586-97.
19. Lopez, M.J., Luna-Pérez, P.: Composite pelvic exenteration: is it worthwhile? *Ann. Surg. Oncol.*, 2003, 11, s. 27-33.
20. Moriya, Y., Akasu, T., Fujita, S., Yamamoto, S. Total pelvic exenteration with distal sacrectomy for fixed recurrent rectal cancer in the pelvis. *Dis. Colon Rectum*, 2004, 47, s. 2047-53.
21. Höckl, M.: Laterally extended endopelvic resection. Novel surgical treatment of locally recurrent cervical carcinoma involving the pelvic side wall. *Gynecol. Oncol.*, 2003, 91, s. 369-77.
22. Höckl, M.: Laterally extended endopelvic resection: Surgical treatment of infrailiac pelvic wall recurrences of gynecologic malignancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1999, 180, s. 306-12.
23. Averette, H.E., Lichtinger, M., Sevin, B-U., Girtanner, R.E.: Pelvic exenteration: A 15-year experience in a general metropolitan hospital. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1984, 150, s. 179-84.
24. Jakowatz, J., Porudominsky, D., Riihimaki, D., et al.: Complications of pelvic exenteration. *Arch. Surg.*, 1985, 120, s. 1261-65.
25. Lawhead, R., Clark, D., Smith, D., Pierce, V., Lewis, J.: Pelvic exenteration for recurrent or persistent gynecologic malignancies: A 10-year review of the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience (1972-81). *Gynecol. Oncol.*, 1989, 33, s. 279-82.
26. Lichtinger, M., Averette, H., Girtanner, R., Sevin, B., Penalver, M.: Small bowel complications after suprapubic urinary diversion in pelvic exenteration. *Gynecol. Oncol.*, 1986, 24, s. 137-42.
27. Miller, B., Morris, M., Gershenson, D.M., Levenback, C.L., Burke, T.W.: Intestinal fistulae formation following pelvic exenteration: a review of the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience, 1957-1990. *Gynecol. Oncol.*, 1995, 56, s. 207-10.
28. Orr, J., Shingleton, H., Hatch, K., Taylor, P., Partridge, E., Soong, S.: Gastrointestinal complications associated with pelvic exenteration. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1983, 145, s. 325-32.
29. Morley, G.W., Hopkins, M.P., Lindenauner, S.M., Roberts, J.A.: Pelvic exenteration, University of Michigan: 100 patients at 5 years. *Obstet. Gynecol.*, 1989, 74, s. 934-43.
30. Shingleton, H.M., Soong, S.J., Gelder, M.S., Hatch, K.D., Baker, V.V., Austin, J.M.: Clinical and histopathologic factors predicting recurrence and survival after pelvic exenteration for cancer of the cervix. *Obstet Gynecol.*, 1989, 73, s. 1027-34.
31. Shepherd, J.H., Ngan, H.Y.S., Neven, P., Fryatt, I., Woodhouse, C.R.J., Hendry, W.F.: Multivariate analysis of factors affecting survival in pelvic exenteration. *Int. J. Gynecol. Cancer*, 1994, 4, s. 361-70.
32. Rutledge, F.N., Smith, J.P., Wharton, J.T., O'Quinn, A.G.: Pelvic exenteration: Analysis of 296 patients. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1977, 129, s. 881-92.
33. Sevin, B-U., Koechli, O.R.: Pelvic exenteration. *Gynecol. Oncol.*, 2001, 81, s. 771-79.
34. Goldberg, J.M., Piver, M.S., Hempling, R.E., et al.: Improvements in pelvic exenteration: factors responsible for reducing morbidity and mortality. *Ann. Surg. Oncol.*, 1998, 5, s. 399-406.
35. Hockel, M., Slenger, K., Hamm, H., et al.: Five-year experience with combined operative and radiotherapeutic treatment of recurrent gynecologic tumors infiltrating the pelvic wall. *Cancer*, 1996, 77, s. 1918-1933.
36. Matthews, C.M., Morris, M., Burke, T.W., et al.: Pelvic exenteration in the elderly patients. *Obstet. Gynecol.*, 1992, 79, s. 773-777.
37. Anthopoulos, A.P., Manetta, A., Larson, J.E., et al.: Pelvic exenteration: a morbidity and mortality analysis of a seven-year experience. *Gynecol. Oncol.*, 1989, 35, s. 219-23.
38. Rodriguez Cuevas, H., Torres, A., de la Garcia, M., et al.: Pelvic exenteration for carcinoma of the cervix: analysis of 252 cases. *J. Surg. Oncol.*, 1988, 38, s. 121-25.
39. Lopez, M.J., Standiford, S.B., Skibba, J.L.: Total pelvic exenteration. A 50-year experience at the Ellis Fischel Cancer Center. *Arch. Surg.*, 129, 1994, s. 390-96.
40. Plukker, J.T., Aalders, J.G., Mensink, H.J., Oldhoff, J.: Total pelvic exenteration: a justified procedure. *Br. J. Surg.*, 1993, 80, s. 1615-17.
41. Hida, J., Yasutomi, M., Maruyama, T., et al.: Results from pelvic exenteration for locally advanced colorectal cancer with lymph node metastases. *Dis. Colon Rectum*, 1998, 41, s. 165-68.
42. Meterissian, S.H., Skibber, J.M., Giacco, G.G., et al.: Pelvic exenteration for locally advanced rectal carcinoma: factors predicting improved survival. *Surgery*, 1997, 121, s. 479-87.
43. Shirozu, K., Isomoto, H., Kakegawa, T.: Total pelvic exenteration for locally advanced colorectal carcinoma. *Br. J. Surg.*, 1996, 83, s. 32-35.
44. Yeung, R.S., Moffat, F.T., Falk, R.E.: Pelvic exenteration for recurrent colorectal carcinoma: a review. *Cancer Invest.*, 1994, 12, s. 176-188.
45. Hafner, G.H., Herrera, L., Petrelli, N.J.: Morbidity and mortality after pelvic exenteration for colorectal adenocarcinoma. *Ann. Surg.*, 1992, 215, s. 63-7.
46. Ketcham, A.S., Deckers, P.J., Sugarbaker, E.V., Hoye, R.C., Thomas, L.B., Smith, R.R.: Pelvic exenteration for carcinoma of the uretine cervix, a 15 year experience. *Cancer*, 1970, 26, s. 513-21.
47. Brunschwig, A.D. Some reflections on pelvic exenteration after 20 years of experience. In: Sturgis, S.H., Taymos, M.L. *Progress in gynecology*. Grune and Stratton. New York, Vol. 5, 1970.

příloha k zápisu České onkologické společnosti

Vážený pan
MUDr. Přemysl Sobotka
předseda Senátu Poslanecké sněmovny České republiky
V Brně dne 7. 9. 2005

Vážený pane předsedo Senátu,
dovolte, abych jménem České onkologické společnosti co nejdůrazněji vyjádřil politování k postoji některých senátorů k Rámcové úmluvě o kontrole tabáku.
Fakta o škodlivosti kouření jsou tak jasná a nezvratná, že diskusní příspěvky některých senátorů, uveřejněné na www stránkách Senátu, by mohly působit směšně, kdyby nešlo o tak vážnou věc jako je zdraví našich občanů a zbytečné spotřebovávání peněz na léčení nemocí indukovaných kouřením.
Věřím, že v případě senátorů jde jen o pouhou neznalost problematiky a ne o podlehnutí lobování tabákových firem.
Vážený pane předsedo Senátu, věřím, že jako lékař dobře chápete obavy, které jsem vyjádřil a že se osobně zasadíte o racionálnější postoj senátorů při příštím projednávání této problematiky.

S úctou
prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.
přednosta Interní hematooonkologické kliniky FN Brno
předseda České onkologické společnosti ČLS JEP
telefon: 532 233 642, email: jvorlic@fnbrno.cz, www.linkos.cz, www.fnbrno.cz/ihok

ÚLOHA GENETICKÝCH POLYMORFISMŮ BIOTRANSFORMAČNÍCH ENZYMŮ V ROZVOJI KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

ROLE OF POLYMORPHISMS OF BIOTRANSFORMATION ENZYMES IN COLORECTAL CANCER

ŠŮSOVÁ S.¹, NOVOTNÝ J.², VODIČKA P.³ A SOUČEK P.^{1*}

¹ ODBORNÁ SKUPINA BIOTRANSFORMACÍ, CENTRUM PRACOVNÍHO LÉKAŘSTVÍ, STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV PRAHA

² ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A IILF UK PRAHA

³ ODDĚLENÍ GENETICKÉ A MOLEKULÁRNÍ TOXIKOLOGIE, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, AKADEMIE VĚD ČR PRAHA

SOUHRN: Východiska: S ohledem na prokázanou souvislost mezi prostředím a genetickou dispozicí bylo hlavním úkolem posoudit vztah mezi genetickými polymorfismy biotransformačních enzymů a kolorektálním karcinomem (CRC). Typ studie a soubor: Studie případů a kontrol - 314 pacientů s CRC a 591 kontrolních subjektů české národnosti.

Metody a výsledky: Restrikční analýzou PCR fragmentů byly sledovány frekvence a rozložení polymorfismů v genech: cytochrom P450 1B1, epoxid hydroláza, NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza a glutathion S-transferázy.

Statistická analýza ukázala, že 1/ jednotlivé polymorfismy nemají statisticky významný vliv na riziko vzniku CRC u neselektované populace. 2/ Ve skupině žen byl rizikovým faktorem polymorfismus chinon oxidoreduktázy. Nositelky variantního genotypu měly více než třikrát vyšší riziko vzniku CRC v porovnání se ženami s normálním genotypem ($P = 0,034$). U mužů tento polymorfismus nehrál významnou úlohu, ovšem jeho úloha v rakovině prsu u žen byla nedávno publikována jak u české, tak u rakouské populace. 3/ Z kombinací genů byly nejzajímavějšími kombinace genů glutathion S-transferáz. U všech testovaných kombinací byly dosaženy vztahy na hranici významnosti ($P < 0,1$). 4/ Věk výsledky statistických analýz neovlivnil.

Závěry: První studie tohoto druhu na české populaci ukázala, že polymorfismy některých biotransformačních enzymů se mohou spolupodílet na rozvoji CRC. Další studium je třeba zaměřit především na hledání rozdílů v expozici mezi oběma pohlavími, na studium významu kombinací polymorfismů a širší spektrum genů s nízkou penetrancí.

Klíčová slova: kolorektální karcinom - riziko - metabolismus - polymorfismy

ABSTRACT: Background: Considering the proven significance of interplay between environmental and genetic factors in cancer, we aimed at determining whether any association exists between genetic polymorphisms in biotransformation enzymes and colorectal cancer (CRC).

Design and Subjects: Case-control study comprised of 314 CRC patients and 591 controls of Czech origin.

Methods and Results: Frequencies and distribution of polymorphisms in cytochrome P450 1B1, epoxide hydrolase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase and glutathione S-transferase were followed by restriction analysis of PCR fragments. Statistical analysis showed: 1/ The lack of association of particular polymorphisms with CRC risk in unselected population. 2/ Female carriers of variant genotype in quinone oxidoreductase were at more than three-fold risk of CRC in comparison with those carrying normal genotype ($P = 0.034$). There was no association of this polymorphism with CRC risk in males, but its role in breast cancer was published in Czech and Austrian populations. 3/ The most interesting gene combinations seemed to be those comprising of glutathione S-transferases as associations of borderline significance were found ($P < 0.1$). 4/ Age played no role as confounding factor.

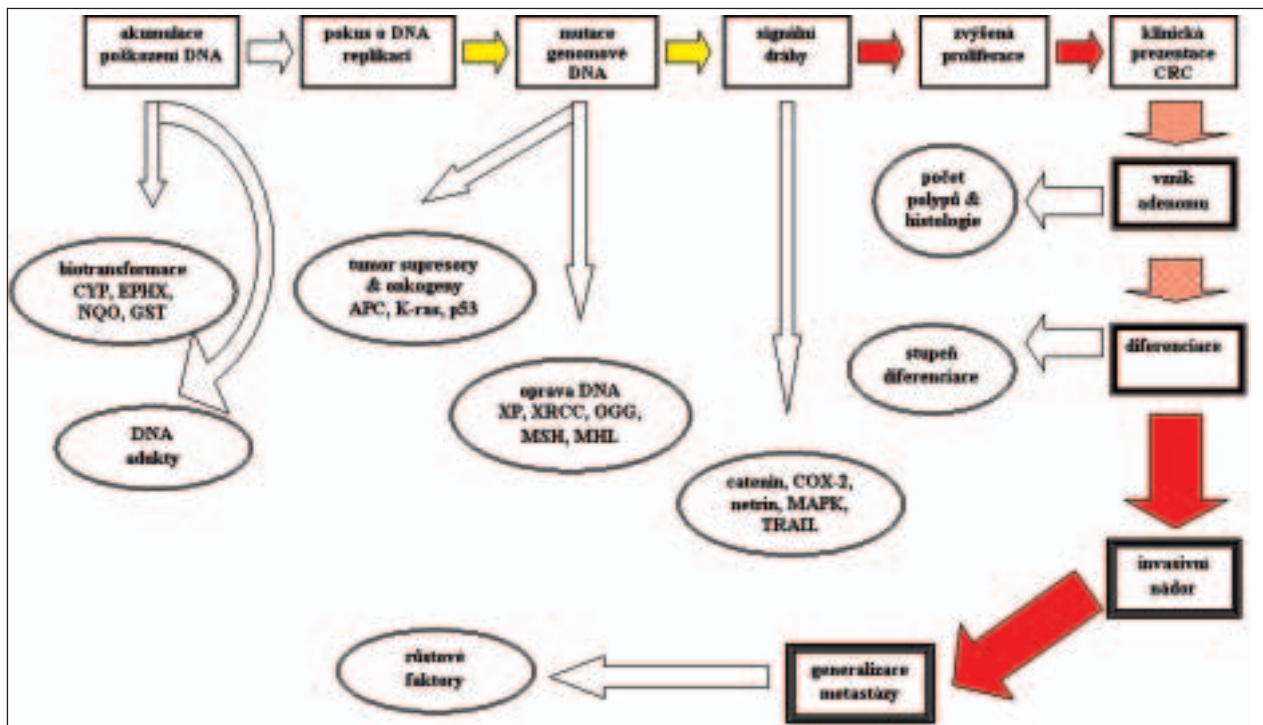
Conclusions: First study of this kind in Czech population showed that polymorphisms in biotransformation enzymes may affect onset of CRC. Further studies should be focused at searching for differences in exposure between genders, assessment of importance of larger selection of low penetrance genes and polymorphism combinations.

Keywords: colorectal - cancer - risk - metabolism - polymorphisms

Úvod

Kolorektální karcinom (colorectal cancer, CRC) je častým onemocněním mužů i žen ve vyspělém světě. Odhady naznačily, že v celosvětovém měřítku tímto nádorem onemocní v průběhu svého života až 5% jedinců (1). CRC svou čet-

ností zaujímá čtvrté místo mezi všemi sledovanými druhy nádorových onemocnění. Každý rok je zjištěno kolem 875 000 nových případů a v poslední dekádě incidence CRC v Evropě stoupá. Na tomto nárůstu se bohužel výrazně podílí populace České republiky, která zaujímá čtvrtou nejvyšší



Obr. č. 1: Jednotlivé kroky vzniku kolorektálního karcinomu - model výběru biomarkerů.

pozici a v případě rakoviny rektu dokonce první (2, 3). Vznik CRC je v poslední době spojován se třemi modely: sporadický (zahrnuje více než 75% případů), rodinný (<20%) a dědičný (5% - především FAP a HNPCC). Na vzniku více než 75% sporadických případů CRC se podílejí faktory životního prostředí a vnímavost určená především polymorfismy a mutacemi v genech s nízkou penetrancí. Mezi celou řadou faktorů vnímavosti, které jsou v poslední době sledovány (obrázek 1) jsme ke studiu zvolili geny metabolismu neboli biotransformace.

Geneticky variabilní biotransformační enzymy: cytochromy P450 (CYP, EC 1.14.14.1) epoxid hydroláza (EPHX, EC 3.3.2.3), NAD(P)H:chinon oxidoreduktáza (NQO, EC 1.6.99.2) a glutathion S-transferázy (GST, EC 2.5.1.18) metabolizují a konjugují léčiva, karcinogeny a látky přírodního původu (4). Některé látky (prokarcinogeny) jsou těmito enzymy metabolicky aktivovány na mutageny a karcinogeny. Jiné látky jsou převážně detoxikovány. V souhrně s expozicí těmto látkám tak funkčnost biotransformačních enzymů může ovlivnit individuální riziko vzniku nádorového onemocnění (5). *CYP1B1* byl lokalizován do oblasti 2p21-p22 chromozomu 2 (6). Protein metabolizuje 17beta-estradiol na 4-hydroxyestradiol, což je endogenní karcinogen, u kterého se předpokládá vztah k rozvoji rakoviny prsu a dělohy (7). P450 1B1 také aktivuje řadu polycyklických aromatických uhlovodíků a arylaminů (8), takže je zajímavý i z hlediska genotoxicity. V *CYP1B1* byla popsána celá řada polymorfismů z nichž dvě varianty v exonu 3 (pozice - C4326G, záměna aminokyseliny - Leu432Val, název alel - *CYP1B1**1/*3 a A4390G, Asn453Ser, *CYP1B1**1/*4) jsou nejlépe charakterizované (9). Varianta *CYP1B1**3 metabolizuje pomaleji benzo(a)pyren na mutagení metabolit (10) a varianta *CYP1B1**4 podléhá degradaci významně rychleji než produkty exprese normální alely *CYP1B1**1, což se promítá ve více než dvakrát nižší hladině a aktivitě proteinu (11). Ve studii Sachse a spol. (12) nebyla prokázána spojitost mezi variantou *CYP1B1**3 a rizikem CRC. Další studie zabývající se úlohou variant *CYP1B1* však dosud publikovány nebyly.

EPHX1 katalyzuje hydrolýzu epoxidů na méně reaktivní transdihydrodioly (13). *EPHX1* je lokalizován na chromozomu 1

(1q42.1). Nejčastěji se vyskytující polymorfismy *EPHX1* jsou v exonu 3 (T337C, Tyr113His, *EPHX1**1/*3) a exonu 4 (A415G, His139Arg, *EPHX1**1/*4). Oba polymorfismy mají vliv na aktivitu vytvářeného proteinu (exon 3 – nízká aktivita, exon 4 – vysoká aktivita; cit. 14). Úloha *EPHX1* v CRC je kontroverzní. V poslední době byly publikovány studie ukazující na možné spojení vysoké aktivity enzymu se zvýšeným rizikem pokročilého adenomu kolorekta (11, 15), ale byly zveřejněny rovněž negativní výsledky (16).

NQO1 se nachází na chromozómu 16 (16q22.1) a kóduje dvouelektronovou reduktázu, která bioaktivuje i detoxikuje látky se strukturálními motivy chinonů. Úloha *NQO1* je často diskutována ve spojení s chemoprevencí (17). Polymorfismus v exonu 6 *NQO1* (C609T, Pro187Ser, *NQO1**1/*2) byl označen jako rizikový faktor CRC (18) a rakoviny prsu (19, 20). Hou a spol. (21) našli kombinaci alel *NQO1**2 a *CYP1A1**2 jako rizikový faktor CRC především u kuřáků.

Enzymy GST se podílí na detoxikaci velké řady karcinogenů. *GSTM1* je lokalizovaný na chromozómu 1 (1p13.3) a *GSTT1* na chromozómu 22 (22q11.2). Delece *GSTM1* (alela *null* nebo *GSTM1**2/*2) je často studována jako rizikový faktor v rozvoji rakoviny. Další gen z této skupiny, *GSTT1* obsahuje rovněž deleční polymorfismus (*null* nebo *GSTT1**2/*2; cit. 22). Delece v genech *GSTM1* a *GSTT1* byly spojeny se zvýšeným rizikem CRC na poměrně malém vzorku turecké populace (23). Úloha *GSTT1* byla naznačena i nedávno publikovanou studií Yeh a spol. (24) na populaci asijské.

GSTP1 nacházející se na chromozómu 11 (11q13) je vysoce exprimován v některých buněčných liniích resistantních vůči cytostatikům. Board a spol. (25) našli dva často se vyskytující polymorfismy *GSTP1*, z nichž variantní alela v exonu 5 (A313G, Ile105Val, *GSTP1**1/*2) exprimuje enzym se sníženou tepelnou stabilitou a substrátovou afinitou (26). Polymorfismy v genech *GSTP1*, *XPD*, *ERCC1* a *TS* mohou napomoci při predikci výsledku chemoterapie CRC 5-fluorouracilem a oxaliplatinou (27).

Z výše uvedeného vyplývá složitost problematiky studia genetických polymorfismů a potřeba výsledky ověřovat, zpřesňovat a sledovat především kombinace genů a polymorfismů, které nebyly dosud analyzovány. Rovněž je třeba sledovat tyto

Tabulka č. 1: Rozdělení genotypů *CYP1B1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, a *NQO1* ve studii případů a kontrol. V tabulce jsou uvedeny počty nositelů jednotlivých genotypů (v závorce procentuální vyjádření).

Gen	genotyp	kontroly	pacienti	OR ¹	95% CI ¹	C ²	P
<i>CYP1B1</i> (kodon 432)	*1/*1	140 (31,6)	111 (35,6)	-	-	-	-
	*1/*3	236 (53,3)	136 (43,6)	0,727	0,524-1,007	3,679	0,055
	*3/*3	67 (15,1)	65 (20,8)	1,224	0,802-1,867	2,483	0,349
	N	443	312			7,767 ²	0,021 ²
<i>CYP1B1</i> (kodon 453)	*1/*1	310 (69,8)	225 (72,1)	-	-	-	-
	*1/*4	126 (28,4)	81 (26,0)	0,886	0,638-1,229	0,527	0,468
	*4/*4	8 (1,8)	6 (1,9)	1,003	0,353-3,020	0,004	0,952
	N	444	312			0,542 ²	0,763 ²
<i>EPHX1</i> (exon 3)	*1/*1	250 (43,9)	148 (47,4)	-	-	-	-
	*1/*3	233 (40,9)	119 (38,1)	0,863	0,639-1,165	0,930	0,335
	*3/*3	86 (15,1)	45 (14,4)	0,884	0,584-1,337	0,342	0,559
	N	569	312			1,009 ²	0,604 ²
<i>EPHX1</i> (exon 4)	*1/*1	341 (61,1)	189 (60,6)	-	-	-	-
	*1/*4	191 (34,2)	107 (34,3)	1,011	0,752-1,359	0,005	0,944
	*4/*4	26 (4,7)	16 (5,1)	1,110	0,581-2,122	0,100	0,751
	N	558	312			0,101 ²	0,951 ²
<i>NQO1</i> (exon 6)	*1/*1	347 (69,8)	216 (69,2)	-	-	-	-
	*1/*2	137 (27,6)	86 (27,6)	1,008	0,733-1,387	0,003	0,959
	*2/*2	13 (2,6)	10 (3,2)	1,236	0,533-2,867	0,244	0,622
	N	497	312			0,244 ²	0,885 ²
<i>GSTM1</i> (deletion)	plus	268 (47,5)	138 (44,2)	-	-	-	-
	null	296 (52,5)	174 (55,8)	1,142	0,865-1,507	0,873	0,350
	N	564	312				
<i>GSTT1</i> (deletion)	plus	449 (83,1)	256 (82,1)	-	-	-	-
	null	91 (16,9)	56 (17,9)	1,079	0,748-1,557	0,167	0,683
	N	540	312				
<i>GSTP1</i> (exon 5)	*1/*1	260 (47,1)	134 (42,9)	-	-	-	-
	*1/*2	227 (41,1)	153 (49,0)	1,308	0,976-1,752	3,242	0,072
	*2/*2	65 (11,8)	25 (8,0)	0,746	0,450-1,238	1,290	0,256
	N	552	312			6,302 ²	0,043 ²

¹ Odhad relativního rizika (odds ratio, OR) a interval spolehlivosti (confidence interval, CI) pro tabulky 2x2 statistikou podle Mantel-Haenszela (jeden stupeň volnosti).

² Rozdělení genotypů testem Pearson Chi-Square 3x2 (dva stupně volnosti).

Tabulka č. 2: Odhad aktivity EPHX1 na základě kombinace obou sledovaných genotypů ve studii případů a kontrol. V tabulce jsou uvedeny počty jedinců s danou aktivitou (v závorce procentuální vyjádření).

Aktivita EPHX1	kontroly	pacienti	χ^2	P
nízká	220 (39,6)	111 (35,6)	-	-
střední	239 (43,0)	146 (46,8)	-	-
vysoká	97 (17,4)	55 (17,6)	-	-
N	556	312	1,493 ¹	0,474 ¹
Aktivita EPHX1	OR ²	95% CI ²	χ^2	P ²
střední vs. nízká	1,211	0,890-1,646	1,489	0,222
střední vs. vysoká	0,928	0,629-1,370	0,141	0,708
vysoká vs. nízká	1,124	0,752-1,680	0,324	0,569

¹ Pearson Chi-Square Test 3x2 (dva stupně volnosti).

² Odhad relativního rizika (odds ratio, OR) a interval spolehlivosti (confidence interval, CI) pro tabulky 2x2 statistikou podle Mantel-Haenszela (jeden stupeň volnosti).

vztahy u populací s vysokou incidencí CRC jako je česká populace. Pro tuto studii byly záměrně vybrány enzymy, jejichž relevance v metabolismu kontaminant životního prostředí je dostatečně prokázána. Jednotlivé polymorfismy byly zvoleny s ohledem na publikovaný vztah k funkci exprimovaného proteinu.

Materiál a metody

Materiál. Restrikční enzymy a deoxynukleotidy (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) vyrobené firmou New England Biolabs (Beverly, MA, USA) byly zakoupeny od distributora Biotech s r.o. RedTaq polymeráza byla od firmy TopBio s r.o. Ultra-Pure agaróza od Life Technologies (Paisley, UK) a oligonuk-

Tabulka č. 3: Pohlavní rozdíly v rozdělení genotypů *NQO1* ve studii případů a kontrol. V tabulce jsou uvedeny počty nositelů jednotlivých genotypů (v závorce procentuální vyjádření).

Ženy							
Gen	genotyp	kontroly	pacienti	OR ¹	95% CI ¹	c ²	P
<i>NQO1</i> (exon 6)	*1/*1	225 (71,7)	83 (70,5)	-	-	-	-
	*1/*2	83 (26,4)	33 (26,8)	1,078	0,670-1,734	0,095	0,757
	*2/*2	6 (1,9)	7 (5,7)	3,163	1,033-9,684	4,473	0,034
	N	314	123			4,469 ²	0,107 ²
Muži							
Gen	genotyp	kontroly	pacienti	OR ¹	95% CI ¹	c ²	P
<i>NQO1</i> (exon 6)	*1/*1	122 (66,7)	132 (70,2)	-	-	-	-
	*1/*2	54 (29,5)	53 (28,2)	0,907	0,577-1,425	0,179	0,672
	*2/*2	7 (3,8)	3 (1,6)	0,396	0,100-1,566	1,858	0,173
	N	183	188			1,936 ²	0,380 ²

¹ Odhad relativního rizika (odds ratio, OR) a interval spolehlivosti (confidence interval, CI) pro tabulky 2x2 statistikou podle Mantel-Haenszela (jeden stupeň volnosti).

² Rozdělení genotypů testem Pearson Chi-Square 3x2 (dva stupně volnosti).

Tabulka č. 4: Vliv kombinací genů a genotypů na riziko CRC ve studii případů a kontrol.

Kombinace	kontroly	pacienti	OR ¹	95% CI ¹	P ¹
<i>GSTM1</i> -plus + <i>GSTP1</i> *1/*1	126	52	-	-	-
vs. <i>GSTM1</i> -null + <i>GSTP1</i> *1/*2					
nebo <i>GSTM1</i> -null + <i>GSTP1</i> *2/*2	154	92	1,448	0,957-2,189	0,049
N	280	144		3,085 ²	
<i>GSTT1</i> -plus + <i>GSTP1</i> *1/*1	212	114	-	-	-
vs. <i>GSTT1</i> -null + <i>GSTP1</i> *1/*2					
nebo <i>GSTT1</i> -null + <i>GSTP1</i> *2/*2	45	36	1,488	0,908-2,438	0,074
N	257	150		2,503 ²	
<i>GSTM1</i> -plus + <i>GSTT1</i> -plus	216	110	-	-	-
vs. <i>GSTM1</i> -null + <i>GSTT1</i> -null	322	202	1,232	0,922-1,645	0,090
N	538	312		1,999 ²	
<i>GSTM1</i> -plus + <i>GSTT1</i> -plus + <i>GSTP1</i> *1/*1	103	44	-	-	-
vs. <i>GSTM1</i> -null nebo <i>GSTT1</i> -null nebo <i>GSTP1</i> *1/*2 nebo					
<i>GSTP1</i> *2/*2	367	211	1,346	0,910-1,991	0,081
N	470	255		2,221 ²	

¹ Odhad relativního rizika (odds ratio, OR) a interval spolehlivosti (confidence interval, CI) pro tabulky 2x2 statistikou podle Mantel-Haenszela (jeden stupeň volnosti). Významnost byla hodnocena jednostranným Fisherovým testem, protože byly testovány pozitivní vs negativní kombinace s očekávaným efektem.

² Rozdělení genotypů testem Pearson Chi-Square 3x2 (dva stupně volnosti).

Korespondence: RNDr. Pavel Souček, CSc., Odborná skupina biotransformací, Centrum pracovního lékařství, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 48, Praha 10, 100 42, tel: 267 082 711, fax: 267 311 236, e-mail: psoucek@szu.cz, www.szu.cz

leotidové primery byly získány od KRD s r.o. Další chemikálie byly zakoupeny od zastoupení firmy Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). PCR byla prováděna s pomocí termocyklérů GeneAmp 2400 a 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) a PTC 200 DNA Engine Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, MA, USA). Aparáty na elektroforézu nukleových kyselin byly produkty firmy Jordan Scientific Co. Inc. (Bloomington, IN, USA) a elektroforetické zdroje od firmy E-C Apparatus Corp. (Holbrook, NY, USA) dodávané firmou Biotech s r.o.

Donoři krevních vzorků. Vzorky žilní krve byly získány od 314 pacientů s CRC a od 591 kontrolních subjektů. Skupina pacientů byla shromážděna v období duben – listopad 2004. Účastníci studie byli nemocní s histologicky verifikovaným CRC, kteří podepsali informovaný souhlas s účastí ve studii. Vlastní krevní odběr byl prováděn při rutinní

dispenzární kontrole společně s odběrem nádorových markerů (u nemocných v remisi) nebo před aplikací chemoterapie. O pacientech byly od klinických spolupracovníků získány následující údaje: pohlaví, věk, etnická příslušnost, datum diagnózy, osobní a rodinná anamnéza, stadium onemocnění (Duke), lokalizace nádoru a jeho histologický typ a stupeň. V dalším průběhu studia budou sledovány i informace o charakteru neoadjuvantní i adjuvantní terapie, výsledky terapie, relapsy a jejich lokalizace, bezpříznakové i celkové přežívání. Jako hlavní expoziční faktor je sledována délka a rozsah kouření. Soubor pacientů byl složen ze 189 mužů a 125 žen (poměr 1,5) průměrného věku 64,8 let (rozpětí 30 – 92 let).

Kontrolní skupina byla složena ze 591 zdravých nepřibuzných jedinců kavkazské rasy (324 žen a 267 mužů, průměrný věk 57,3, rozpětí 11 - 105 let). Kontroly se skládaly z pacientů tří velkých pražských nemocnic a byli odebráni v období let 2000 – 2003. Ze zdravotní dokumentace byly získány údaje o věku, pohlaví, etnické příslušnosti a osobní anamnéze kontrolních subjektů. Hlavním kritériem pro přijetí do kontrolní skupiny byla prokazatelná absence nádorového onemocnění v osobní anamnéze.

Pacienti i kontrolní subjekty byly informováni o významu studie a byl jim předložen k podpisu formulář Informovaného souhlasu, který byl schválen etickým komise Státního zdravotního ústavu a Ústavu experimentální medicíny AV ČR.

Genotypování. Genomová DNA byla izolována z periferních lymfocytů za pomoci fenol/chloroformové extrakce podle Sugimury a spol. (28). Přítomnost polymorfismů biotransformačních enzymů byla stanovena publikovanými metodami přístupem restriční analýzy fragmentů získaných z DNA pomocí PCR (19, 29).

Odhad aktivity EPHX1 byl proveden podle dříve publikované metody (29) s pomocí kombinací genotypů v exonech 3 a 4 EPHX1 (exon 3 + exon 4), nízká aktivita: 3/*3+*1/*1, *3/*3+*1/*4, *1/*3+*1/*1 a *3/*3+*4/*4; střední: *1/*1+*1/*1, *1/*3+*1/*4 a *1/*3+*4/*4; vysoká: *1/*1 + *1/*4 a *1/*1 + *4/*4.

Statistické analýzy. V prvním sledu byly testovány rozdíly v rozložení genotypů mezi pacienty a kontrolami za pomoci kontingenčních tabulek 3x2 testem Pearson Chi-Square (2, oboustranný asymptotický test se dvěma stupni volnosti). Rovněž byly pro jednotlivé genotypy spočítány hrubé odhady relativního rizika (odds ratio, OR) z tabulek 2x2 podle Mantel-Haenszela.

V další fázi byl testován vliv věku a pohlaví s pomocí binární logistické regrese testem podle Hosmera a Lemeshowa a byly sledovány intervaly spolehlivosti na hladině 95% (95% confidence interval, CI).

V poslední sérii analýz byl analyzován vliv vybraných kombinací genů a genotypů. Následující kombinace byly vybrány na základě hypotézy o pozitivní vs. negativní kombinaci genotypů (u negativní kombinace očekáván jednosměrný efekt): EPHX1-aktivita + GSTM1, EPHX1-aktivita + GSTT1, EPHX1-aktivita + GSTP1, EPHX1-aktivita + NQO1, EPHX1-aktivita + CYP1B1, GSTM1 + GSTT1, GSTM1 + GSTP1, GSTM1 + CYP1B1, GSTM1 + NQO1, GSTT1 + GSTP1, GSTT1 + CYP1B1, GSTT1 + NQO1, GSTP1 + NQO1, GSTP1 + CYP1B1 a NQO1 + CYP1B1. Z důvodu testování předem dané hypotézy nebyla v výše zmíněných 15ti testů prováděna žádná korekce. Pro všechny statistické analýzy byl použit program Win SPSS v10.0 program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). V případě, že v některé z testovaných skupin byl počet jedinců menší než 40 nebo pokud byl očekávaný výstup z kontingenčních tabulek menší než 5, byl pro zpřesnění výsledku dodatečně použit exaktní test podle Fishera. Za významný byl považován výsledek s hodnotou P nižší nebo rovnou 0.05. Výše uvedené analýzy jsou v souladu s postupy doporučenými Breslowem a Dayem (30).

Výsledky a diskuse

1. Frekvence alel a genotypů sledovaných genů u kontrolní české populace ve srovnání s jinými populacemi

Skupina zdravých nepřibuzných subjektů z české populace (n = 591) byla sestavena tak, aby byla vyvážená z hlediska zastoupení obou pohlaví i věkových skupin. U tohoto souboru byla zjištěna frekvence variantních alel CYP1B1*3 nesoucí Val - 41,8% a CYP1B1*4 nesoucí Ser -16,0%. Rozdělení genotypů i frekvence variantních alel bylo srovnáno pomocí kontingenčních tabulek s údaji známými z literatury. U zdravé populace 1549 švédských žen byly popsány frekvence 45,2% a 16,9% (31). V britské populaci 593 kontrolních subjektů byla zjištěna frekvence CYP1B1*3 44,6% (12).

Studiem genotypů EPHX1 byly nalezeny frekvence alely nesoucí His v exonu 3 – 35,6% a alely nesoucí Arg v exonu 4 – 21,8%. Variantní alela *3 má o 50% nižší aktivitu a alela *4 naopak o 25% vyšší aktivitu než nativní protein (14). Proto je možné se pokusit o odhad aktivity EPHX1 kombinací sledovaných genotypů. Ve zdravé české populaci by tak bylo cca 17% nositelů vysoké aktivity a 40% nositelů nízké aktivity EPHX1. Tyto frekvence byly velmi podobné frekvencím zjištěným dříve ve zdravých populacích Evropy (29, 32).

Variantní alela v genu NQO1 nesoucí Ser byla zastoupena v české populaci 16,4%, což odpovídá frekvencím zaznamenaným ve švédské a německé populaci (33, 34).

Genotypováním GSTP1 byla zjištěna frekvence variantní alely nesoucí Val – 32,3%. Tato frekvence ani rozdělení genotypů se nelišilo od celé řady bělošských populací Evropy (29). Frekvence genotypů nesoucích delece v genech GSTM1 a GSTT1 byly v české populaci 52,5% a 16,9%, což jsou velice podobné výsledky jako dříve publikovaná data u slovenské a polské populace (35, 36).

Nalezený soulad v celkových frekvencích variantních alel ukázal, že použité metodiky byly dobře validovány a poskytly kvalitní údaje.

2. Analýza významu jednotlivých genotypů porovnáním skupiny pacientů se zdravou populací

Stanovení genetických polymorfismů bylo provedeno u skupiny pacientů trpících CRC (n = 314) a u zdravé kontrolní populace (n = 591), která byla vybrána tak, aby věkové i pohlavní složení bylo srovnatelné s pacienty. Statistická analýza výsledků provedená pomocí kontingenčních tabulek sledujících relativní riziko u neselektovaných skupin ukázala, že mezi pacienty a kontrolami nejsou významné rozdíly v rozdělení genotypů CYP1B1, EPHX1, NQO1, GSTM1, GSTP1 a GSTT1 (tabulka 1). Další analýza vlivu aktivity EPHX1 odhadnuté na základě kombinací stavu dvou polymorfismů v exonech 3 a 4 EPHX1 (29, 32) rovněž nenaznačila významné rozdíly mezi oběma skupinami (tabulka 2).

Úloha těchto polymorfismů již byla studována u řady populací avšak nikoliv u populace české. Rovněž velikost srovnávaných souborů se značně liší. Studií s dostatečnou statistickou silou nebylo zveřejněno mnoho. Studie Sachse a spol. (12) na 490 pacientech s CRC a 592 kontrolách britské národnosti neprokázala vliv polymorfismů CYP1B1*3, NQO1, GSTP1 a GSTT1 na CRC, avšak naznačila možnou protektivní úlohu pomalé alely EPHX1*3 (OR = 0,68; CI = 0,49–0,95; P = 0,012). Spojení vysoké aktivity enzymu se zvýšeným rizikem pokročilého adenomu kolorekta nedávno publikoval Huang a spol. (15) u 772 pacientů a 777 zdravých kontrol čínské národnosti. Negativní výsledky byly rovněž zveřejněny (16). Vysoká aktivita EPHX1 korelovala s vyšším rizikem CRC u kuřáků (37) a rovněž u konzumentů pečeného masa (OR = 3,3; CI = 1,4 - 7,9; cit. 38).

Glutathion S-transferázy P1 a T1 nekorelovaly s výskytem CRC v maďarské studii u 500 pacientů a 500 kontrol. Delece GSTM1 však byla označena jako rizikový faktor (OR = 1,48; CI = 1,15 – 1,92; cit. 39). Podobně silné studie holandské však žádný vztah GST k CRC nalezly (16, 40).

Během analýz zohledňujících pohlaví a věk pacientů však byl

nalezen významný rozdíl v rozdělení genotypů *NQO1*. Podle těchto výsledků se zdá, že u pacientů s CRC ženského pohlaví převládají nositelky variantního genotypu *NQO1**2/*2 (tabulka 3), který kóduje enzymaticky neaktivní protein (41). Enzym *NQO1* katalyzuje dvouelektronovou redukci chinonů na hydrochinony. *NQO1* o chinony soupeří s NADPH-cytochrom P450 reduktázou, která jedoelektronovým mechanismem redukuje chinon na hydrochinon za vzniku velmi reaktivního meziprojektu – semichinonu a vedlejšího produktu superoxid anionradikálu (42). Chinony a jejich redukované formy - hydrochinony jsou mutageny, které tvoří adukty s DNA (43,44). Mutační spektra chinonů, semichinonů a hydrochinonů se navzájem liší ve frekvenci i specificitě. *NQO1* tak vlastně ochraňuje buňky před mutagenitou chinonů a především semichinonů i následně vznikajících reaktivních forem kyslíku. Nositelé variantního genotypu nemají funkční *NQO1* a proto při současné expozici chinonům, např.: produkty metabolismu benzenu, polycyklických aromatických uhlovlodíků, ale i autooxidace polyfenolů, mohou být vystaveni zvýšené mutageně a karcinogenezi.

Hou a spol. (21) nalezi v 725 pacientů a 729 kontrol kombinaci alel *NQO1**2 a *CYP1A1*/*2 jako rizikový faktor CRC (OR = 2,2; CI = 1,1 – 4,5). Vztah byl velmi významný především u těžkých kuřáků, kteří měli spotřebu nad 20 cigaret na den (OR = 21,1; CI = 3,9 – 114,4; P = 0,03). Multivariátní analýzy španělské populace složené z 247 CRC pacientů a 296 kontrol ukázaly významnou úlohu variantní alely *NQO1**2 jako rizikového faktoru v CRC (OR = 2,9; CI = 1,19 – 6,97; P = 0,01) a navíc byla tato alela spojena se zvýšenou frekvencí mutací v kodonu 12 genu *K-ras* (OR = 6,5; CI = 1,39 – 34,9; P = 0,003; cit. 18). Pohlavní rozdíly spojené s polymorfismem *NQO1* byly publikovány u rakoviny plic, kde ženy s alespoň jednou variantní alelou *NQO1*, na rozdíl od mužů, měly významně vyšší riziko onemocnění (OR = 1,89; CI = 1,33 – 2,68; cit. 45). Pohlavní rozdíly mohou souviset s rozdílnou expozicí mezi muži a ženami (především faktory výživy) či hormonálními vlivy uvnitř organismu.

S pomocí logistické regrese bylo zjištěno, že žádný ze sledovaných vztahů nebyl významně ovlivněn věkovým rozdělením v obou sledovaných skupinách.

3. Analýza významu kombinací genů porovnáním skupiny pacientů se zdravou populací

Analýzy patnácti vybraných kombinací dvou genů byly zjištěny zajímavé, i když nevýznamné vlivy všech tří možných kombinací genů *GSTM1*, *GSTP1* a *GSTT1* (tabulka 4). Tyto kombinace byly vybrány na základě hypotézy o negativní vs. pozi-

itivní kombinaci polymorfismů. Negativní kombinace by podle hypotézy znamenala sníženou detoxikaci, a tudíž zvýšené riziko interakce reaktivních metabolitů např.: polycyklických aromatických uhlovlodíků a dalších kontaminantů životního prostředí s biomakromolekulami proti normálnímu stavu.

Kombinace výše uvedených genů nebyly jako rizikové faktory zatím v literatuře uvedeny, avšak kombinace *GSTM1-null* a přítomnosti aspoň jedné variantní alely *GSTM3**B byla označena jako významný rizikový faktor CRC (OR = 2,12; CI = 1,24 – 3,63; cit. 46). Jedinci s kombinací *GSTM1-null* a *GSTP1**2 mají vyšší riziko vzniku rakoviny plic (OR = 4,0; CI 1,3 – 12,2; cit. 47). Velmi podobné zjištění publikovali Wenzlaff a spol. (48). Významný vztah této kombinace byl rovněž nalezen u rakoviny prsu (OR = 2,03; CI = 1,18 – 3,50; P = 0,010; cit. 20).

Naše předchozí zjištění dále podporuje vztah na hranici významnosti, který byl nalezen u kombinace všech tří genů GST (OR = 1,346; 0,910 - 1,991; 0,081; tabulka 4).

Závěry

Analýza polymorfismů v genech kódujících enzymy biotransformace v české populaci ukázala, že mohou existovat pohlavní rozdíly v riziku CRC. Ze studovaných genů se v tomto ohledu zdá být nejzajímavějším *NQO1*, který detoxikuje látky se strukturálním motivem chinonů. Expozice těmto látkám současně s defektem v uvedeném genu může znamenat zvýšené riziko vzniku nádorových onemocnění obecně. Pro další studium zůstává otázkou proč jsou právě ženy ohroženější ve srovnání s muži. V tomto ohledu bude třeba prostudovat hormonální poměry v organismu, například délku menstruační aktivity a používání exogenních hormonálních látek typu hormonální antikoncepce apod.

Dalšími rizikovými faktory CRC se zdají negativní kombinace konjugčních enzymů GST. Tyto kombinace se mohou uplatnit zejména při interakci s faktory životního stylu (kouření, spotřeba pečeného masa či zeleniny). Tyto předpoklady je třeba ověřit studiem dobře charakterizovaného souboru s ohledem na životní styl pacientů i kontrolních subjektů. Na podobné studii v současnosti pracujeme.

Poděkování

Studie byla podpořena grantem Ligy proti rakovině Praha pro rok 2004-2005 a grantem Grantové agentury ČR, číslo: 310/05/2626. Autoři by rádi poděkovali personálu klinických pracovišť, která dodávají vzorky i data, a především pacientům za ochotu podporovat tento výzkum.

Literatura

1. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med.* 2002;137:603-12
2. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *Br Med J.* 2000;321:805-8.
3. Janout V and Kollarova H (2001) *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc.*
4. Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, et al. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. IARC Scientific Publication no. 148. IARC, Lyon, France, 1999.
5. Raunio H, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, Hietanen E, et al. Diagnosis of polymorphism in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review. *Gene* 1995;159:113-21.
6. Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, et al. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J Biol Chem.* 1996;271:28324-30.
7. Tuominen R, Warholm M, Moller L, Rannug A. Constitutive CYP1B1 mRNA expression in human blood mononuclear cells in relation to gender, genotype, and environmental factors. *Environ Res.* 2003;93:138-48.
8. Guengerich FP, Shimada T. Activation of procarcinogens by human cytochrome P 450 Enzymes. *Mutat Res.* 1998;400:201-13.
9. Stoilov I, Akarsu AN, Alozie I, Child A, et al. Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21

- results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. *Am J Hum Genet.* 1998;62:573-84.
10. Shimada T, Watanabe J, Inoue K, Guengerich FP, et al. Specificity of 17beta-oestradiol and benzo[a]pyrene oxidation by polymorphic human cytochrome P4501B1 variants substituted at residues 48, 119 and 432. *Xenobiotica* 2001;31:163-76.
11. Bandiera S, Weidlich S, Harth V, Broede P, et al. Proteasomal degradation of human CYP1B1: effect of the Asn453Ser polymorphism on the post-translational regulation of CYP1B1 expression. *Mol Pharmacol.* 2005;67:435-43.
12. Sachse C, Smith G, Wilkie MJ, Barrett JH, et al. Colorectal Cancer Study Group. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2002;23:1839-49.
13. Oesch F. Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica* 1973;3:305-40.
14. Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet.* 1994;3:421-8.
15. Huang WY, Chatterjee N, Chanock S, Dean M, et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and risk for advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:152-7.

16. Tiemersma EW, Bunschoten A, Kok FJ, Glatt H, et al. Effect of SULT1A1 and NAT2 genetic polymorphism on the association between cigarette smoking and colorectal adenomas. *Int J Cancer*. 2004;108:97-103.
17. Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, et al. Characterization of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *Br J Cancer* 1997;75:69-75.
18. Lafuente MJ, Casterad X, Trias M, Ascaso C, et al. NAD(P)H:quinone oxidoreductase-dependent risk for colorectal cancer and its association with the presence of K-ras mutations in tumors. *Carcinogenesis*. 2000;21:1813-9.
19. Šarmanová J, Šušová S, Gut I, Mrhalová M, et al. Breast cancer: role of polymorphisms in biotransformation enzymes. *Eur J Hum Genet*. 2004;12:848-54.
20. Menzel H-J, Sarmanova J, Soucek P, Berberich R, et al. Association of NQO1 polymorphism with spontaneous breast cancer in two independent populations. *Br J Cancer* 2004;90:1989-94.
21. Hou L, Chatterjee N, Huang WY, Baccarelli A, et al. CYP1A1 Val462 and NQO1 Ser187 polymorphisms, cigarette use, and risk for colorectal adenoma. *Carcinogenesis*. 2005;26:1122-8.
22. Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, et al. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300:271-6.
23. Ates NA, Tamer L, Ates C, Ercan B, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet*. 2005;43:149-63.
24. Yeh CC, Hsieh LL, Tang R, Chang-Chieh CR, et al. Vegetable/fruit, smoking, glutathione S-transferase polymorphisms and risk for colorectal cancer in Taiwan. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1473-80.
25. Board PG, Webb GC, Coggan M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome band 11q13 and 12q13-14. *Ann Hum Genet* 1989;53: 205-13.
26. Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bendorowicz-Pikula J, et al. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 1994;224:893-9.
27. Stoechlmaier J, Park DJ, Zhang W, Yang D, et al. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:344-54.
28. Sugimura H, Caporaso NE, Shaw GL, Modali RV, et al. Human debrisoquine hydroxylase gene polymorphisms in cancer patients and controls. *Carcinogenesis* 1990;11:1527-30.
29. Šarmanová J, Týnková L, Šušová S, Gut I, Souček P. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes: allele frequencies in the population of the Czech Republic. *Pharmacogenetics* 2000;10:781-8.
30. Breslow NE, Day NE. In: *Statistical methods in cancer research*, Vol.1, Lyon, France, IARC, 362-71, 1980.
31. Rylander-Rudqvist T, Wedren S, Jonassdottir G, Ahlberg S, et al. Cytochrome P450 1B1 gene polymorphisms and postmenopausal endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:1515-20.
32. Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, et al. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res*. 1998;58:5291-3.
33. Sanyal S, Festa F, Sakano S, Zhang Z, et al. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis*. 2004;25:729-34.
34. Sarbia M, Bitzer M, Siegel D, Ross D, et al. Association between NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) inactivating C609T polymorphism and adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer*. 2003;107:381-6.
35. Gawrońska-Szklarz B, Lubiński J, Kładny J, Kurzawski G, et al. Polymorphism of GSTM1 gene in patients with colorectal cancer and colonic polyps. *Exp Toxicol Pathol* 1999;51:321-5.
36. Šalagovič J, Kalina I, Štubňa J, Habalová V, et al. Genetic polymorphism of glutathione S-transferases M1 and T1 as a risk factor in lung and bladder cancers. *Neoplasma* 1998;45:312-7.
37. Cortesiss V, Siegmund K, Chen Q, Zhou N, et al. A case-control study of microsomal epoxide hydrolase, smoking, meat consumption, glutathione S-transferase M3, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res*. 2001;61:2381-5.
38. Ulrich CM, Bigler J, Whitton JA, Bostick R, et al. Epoxide hydrolase Tyr113His polymorphism is associated with elevated risk of colorectal polyps in the presence of smoking and high meat intake. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10:875-82.
39. Kiss I, Nemeth A, Bogner B, Pajkos G, et al. Polymorphisms of glutathione-S-transferase and arylamine N-acetyltransferase enzymes and susceptibility to colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2004;24:3965-70.
40. van der Logt EM, Bergevoet SM, Roelofs HM, van Hooijdonk Z, et al. Genetic polymorphisms in UDP-glucuronosyltransferases and glutathione S-transferases and colorectal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2004;25:2407-15.
41. Siegel D, McGuinness SM, Winski SL, Ross D. Genotype-phenotype relationships in studies of a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase I. *Pharmacogenetics* 1999;9:113-121.
42. Joseph P, Jaiswal AK. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 reduces the mutagenicity of DNA caused by NADPH:P450 reductase-activated metabolites of benzo(a)pyrene quinones. *Br J Cancer* 1998;77:709-19.
43. Lin PH, Nakamura J, Yamaguchi S, Upton PB, et al. Oxidative damage and direct adducts in calf thymus DNA induced by the pentachlorophenol metabolites, tetrachlorohydroquinone and tetrachloro-1,4-benzoquinone. *Carcinogenesis* 2001;22:627-34.
44. Arif JM, Lehmler HJ, Robertson LW, Gupta RC. Interaction of benzoquinone- and hydroquinone-derivatives of lower chlorinated biphenyls with DNA and nucleotides in vitro. *Chem Biol Interact* 2003;142:307-16.
45. Saldivar SJ, Wang Y, Zhao H, Shao L, et al. An association between a NQO1 genetic polymorphism and risk of lung cancer. *Mutat Res*. 2005;582:71-8.
46. Loktionov A, Watson MA, Gunter M, Stebbings WS, et al. Glutathione-S-transferase gene polymorphisms in colorectal cancer patients: interaction between GSTM1 and GSTM3 allele variants as a risk-modulating factor. *Carcinogenesis*. 2001;22:1053-60.
47. Cote ML, Kardia SL, Wenzlaff AS, Land SJ, et al. Combinations of glutathione S-transferase genotypes and risk of early-onset lung cancer in Caucasians and African Americans: a population-based study. *Carcinogenesis*. 2005;26:811-9.
48. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ, et al. GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms, environmental tobacco smoke exposure and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis*. 2005;26:395-401.

informace

Srdečně Vás zveme na
přednášku/workshop

Psychické aspekty onkologických onemocnění 18. – 19. 11. 2005, Praha

pod vedením vynikajícího německého odborníka v oblasti psychoonkologie
profesora **Volkera Tschuschke**.

Témata:

- psychoonkologie – aktuální otázky oboru a jeho rostoucí význam
- vliv psychosociálních faktorů na vznik a průběh nádorových onemocnění
- vhodné metody psychosociální intervence u nádorových onemocnění
- psychické aspekty práce s onkologicky nemocnými a jejich rodinami
- kazuistiky, diskuze

Workshop je určen pro lékaře, sestry, psychology a další odborníky, kteří pracují s onkologicky nemocnými, a pro studenty.

Centrum dohody, V Hůrkách 1292/8, 158 00 Praha 5
office@centrumdohody.com
www.centrumdohody.com

CHYBÍ ONKOPREVENTIVNÍ PROGRAM PO ORGÁNOVÝCH TRANSPLANTACÍCH LACK OF AN ONCO-PREVENTION PROGRAM AFTER ORGAN TRANSPLANTATIONS

ŽALOUĐÍK J.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV A UNIVERZITNÍ ONKOLOGICKÉ CENTRUM BRNO

Pacientů dlouhodobě sledovaných po úspěšné orgánové transplantaci přibývá ve světě i v České republice. Je známo, že k nemalému riziku vzniku zhoubného nádoru zvyšujícím se také v běžné populaci s věkem přistupuje u transplantovaných ještě další významné navýšení rizika z důvodu imunosuprese, virových infekcí a indukovaných hyperproliferací, které dramaticky narůstá již od pátého roku po transplantaci (1). Nedávno u nás na zvýšené riziko zhoubných nádorů po orgánových trasplantacích upozornil také Gurlich (2).

Bylo by zapotřebí provést analýzu průnikem údajů Národního onkologického registru, vedeného od roku 1977, a registru transplantovaných a zjistit skutečné navýšení onkologického rizika po orgánových transplantacích v našich podmínkách jak co do typů nádorů, tak co do časového rozložení. Takovéto analýzy průnikem dvou databází provádějí systematicky třeba Israel Penn International Transplant Tumor Registry a databáze SEER Národního ústavu pro rakovinu (NCI) v USA. Kromě údajů o míře rizika se tak zjišťují i rozdíly v biologických vlastnostech nádorů vzniklých po transplantacích. Třeba kolorektální karcinomy transplantovaných vznikají v mladším věku a jsou agresivnější než v běžné populaci (3).

Podmínky pro analýzu databází ve spolupráci transplantologů a onkologů jsou v České republice velmi dobré a jistě srovnatelné s USA, pouze zatím nebyly dostatečně využity a nikdo se tohoto mezioborového problému zatím systematicky nechoopil. Nesporně na nás tak zatím čekají užitečné informace za dvě desetiletí, které by pomohly popsat rozsah problému a možnosti jeho současného i budoucího řešení v České republice.

Literární údaje slouží základní orientaci, ale vlastní data z České republiky nenahradí. Vždyť třeba taiwanská studie výskytu nádorů po transplantacích ledvin s vysokou prevalencí hepatocelulárního karcinomu a žádnými kožními nádory (4) ukazuje na zcela jinou skladbu posttransplantačních nádorů než podobná studie italská, kde dominují právě kožní nádory a lymfoproliferace (1).

Pro specifickou skupinu občanů se zvýšeným hereditárním rizikem vzniku nádoru na podkladě rodinné anamnézy či genetického testování již onkopreventivní program a onkogenetické poradenství máme. Pro transplantované zatím jednotná onkopreventivní strategie chybí, ačkoli jsou neméně ohroženou skupinou a prevalence transplantovaných již od osmdesátých let každoročně narůstá. Je vskutku o čem diskutovat, protože se zdá, že kromě systematické dispenzarizace jsou možné i různé specifické onkopreventivní strategie. Od pouhých doporučení vyhybat se neúměrné sluneční expozici (5), neboť rakovina kůže patří mezi časté posttransplantační malignity, přes cílená onkopreventivní vyšetření zaměřená na neméně časté posttransplantační lymfoproliferativní malignity, ultrazvuková orgánová vyšetření a preventivní endoskopie, až po úvahy o novější imunosupresi kombinované s onkopreventivním účinkem jakou nabízí třeba rapamycin (1).

Spolupráce transplantologů a onkologů s cílem zjistit skutečný rozsah problému zvýšeného onkologického rizika transplantovaných u nás průnikem registrů a dohodnout onkopreventivní strategii pro transplanované by byla určitě prospěšná.

Literatura

1. Sandrini S, Setti G, Bossini N, Maiorca P.: Cancer after kidney transplantation G Ital Nefrol. 2004 Jan-Feb;21 Suppl 26:S67-73.
2. Gurlich R, Novotný J, Stříž I et al.: Riziko vzniku malignity po orgánové transplantaci. Časopis lékařů českých, 2005, 144, 9, 597-600
3. Buell JF, Papaconstantinou HT, Skalow B, Hanaway MJ, Alloway RR, Woodlee ES. De novo colorectal cancer: five-year survival is markedly lower in transplant recipients compared with the general population. Transplant Proc. 2005 Mar;37(2):960-1.
4. Chiang YJ, Chen CH, Wu CT, Chu SH, Chen Y, Liu KL, Chen SW, Chuang CK. De novo cancer occurrence after renal transplantation: a medical center experience in Taiwan. Transplant Proc. 2004 Sep;36(7):2150-1.
5. Donovan JC, Rosen CF, Shaw JC.: Evaluation of sun-protective practices of organ transplant recipients. Am J Transplant. 2004 Nov;4(11):1852-8.

Klinický audit kvality IAEA radioterapie v MOÚ

Clinical audit of IAEA in the Department Radiation Oncology of MMCI

ŠLAMPA P.

Radiační onkologie

Masarykova onkologického ústavu Brno

Ve dnech 12.-16. 9. 2005 proběhl v Masarykově onkologickém ústavě na oddělení radiační onkologie klinický audit Mezinárodní atomové agentury (IAEA). Cílem auditu bylo zmapování a hodnocení kvality všech složek provádějící nejen radioterapii, ale i zhodnocení komplexní péče o pacienty, dále úrovně vzdělání personálu a vědeckovýzkumných aktivit. Auditní tým pracoval ve složení I. Kunkler (radioterapeut, Edinburg), H. Nystrom (radiofyzik, Kodaň) a p. Coffey (hl. radiologická asistentka, Dublin).

Auditoři první dva dny pouze mapovali situaci v ústavu a na oddělení radiační onkologie, poté audit spočíval v cílených dotazech na pracovníky radiační onkologie, radiologické fyziky, náměstky ředitele pro výzkum a ošetrovatelství, vedoucího registru a nemocničního informačního systému, vedoucího oddělení klinických studií, ale také na přítomné studentky SZŠ a hospitalizované pacienty. Hodnocení počtu ozařovaných pacientů a ošetřujícího personálu ponechali až na „domácí“ zpracování (veškeré údaje, u personálu i s úrovní vzdělání a dobou praxe, si auditoři písemně vyžádali). Dále bylo nutné předložit m.j. seznam odborných publikací za posledních pět let, program vzdělání lékařů, asistentů i radiofyziků.

Auditoři byli přítomni v MOÚ vždy celý den, účastnili se vizit, které řešily izodózní plány, simulační snímky, a vizit na lůžkovém oddělení (běžné i vizity s primářem). Navštívili jednání i dvou multidisciplinárních komisí (pro nádory CNS a pro gynekologické nádory). Náhodně si vybrali k zhodnocení provedené léčby dokumentaci sedmi pacientů. V jejich dokumentaci kontrolovali úplnost stagingu, způsob odesílání k léčbě, úroveň konzilií, léčebných rozvah a příjmových vyšetření. Podle léčebných doporučení ORO MOÚ kontrolovali definice cílových objemů, aplikaci celkové dávky a její dodržení podle standardů i při změně. U pacienta s karcinomem jícnu hodnotili na simulačním snímku měřením doporučený bezpečnostní lem od hranic nádoru k okraji ozařovaného pole. U pacientů s karcinomem prostaty kontrolovali dosažené dávky na kritických orgánech - zda také odpovídají doporučeným postupům ORO. U dvou v daném týdnu léčených (resp. plánovaných) pacientek s karcinomem prsu hodnotili polohu a techniku radioterapie, izodózní plán, práci asistentů a lékařů na simulátoru a na ozařovně.

V pohovorech ze zaměstnanci (lékaři, radiofyzici, radiol. asistenti) se důvěrně tázali na úroveň vzdělání, možnosti účasti na domácích a zahraničních výukových programech, na výzkumné aktivity, kontinuální zvyšování kvality, na případná kázeňská opatření při porušení vnitřního organizačního řádu, na radiační bezpečnost atd.

Poslední den provedli závěrečný pohovor s ředitelem ústavu, vedoucím lékařem odd. radiační onkologie a poté se všemi zaměstnanci odd. radiační onkologie a odd. radiologické fyziky bez přítomnosti pracovníků jiných oddělení či vedení ústavu.

V úvodu pohovoru členi auditního týmu potvrdili zaslání definitivního posudku do tří týdnů, budou ještě kontrolovat údaje v předem zasláném dotazníku do sídla IAEA se zjištěnou skutečností (především počty pacientů, personálu, přístrojů atd.) Dále akceptovali možnost ještě změny závěrů na základě diskuse na závěrečném sezení se zaměstnanci ORO a ORF.

Z kladných hodnocení: Příkladné zaujetí k pracovním činnostem, entuziasmus pracovníků, výborná organizace a systém práce, neobvykle rychlý proces od zahájení plánování radioterapie k jejímu provedení, dobrá spolupráce mezi pracovníky ORO a ORF, dostatek multidisciplinárních týmů a počet odborných oddělení v MOÚ, orientace práce na pacienta, výborná úroveň informovaných poučení a souhlasů, edukační centrum pod vedením zkušené sestry, vysoká úroveň prevence nosokomiálních nákaz na lůžkovém odd. ORO a zabezpečení ochrany pacientů a personálu, výborně prováděná a vedená dokumentace při pravidelných testech kvality funkce ozařovacích přístrojů, výborná organizace práce na ozařovnách, motivace pracovníků ORO při tvorbě léčebných protokolů. Pozitivně byl hodnocen vývoj edukačního výcviku, kladně hodnocena infrastruktura klinických studií (odd. klinických studií), vysoká úroveň radiodiagnostiky a laboratoří. Kladem jsou i plány na rozšíření oddělení a snadný přístup pracovníků k počítačům.

Z negativních hodnocení: Léčebný protokol pro karcinom prsu neodpovídá současným mezinárodně uznávaným protokolům v otázce indikace ozařování axily, není statisticky vyhodnocována míra chronických komplikací po radioterapii, nevhodná poloha pacientky při ozařování u karcinomu prsu. Auditoři shledali příklady nedodržování léčebných protokolů (např. snížení celkově aplikované dávky o 2 Gy bez vysvětlení v dokumentaci), nedostatečně definovaný rozdíl v dávkách a velikostí cílového objemu u karcinomu jícnu pro kurativní a paliativní radioterapii. Omezené důkazy výzkumných aktivit (chybí zapojení do mezinárodních randomizovaných studií - EORTC).

Z doporučení komise: Všechny léčebné protokoly ověřit a upravit podle mezinárodních protokolů. Zvýšit aktivitu na poli postgraduálního vzdělávání - účast na tuzemských a zahraničních kursech, kongresech a sympóziích. Upravit léčebný protokol pro ozařování axily u karcinomu prsu - ihned. Přehodnotit techniku a polohu pacientek při ozařování u karcinomu prsu. V léčebných protokolech více rozlišit objemy, dávky a frakcionaci u kurativní a paliativní radioterapie. Podpořit další vzdělávání v zahraničí. Více se podílet na randomizovaných českých a zahraničních studiích. Založit léčebné týmy i na odd. radiační onkologie (s pracovníky ORF) pro jednotlivé diagnózy (nejen v rámci ústavu).

ZÁPIS Z JEDNÁNÍ VÝBORU ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI KONANÉHO DNE 20. 9. 2005 V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přítomni: Vorlíček, Abrahámová, Aschermannová, Fínek, Konopásek, Petera, Příbylová, Petruželka, Stáhalová, Žaloudík

Omluveni: Rob, Cwierka, Eckschlager, Jelínková, Stankušová, Vyzula

Hosté: Fischer

V budějovické nemocnici přivítal členy výboru prim. MUDr. Fischer, přednosta onkologického oddělení.

1. Prezentace doc. Duška kompletizaci SVOD (software pro vizualizaci onkologických dat) s předáním manuálu k webovému portálu a uživatelské příručky k sw SVOD. Nabídkou webového portálu lze trvale zpřístupnit veškeré epidemiologické údaje NOR 1977-2002 a v dalších letech již průběžně, pro všechny onkologické diagnózy. Toto softwarové zřehlednění více než 1,2 milionu případů anonymizovaných onkologických záznamů za více než čtvrtstoletí je významným úspěchem české onkologie a informatiky, které snese nejnáročnější mezinárodní srovnání. Po delší diskusi o způsobech využívání SVOD došel výbor ČOS hlasováním k těmto závěrům:

- výbor ČOS přebírá garanci nad dalším vývojem SVOD a jeho využíváním v ČR a zahraničí

- výbor souhlasí s ustavením Rady garantů SVOD (ČOS, SROBF, ČHS, Rady NOR, UZIS, ČSU, MZ CR, CaK SZU, aj.), do příštího jednání bude připraven jmenový seznam Rady

- výbor ČOS schválil veřejné zpřístupnění epidemiologických dat NOR ve SVOD na webovém portálu www.cba.muni.cz/svod

- klinická data NOR bez identifikace zdravotnického zařízení budou dostupná pouze v lokální (CD) databázi a jejich distribuce lékařům bude předmětem dalšího vývoje podle poptávky, perspektiva je v převedení na krytou webovou zónu

- data s identifikací daného zdravotnického zařízení budou formou kryté zóny přístupná na certifikovanou žádost ředitele tohoto zařízení, který je může srovnávat pouze s průměry krajů a ČR

2. Prof. Žaloudík prezentoval z nového SVOD trendy incidence a mortality v relativních hodnotách evropského standardu s věkovou korekcí pro 16 nejčastějších onkologických diagnóz. Souhrnně lze konstatovat, že od poloviny devadesátých let riziko úmrtí na žádnou z těchto diagnóz nestoupá, buď zůstává stacionární nebo klesá. Upozornil, že v odborných i mediálních prezentacích je nutno přísně odlišovat trendy absolutních hodnot, v nichž se projevuje i stárnutí populace, od relativních hodnot udávajících riziko vzniku nádoru nebo úmrtí na nádor především v produktivním věku. Článek na toto téma jako kolektivní dílo MOŮ, ČOS, Rady NOR a CBA MU bude publikován v Medical Tribune a v Klinické onkologii, aby se předešlo desinterpretacím onkologických trendů zejména v kontextu srovnávání v rámci EU.

3. Inventurou stavu financování časopisu Klinická onkologie bylo zjištěno, že ČOS dosud nepřispěla k chodu časopisu. Slovenská strana přispívá formou grantu BMS. Výbor rozhodl o spolufinancování časopisu částkou 60 tis. Kč ročně, což je příspěvek zhruba 100 Kč na jednoho člena ročně. Dále výbor rozhodl dát časopisu na ediční činnost jednorázově 60 tis. Kč. Časopis prosperuje a příspěvek ČOS, kterou časopis reprezentuje, přispěje k jeho dalšímu rozvoji.

4. Prostředky sbírky Běhu T. Foxe budou na přání pořadatele sbírky letos věnovány na přístroje pro onkologický výzkum a představa výboru je taková, že by se účel sbírky střídal. V dalším roce by peníze šly opět podle konceptu RASO na financování onkologických studií a analýz dat na onkologických pracovištích.

5. Výbor ČOS rozhodl pokračovat dále v budování onkosítě ČR. V nejbližší době budou k dispozici jednoduché dotazníky, na jejichž základě se mohou pracoviště hlásit jako Komplexní onkologické skupiny nebo centra. Ta pak budou mít za úkol pojmenovat strukturu sítě ve

své oblasti či okruhu své působnosti. KOS či KOC musejí naplňovat již schválená kritéria vybavenosti a komplexnosti onkologické péče. Budou však rovněž zodpovídat za strukturovanou péči ve svém okruhu, regionu či kraji. Předpokládáme přihlášky do měsíce po zveřejnění.

6. Dr. Aschermannová prostuduje a podá pro výbor ČOS do 14 dnů návrh připomínek k novele důchodového pojištění, jak je po ČOS požadováno.

7. Doc. Abrahámová seznámila členy s inovovanou formou hlášenky zhoubných novotvarů i změněným režimem jejího odesílání. Je zapotřebí zajistit kontrolu platbou z VZP, protože neexistují jiné vymáhací nástroje odesílání hlášení v potřebném termínu i kvalitě. Výbor ČOS odsouhlasil inovovanou verzi hlášenky. Všechny identifikační údaje včetně adresy jsou součástí hlášenky po dobu její existence ve zdrav. zařízení jako součást zdrav. Dokumentace. Pro ÚZIS je hlášenka zbavena identifikačních znaků dle platného zákonného ustanovení.

8. Prof. Starý informuje o přednášce prof. Altera z NCI Rockville, USA na téma „Cancer-prone rare genetic syndromes - how do they instruct us?“, která se koná 5.10.2005 v 11 hodin ve FN Motol.

9. Výbor přebírá záštitu nad onkologickými odbornými konferencemi JOD Český Krumlov 12.-14.10.2006, Symposiem onkogynekologie Brno, 6.-7.1.2006, Staškovy dny Praha 31.3.-1.4.2006 a BOD Brno 11.-13.5.2006

10. Firma Novartis hodlá uspořádat kurzy angličtiny pro lékaře s rodilými mluvčími, výbor tuto aktivitu vítá a souhlasí.

11. Výbor ČOS ocenil odeslání dopisu předsedy ČOS předsedovi Senátu ČR o boji proti kouření – členové text dostali na vědomí emailem. (Viz. příloha zápisu na str. 187)

12. Pro ustavení nových sekcí ČOS Sekce psychoonkologie a Sekce uroonkologie byli jmenováni garanti Mgr. Kalvodová, doc. Abrahámová, kteří připraví zřízení sekcí i volby do jejich výborů.

13. Výbor ČOS schválil přijetí nových členů: Lavryšinová (Nový Jičín), Vlášek (Praha), Kozel (Ostrava), Švandová (Praha), Roman Svoboda (Pliva), Hrstka (Brno).

14. Dr. Stáhalová upozornila, že podmínky pro přístup pacientů k onkologické léčbě jsou na různých pracovištích různé, což lze doložit řadou příkladů. Jde o rozdíly v ekvité a rozpory mezi medicínskými indikacemi a následně dostupností financování. Tento rozdíl v přístupu k onkologické léčbě je způsoben především rozdílným přístupem zdravotních pojišťoven k hrazení léčby. Výbor dospěl k názoru, že na toto téma je možné i potřebné zahájit širší diskusi v odborném tisku nebo na relevantních fórech. Možnosti řešení přímo na výboru ČOS jsou omezené.

15. Byla projednávána nová pravidla pro podávání erytropeotinu, vzhledem k tomu, že nebyl přítomen doc. Vyzula, který má k dispozici další relevantní materiály, bude konečné znění doporučení uveřejněno později a rozesláno členům emailem. Doporučení bude uveřejněno i v Klinické onkologii.

16. Prof. Vorlíček zaslal řediteli České pošty a Ministerstvu informatiky žádost o vydávání poštovních známek s onkologickou, hlavně preventivní, problematikou. Odpověď Ing. Jiřího Řeholy, ředitele odboru poštovních služeb Ministerstva informatiky najdete v příloze.

Členové výboru ČOS po jednání diskutovali s ředitelem budějovické nemocnice dr. Novákem o aktuální problematice financování onkologické péče a zodpověděli jeho cílené dotazy.

Příští výbor ČOS bude v úterý 11. října 2005 ve Zlíně.

Sledujte www.linkos.cz – denně nové informace nejen o onkologii.