

# KLINICKÁ ONKOLOGIE

Z obsahu:

Leptin –2548 G/A Polymorphism in Endometrial Cancer

Proteomická analýza nádorových buněk

Chronická gastrointestinální toxicita po zevní radioterapii karcinomu prostaty



# Kontrola onemocnění – otevření nových možností



## SUTENT® v 1. a 2. linii metastatického renálního karcinomu (mRCC)<sup>2,3,4</sup>

**STANDARD v 1. linii<sup>1,5</sup>**



### Zkrácená informace o přípravku

#### SUTENT 12,5 mg, 25 mg, 50 mg tvrdé tobolky

**Léčivá látka:** Sunitinibi malas odpovídající 12,5 mg, 25 mg nebo 50 mg sunitinibum v jedné tobolce. **Indikace:**

Neresekovatelný a/nebo metastatický maligní gastrointestinální stromální tumor po selhání léčby imatinib-mesylátem

v důsledku rezistence nebo intolerance, pokročilý a/nebo metastatický adenokarcinom ledviny. **Dávkování a způsob podávání:**

Doporučená dávka je 50 mg denně perorálně po dobu 4 po sobě následujících týdnů, následuje 2týdenní pauza (režim 4/2). Na základě

individuální bezpečnosti a snášenlivosti možnost úpravy dávky v příštích po 12,5 mg. Denní dávka by neměla překročit 75 mg ani by neměla klesnout pod 25 mg.

**Kontraindikace:** Hypersenzitivita na sunitinib-malát nebo na kteroukoli pomocnou látku.

**Zvláštní upozornění:** Současné podávání se silnými induktory CYP3A4 může snížit koncentrace sunitinibu v plazmě, současné podávání se silným inhibitorem CYP3A4 může zvýšit koncentrace sunitinibu v plazmě a kombinaci s nimi je třeba se vyhnout. Změna barvy kůže je častým

nežádoucím účinkem přibližně u 30 % pacientů. Pacienti by měli být upozorněni na to, že během léčby přípravkem SUTENT může dojít k reverzibilní depigmentaci kůže/vlasů. Hypertenze byla zaznamenána cca u 16 %

pacientů se solidními tumory. U pacientů by měl být prováděn screening hypertenze a v případě potřeby její léčba. Dále

by se mělo provádět vyšetření úplného krevního obrazu na začátku každého léčebného cyklu. Snížení ejekční frakce levé komory o 20 % a pod dolní hranici normálních hodnot se objevilo cca u 2 % pacientů s GIST a u 4 % pacientů s mRCC. Tyto poklesy LVEF se ukázaly jako neprogresivní a často se při pokračující léčbě zlepšily. Pečlivě sledování klinických známek a příznaků městnavého srdečního selhání (CHF) je nutné provádět zejména u pacientů s kardiálními rizikovými faktory a/nebo

s onemocněním koronárních arterií v anamnéze. Pokud jsou přítomny příznaky pankreatitidy nebo jaterního selhání, pacient musí užívání přípravku SUTENT přerušit a musí mu být poskytnuta náležitá podpora léčba. **Interakce:** S látkami ze skupiny silných inhibitorů CYP3A4 a ze skupiny silných induktorů CYP3A4 – viz Zvláštní upozornění. U pacientů užívajících současně

antikoagulační by se měl pravidelně sledovat celkový krevní obraz, koagulační faktory a tělesný stav. **Těhotenství a kojení:** U těhotných žen nebyly provedeny žádné studie. Není známo, zda je sunitinib nebo jeho primární aktivní metabolit vylučován do lidského mateřského mléka. **Účinky na schopnost řídit a obsluhovat stroje:** Pacienti by měli být upozorněni, že během léčby se mohou vyskytnout závratě. **Nežádoucí účinky:** Případy krvácení, některé s fatálním průběhem, zahrnovaly gastrointestinální, dýchací a močový trakt, krvácení do tumoru a mozkové krvácení. Případy kardiovaskulárních účinků, některé s fatálním průběhem, zahrnovaly snížení ejekční frakce levé komory a srdeční selhání. Jiné fatální účinky zahrnovaly multisystémové

organové selhání, diseminovanou intravaskulární koagulaci, peritoneální krvácení, rhabdomyolýzu, cerebrovaskulární příhody, dehydrataci, adrenální insuficienci, renální selhání, respirační selhání, pleurální efuze, pneumotorax, šok a náhlé úmrtí. Nej důležitější závažnými nežádoucími účinky vztahujícími se k léčbě pacientů se solidními nádory byly plicní embolie, trombotyopenie, krvácení do tumoru, febrilní neutropenie a hypertenze. Mezi nejčastější nežádoucí účinky všech stupňů závažnosti související s léčbou patří únava; gastrointestinální poruchy, jako jsou průjem, nauzea, stomatitida, dyspepsie, abdo-

bolest, flatulence, zvracení, zácpa, glosodynie, sucho v ústech, bolest v ústech; změna barvy kůže; anémie, neutropenie, hypotyreóza; bolest hlavy, dysgeúzie a anorexie; zedloutnutí kůže, palmo-plantární erytrodyséstezie; změny barvy vlasů, vyrážka; bolest končetin; pokles hmotnosti; zánět sliznice; otok; suchá pokožka, alopecie; epistaxe. **Předávkování:** Nebyl hlášen žádný případ akutního předávkování. **Uchovávání:** Přípravek nevyžaduje žádné zvláštní podmínky uchovávání. **Balení:** 30 tobolek v HDPE lahvičce. **Jméno a adresa držitele rozhodnutí o registraci:** Pfizer Ltd, Ramsgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NJ, Velká Británie. **Registrační číslo:** EMEA/1/06/347/001-006. **Datum poslední revize textu:** 22.8.2008. Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis. Před předepsáním se, prosím, seznáme s úplnou informací o přípravku. Přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění.

**LITERATURA:** 1) Ljungberg B et al. European Association of Urology Guidelines. 2007 edition. 2) Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. JAMA. 2006 Jun 7; 295(21): 2516-24. 3) Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2006 Jan 1; 24(1): 16-24. 4) Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. N Engl J Med. 2007 Jan 11; 356(2): 115-24. 5) Figlin RA, Hutson TE et al. Overall survival with sunitinib versus interferon-alfa as first-line treatment of metastatic renal cell cancer (mRCC). ASCO 2008, Oral 5024.

**Souhrnné údaje o přípravku jsou k dispozici na adrese:**

Pfizer, spol. s r.o., Stroupežnického 17, 150 00 Praha 5

tel.: 283 004 111; fax: 251 610 270, www.pfizer.cz

SUT-2009.01.05



# Obsah | Contents

## PŘEHLEDY | REVIEWS

- Neuroendokrinní nádory rekta** 195  
Rectal Neuroendocrine Tumours  
Louthan O.
- DNA a mikroRNA čipové technologie v diagnostice a predikci u pacientů s renálním karcinomem** 202  
DNA and MicroRNA Microarray Technologies in Diagnostics and Prediction for Patients with Renal Cell Carcinoma  
Slabý O., Svoboda M., Michálek J., Vyzula R.
- Proteomická analýza nádorových buněk** 210  
Proteomic Analysis of Cancer Cells  
Tomancová A., Šedo O., Zdráhal Z., Mayer J., Pospíšilová Š.

## PŮVODNÍ PRÁCE | ORIGINAL ARTICLES

- Studie evaporace vybraných cytostatik a propustnosti ochranných rukavic v rámci výzkumu profesní zátěže zdravotnických pracovníků exponovaných cytotoxickým protinádorovým léčivům (projekt CYTO)** 218  
Evaporation of Selected Cytotoxic Drugs and Permeation of Protective Gloves – Research into the Occupational Risks of Health Care Personnel Handling Hazardous Cytotoxic Drugs (CYTO Project)  
Doležalová L., Odrážka P., Gorná L., Prudilová M., Vejpustková R., Bláha L.
- Leptin –2548 G/A Polymorphism in Endometrial Cancer** 223  
Polymorfismus –2548 G/A v genu pro leptin u pacientek s endometriálním karcinomem  
Chovanec J., Bienertová-Vašků J. A., Dostálová Z.
- Profily nízkomolekulárního proteomového spektra získané pomocí hmotnostní spektrometrie SELDI-TOF v sérech pacientů s diseminovaným maligním melanomem: pilotní studie** 228  
Profiles of Low-Molecular Proteome Spectrum Obtained through SELDI-TOF Mass Spectrometry in the Sera of Patients with Metastatic Malignant Melanoma: Pilot Study  
Lakomý R., Greplová K., Pílný R., Budinská E., Valík D., Poprach A., Němeček R., Vyzula R.
- Chronická gastrointestinální toxicita po zevní radioterapii karcinomu prostaty** 233  
Chronic Gastrointestinal Toxicity after External-Beam Radiation Therapy for Prostate Cancer  
Šefrová J., Paluska P., Odrážka K., Jirkovský V.

## AKTUALITY V ONKOLOGII | ONCOLOGY HIGHLIGHTS

- Úvaha nad vývojem screeningu kolorektálního karcinomu** 242  
Reflection about the Colorectal Carcinoma Screening Evolution  
Šachlová M., Novák J.
- Pohled na vývoj onkologie ve 3. tisíciletí** 243  
View of the Development of Oncology in the 3rd Millennium  
Petruželka L.

## INFORMACE Z ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI | SOCIETY NEWS

- Zápis ze schůze výboru České onkologické společnosti dne 8. 9. 2009 v Liberci** 247



# Herceptin<sup>®</sup> je základem péče pro ženy s HER2 pozitivním časným a metastatickým karcinomem prsu

## HERCEPTIN<sup>®</sup> 150 mg

### Základní informace o přípravku



- **Účinná látka:** trastuzumabum.
- **Držitel registračního rozhodnutí:** Roche Registration Ltd., Welwyn Garden City, Velká Británie.
- **Registrační číslo:** EU/1/00/145/001.
- **Indikace:** Léčba metastazujícího karcinomu prsu u pacientek, jejichž nádory ve zvýšené míře exprimují HER2 (human epidermal growth factor receptor 2): **a)** v monoterapii u pacientek, které byly pro své metastazující nádorové onemocnění již léčeny nejméně 2 chemoterapeutickými režimy; **b)** v kombinaci s paklitaxelem k léčbě pacientek, které nedostávaly předchozí chemoterapii k léčbě metastatického nádorového onemocnění a pro něž léčba antracyklinem není vhodná; **c)** v kombinaci s docetaxelem k léčbě pacientek, které nedostávaly předchozí chemoterapii k léčbě metastatického nádorového onemocnění; **d)** v kombinaci s inhibitorem aromatázy k léčbě postmenopauzálních pacientek s metastatickým karcinomem prsu s pozitivitou hormonálních receptorů, dosud neléčených trastuzumabem. Léčba pacientek s HER2 pozitivním časným karcinomem prsu po chirurgickém zákroku, chemoterapii (neoadjuvantní nebo adjuvantní) a radioterapii (pokud je to relevantní). Herceptin by měl být podáván pouze pacientkám s nádory se zvýšenou expresí HER2, nebo pacientkám, jejichž nádory vykazují amplifikaci genu HER2 pokud byla stanovena přesnou a ověřenou metodou.
- **Kontraindikace:** Pacientky se známou přecitlivělostí na trastuzumab, myší proteiny nebo na některou z pomocných látek. Pacientky, které z důvodu komplikací spojených s pokročilým onkologickým onemocněním trpí klidovou dušností nebo vyžadují podpůrnou kyslíkovou terapii.
- **Upozornění:** Užití samotného Herceptinu je spojeno s určitým rizikem kardiotoxicity, současné podávání přípravku v kombinaci s antracykliny toto riziko zvyšuje. U pacientek, kterým byly antracykliny podávány v minulosti, je riziko kardiotoxicity nižší než při současném podávání.
- **Klinicky významné interakce:** Studie lékových interakcí u lidí nebyly s Herceptinem prováděny.
- **Hlavní klinicky významné nežádoucí účinky** při léčbě Herceptinem v monoterapii nebo v kombinacích byly příznaky spojené s podáním infuzí (obvykle po první infuzi přípravku) - hlavně horečka a/nebo třesavka, méně často nauzea, zvracení, bolest, ztuhlost, bolest hlavy, kašel, závratě, vyrážka, astenie, dušnost; zřídka hypotenze, hypertenze, bronchospasmus, tachykardie, dechová tíseň, angioedém; alergické a hypersenzitivní reakce. Některé z těchto reakcí mohou být závažné. Dalšími čtenějšími nežádoucími účinky byly bolesti břicha, astenie, bolest na hrudi, třesavka, horečka, bolest hlavy, nespecifikovaná bolest; průjem, nauzea, zvracení; artralgie, myalgie, vyrážka, vypadávání vlasů. Byly zaznamenány izolované případy závažných plicních příhod, které v několika případech vedly k úmrtí pacienta. Tyto příhody mohou být součástí reakcí spojených s podáním infuze nebo k jejich výskytu může dojít později po podání přípravku. U pacientek léčených přípravkem Herceptin byly zaznamenány některé projevy srdeční toxicity jako snížení ejekční frakce a příznaky srdečního selhání, např. dušnost, ortopnoe, zvýšený kašel, plicní edém a třetí srdeční ozva.
- **Dávkování a způsob podání:** Léčba Herceptinem by měla být zahájena pouze lékařem, který má dostatečné zkušenosti s podáváním cytotoxické chemoterapie. Příslušné informace o dávkování a způsobu podání Herceptinu v monoterapii a v kombinacích viz platný Souhrn údajů o přípravku Herceptin.
- **Dostupná balení přípravku:** Herceptin 150 mg, prášek pro koncentrát pro přípravu infuzního roztoku v injekční lahvičce.
- **Podmínky uchování:** Při teplotě 2 °C až 8 °C. Po rekonstituci se sterilní vodou na injekce je rekonstituovaný roztok fyzikálně a chemicky stabilní po dobu 48 hodin při teplotě 2 °C až 8 °C.
- **Datum poslední revize textu:** 2.12.2008.



**Herceptin<sup>®</sup>**  
trastuzumab

Precision • Power • Promise



Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis. Léčivý přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Další informace o přípravku získáte z platného Souhrnu údajů o přípravku Herceptin nebo na adrese:

Roche, s.r.o., Dukelských hrdinů 52, 170 00 Praha 7, telefon 220 382 111.

Podrobné informace o tomto přípravku jsou uveřejněny na webových stránkách Evropské lékové agentury (EMA) [www.emea.europa.eu](http://www.emea.europa.eu)

# Neuroendokrinní nádory rekta

## Rectal Neuroendocrine Tumours

Louthan O.

IV. interní klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN, Praha

### Souhrn

Rektální neuroendokrinní tumory, dle starší nomenklatury zvané rektální karcinoidy, nevolávají karcinoidový syndrom. Kolonoskopie je zlatým standardem pro diagnostiku těchto tumorů. Endosonografie je významná metoda pro hodnocení hloubky růstu, CT kolonografie a <sup>111</sup>In-octreoscan pro staging nádoru. Minimálními požadavky pro biochemickou diagnostiku jsou sérový chromogranin A a kyselá fosfatáza. Pro malé tumory je postačující metodou lokální resekce, pro nádory > 2 cm je indikována přední resekce. Nebyl prokázán benefit adjuvantní léčby. Pacienti s rektálními karcinoidy < 2 cm mají velmi dobrou prognózu s dlouhodobým přežíváním.

### Klíčová slova

karcinoid – nádory rekta – chromogranin A – octreoscan – endosonografie – léčba

### Summary

Rectal neuroendocrine tumours (carcinoids) belong to the hindgut carcinoid group, according to older classification. They are not associated with carcinoid syndrome. Colonoscopy is a gold standard for detecting rectal carcinoids. Endosonography is important for assessing rectal carcinoid growth. CT colonography and <sup>111</sup>In-octreotide scanning is required for staging if residual or metastatic disease is suspected. Serum chromogranin A and acid phosphatase are necessary biochemical markers. Local resection is sufficient for small tumours, anterior resection for rectal tumours > 2 cm is appropriate. There is no evidence base for adjuvant therapy. Patients with rectal carcinoids < 2 cm have a very good prognosis with long-term survival.

### Key words

carcinoid – rectal cancer – chromogranin A – OctreoScan – endosonography – therapy

Článek byl vytvořen v rámci výzkumného zá-  
měru MŠMT 00216200808.

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem  
studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has no potential  
conflicts of interest concerning drugs, products,  
or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce  
splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do  
biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript  
met the ICMJE "uniform requirements" for  
biomedical papers.



**MUDr. Oldřich Louthan**

IV. interní klinika  
1. lékařské fakulty UK a VFN v Praze  
U nemocnice 2  
128 08 Praha 2  
e-mail: louthan@post.cz

Obdrženo/Submitted: 2. 4. 2008

Přijato/Accepted: 20. 8. 2009

## Úvod

Neuroendokrinní nádory (NET) rekta jsou podle starší terminologie Williamse a Sandlera z roku 1963 [1] řazeny k tzv. hindgut karcinoidům, což odkazuje na fakt, že část tlustého střeva distálně od středního úseku colon transversum až po rektum vznikla ze zadní části embryonálního střeva. Rektální karcinoidy jsou nejčastějšími hindgut karcinoidy a představují asi 1 % všech anorektálních neoplazií.

Podle dat SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) z let 1992–1999 tvoří rektální karcinoidy 27,44 % všech gastrointestinálních kar-

cinoidů, což představuje nárůst v porovnání se staršími údaji z let 1973–1991, kdy rektální karcinoidy tvořily 15,33 % gastrointestinálních karcinoidů [2–3]. Otázkou zůstává vliv omezených diagnostických možností ve starším období a dřívější malá povědomost o této entitě. Rektální karcinoidy se vyskytují u poměrně mladé populace, medián věku v době diagnózy činí 56,2 let. Postihují stejně často muže jako ženy. V porovnání s tím jsou NET proximální části tlustého střeva diagnostikovány ve vyšším věku, nejčastěji u mužů v sedmé dekádě, u žen jsou NET tlustého střeva diagnostikovány nejčastěji v páté dekádě [4]. Vět-

šinou bývají zjišťovány náhodně při rutinní sigmoidoskopii.

Endokrinně funkční nádory se v rektu a v proximální části tlustého střeva vyskytují velmi vzácně, neboť nádorové buňky neobsahují substance schopné vyvolat klinicky zjiřitelné endokrinní projevy ve smyslu karcinoidového syndromu (např. téměř neobsahují serotonin, typický pro NET tenkého střeva). Na rozdíl od tenkého střeva nebývají NET v tlustém střevě multifokální. Je však nutno uvažovat o adenokarcinomu tlustého střeva jako o nádorové duplicitě u osob z karcinomových rodin, zejména u jedinců starších 40 let.

Tab. 1. WHO klasifikace neuroendokrinních nádorů.

skupina 1	dobře diferencovaný NET (karcinoid)	benigní, nefunkční léze < 2 cm zasahující do mukózy, submukózy, bez angioinvasze neznámé chování: nefunkční tumor omezený na mukózu či submukózu
skupina 2	dobře diferencovaný neuroendokrinní karcinom – maligní karcinoid	low-grade malignita, invazivní či metastazující
skupina 3	málo diferencovaný neuroendokrinní karcinom – malobuněčný karcinom	high-grade malignita

Tab. 2. Návrh TNM klasifikace.

	Charakteristika
<b>T – primární tumor</b>	
TX	primární nádor nelze posoudit
T0	primární nádor není přítomen
T1	tumor prorůstá do mukózy či submukózy
T1a velikost < 1 cm	
T1b velikost < 1–2 cm	
T2	tumor prorůstá do muscularis propria nebo má velikost > 2 cm
T3	tumor prorůstá do subserózy/perikolické/perirektální tukové tkáně
T4	tumor přímo prorůstá do okolních orgánů/struktur a/nebo perforuje viscerální peritoneum pro jakékoliv T přidejte (m) pro mnohočetné tumory
<b>N – regionální lymfatické uzliny</b>	
NX	regionální lymfatické uzliny nelze posoudit
N0	nejsou přítomny metastázy v regionálních lymfatických uzlinách
N1	metastázy v regionálních lymfatických uzlinách
<b>M – vzdálené metastázy</b>	
MX	přítomnost vzdálených metastáz nelze posoudit
M0	nejsou přítomny vzdálené metastázy
M1	vzdálené metastázy

### Klinicko-patologický staging a WHO klasifikace

Základní rozdělení je shodné s jinými neuroendokrinními nádory (tab. 1).

Termín „benigní“ je některými patologi považován v souvislosti s karcinoidy za sporný, neboť MKN-O klasifikace uvádí pro pátou pozici morfoloického kódu s hodnotou „/1“ termín „nejisté, zda benigní, nebo maligní“.

### ENETS návrh TNM klasifikace

TNM klasifikace existuje v návrhu, diskutuje se o ní a byla prezentována na konferenci ENETS (European Neuroendocrine Tumor Society) v Paříži v březnu 2008 (tab. 2, 3).

### Biologické vlastnosti a prognóza

Prognóza karcinoidů rekta je relativně dobrá, neboť očekávané pětileté přežití dosahuje podle databáze SEER díky biologickým vlastnostem, dřívějšímu nástupu symptomů a včasné diagnóze v průměru 80%. V době diagnózy je 75 až 85% karcinoidů rekta lokalizovaných. Vzdálené metastázy se vyskytují v 1,7 až 8,1% případů. Při lokalizované formě je pětileté přežití 84–90,8%. Při postižení regionálních uzlin však pětileté přežití klesá na 36,3–48,9% a na 20,6–32,3% u metastazujících forem, které jsou ovšem vzácné. S tím kontrastuje pro-

Tab. 3. Staging neuroendokrinních tumorů rekta.

Stadium	T	N	M
stadium IA	T1a	N0	M0
stadium IB	T1b	N0	M0
stadium IIA	T2	N0	M0
stadium IIB	T3	N0	M0
stadium IIIA	T4	N0	M0
stadium IIIB	jakékoliv T	N1	M0
stadium IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

gnóza karcinoidů proximální části tlustého střeva, tedy céka, colon ascendens a proximální části colon transversum, která je naopak poměrně nepříznivá, neboť pětileté přežití NET v proximální lokalizaci tlustého střeva se pohybuje mezi 40 a 70%. Pro srovnání celkové pětileté přežití u všech gastrointestinálních karcinoidů činí asi 67% (tab. 4).

Hlavními faktory ovlivňujícími prognózu NET rekta je velikost tumoru a histologický nález. Rektální tumory < 1 cm metastazují jen výjimečně, tumory velké 1–2 cm mají riziko metastazování do lymfatických uzlin asi v 5%. Faktory zvyšující riziko metastazování jsou velikost nádoru > 2 cm, špatná diferenciace, invaze do muscularis mucosae, angioinvaze, perineurální invaze, invaze do lymfatického systému, angiogeneze, přítomnost bu-

něčných atypií, vyšší mitotický a proliferační index podle Ki-67 a staging nádoru. Tumory mají tendenci metastazovat do regionálních lymfatických uzlin, do jater a vzácně do skeletu.

### Patologie a genetika

V rámci dobře diferencovaných NET tlustého střeva a rekta existují dva typy [9]: tumory obsahující EC buňky a tumory obsahující L buňky.

NET v *proximální části tlustého střeva* jsou většinou tvořeny EC buňkami. Rektální NET jsou naproti tomu tvořeny především L buňkami, obsahujícími peptidy blízké glicentinu, glukagonu a peptidu PYY a jejich prekurzory, serotonin je přítomný vzácně. Další peptidy, jako synaptofyzin a chromogranin A, jsou vyšetřovány rutinně imunohistochemicky.

Tab. 4. Patologické a biochemické charakteristiky.

	Parametry
histopatologie	malé až středně velké buňky s NE diferenciací, shluky buněk, nekrózy stužkovité uspořádání buněk spíše než acinární charakter uspořádání vzácně buňky secernující mucin (goblet cell carcinoid)
velikost	< 1 cm: 3–4% nádorů metastazuje 1–2 cm: 10–15% nádorů této velikosti metastazuje > 2 cm: v 60–80% metastazuje
imunohistochemie	CgA exprimuje > 70% tumorů neuronspecifická enoláza (NSE) > 50% tumorů prostatická specifická kyselá fosfatáza 80–100% tumorů serotonin, somatostatin, synaptofyzin: příležitostně pozitivní Ki-67: marker proliferace
biochemické markery	S-CgA: nejsenzitivnější screeningový test 5-hydroxyindoloctová kyselina ve 24hodinovém sběru moči serotonin v séru, v trombocytech, substance P, glukagon – často negativní negativní markery: CA19-9, CEA, AFP (alfa1-fetoprotein)

Rektální karcinoidy vyrůstají z hlouběji uložených částí slizničních žlázek. Mají vzhled hladkých, okrouhlých submukózních uzlů anebo fokálních ložisek ztluštění submukózy normální či žlutavé barvy. Jsou velké od několika milimetrů do několika centimetrů. Nacházejí se ve vzdálenosti 4–20 cm od linea dentata na přední či laterální stěně rektu.

Histologie: Dobře diferencované neuroendokrinní tumory (**WHO skupina 1**) [5] tvoří uniformní buňky s malým počtem mitóz, uspořádané jako podslizniční shluky nebo pruhy s omezenou invazí do lymfatických uzlin, bez produkce mucinu, bez angioinvasze, perineurální invaze či prorůstání za muscularis propria [6]. Mitotický index Ki67 je nízký, nepřesahuje 2% [7–8].

Podobný obraz je u dobře diferencovaných neuroendokrinních karcinomů (**WHO skupina 2**), jež však mají vyšší mitotický index, vykazují invazi do lymfatického systému, angioinvasi a hlubší invazi do střešní stěny. Tento typ nádoru tvoří trabekulární buněčné formace. V porovnání s tím nádorové buňky u dobře diferencovaných neuroendokrinních tumorů *proximální části tlustého střeva* tvoří solidní formace.

Málo diferencované malobuněčné neuroendokrinní karcinomy (**WHO skupina 3**) mají solidní strukturu s centrálními nekrotizacemi, buněčnou atypii, vysoký mitotický a proliferační index Ki67 (vyšší než 10%, ale neřídka i nad 50%), vykazují invazi do střešní stěny, lymfatických uzlin, angioinvasi [6] a perineurální invazi. Bývá prokazován mucin, enteroglukagon a hormony příbuzné pankreatickému polypeptidu, ale nikoli serotonin. Buňky mohou vykazovat pozitivitu barvení na neuron-specifickou enolázu nebo PGP 9.5. Dále bývá typicky přítomen synaptofyzin v malých vesikulích a chromogranin A v sekrečních granulech. U málo diferencovaných NET je též vhodný marker p53. V 80–100% NET rektu je exprimována prostatická specifická kyselá fosfatáza, lze jí užít jako onkomarker. Specializované laboratoře mohou stanovit somatostatinové receptory subtyp 2A (existuje celkem 5 subtypů: SSTR1 až SSTR5). Choriogonadotropin ( $\beta$ -hCG) může mít vztah k malignímu potenciálu nádoru.

**Tab. 5. Pětileté přežití u rektálních neuroendokrinních tumorů podle SEER 1973–1999.**

Rozsah postižení	Pětileté přežití
lokalizovaný tumor	87 %
regionální postižení	41 %
vzdálené metastázy	25 %

Minimální histopatologický konsenzus: Histologická klasifikace vychází z WHO kritérií, v rámci minimálních požadavků na imunohistochemické vyšetření NET je nutno provést vyšetření chromograninu, synaptofyzinu a vyšetření proliferačního indexu Ki67 [8–10].

Genetické vyšetření: Genetické anomálie nejsou popisovány, genetická vyšetření se rutinně neprovádějí. Neuroendokrinní tumory rektu a tlustého střeva se prakticky vůbec nevyskytují v rámci mnohočetné adenomatózy (tab. 5).

### Klinické projevy

Asi ve 40% jsou NET rektu náhodně zjištěny při endoskopickém vyšetření provedeném z různých důvodů. Jindy se tumor manifestuje přítomností krve ve stolici, rektálním syndromem (tenesmus, rektální dyskomfort nebo bolest), vzácně projevy střešní obstrukce. NET rektu jsou endokrinně prakticky vždy němé, nevyvolávají karcinoidový syndrom.

Podmínkou pro vznik karcinoidového syndromu by mimo přítomnost jaterních metastáz byla přítomnost enterochromaffinických buněk s produkcí serotoninu, ale nádory v této lokalizaci serotonin prakticky neobsahují. Proto metastatická nemoc může být i delší dobu klinicky němá, později se manifestuje hepatomegalií, bolestmi břicha v pravém horním kvadrantu, nechutenstvím, hubnutím, slabostí, karcinoidový syndrom nebývá přítomen [11].

### Diagnostika

#### Laboratorní vyšetření

**Kyselina 5-hydroxyindolactová (5-HIOK)** ve 24hodinovém sběru moči je většinou normální. U malých primárních nádorů je sérový chromogranin A v mezích normy, u větších primárních nádorů a u metastatické nemoci bývá sérový **chromogranin A (S-CgA)** zvýšen. Stu-

peň jeho navýšení může odrážet rozsah nádorového postižení. Tumory vykazují pozitivitu prostata-specifické kyselé fosfatázy a  $\beta$ -hCG. Může být zvýšený i pankreatický polypeptid a enteroglukagon. Minimálním požadavkem pro vyšetření je dle ENETS vyšetření S-CgA a kyselé fosfatázy [12].

### Endoskopie

Většina lézí je v rektu diagnostikována endoskopicky. Ložiska lze odstranit polypektomií s histologickým potvrzením diagnózy. Kolonoskopie je zlatým standardem pro diagnózu, staging a bližší určení kolorektálních NET. V rámci stagingu je třeba vyloučit přítomnost synchronních karcinomů. Všechny polypy je nutno odstranit anebo, v případě nemožnosti kompletního odstranění, biopskovat a označit pro budoucí chirurgické či endoskopické snesení. Centrální vklesliny sliznice nebo ulcerace jsou známkami možného maligního potenciálu.

### Irrigografie, CT kolonografie

CT kolonografie může prokázat infiltraci perirektálního tuku, perirektální fascie anebo infiltraci perirektálních a pararektálních lymfatických uzlin. Pozitivní nález musí být ověřen kolonoskopicky a potvrzen histologickým vyšetřením. Irrigografie má doplňkový význam.

### Endorektální endosonografie

Endorektální endosonografie je užitečná pro předoperační vyšetření rektálních karcinoidů. Vyšetření může ukázat velikost nádoru, hloubku invaze a případné postižení pararektálních lymfatických uzlin [13].

### Transabdominální ultrazvuk

Nemá větší přínos pro diagnostiku primárního tumoru, může však detekovat případné jaterní metastázy a usnadnit jejich biopsii.



### Počítačová tomografie (CT) a magnetická rezonance (MR)

Obě tyto modalitty jsou senzitivnější nežli ultrazvuk. Víceřezové (multislice) trifázické CT je nejužitečnější pro staging, pokud jde o detekci případných lézí hrudníku či břicha. Podle některých autorů je MR nadřazena CT, pokud jde o detekci jaterních metastáz, ale jiní obě metody považují za srovnatelné. Každý rektální tumor, který nebyl kompletně odstraněn při endoskopii, musí být vyšetřen endosonograficky a pomocí CT či MR s posouzením lokálního šíření do okolních pánevních struktur a s posouzením resekability.

### <sup>111</sup>In-octreoscan

Senzitivita octreoscanu pro detekci primárního rektálního nádoru není dosud přesně známa. Vyšetření je zásadní pro staging a pro detekci jaterních metastáz. Dediferencované NET s malou expresí somatostatinových receptorů nemusí akumulovat radionuklid, nádorová ložiska zde nemusí být proto vizualizována. Pozitivita octreoscanu, podmíněná přítomností somatostatinových receptorů na povrchu nádorových buněk, predikuje i možnou odpověď na případnou léčbu analogy octreotidu u pokročilých forem. Octreoscan je možno na vybavených pracovištích využít intraoperačně při detekci malých nádorů anebo k detekci reziduálních metastáz do lymfatických uzlin [14]. Vhodné, leč velmi málo dostupné vyšetření pro diferencovaný NET je <sup>68</sup>gallium DOTA octreotate.

### Pozitronová emisní tomografie (PET)

Málo diferencované rychle rostoucí tumory lze vizualizovat pomocí 18-fluorodeoxyglukózy. Dobře diferencované NET mají nízký metabolický obrát, a proto nemusí být tímto radionuklidem zobrazeny.

**Poznámky ke stagingu:** Je-li rektální tumor malý, s rozměry < 10 mm a s nízkým proliferačním indexem Ki67, není další staging zpravidla nutný. Pokud byla kolonoskopie neúplná, je třeba provést doplňující CT kolonografii. Minimální požadavky na detekci NET tlustého střeva zahrnují kolonoskopii s biopsií a s kontrastním CT vyšetřením břicha a malé pánve (schéma 1).

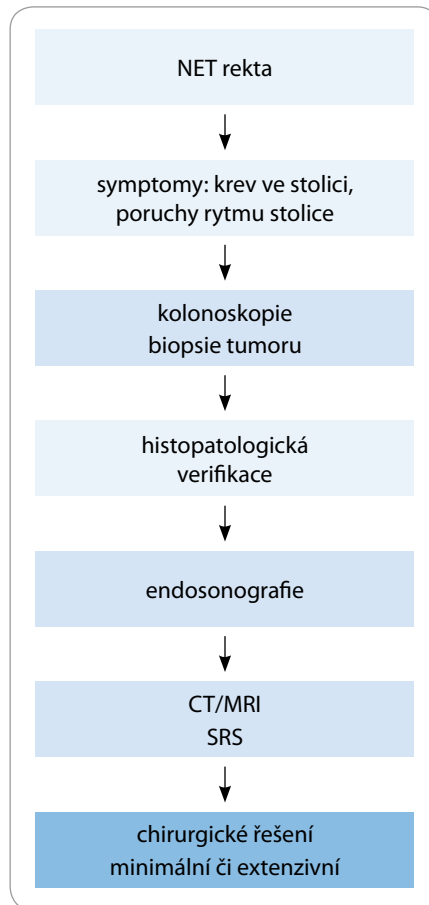


Schéma 1. Algoritmus diagnostiky NET rekta.

### Terapie

#### Chirurgická léčba

##### Lokalizovaný nále

Jediný kurativní přístup je radikální odstranění lokalizovaného nádoru. Malé rektální karcinoidy většinou nemetastazují, a proto endoskopické odstranění či metodu transanální endoskopické mikrochirurgie (TEM) lze považovat za kurativní léčebné postupy [15–16]. TEM je minimálně invazivní mikrochirurgická technika umožňující odstraňovat nádory ve vzdálenosti 4–18 cm od anu [17].

**Léze menší než < 1 cm** metastazují vzácně, u < 3 % případů v dlouhodobém sledování. Tyto malé léze představují asi 80 % všech případů rektálních karcinoidů. Mohou být odstraněny kompletně endoskopicky nebo transanální resekci [18]. Podmínkou je absence invaze do muscularis propria, absence centrální indurace či ulcerace [19] potvrzená endosonograficky. V případě endosonograficky potvrzené lokální invaze nebývá standardní polypektomie dostatečným

opatřením. Transanální resekce je možná u výše situovaných lézí a umožňuje resekci celé vrstvy sliznice a svaloviny [20]. Přední resekce je dle některých autorů zbytečně razantní, s nepříznivým poměrem rizika vůči benefitu.

**Tumory o velikosti 1–2 cm** představují asi 10 % případů karcinoidů rekta. Další vývoj je nejistý, k metastazování dochází v 10–15 %. Proto jsou i poněkud rozporné názory na operační postupy. Většinou se doporučuje široká excize s vyloučením invaze do svaloviny střešní stěny. Někteří doporučují lokální či radikální chirurgický výkon [20–21], většinou ale tumory do 2 cm velikosti mají nízký mitotický index, nevykazují invazi přes lamina propria, a proto je možno tumory odstranit lokální resekci [22–23]. V úvahu tedy připadá endoskopické odstranění, transanální excize vs přední resekce podle konkrétních okolností.

V rozhodnutí může pomoci histologické a histochemické vyšetření nádorové tkáně a endosonografické vyšetření nádorové léze. Některé studie neprokázaly prospěch z agresivních léčebných postupů, ovšem u high-grade tumorů je nutné uvážit extenzivnější výkon [21,23–24].

**Léze větší než 2 cm** představují necelých 10 % případů NET rekta. Mají významně vyšší metastatický potenciál pohybující se mezi 60 a 80 %, s častou přítomností invaze muscularis propria. Chirurgická léčba je v principu podobná jako u adenokarcinomu [21–23]. V praxi se používá totální mezorektální excize s kurativním léčebným záměrem, přední resekce. Vliv na přežití není dosud znám. Lokální odstranění primárního NET rekta u generalizovaného nádoru může mít paliativní efekt. Lokoregionální resekce u radikálně inoperabilních forem může mít rovněž paliativní účinek při ovlivnění lokálních symptomů a pánevního postižení, ovšem bez zlepšení přežití [25].

#### Paliativní léčba u pokročilých forem onemocnění

Vodítkem v rozhodovacím procesu u paliativní péče je kvalita života pacienta. NET metastazují většinou do jater. Léčba v podstatě zahrnuje postupy používané u generalizovaného one-

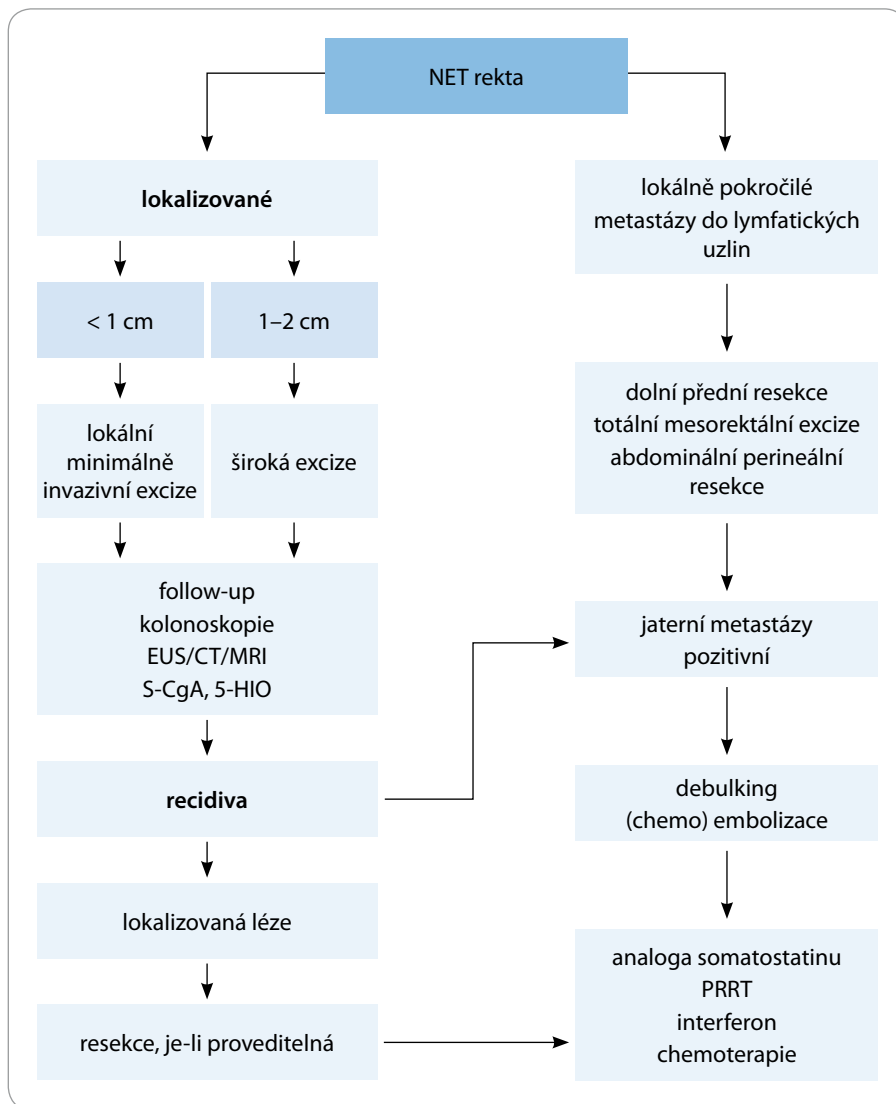


Schéma 2. Algoritmus terapie u NET rekta.

mocnění NET jiné lokalizace v zažívacím traktu: (chemo-)embolizace, chirurgická cytoredukce, resekce jaterních metastáz, radiofrekvenční ablace [26].

V porovnání s NET tenkého střeva a proximální částí tlustého střeva je desmoplastická reakce u generalizovaného NET rekta málo častá, a proto zde problémy se strangulací střevních kliček adhezemi či ischemické komplikace většinou není třeba řešit.

#### Bioterapie

I když rektální NET exprimují somatostatinové receptory, nejsou analoga paušálně indikována. Hlavní indikací k aplikaci analogu je karcinoidový syndrom, ten však není u rektálních karcinoidů častý.

V některých případech se zahajuje aplikace analog se snahou docílit tumoristatický efekt. Taková léčba by měla probíhat v rámci kontrolované klinické studie, v principu se to týká i interferonu alfa [27].

#### Systémová chemoterapie

Není u dobře diferencovaných NET rekta indikována, výjimečně se u progredujících neoplazií doporučuje 5-fluorouracil se streptozotocinem, ten však v ČR není běžně dostupný. Navíc procento léčebných odpovědí je nízké – < 25%. U rychle progredujících, málo diferencovaných NET se aplikuje kombinace cisplatinu s etopozidem. Léčebná odpověď je > 50%, ale procento časných relapsů

je značné. Nově se v rámci klinického výzkumu aplikují antiangiogenetické látky či inhibitory mTOR (mammalian target of rapamycin) neboli rapaloga (analoga rapamycinu), např. everolimus, v kombinaci s analogy somatostatinu. Intracelulární protein mTOR hraje ústřední roli v řízení buněčného růstu a proteosyntéze. Jeho inhibicí ve spojení s dalším léčebným zásahem, např. aplikací analogu somatostatinu, může být docíleno tumoristatického efektu nádoru. U karcinoidů rekta však nejsou s touto kombinací větší klinické zkušenosti.

#### Peptidová receptorová radionuklidová terapie (PRRT)

Tak jako u NET jiných lokalizací přichází v úvahu u radikálně inoperabilních nádorů s pozitivitou octreoscanu. Používají se čisté beta-zářiče <sup>90</sup>Yttrium nebo <sup>177</sup>Lutetium navázané na somatostatinová analoga octerotid či octreotate [28–29]. Na rozdíl od generalizovaných karcinoidů tenkého střeva však u NET rekta není s touto léčbou dostatek zkušeností. V úvahu dále přichází cílené ozáření jaterních metastáz metodou SIRT (selective internal radiation therapy) se zavedením mikrosfér pryskyřice s navázaným <sup>90</sup>Yttriem do větví arteria hepatica zásobujícím jaterní metastázy. Tato metoda se rovněž zavádí do klinického použití, je však cenově nákladná a není ve světě většinou hrazena pojišťovnami. Pozitivita octreoscanu pro realizaci léčby touto modalitou není nutná.

#### Adjuvantní terapie

Dle dosavadních zkušeností není indikována. Lze uvažovat o adjuvantní chemoterapii u málo diferencovaných tumorů, není-li jisté, zda chirurgický výkon byl dostatečně radikální [23] (schéma 2).

#### Kontroly po chirurgickém nebo endoskopickém odstranění tumoru (dle ENETS):

Pokud je chirurgický výkon radikální, jsou výsledky dlouhodobého přežívání velmi dobré i u větších nádorů.

Dispenzarizace pacientů by měla být trvalá i u příznivých forem NET rekta s ohledem na fakt, že vznik metastatické nemoci bývá popisován po 5–10 i více letech, i když ENETS doporučuje pone-

chat tumory o velikosti < 1 cm bez dalších kontrol a tumory o velikosti < 2 cm jen v případě rizikových faktorů (angioin-vaze, perineurální růst, invaze do muscularis mucosae, atypie v histologii).

### Frekvence kontrol

- a) U nemocných s nižším rizikem se provádí octreoscan a sérové markery v prvním roce a dále ročně.  
b) U ostatních případů každých 4–6 měsíců první rok, dále alespoň 1krát ročně.

V rámci kontrol se provádí endoskopická vyšetření, dle potřeby rektální endosonografie a vyšetření onkomarkerů. Z markerů jde o vyšetření sérového chromograninu A a kyselé fosfatázy v séru. Jiné onkomarkery mohou být zvýšené, ale v rutinní praxi se jejich vyšetření neprovádí. 5-HIOK ve 24hodinovém sběru moči je většinou u rektální NET negativní, a proto ji není třeba v rámci kontrol většinou provádět. Při restagingu nebo podezření na metastatickou nemoc je nutno provést CT či MR a octreoscan.

### Závěr

Rektální neuroendokrinní nádory (kar-cinoidy) jsou poměrně vzácné. Mají malígní potenciál, jež je zřetelně nižší nežli u karcinoidů proximální části tlustého střeva. U rektálních karcinoidů nebývá přítomen karcinoidový syndrom. Většina tumorů je diagnostikována endoskopicky, lokální staging se provádí endosonograficky. Vzdálené metastázy lze detekovat obvyklými zobrazovacími me-

todami, u NET má pak zvláštní význam octreoscan. Kurativní léčbou je radikální chirurgické odstranění a u malých nádorů endoskopické odstranění. Paliativní léčba spočívá v ablační terapii, jako jsou embolizace nádoru, radiofrekvenční ablace, chirurgická cytoredukce či resekce jaterních metastáz. S terapií analogy somatostatinu či s chemoterapií není větší zkušenost vzhledem k ojedinělým případům generalizace rektálních NET.

### Literatura

- Williams ED, Sandler M. The classification of carcinoid tumours. *Lancet* 1963; 281: 238–239.
- Modlin IM, Kidd M, Latich I et al. Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* 2005; 128: 1717–1751.
- Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13 715 carcinoid tumours. *Cancer* 2003; 97: 934–959.
- Jetmore AB, Ray JE, Gathright JB et al. Rectal carcinoids: the most frequent carcinoid tumor. *Dis Colon Rectum* 1992; 35: 717–725.
- Capella C, Heitz PU, Hofler H et al. Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch* 1995; 425: 547–560.
- Onogawa S, Tanaka S, Oka S et al. Clinical significance of angiogenesis in rectal carcinoid tumors. *Oncol Rep* 2002; 9: 489–494.
- Shimizu T, Tanaka S, Haruma K et al. Growth characteristics of rectal carcinoid tumors. *Oncology* 2000; 59: 229–237.
- Hotta K, Shimoda T, Nakanishi Y et al. Usefulness Ki-67 for predicting the metastatic potential of rectal carcinoids. *Pathol Int* 2006; 56: 591–596.
- Solcia E, Klöppel G, Sobin LH. Histological typing of endocrine tumours. Springer-Verlag 2000.
- Modlin IM, Öberg IK. A Century of Advances in Neuroendocrine Tumor Biology and Treatment. Published by Felsenstein C.C.C.P.: 464.
- Öberg K. Neuroendocrine gastrointestinal tumours. *Annals of Oncology* 1996; 7: 453–463.
- Öberg K. Carcinoid Tumors: Current Concepts in Diagnosis and Treatment. *The Oncologist* 1998; 3: 339–345.
- Matsumoto T, Iida M, Suekane H et al. Endoscopic ultrasonography in rectal carcinoid tumors: contribution to selection of therapy. *Gastrointest Endosc* 1991; 37: 539–542.

- Banzo J, Vidal-Sicat S, Prats E et al. In-111 DTPA octreotide scintigraphy and intraoperative gamma probe detection in the diagnosis and treatment of residual lymph node metastases of a rectal carcinoid tumor. *Clin Nucl Med* 2005; 30: 308–311.
- Matsushita M, Takakuwa H, Nishio A. Management of rectal carcinoid tumors. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 641.
- Kinoshita T, Kanehira E, Omura K et al. Transanal endoscopic microsurgery in the treatment of rectal carcinoid tumor. *Surg Endosc* 2007; 21: 970–974.
- Anděl P, Dostálík J, Pelikán A et al. Transanální endoskopická mikrochirurgie ve FN Ostrava. *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2007; 61(5): 264–268.
- Onozato Y, Kakizaki S, Ishihara H et al. Endoscopic submucosal dissection for rectal tumors. *Endoscopy* 2007; 39: 423–427.
- Shirouzou K, Isomoto H, Kakegawa T et al. Treatment of rectal carcinoid tumors. *Am J Surg* 1990; 160: 262–265.
- Schindl M, Niederle B, Hafner M et al. Stage-dependent therapy of rectal carcinoid tumors. *World J Surg* 1998; 22: 628–633.
- Koura AN, Giacco GG, Curley SA et al. Carcinoid tumors of the rectum: effect of size, histopathology, and surgical treatment on metastasis-free survival. *Cancer* 1997; 79: 1294–1298.
- Loftus JP, van Heerden JA. Surgical management of gastrointestinal carcinoid tumours. *Adv Surg* 1995; 28: 317–336.
- Ahlman H, Wängberg B, Jansson S et al. Interventional Treatment of Gastrointestinal Neuroendocrine Tumours. *Digestion* 2000; 62 (Suppl 1): 59–68.
- Ramage JK, Goretzki PE, Manfredi R et al. Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Tumours: Well-Differentiated Colon and Rectum Tumour/Carcinoma. *Neuroendocrinology* 2008; 87: 31–39.
- O'Toole D, Maire F, Ruzsniwski P. Ablative therapies for liver metastases of digestive endocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10: 463–468.
- Öberg K. Established Clinical Use of Octreotide and Lanreotide in Oncology. *Chemotherapy* 2001; 47: 40–53.
- Van Essen M, Krenning EP, De Jong M et al. Peptide Receptor Radionuclide Therapy with radiolabelled somatostatin analogues in patients with somatostatin receptor positive tumours. *Acta Oncol* 2007; 46: 723–734.
- Coldwell D, Kennedy AS, Van Echo DA. Comparative side effects of yttrium-90 based intra-arterial brachytherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22: 3760.
- Otte A, Mueller-Brand J, Dellas S et al. Yttrium-90-labelled somatostatin analogue for cancer treatment. *The Lancet* 1998; 351: 417–418.

# DNA a mikroRNA čipové technologie v diagnostice a predikci u pacientů s renálním karcinomem

## DNA and MicroRNA Microarray Technologies in Diagnostics and Prediction for Patients with Renal Cell Carcinoma

Slabý O.<sup>1</sup>, Svoboda M.<sup>1</sup>, Michálek J.<sup>2</sup>, Vyzula R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup> Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, Masarykova univerzita, Brno

### Souhrn

Renální karcinom tvoří přibližně 3% zhoubných nádorů dospělé populace a z urologických malignit dosahuje nejvyšší letality. Výzkum v oblastech vzniku a vývoje renálního karcinomu vedl k identifikaci klíčových signálních drah a následně i cílené protinádorové léčby prodlužující čas do progresu onemocnění, případně i celkové přežití léčených pacientů. Mikročipové technologie patří v současnosti mezi nejefektivnější metody studia genové exprese. Pomocí jednoho čipu lze paralelně detekovat expresi až desítek tisíc genů, a výrazně tak urychlit výzkum studovaných biologických modelů. K nejčastěji používaným mikročipům patří DNA čipy analyzující expresi mediátorové RNA (mRNA), nově se začínají uplatňovat mikročipové platformy detekující krátké nekódující RNA (mikroRNA), tzv. mikroRNA čipy. MikroRNA post-transkripčně regulují genovou expresi, a tak zásadním způsobem ovlivňují vlastnosti buňky. Ve výzkumu renálního karcinomu byly za posledních pět let využity mikročipové technologie ve více než dvaceti studiích. Tyto práce popisovaly schopnost mikročipů odlišit nádorovou tkáň od normálního renálního parenchymu, klasifikovat zhoubné novotvary ledviny podle histologických podtypů, identifikovat genové profily predikující metastazování renálního karcinomu a determinující prognózu jednotlivých pacientů. Cílem tohoto přehledu je shrnout výsledky z dosud provedených mikročipových studií u renálního karcinomu a prezentovat jejich potenciální uplatnitelnost v diagnostických a léčebných postupech.

### Klíčová slova

renální karcinom – DNA čipy – mikroRNA čipy – prognóza – predikce

Práce byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví ČR IGA NS 10361-3/2009, projektem MZOMOU2005 a grantem MŠMT NPV II – 2B 06058 LF 2921.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicinských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: slaby@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 21. 7. 2009

Přijato/Accepted: 11. 9. 2009



## Summary

Renal cell carcinoma accounts for approximately 3% of adult cancers and has the highest lethality of urological malignancies. Research focusing on carcinogenesis and development of renal cell carcinoma has led to the identification of the key signalling pathways and consequently targeted cancer therapy which improves time to progression or overall survival of renal cell carcinoma patients. Today, microarray technologies are some of the most efficient methods used in gene expression studies. Through one microarray experiment we can simultaneously determine the expression of thousands of genes, thus facilitating research of examined biological models. The most frequently used of the microarray technologies are DNA microarrays enabling global analysis of the mRNA (messenger RNA) expression, while recently, microarray platforms modified to detect short non-coding RNAs (microRNAs) have been employed (microRNA microarrays). MicroRNAs significantly affect the behaviour of tumour cells by post-transcriptional regulation of the gene expression. In the research into renal cell carcinoma, microarray technologies have been applied in more than twenty studies over the past five years. These papers describe the potential of microarrays to distinguish tumour tissue from normal renal parenchyma, to classify renal cell carcinomas according to histological subtypes, to identify expression profiles predicting metastasizing in primary renal tumours, and to determine the prognosis of particular renal cell carcinoma patients. The aim of this review is to summarize the results from microarray studies of renal cell carcinoma realized to date and to present their potential usage in diagnostic and therapeutic protocols.

## Key words

renal cell carcinoma – DNA microarrays – microRNA microarrays – prognosis – prediction

## Úvod

Přestože zhoubné novotvary (ZN) ledvin představují u dospělých přibližně pouze 3% ze všech nově diagnostikovaných maligních nádorů, jejich incidence narůstá nepřetržitě od 70. let minulého století. Ve srovnání s výskytem ZN ledviny s ostatními zeměmi světa se Česká republika v roce 2002 zařadila na první místo. Roční incidence a mortalita ZN ledviny v České republice v posledních letech opakovaně překročila 2 800, resp. 1 200 případů, což představuje incidenci přibližně 28 a mortalitu 12 případů na 100 000 obyvatel [1]. V celkové incidenci ZN ledvin převažují v ČR muži nad ženami v poměru 1,5–1,7 : 1, u renálního karcinomu může být rozdíl ještě výraznější (až 2 : 1).

V ledvinách se mohou vyskytnout nádory různé histogeneze. Přibližně 85% tvoří karcinomy vycházející z epitelu v oblasti parenchymu ledviny, cca po 5% představují uroteliální karcinomy z epitelu ledvinné pánvičky a embryonální nádory, zbývající část připadá na sarkomy, lymfomy a některé další vzácné podjednotky. Z karcinomů jednoznačně převažuje renální karcinom ze světlých buněk (80% karcinomů), vycházející z buněk proximálních tubulů (clear cell carcinoma – cRCC). Z proximálních tubulů vzniká i papilární renální karcinom (pRCC) (10% karcinomů), z distálních tubulů vychází chromofobní renální karcinom (chRCC) (5% karcinomů). Vzácně se vyskytuje karcinom ze sběrných kanálek (tzv. onkocytom) a medulární karcinom (tzv. Ductus Bellini karcinom) [2].

Základním prognostickým ukazatelem stále zůstává rozsah onemocnění definovaný TNM klasifikací. V případě karcinomů omezených pouze na vlastní ledvinu, nepřesahujících 7 cm, dosahuje pětiletého přežití až 90% pacientů, u větších nádorů cca 60% pacientů, při postižení uzlin či invaze do okolních velkých žil maximálně 40% a při metastatickém rozsevu přibližně 5% pacientů [3–4]. K vyhledání pacientů se špatnou prognózou lze rovněž použít několik kombinovaných klinickopatologických skórovacích systémů, např. Memorial Sloan-Kettering Cancer Center kritéria ([www.mskcc.org](http://www.mskcc.org)) nebo nomogramy University of Montreal ([www.umontreal.ca](http://www.umontreal.ca)).

Základní léčebnou modalitou je chirurgie, která jako jediná má kurativní potenciál, v případě inoperabilního a disseminovaného onemocnění na významu nabývají systémová imunoterapie, cytostatická léčba a radioterapie. Renální karcinom je nicméně vysoce radio- a chemorezistentní onemocnění a podobně i v případě imunoterapie nepřekračuje počet léčebných odpovědí 20%. Z tohoto důvodu není adjuvantní léčba dosud standardním postupem [3–4]. V paliativním přístupu se až do současnosti uplatňovala pouze imunoterapie založená na aplikaci interferonu-alfa a/nebo interleukinu-2. V posledních letech došlo k výraznému rozšíření terapeutických možností díky rozvoji cílené terapie působící na úrovni signálních drah angiogeneze, buněčné proliferace a apoptózy. V klinické praxi jsou v současnosti používány

především nízkomolekulární inhibitory tyrozinkináz sunitinib, sorafenib a temsirolimus a monoklonální protilátka bevacizumab zaměřená proti vaskulárnímu endoteliálnímu faktoru (VEGF) [5–7]. Do popředí zájmu se dostávají také moderní imunoterapeutické postupy založené na aktivním ovlivňování imunitního systému, především cestou protinádorových vakcín na bázi dendritických buněk [8]. Vývoj většiny nových preparátů určených pro tzv. cílenou terapii (targeted therapy) by ovšem nebyl možný bez současného rozvoje genomických metod umožňujících komplexní pohled na molekulární podstatu karcinogeneze. Moderní genomické přístupy založené na mikročipových technologiích byly v posledních letech opakovaně využity rovněž ve výzkumu renálního karcinomu. Publikované práce popisují schopnost mikročipů odlišit nádorovou tkáň od normálního renálního parenchymu, klasifikovat zhoubné novotvary ledviny podle histologických podtypů, identifikovat genové profily predikující metastazování renálního karcinomu a determinující prognózu jednotlivých pacientů [9–10]. Cílem tohoto přehledu je shrnout výsledky z dosud provedených mikročipových studií u renálního karcinomu a prezentovat jejich potenciální uplatnitelnost v diagnostických a léčebných postupech.

## DNA a mikroRNA čípoové technologie

Technologie DNA čipů (DNA microarrays) umožňuje ve velmi krátkém čase para-

lelně monitorovat expresi tisíců genů, případně celý lidský genom na úrovni RNA (tedy transkriptom) [11–13]. DNA čipy lze definovat jako miniaturizované zařízení nesoucí na svém povrchu imobilizované fragmenty nukleových kyselin, označované jako sondy, v přesně daném uspořádání. Tyto fragmenty jsou sekvencně odvozeny tak, aby mohly specificky hybridizovat s volnými molekulami nukleových kyselin izolovanými z analyzovaného vzorku, který je předem fluorescenčně označen za účelem posthybridizační detekce [11]. Signál generovaný ohraničeným polem odpovídajícím dané sondě pak odráží hladinu exprese mRNA daného genu v analyzovaném vzorku. Po detekci, denzitometrické kvantifikaci a normalizaci intenzit signálu pomocí specializovaného softwaru je vytvořen tzv. profil genové exprese analyzovaného vzorku, který je pak možné srovnávat s expresními profily dalších vzorků. Díky výrazným alteracím v expresních profilech nádorové buňky je ideální aplikací pro tuto technologii právě onkologický výzkum. Klíčovou studií z hlediska onkologické prognostiky provedli van't Veerová et al [14], kteří analyzovali profily genové exprese primárních nádorů pacientek s karcinomem prsu a pomocí exprese 70 genů byli schopni predikovat vznik metastáz s 89% přesností [14]. Ve srovnání s dosud klinicky používanými prognostickými ukazateli se jedná o velmi přesný odhad relapsu onemocnění, který, pokud by byl potvrzen, by znamenal možnost výraznější individualizace protinádorové léčby. Řada pacientek s karcinomem omezeným pouze na oblast prsu a s nízkým rizikem relapsu onemocnění by tak nemusela vůbec podstupovat adjuvantní chemoterapii. K validaci prediktivního potenciálu zmíněného 70genového profilu byla otevřena klinická studie MINDACT (Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy). Probíhá v síti 40 výzkumných pracovišť z 21 zemí s celkovým rozpočtem přibližně 20 mil. eur a očekává se, že do ní bude zařazeno přibližně 5 000 pacientek [15]. K získání dalších informací o použití DNA čipů v oblasti onkologického výzkumu odkazujeme čtenáře na již publikované přehledové práce [12–13].

Nejnovějším z molekulárněbiologických přístupů charakterizace nádorů je jejich studium pomocí profilů exprese mikroRNA (miRNA). MiRNA jsou poslední z dosud objevených ribonukleových kyselin (RNA). Jedná se o nekódující jednořetězcové RNA o délce 18–25 nukleotidů, jejichž hlavní funkcí je regulace genové exprese na úrovni mediátorové RNA (mRNA) [16]. V závislosti na míře komplementarity s cílovou mRNA využívají miRNA dva rozdílné mechanismy posttranskripční regulace genové exprese, které vedou buď přímo k degradaci cílové mRNA, nebo k represii její translace a následně k poklesu hladiny jejího proteinového produktu. Dle bioinformatických modelů jsou miRNA schopny regulovat až jednu třetinu lidských genů, včetně významných onkogenů či nádorových supresorů. Geny regulované pomocí miRNA se uplatňují jak v iniciálních fázích procesu karcinogeneze, tak i v regulaci nádorové invazivity a metastazování. Kromě toho se účastní i řady dalších procesů, např. lékové rezistence [17–19]. Zajímavá je rovněž skutečnost, že přibližně 50% miRNA genů se nachází na fragilních částech chromozomů, jejichž ztráta nebo amplifikace je často detekována u nádorových onemocnění. Z tohoto pohledu jsou i nekódující miRNA nositelkami důležité genetické informace, jejíž regulace je narušena, nebo dochází k její ztrátě v průběhu nádorové transformace. Analýza expresních profilů miRNA je proto stále častěji využívána pro účely molekulární charakterizace nádorových onemocnění, analogicky se studii založenými na DNA čipech a profilování kódujících transkriptů.

### Expresní čipové technologie a renální karcinom

V posledních osmi letech bylo publikováno přes dvacet studií, ve kterých bylo ve výzkumu renálního karcinomu využito DNA čipových technologií. Tyto studie byly většinou zaměřeny na charakterizaci profilu genové exprese renálního karcinomu a jejich výstupem byla většinou sada genů, jejichž exprese se významně lišila mezi nádorovou tkání a normálním parenchymem ledviny. Tímto způsobem byly identifikovány stovky nových genů, potenciálních markerů renálního karcino-

geneze. Bohužel mikročipové analýzy je vždy nutné podrobovat kritickému pohledu, neboť jak je při podobných experimentech obvyklé, sady genů nalezených jednotlivými autory se vzájemně značně liší. Tato skutečnost může být způsobena zejména nízkým počtem analyzovaných vzorků, nedostatečně homogenními soubory pacientů, rozdílnými limity pro kvalitu izolované RNA, použitím různých čipových platform (cDNA čipy – Agilent, oligonukleotidové čipy – Affymetrix, kulčkové čipy – Illumina, Real-Time PCR čipy – Applied Biosystems) a stejně tak variabilitou statistických metod a různými kritérii statistické významnosti [20–22].

Přes všechny tyto limitace existují geny, které byly opakovaně identifikovány ve více studiích. Příklady genů nadměrně exprimovaných v renální nádorové tkáni jsou VEGF, endotelin 1, glukózový přenašeč GLUT9, IGF-vázající protein 3 v nádorech typu cRCC, alfa-metyl-CoA racemáza u pRCC nebo KIT (CD117) u chrRCC [10]. Tyto geny se podílejí zejména na regulaci buněčného metabolismu, angiogeneze a signální transdukce, a rozšiřují tak spektrum již dříve popsanych genetických abnormalit u RCC (např. mutace genu von Hippel-Lindau, onkogenu MET a receptoru pro epidermální růstový faktor /EGFR/) [23–24]. Podobně jako v případě karcinomu prsu uvedeném výše byly i u RCC zjištěny specifické skupiny genů (genové profily), jejichž vzájemná exprese je spojena s prognózou onemocnění. Tyto profily mají potenciál pro užití v diagnostice a léčbě pacientů s RCC. Za tímto účelem však bude nutné provést jejich validace formou klinických studií.

Velice slibné jsou výsledky prací zaměřených na profilování exprese mikroRNA u pacientů s RCC. Zatímco k jednoznačnému odlišení renálního karcinomu od renální nenádorové tkáně jsou zapotřebí skupiny čítající desítky genů (mRNA), na úrovni miRNA je tento počet významně nižší, neboť jedna miRNA může regulovat desítky až stovky cílových mRNA. To dokazuje i práce německých autorů, kteří na základě kombinace pouze dvou miRNA, miR-141 a miR-155, byli schopni správně identifikovat 97% testovaných vzorků RCC mezi vzorky normální renální tkáně [25].

### Profily genové exprese renálního karcinomu a nenádorové tkáně: Lze diagnostikovat renální karcinom pomocí čípoové technologie?

Technologie DNA čipů byla nejčastěji použita ke srovnávání profilů genové exprese cRCC a nenádorové renální tkáně (NRT). Cílem těchto studií je bezchybně identifikovat renální karcinom na molekulární úrovni a zároveň rozšířit naše znalosti o molekulárněbiologické povaze tohoto klinicky heterogenního nádorového onemocnění. Dosud nalezené geny je možné rozdělit do skupin na základě jejich biologické funkce. Příkladem je práce Boerové et al [26], kteří použili cDNA čipy k analýze biologického materiálu z 32 primárních tumorů a 5 metastáz RCC a identifikovali 1 738 genů rozdílně exprimovaných ve srovnání s nenádorovou tkání parenchymu ledviny. Geny zapojené do buněčné adheze, metabolismu nukleových kyselin a nukleotidů byly u RCC zvýšeně exprimovány, zatímco hladiny genů spojené s iontovou homeostázou, transportem elektronů a metabolismem kyslíku vykazovaly sníženou expresi. S podobným designem bylo provedeno několik dalších studií [27–32]. Na souboru 18 RCC a jejich paralelní nenádorové tkáni provedli analýzu expresních profilů pomocí čipů Affymetrix Lenburg et al [33] a identifikovali 1 234 rozdílně exprimovaných genů. Svoje pozorování rozšířili o metaanalýzu publikovaných studií, ve které zjistili, že 800 jimi identifikovaných genů nebylo nalezeno v žádné z předchozích studií, kdežto pouze 37 genů bylo již dříve identifikováno minimálně ve třech studiích. Tyto geny byly spojeny s biologickými procesy, jako je hypoxie, angiogeneze, apoptóza, odpověď na interferon a léková rezistence [33]. V podobné studii Jones et al [34] bylo mezi vzorky 32 cRCC a 23 normálních parenchymů ledviny nalezeno 1 359 genů se zvýšenou a 493 se sníženou expresí u RCC. Stejně tak i Jones byl schopen rozdělit identifikované geny do několika hlavních skupin na základě jejich biologické funkce: angiogeneze (např. VEGF, angiopoietin-like 4 a 2, bFGF, ECGF1, endotelin 1, TGF-beta 1 a 2), invazivita/migrace/adheze (např. MMP14, CXCR1, CXCR4), tyrozin kinázové receptory (např. FLT1, AXL, EGFR). Mezi touto

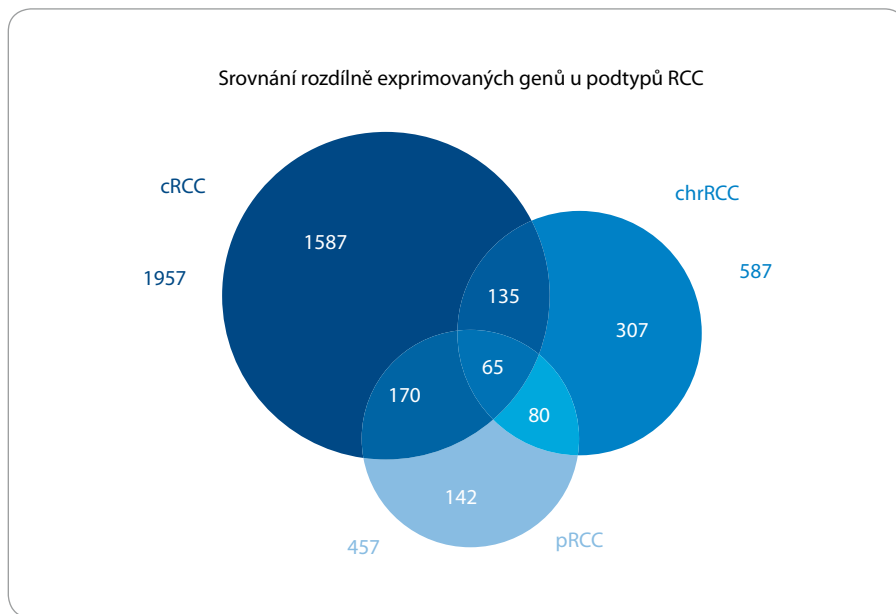
genovou sadou a sadami publikovanými Lenburgem et al [33] existoval významný překryv, přestože byly použity rozdílné DNA čípoové platformy a rozdílné bioinformatické algoritmy. Stejný tým studoval také různé podtypy RCC (pRCC, chrRCC a onkocytomy) a nádory ledvinné pánvičky, přičemž profily genové exprese rozdělily tyto nádory do skupin v souladu s jejich histopatologickými fenotypy [33]. Překvapivě existuje sada 31 genů, která vykazuje zvýšenou expresi napříč všemi podtypy RCC i jinými nádory ledvin. Tato sada genů v sobě zahrnuje geny se známou funkcí v nádorové biologii: transformující růstový faktor  $\beta 2$  (TGF- $\beta 2$ ), disintegrin a metaloproteináza 12 (MMP12) a proteinkináza C $\delta$ , naznačující význam těchto běžných biologických mechanismů napříč všemi typy renálních nádorů. Deregulace signální dráhy TGF- $\beta$  byla již dříve asociována s kancerogenezi a progresí RCC [35]. Disintegrin a MMP12 byly zase úspěšně studovány v souvislosti s prognózou RCC [36]. V případě mikroRNA bylo provedeno rovněž několik studií zaměřených na porovnání exprese miRNA mezi renálními karcinomy a normálním parenchymem ledviny. Gottardo et al [37] identifikovali sadu čtyř miRNA se signifikantně zvýšenou expresí (miR-28, miR-185, miR-27, and let-7f-2) v tkáni renálního karcinomu oproti kontrolním vzorkům tkáně zdravé ledviny. V další práci používající miRNA čipy nesoucí sondy pro 470 miRNA, Nakada et al [38] pozorovali u RCC snížené hladiny miR-141 a miR-200c, které validovali metodou Real-Time PCR, a jako cíle regulované těmito miRNA potvrdili ZFH1B a E-kadherin. Jung et al [25] na souboru 12 párových biopsií cRCC a normální renální tkáně stanovili specifický miRNA profil cRCC, charakterizovaný zvýšenou expresí miR-16, miR-452\*, miR-224, miR-155 a miR-210 a snížením exprese miR-200b, miR-363, miR-429, miR-200c, miR-514 a miR-141. Změny hladin exprese uvedených miRNA byly validovány metodou Real-Time PCR na souboru 72 párových biopsií cRCC a normální renální tkáně. Na tomto testovacím souboru bylo možné odlišit cRCC od zdravé tkáně pouze na základě exprese miR-141 a miR-155, a to s 98% přesností [25]. V práci kanadského týmu se

podařilo u cRCC identifikovat 33 deregulovaných miRNA, z nichž 21 bylo zvýšeno (např. miR-21, miR-210, miR-106a, miR-106b, miR-15a) a 12 sníženo (např. miR-200c, miR-200b, miR-720, miR-150) ve srovnání se zdravou tkání [39]. Napříč všemi prezentovanými studiemi bylo pozorováno snížení exprese miR-200c, velice frekventně také snížení exprese miR-141, a naopak nárůst exprese miR-210. Všechna výše uvedená pozorování potvrzují, že miRNA hrají významnou roli v kancerogenezi RCC a je třeba je brát v úvahu v rámci komplexního vnímání molekulární patologie tohoto onemocnění.

### Molekulární klasifikace renálního karcinomu: Lze pomocí mikročipů určit, o jaký podtyp renálního karcinomu se jedná?

Diagnostika a klasifikace nádorových onemocnění na molekulární úrovni je v současnosti nezbytným předpokladem ke správné léčbě již u řady diagnóz (např. karcinom prsu, kolorektální karcinom, difuzní velkobuněčný lymfom). V případě renálního karcinomu existuje několik histologických podjednotek (podrobně viz úvod), ale podobně jako u jiných nádorů se ukazuje, že i přes stejný morfologický základ (v daném případě renální tubulární epitel) dochází u jednotlivých podjednotek v průběhu karcinogeneze k řadě odlišných genetických alterací.

Pomocí DNA čipů bylo zjištěno, že morfologická diverzita RCC má významné koreláty v profilech genové exprese. Např. Schuetz et al [30] popsali specifické expresní profily ve vztahu k jednotlivým histologickým podtypům RCC. Jak světlobuněčný (cRCC), tak papilární (pRCC) renální karcinom vykazovaly profil genové exprese charakteristický pro proximální nefron, zatímco u chromofobního renálního karcinomu (chrRCC) a onkocytomu byly nadměrně exprimovány především geny typické pro distální nefron [30]. Sultmann et al [40] jednoznačně prokázali rozdílnost expresních profilů cRCC a chrRCC ve studii s 87 RCC a 25 vzorky normálního renálního parenchymu. Ve své práci navíc použili DNA čipy specificky konstruované pro výzkum zhoubných nádorů ledvin. Tyto čipy nesly na svém povrchu



**Obr. 1.** Množinový diagram znázorňující souvislost jednotlivých histologických podtypů RCC (cRCC – světlobuněčný renální karcinom, pRCC – papilární renální karcinom, chrRCC – chromofobní renální karcinom) na úrovni profilů genové exprese. Čísla udávají počty genů se signifikantně rozdílnou expresí. Upraveno podle Jonese et al [9].

sondy 4 207 genů asociovaných s renální tkání. Jones et al [34] stanovili pro každý z pěti studovaných histologických podtypů RCC genový profil čítající 30 genů. Použitím celé sestavy 150 genů byli následně schopni zpětně identifikovat jednotlivé podtypy RCC se 100% přesností. Tato skupina genů, jejichž seznam je součástí oddílu „Supplementary data“ autorovy práce (<http://www.bidmegenomics.org/KidneyCancer/index.html>), byla úspěšně validována nezávislou laboratoří na rozdílném souboru pacientů při použití odlišné čípoové technologie [40]. Rozdílnost a průniky expresních profilů jednotlivých histologických podtypů RCC demonstruje množinový diagram (obr. 1) vytvořený na základě dat získaných Jonesem et al [34]. Rovněž na úrovni miRNA byly identifikovány expresní profily specifické pro jednotlivé histologické podtypy RCC [41]. Konkrétně exprese miR-423 a miR-203 byla signifikantně zvýšená u cRCC ve srovnání s pRCC. Naproti tomu u onkocytomu byla miR-203 snížena ve srovnání s chrRCC [41].

V případě renálního karcinomu je pozoruhodné, že přes klinicky heterogenní onemocnění, a to i uvnitř jednotlivých histologických podjednotek, profilování genové exprese nepřineslo žádné změny

v jeho klasifikaci. To je v rozporu s očekáváním odborné veřejnosti, jež předpokládala změny podobné těm, ke kterým došlo např. u difuzního velkobuněčného lymfomu nebo u karcinomu prsu. Z tohoto pohledu molekulární klasifikace RCC kopíruje histologické podtypy RCC. Identifikované genové skupiny ovšem umožní hlubší pochopení molekulární povahy jednotlivých histologických podtypů RCC.

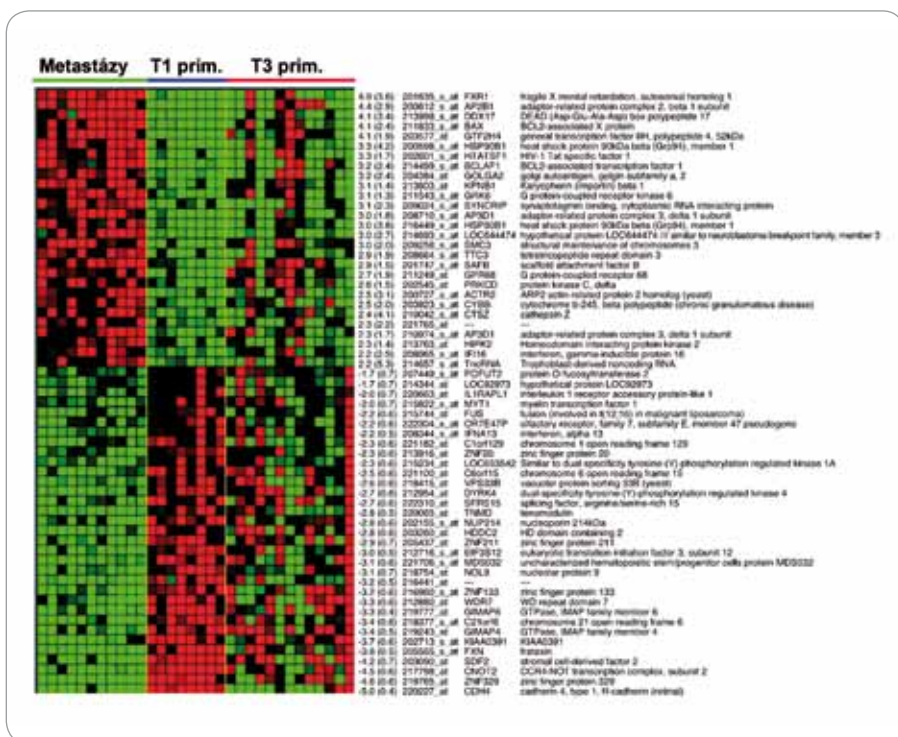
#### Využití DNA a mikroRNA čipů ke stanovení prognózy pacientů s renálním karcinodem:

##### Jaké je riziko metastazování?

Ve své podstatě prvním a dosud jediným v klinické praxi široce využívaným prognostickým systémem renálního karcinomu je TNM klasifikace. Přestože se přežití pacientů s renálním karcinodem jednoznačně odvíjí od klinického stadia choroby i uvnitř jednotlivých skupin (I. až IV. klinické stadium), se může dosažená délka času do progresu choroby (disease-free survival – DFS) a celkového přežití (overall survival – OS) mezi jednotlivými pacienty významně lišit. Mikročipové technologie nabízejí atraktivní nástroj k hledání rozdílů v genové expresi karcinomů ledviny mezi pacienty s výrazně odlišnými časy DFS a OS.

První studie využívající genomický přístup ke klasifikaci RCC podle rozdílné prognózy byla provedena na souboru 29 pacientů s cRCC pomocí cDNA čipů nesoucích 21 632 sond [42]. Takahashi et al [42] identifikovali soubor 40 genů umožňující rozdělit pacienty s cRCC do skupiny s dobrou a špatnou prognózou. Mezi těmito geny se objevily i některé již dříve identifikované, jako např. TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ RII nebo TIMP3. Je zajímavé, že u pacientů se špatnou prognózou byla pozorována snížená exprese TGF- $\beta$ RII a TGF- $\beta$ RIII a dalších genů spojených s TGF- $\beta$  signální dráhou, zatímco samotné TGF- $\beta$ 2 se v těchto cRCC vyskytovalo ve zvýšených hladinách [42]. Vasselli et al [43] pomocí DNA čipů na souboru 58 pacientů s metastazovaným RCC identifikovali 45 genů, na základě jejichž vzájemné exprese mohli být pacienti stratifikováni do skupiny s nízkým nebo vysokým rizikem časného úmrtí v důsledku progresu renálního karcinomu. U pacientů s nízkým rizikem byl dosažen medián OS 556 dnů (třileté OS téměř 40% případů), u pacientů s vysokým rizikem 180 dnů (třileté přežití méně než 10% případů ( $p < 0,001$ )). Nejvýznamnějším molekulárním prognostickým ukazatelem z uvedených 45 genů byl gen kódující VCAM1 (vaskulární adhezivní molekula VCAM1) [43]. Další gen identifikovaný pomocí DNA čipů, jehož význam v prognóze cRCC je v současnosti studován, je protein spojený s diferenciací tukové tkáně (ADFP). Kromě adipocytů se ADFP zvýšeně vyskytuje i v řadě jiných tkání, např. v buňkách mamárních ductů, v Sertoliových a Leydigových buňkách. ADFP patří mezi geny indukované hypoxií, přičemž hlavním transkripčním faktorem, který zprostředkovává tuto odpověď, je HIF (hypoxia-inducible factor) [44–45]. Yao et al [44] nejdříve provedli analýzu profilu genové exprese u 33 vzorků RCC a 9 normálních vzorků ledviny, při které zjistili vyšší expresi ADFP u světlobuněčných renálních karcinomů a následně na konsektivním souboru 423 pacientů se sporadickým cRCC potvrdili pozitivní prediktivní význam ADFP [45]. Expresi ADFP byla výrazně vyšší u pacientů bez přítomnosti systémových klinických symptomů nádorového onemocnění, u karcinomů





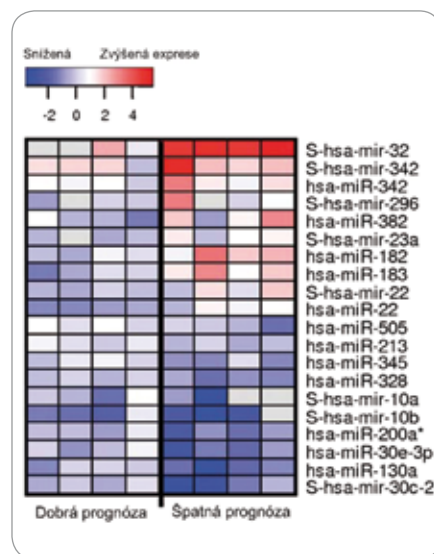
Obr. 2. Část 155genového metastatického profilu cRCC, vytvořeného na základě srovnání expresních profilů vzdálených metastáz cRCC a primárních tumorů o rozsahu T1 (dle TNM klasifikace). Tento profil následně aplikovaný na cRCC o rozsahu T3 rozdělil T3 tumory na dvě skupiny. Skupina T3 tumorů, která měla profil genové exprese 155 genů podobný profilu vzdálených metastáz, měla v době chirurgického výkonu vzdálené metastázy skutečně přítomny. U pacientů s T3 tumory s profilem genové exprese podobným T1 tumorům v době chirurgického výkonu vzdálené metastázy přítomny nebyly.

dobře diferencovaných, lokálně méně pokročilých. Naopak nižší expresi ADFP zaznamenali u špatně diferencovaných karcinomů nebo pacientů s již metastatickým onemocněním. Hladina ADFP významně korelovala s DFS i OS [45].

Možnost přesně predikovat metastatický potenciál renálního karcinomu již v době diagnózy by mohla významně ovlivnit léčebný plán. Kosari et al [46] rozdělili svůj soubor pacientů s cRCC na část s agresivním průběhem onemocnění, která podlehl nemocí do čtyř let od nefrektomie, a na část s relativně příznivým průběhem choroby. Pomocí DNA čipů provedli analýzu profilů genové exprese v obou souborech a našli sadu 35 genů, jejichž exprese se mezi oběma soubory statisticky významně lišila. Svě výsledky verifikovali na nezávislém souboru pacientů metodou Real-Time PCR a mezi analyzovanými geny identifikovali anti-apoptický survivin, jehož vy-

soké hladiny byly spojeny s kratším přežitím pacientů s cRCC. Souvislost survivinu a přežívání pacientů s cRCC ověřil tento tým rovněž imunohistochemicky na proteinové úrovni [46].

Zatímco profily genové exprese specifické pro jednotlivá klinická stadia cRCC nebyly dosud použitím DNA čipů nalezeny, další prognostický genový profil obsahující 155 genů stanovili Jones et al na základě srovnání profilů genové exprese vzdálených metastáz cRCC a primárních tumorů klasifikovaných v TNM klasifikaci T1 (tumor nepřesahující 7 cm, omezený pouze na samotnou ledvinu) [9,34,47]. Expresi uvedených 155 genů následně vyšetřili ve vzorcích primárních cRCC o rozsahu T3 (nádor se šíří do velkých vén nebo postihuje přímo nadledvinu nebo perirenální tkáň, ale ne přes Gerotovu fascii). Výsledek genové exprese rozdělil T3 tumory na dvě skupiny. Skupina T3 tumorů, která měla profil ge-



Obr. 3. Skupina miRNA umožňující rozdělit pacienty s cRCC na skupiny s dobrou a špatnou prognózou. Červená a modrá barva znamená zvýšenou, resp. sníženou expresi dané miRNA ve srovnání s nenádorovou renální tkání. Předpona S znamená prekurzorovou formu dané miRNA. Upraveno podle Petilla et al [41].

nové exprese 155 genů podobný profilu vzdálených metastáz, měla v době chirurgického výkonu vzdálené metastázy skutečně přítomny. Druhá skupina T3 tumorů s profilem genové exprese podobným T1 tumorům v době chirurgického výkonu vzdálené metastázy neměla (obr. 2). Z dendrogramu na obr. 2 je patrné, že primární nádory o stejném rozsahu (T3) mohou mít rozdílné biologické vlastnosti, které determinují vznik vzdálených metastáz. Tyto vlastnosti přitom nemohou být zjištěny při rutinním histologickém vyšetření.

Identifikovaný 155genový profil zahrnoval řadu genů s již popsaným významem v kancerogenezi (např. proteinkináza Cδ, transkripční faktor POU5F1/OCT4, heat shock protein 90beta, kaveolin 1, annexin A4, katepsin Z. Jones na svém souboru vyzkoušel aplikovat i 128genový profil, objevený bostonskými autory na modelu karcinomů jiného než renálního původu, který predikuje vznik metastáz obecně u epitelálních nádorů [48]. S použitím tohoto „obecného profilu metastazování“ dosáhl správného rozdělení více než 80% primárních tumorů do dvou výše definova-

ných skupin. Jak přesně interpretovat, že dva odlišné genové profily shodně seskupily světlobuněčné renální karcinomy na základě jejich schopnosti zakládat metastázy, není jasné. Rozhodně však tato skutečnost potvrzuje biologickou odlišnost primárních tumorů schopných časně metastazovat od nádorů méně agresivních. Tuto odlišnost lze přitom stanovit pomocí profilu genové exprese. Z klinického pohledu je pak možné včas rozpoznat pacienty s vysokým rizikem vzniku metastáz a zlepšit jejich prognózu individualizací jejich sledování a včasným zahájením správné léčby.

Na úrovni miRNA definovali odlišné prognostické skupiny pacientů (ve vztahu k pětiletému přežití) Petillo et al (obr. 3) [41]. Nádory se špatnou prognózou byly charakterizovány především zvýšenou expresí pre-miR-32, což je prekurzor, ze kterého je aktivní miR-32 tvořena účinkem ribonukleázy Dicer. Studie zaměřené na zdokonalení stagingu cRCC na základě expresních profilů miRNA probíhají také na Klinice komplexní onkologické péče Masarykova onkologického ústavu v Brně.

### Závěr: vize klinického využití moderních genomických metod u pacientů s renálním karcinodem

DNA i mikroRNA čípoové technologie byly již úspěšně implementovány do výzkumu nádorových onemocnění. V této oblasti bylo největšího pokroku dosaženo u ne Hodgkinsonských lymfomů a karcinomu prsu, kde DNA čipy významnou měrou přispěly k vytvoření molekulárních klasifikací uvedených chorob, jež mají jednoznačný prognostický potenciál a dopad na léčbu pacientů. V současné době u karcinomu prsu probíhají klinické studie s použitím DNA čipů, čítající tisíce pacientek. Zda nabudou čípoové technologie podobného významu také u renálního karcinomu, je předčasné odhadovat, neboť dosud nebylo provedeno tolik studií jako v případě dvou výše uvedených malignit. Nicméně dosažené výsledky jsou velice povzbudivé. Pomocí DNA a mikroRNA čipů byly identifikovány jednotlivé geny a miRNA mající prognostický význam u cRCC. Obě čípoové platformy lze použít k diferenciaci mezi nádorovou tkání a normálním re-

nálním parenchymem, v případě nádoru lze rozlišit jednotlivé podtypy RCC. Čípoové technologie si nekladou za cíl nahradit histologické vyšetření bioptované tkáně, navíc tkáň vyšetřovaná pomocí čipů musí být z řady důvodů zpracována a zhodnocena patologem. Lze ovšem předpokládat, že do budoucna budou aplikována obě vyšetření paralelně, přičemž čípoové technologie významnou měrou doplní informace získané z rutinního histologického vyšetření. Tyto informace budou základem molekulárního stagingu a molekulární klasifikace nádorových onemocnění, s přímým dopadem do klinické praxe.

### Literatura

- Dušek L, Mužík J, Kukásek M et al. Český národní webový portál epidemiologie nádorů [online]. Masarykova univerzita, 10. 1. 2008. <http://www.svod.cz>.
- Yan BC, Mackinnon AC, Al-Ahmadie HA. Recent developments in the pathology of renal tumors: morphology and molecular characteristics of select entities. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 1026–32.
- Bukowski RM. Prognostic factors for survival in metastatic renal cell carcinoma: update 2008. *Cancer* 2009; 115: 2273–2281.
- Richie JP, Jonasch E, Kantoff PW. Renal Cell Carcinoma. In: Kufe WD, Bast RC, Hait WN et al. *Holland-Frei Cancer Medicine*, 7th ed. Hamilton (Canada): BC Decker 2006: 1401–1410.
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3584–3590.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM et al. Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3312–3318.
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 2271–2281.
- Amato RJ. Vaccine therapy for renal cancer. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7: 925–935.
- Jones J, Libermann TA. Genomics of renal cell cancer: the biology behind and the therapy ahead. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6855–6925.
- Jones J, Pantuck AJ. Genomics and proteomics in renal cell carcinoma: diagnosis, prognosis, and treatment selection. *Curr Urol Rep* 2008; 9: 9–14.
- Svoboda M, Michálek J. Úvod do technologie DNA čipů. *Lék a Techn* 2004; 35: 67–75.
- Perez-Diez A, Morgun A, Shulzhenko N. Microarrays for cancer diagnosis and classification. *Adv Exp Med Biol* 2007; 593: 74–85.
- Virtanen C, Woodgett J. Clinical uses of microarrays in cancer research. *Methods Mol Med* 2008; 141: 87–113.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530–536.
- Slabý O. Pokroky v čípoových technologiích znamenají pokroky v biomedicinském výzkumu i klinické diagnostice. *Klin Onkol* 2007; 2: 235–236.
- Slabý O, Krekac D, Hrstka R et al. Zapojení mikroRNA do patogeneze nádorových onemocnění a možnosti jejich využití v diagnostické a prediktivní onkologii. *Čas Lék Čes* 2008; 147: 25–31.

- Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 2009; 60: 167–179.
- Bartels CL, Tsongalis GJ. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clin Chem* 2009; 55: 623–631.
- Brown BD, Naldini L. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 578–585.
- Tibshirani R. A simple method for assessing sample sizes in microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 2006; 7: 106.
- Hardiman G. Microarrays Technologies 2006: an overview. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 1153–8.
- Tichý B, Svoboda M, Mayer J et al. Odběr a zpracování vzorků pro expresní DNA čipy. *Klin Onkol* 2006; 19 (Suppl 2): 350–354.
- Lukešová Š, Kopecký O, Dvořák J et al. Význam genetických mutací a podstata poruchy angiogeneze u světlobuněčného karcinomu ledviny. *Klin Onkol* 2006; 19: 290–292.
- Křepelová A. Dědičné formy nádorů ledvin – spektrum predispozičních genů a jejich testování. *Klin Onkol* 2006; 19 (Suppl): 82–84.
- Jung M, Mollenkopf HJ, Grimm C et al. MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med* 2009. In press.
- Boer JM, Huber WK, Sultmann H et al. Identification and classification of differentially expressed genes in renal cell carcinoma by expression profiling on a global human 31,500-element cDNA array. *Genome Res* 2001; 11: 1861–1870.
- Skubitz KM, Zimmermann W, Kammerer R et al. Differential gene expression identifies subgroups of renal cell carcinoma. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 250–267.
- Liou LS, Shi T, Duan ZH et al. Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma. *BMC Urol* 2004; 4: 9.
- Higgins JP, Shinghal R, Gill H et al. Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am J Pathol* 2003; 162: 925–932.
- Schuetz AN, Yin-Goen Q, Amin MB et al. Molecular classification of renal tumors by gene expression profiling. *J Mol Diagn* 2005; 7: 206–218.
- Gieseg MA, Cody T, Man MZ et al. Expression profiling of human renal carcinomas with functional taxonomic analysis. *BMC Bioinformatics* 2002; 3: 26.
- Diegmann J, Tomiuk S, Sanjmyatav J et al. Comparative transcriptional and functional profiling of clear cell and papillary renal cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2006; 18: 395–403.
- Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP et al. Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer* 2003; 3: 31.
- Jones J, Otu H, Spentzos D et al. Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5730–5739.
- Copland JA, Luxon BA, Ajani L et al. Genomic profiling identifies alterations in TGFbeta signaling through loss of TGFbeta receptor expression in human renal cell carcinogenesis and progression. *Oncogene* 2003; 22: 8053–8062.
- Roemer A, Schwettmann L, Jung M et al. Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. *Oncol Rep* 2004; 11: 529–536.
- Gottardo F, Liu CG, Ferracin M et al. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007; 25: 387–392.
- Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y et al. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. *J Pathol* 2008; 216: 418–427.

39. Chow TF, Youssef YM, Lianidou E et al. Differential Expression Profiling of microRNAs and Their Potential Involvement in Renal Cell Carcinoma Pathogenesis. *Clin Biochem* 2009. In press.
40. Sultmann H, von Heydebreck A, Huber W et al. Gene expression in kidney cancer is associated with cytogenetic abnormalities, metastasis formation, and patient survival. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 646–655.
41. Petillo D, Kort EJ, Anema J et al. MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *Int J Oncol* 2009; 35: 109–114.
42. Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA et al. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9754–9759.
43. Vasselli JR, Shih JH, Iyengar SR et al. Predicting survival in patients with metastatic kidney cancer by gene-expression profiling in the primary tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6958–6963.
44. Yao M, Tabuchi H, Nagashima Y et al. Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J Pathol* 2005; 205: 377–387.
45. Yao M, Huang Y, Shioi K et al. Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 152–160.
46. Kosari F, Parker AS, Kube DM et al. Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5128–5139.
47. Moch H, Artibani W, Delahunt B et al. Reassessing the Current UICC/AJCC TNM Staging for Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2009. In press.
48. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003; 33: 49–54.

# Proteomická analýza nádorových buněk

## Proteomic Analysis of Cancer Cells

Tomancová A.<sup>1</sup>, Šedo O.<sup>2</sup>, Zdráhal Z.<sup>2</sup>, Mayer J.<sup>1</sup>, Pospíšilová Š.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, Lékařská fakulta MU a FN Brno

<sup>2</sup>Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU Brno

### Souhrn

Výrazný rozvoj analytické instrumentace a metodických přístupů během posledních dvou desetiletí významně rozšířil možnosti studia proteinů v živých systémech. Analýza tzv. proteomu poskytuje neustále se prohlubující náhled do biologických procesů na úrovni kvalitativních a kvantitativních změn proteinového složení v souvislosti s fyziologickými a patologickými stavy organismu, čímž nabízí možnost jejich lepšího pochopení a stává se přínosem pro vývoj a validaci diagnostických a terapeutických přístupů. Proto se na studium lidského proteomu v současné době soustřeďuje i pozornost odborné veřejnosti v oblasti onkologie. V tomto článku jsou vysvětleny principy nejvyužívanějších proteomických metod (gelová elektroforéza, kapalinová chromatografie, hmotnostně spektrometrická analýza, čipové technologie) a uvedeny příklady jejich využití v oblasti onkologických, resp. hematologických onemocnění.

### Klíčová slova

proteomika – proteiny – onkologie – hematologie

### Summary

The rapid development of analytical instrumentation and methodical approaches in the course of the last two decades has significantly extended the possibilities of studying proteins in living systems. Proteomic analysis provides ever deeper insights into the molecular nature of biological processes in terms of qualitative and quantitative changes in protein composition in connection with the physiological and pathological states of the organism. Thus, proteomic analysis contributes to a better understanding of these processes and becomes a tool for the development and validation of diagnostic and therapeutic approaches. Thanks to recent achievements, the attention of cancer specialists is more and more focused on human proteome research. In this brief review we explain the principles of widely used proteomic techniques (gel electrophoresis, liquid chromatography, mass spectrometry analysis, protein array technologies) and show examples of their application in oncology, namely hematological diseases.

### Key words

proteomics – proteins – oncology – hematology

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NS9683-4/2008 a NS10439-3/2009 a výzkumnými záměry MSM00216 22415 a MSM0021622430.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



**RNDr. Šárka Pospíšilová, PhD.**  
Centrum molekulární biologie  
a genové terapie  
Interní hematologická klinika  
FN Brno  
Černopolní 9  
625 00 Brno  
e-mail: sarka.pospisilova@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 9. 2009

Přijato/Accepted: 20. 9. 2009



**Úvod**

Základní role proteinů v živých organizmech byla prokázána už v začátcích biologického bádání. Termín „protein“ poprvé použil Berzelius roku 1838, aby ilustroval význam těchto molekul. Název „protein“ odvodil od řeckého slova „proteios“ znamenající „první pozici“ [1].

Po úspěšném rozluštění lidského genomu [2] následuje další etapa v poznání molekulární podstaty buněčných procesů, a to studium vlastních vykonatelů většiny těchto procesů, tedy proteinů. Vědní disciplína zabývající se analýzou proteinů, resp. proteomu, se nazývá proteomika. Termín „proteom“ vytvořený spojením slova protein a zažitého termínu „genom“ poprvé použil v roce 1994 Marc Wilkins [3]. Proteom bývá definován jako kompletní sada bílkovin v buňce, tkáni nebo organismu zahrnující veškeré jejich formy [4]. Vědní disciplína proteomika studuje z hlediska kvality i kvantity všechny proteinové formy, které jsou exprimovány organismy v závislosti na jejich funkci, stáří a externích faktorech, jež příslušný organismus ovlivňují [5]. Jinými slovy předmětem zájmu proteomiky je popis struktury a funkce všech funkčních produktů genové exprese, zahrnující identifikaci každého proteinu včetně jeho kvantifikace, lokalizace v buňce, určení protein-proteinových interakcí a charakterizace posttranslačních modifikací (např. fosforylace, acetylace, glykosylace, metylace aj.), které hrají důležitou roli v buněčných procesech [6–7]. Analýza proteomu poskytuje náhled do biologických procesů v závislosti na koncentraci proteinů v daném čase, čímž nabízí možnost lépe pochopit fyziologické a patologické stavy organismu a stává se přínosem pro vývoj a validaci diagnostických a terapeutických přístupů. Např. v hematologii se pomocí aplikace proteomických přístupů rozšiřují možnosti popisu vývoje hematopoetických buněk, leukemogeneze nebo funkční aktivity zralých buněk [8].

Analýza proteomu díky jeho komplexnosti (v případě člověka se jedná až o stovky tisíc proteinů či jejich forem) představuje podstatně složitější úkol, než jakým je analýza genomu. Vedle velkého počtu molekul je to také rozpětí koncentrací jednotlivých komponent (u krve je

to až deset řádů), které velmi komplikuje analýzu minoritních složek, např. signálních proteinů. Charakterizace posttranslačních modifikací, jež hrají významnou roli v mnoha buněčných procesech, klade ještě náročnější požadavky na přípravu vzorku i na instrumentaci.

V posledních 20 letech zaznamenaly proteomické metody i odpovídající instrumentace prudký rozvoj. Jedním z hlavních nástrojů proteomické analýzy se stala hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry – MS) ve spojení s vybranými separačními metodami. V následujícím textu je uveden stručný přehled separačních technik a nejběžnější MS instrumentace. Kompletní přehled MS instrumentace je uveden např. v práci B. Domona [9]. Pozornost je věnována také technikám využívajícím proteinové čipy.

**Dvourozměrná gelová elektroforéza (2D-GE)**

Dvourozměrná gelová elektroforéza byla poprvé popsána O’Farrelem v roce 1975 a stala se klíčovou metodou pro separaci komplexních směsí proteinů v biologických vzorcích. Metoda kombinuje dva separační kroky. V prvním rozměru

jsou rozpuštěné a denaturované proteiny separovány v proužku polyakrylamidového gelu s imobilizovaným gradientem pH dle svých izoelektrických bodů (hodnota pH, při němž mají proteiny nulový náboj) metodou izoelektrické fokusace. V druhém rozměru je tento proužek gelu obsahující separované proteiny z předchozího kroku přiložen na separační gel. Proteiny jsou separovány technikou SDS-PAGE podle svých relativních molekulových hmotností (Mr) [10] (schéma 1).

Tato metoda je schopna simultánně rozlišit více než 5 000 proteinů, po vizualizaci lze metodami hmotnostní spektrometrie detekovat méně než 1 ng proteinu ve spotu. Dokáže separovat také jednotlivé izoformy i posttranslačně modifikované proteiny. Velmi často se využívá pro hledání nových markerů na základě kvantitativních a kvalitativních rozdílů v proteinové expresi, které jsou stanoveny prostřednictvím softwarové analýzy obrazu [11].

Mezi nevýhody 2D-GE patří množství směsných spotů obsahujících různé proteiny se stejným pI a Mr, omezené možnosti detekce proteinů s nízkým, resp. vysokým pI, vysokou hydrofobicitou nebo příliš vysokou/nízkou Mr. Reprodukova-

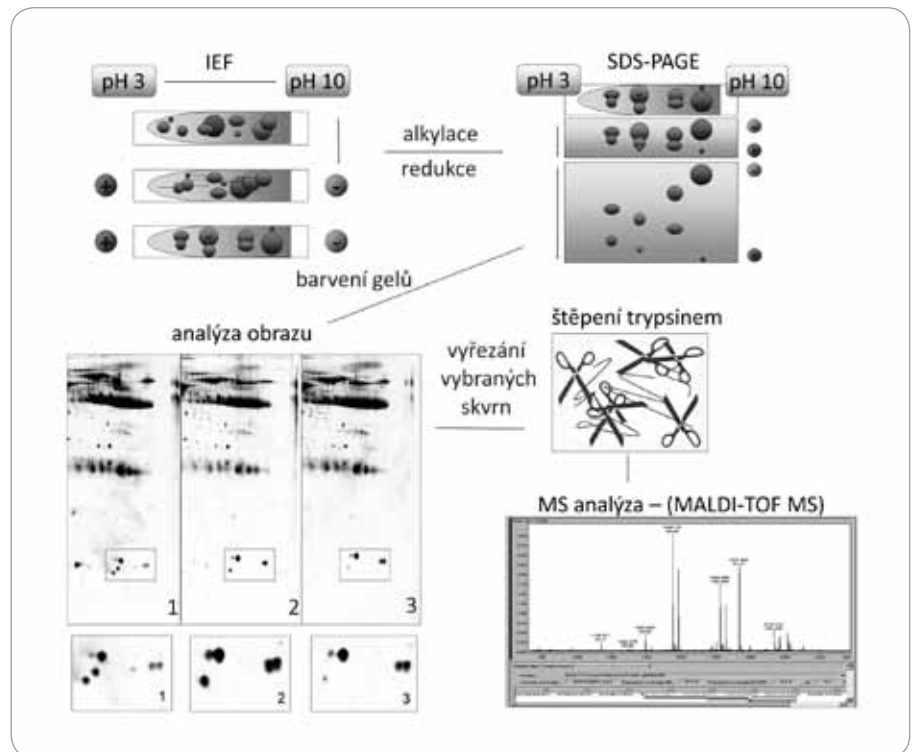


Schéma 1. Dvourozměrné gelové elektroforézy.

telnost metody spojená s 2D-GE je ovlivněna mnoha faktory, např. přípravou vzorků, původem činidel, použitou barvicí metodou, způsobem a kvalitou vyhodnocení gelů pomocí zvoleného programu pro analýzu obrazu. Výsledkem je celková variabilita metody pohybující se mezi 20 a 30 % [12].

Jedna z prvních studií využívající 2D gelovou elektroforézu k analýze hematologických vzorků byla publikována v roce 1988. Srovnávána byla exprese proteinů v různých typech krevních buněk (neutrofilů, nefrakcionované lymfocyty periferní krve, T-lymfocyty, B-lymfocyty, T4 a T8 antigen pozitivní lymfocyty, buňky kostní dřene aj.). Na jejím základě byl popsán protein p18 jako onkoprotein, jehož množství se mění v závislosti na jeho buněčném původu [13]. Na základě 2D-GE analýzy pozorovali v roce 2005 Cui JW a jeho skupina rozdílnou expresi proteinů mezi leukocyty pacientů s akutní leukémií a zdravými jedinci. Současně popsali i rozdíly v proteinové expresi mezi jednotlivými podtypy akutní myeloidní leukémie a akutní lymfoidní leukémie [14]. Ve stejném roce publikovali odlišné zastoupení proteinů mezi jednotlivými podtypy akutní myeloidní leukémie také Lopez-Pedra et al. Identifikované proteiny patřily ke skupině metabolických enzymů, antioxidantů, strukturních proteinů a produktů supresorových genů. Sedm z identifikovaných proteinů vykazovalo také rozdílné zastoupení mezi blastocyty a normálními mononukleárními buňkami. Jednalo se o alfa-eno-lázu, RhoGDI2, annexin A10, catalázu, peroxiredoxin 2, tromomyosin 3 a lipocortin 1 (annexin 1). Tyto rozdílně expri-mované proteiny mohou ovlivňovat významné metabolické dráhy buněk, např. glykolýzu, nádorovou supresi, apoptózu, angiogenezi a metastazování [15].

### Diferenční gelová elektroforéza (2D-DIGE)

Z principu dvourozměrné gelové elektroforézy vychází další metoda, tzv. diferenční gelová elektroforéza (difference gel electrophoresis – 2D-DIGE). Poprvé byla popsána skupinou Jona Mindena [16]. Tato technika je založena na pre-elektroforetickém barvení vzorků fluorescenčními značkami (Cy2, Cy3 a Cy5), což

umožňuje současnou separaci až tří proteinových vzorků na jednom gelu. Jednotlivé vzorky (např. zdravá vs nemocná tkáň, případně i referenční vzorek) jsou označeny značkami lišícími se vlnovou délkou emitovaného a excitovaného světla. Následně jsou všechny vzorky spojeny a jako jediný směsný vzorek podstupují klasickou 2D-GE. Protože jsou proteinové vzorky separovány na stejném gelu současně, proteiny společně smíchaným vzorkům migrují společně, díky tomu je zvýšena reprodukovatelnost metody. Tato metoda takto částečně odstraní některé z nevýhod klasické 2D-GE [17].

Na základě 2D-DIGE byly Wangem a jeho skupinou popsány kvantitativní rozdíly u 194 proteinů mezi směsí vzorků krevní plazmy pacientů po alogenní transplantaci kostní dřene bez projevu reakce štěpu proti hostiteli a po projevu této reakce [18]. Skupina Y. J. Jianga pozorovala změny v proteinovém složení buněčných linií Burkittova lymfomu v závislosti na působení chemoterapie adriamycinu [19].

### Desorpce/ionizace laserem za přítomnosti matrice – hmotnostní spektrometrie (MALDI-MS)

Pro charakterizaci proteinů separovaných elektroforetickými metodami se velmi často využívá hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry – MS) s ionizací MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization – MALDI). Obecně, základním principem MS analýzy je přesné určení molekulové hmotnosti analyzovaných molekul, resp. jejich fragmentů. Proteiny jsou po gelové elektroforetické separaci vyříznuty z gelu a specificky naštěpeny proteázou, nejčastěji trypsinem, který štěpí proteiny v místě Lys a Arg. Takto vznikají peptidy o průměrné délce 10–30 aminokyselin, jejichž směs je pak podrobena MS analýze.

Prvním krokem hmotnostní analýzy je vždy ionizace. Při použití ionizace MALDI, která je jednou z nejčastěji používaných ionizačních technik pro MS analýzu biomolekul, je nejprve směs naštěpených peptidů smíchána s roztokem organické látky, obvykle derivátem aromatické karboxylové kyseliny (tzv. matrice), a nanesena na vzorkovací destičku. Po zaschnutí je vzorkovací destička vsunuta do ionto-

vého zdroje hmotnostního spektrometru. Vlastní ionizace je vyvolána krátkým pulzem laserového paprsku, jehož energii z velké části absorbuje matrice a šetrnou formou předá peptidům ve vzorku, aniž dojde k jejich nežádoucí fragmentaci. Peptidy během procesu MALDI přecházejí do plynné fáze převážně v podobě molekulových iontů. Dalším krokem je pak separace vzniklých iontů v hmotnostním analyzátoru. Nejčastěji používaným typem ve spojení s MALDI je průletový analyzátor (time-of-flight – TOF). Ionty jsou před vstupem do průletového analyzátoru urychleny v elektrickém poli tak, aby jim byla udělena stejná kinetická energie, a po průletu analyzátozem dopadají na detektor. Změřená doba letu iontů je závislá na jejich náboji a hmotnosti. Výsledkem analýzy je v tomto případě zjištění přesných molekulových hmotností jednotlivých peptidů (s přesností řádově v ppm). Naměřené molekulové hmotnosti naštěpených peptidů získaných z jednotlivých spotů na gelu jsou vstupními daty pro identifikaci proteinu pomocí databázového prohledávání, kdy jsou experimentální data srovnávána s daty vytvořenými *in silico* vyhledávacím programem z primárních sekvencí proteinů v dostupných proteinových databázích. Tento způsob identifikace proteinů se označuje jako peptidové mapování (peptide mass fingerprinting) [20].

Informace o primární sekvenci peptidů vedoucí k spolehlivější identifikaci proteinů na základě cíleně vytvořených fragmentů jednotlivých peptidů lze získat pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) [21].

### Desorpce/ionizace laserem z upravených povrchů SELDI-TOF-MS

Na rozdíl od MALDI využívá technika SELDI (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) speciálních vzorkovacích destiček (tzv. čipů) s různými chromatografickými povrchy umožňujícími úpravu vzorků přímo na destičce [22]. Malé množství vzorku je naneseno na čip, který selektivně váže různé subtypy proteinů v surovém vzorku pomocí adsorpce, elektrostatických nebo afinitních interakcí. Po krátké inkubaci jsou vhod-

ným puřrem a vodou odmyty nenavázané proteiny a nespecificky vázané látky [23].

Technika SELDI je takřka výhradně spojena s průletovým analyzátořem a využívá se k měření profilů, tzn. zastoupení peptidů a proteinů s nízkou Mr ve vzorcích (nejčastěji do Mr 20 kDa). Dostupné přístroje tohoto typu neumožňují identifikaci jednotlivých složek vzorku. Výhodou SELDI-TOF-MS je jeho relativně vysoká tolerance vůči nečistotám ve vzorcích, nízké požadavky na množství vstupního materiálu a minimální požadavky na přípravu vzorků pro analýzu [24]. K nevýhodám řadíme nepřímou identifikaci proteinů a menší citlivost pro proteiny s vysokou relativní molekulovou hmotností (> 20kDa).

Tato technika se nejčastěji využívá pro hledání potenciálních biomarkerů, zejména v oblasti nádorových onemocnění [25–26], ale je možno ji uplatnit i u dalších chorob, např. pro akutní mozkové příhody [27], tromboembolii [28], remodelaci arteriálních stěn při hypertenzi [29] a další. Díky tomuto přístupu byly také popsány specifické změny v proteomu např. kmenových buněk po nízkých dávkách radioaktivity v rámci terapie [30] nebo změny proteinového složení u AML buněk s FLT3-IDT mutací [31].

### MS identifikace proteinů s využitím vícerozměrné kapalinové chromatografie

Vedle dnes již klasické cesty identifikace proteinů pomocí elektroforetických separací a MALDI-MS popsané výše lze alternativně využít vícerozměrné separace peptidů pomocí kapalinové chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií a databázovým prohledáváním (multidimensional protein identification technology – MudPIT).

Technika MudPIT byla poprvé použita v Yatesově laboratoři [32]. Komplexní směs proteinů je štěpena v roztoku specifickou proteázou. Následně jsou naštěpené peptidy separovány dvou- či vícerozměrnou kapalinovou chromatografií [33]. Obvykle v prvním rozměru jsou peptidy separovány na základě náboje na kationtové koloně a poté jsou peptidy dle hydrofobicity rozděleny na koloně s reverzní fází. Eluované peptidy jsou *on-line* identifikovány pomocí tandemové hmot-

nostní spektrometrie využívající ionizaci elektrosprejem (electrospray ionization – ESI) [34]. Technikou ESI jsou peptidy ionizovány v kapalně fázi prostřednictvím spreje drobných kapiček, na který je vloženo napětí. V protiproudě sušícího plynu jsou pak odstraněny molekuly rozpouštědla a do analyzátoř hmotnostního spektrometru vstupují peptidy v podobě vícenásobně nabitých molekulových iontů. Tato ionizační metoda umožňuje přímé spojení MS se separací peptidů pomocí kapalinové chromatografie (liquid chromatography – LC). Schéma metody MudPIT je znázorněno na obr. 2. MudPIT umožňuje rychlou a simultánní separaci a identifikaci proteinů a peptidů v komplexní směsi [35]. Na druhou stranu MudPIT není vhodný pro sledování kvantitativních rozdílů exprese jednotlivých proteinů [36].

Koch et al popsali využití metody MudPIT k identifikaci nových proteinových interakcí onkogenu c-MYC, který kóduje transkripční faktor nezbytný pro indukci proliferace buněk, s cílem odhalit nové funkce a případně i dosud neznámé regulátory c-MYC. Identifikovali 221 proteinů spojených s c-MYC, z nichž jen u 17 bylo toto spojení známo. Mezi nově identifikovanými regulátory c-MYC patří např. DBC-1, FBX29, KU70, MCM7, Mi2-beta/CHD4, RNA Pol II, RFC2, RFC3, SV40 Large T Antigen, TCP1alpha, U5-116kD, ZNF281. Ektopicky exprimovaný FBX29 a E3 ubikvitinligáza snižují hladinu proteinu c-MYC a inhibují jeho transaktivaci, zatímco limitující množství FBX29 koncentraci c-MYC zvyšuje. Výsledky této skupiny naznačují, že c-MYC bez působení mitogenních transkripčních faktorů reguluje buněčnou proliferaci přímým spojením s proteinovými komplexy zahrnutými do různých syntetických procesů nutných pro dělení buňky. Komplexní popis sub-proteomu spojeného s c-MYC by mohl vysvětlit jeho regulaci [37].

Metoda MudPIT byla v oblasti hematologie využita také při charakterizaci proteinů krevních destiček v souvislosti s aterosklerotickým poškozením. Bylo určeno více než 300 proteinů krevních destiček zapojených do aktivace trombinu. Mezi nimi např. secretogranin III, cyclophilin A a calumenin, které byly identifikovány při arte-

rosklerotických změnách cév, ale ve zdravých cévách nalezeny nebyly [38].

### Kvantifikace pomocí hmotnostní spektrometrie

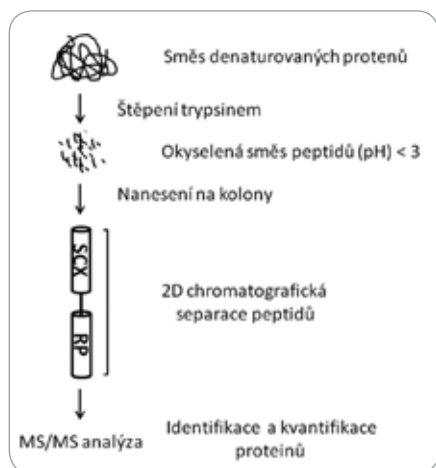
Výše zmíněné postupy poskytují jen nedostatečně přesné informace o kvantitě proteinů, např. kvůli relativně nízké reprodukovatelnosti (2D-GE). K překonání těchto nedostatků byly vyvinuty metody kvantifikace využívající hmotnostní spektrometrie, které současně umožňují i souběžnou identifikaci kvantifikovaných proteinů. Jsou to především metody založené na využití izotopicky rozdílných značek. Některé z nich jsou popsány níže.

### ICAT

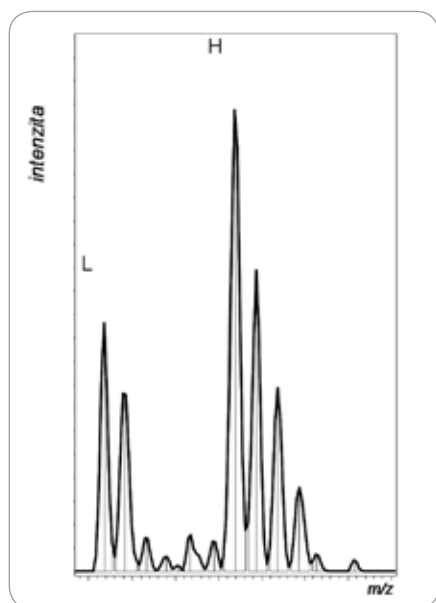
Historicky první metodou využívající izotopové značení byla metoda izotopově rozdílných afinitních značek (isotope coded affinity tags – ICAT) vyvinutá R. Ebersoldem a jeho kolegy na univerzitě ve Washingtonu v roce 1999 [39]. Princip této metody spočívá v označení dvou vzorků (např. pro porovnání zdravé a nemocné tkáně) různě „těžkými“ variantami značky vázajícími se na cystein („lehký“ a „těžký“ řetězec liší se přítomností izotopu, např. <sup>2</sup>H). Proteinové vzorky označené těmito činidly jsou následně smíchány a enzymaticky naštěpeny. Před MS analýzou jsou afinitně odděleny peptidy se značkou od ostatních peptidů neoznačených. Na základě odlišné molekulové hmotnosti použitých variant značky jsou analyzované peptidy v hmotnostním spektru snadno odlišitelné a kvantifikovatelné na základě poměru intenzit signálu (obr. 3).

Metoda ICAT využívající kapalinové chromatografické separace může být na rozdíl od elektroforetických metod s úspěchem využita ke kvantifikaci proteinů s extrémními pl, málo abundantních proteinů [40] i membránově vázaných proteinů [41]. Mezi nevýhody této metody patří neschopnost ICAT činidla se vázat na proteiny neobsahující cystein, což na druhé straně významně snižuje komplexitu vzorků a výsledků jejich MS analýzy [42].

Publikovaných výsledků získaných metodou ICAT v hematologii nebo onkologii zatím není mnoho. V oblasti onkologie Pawlik TM et al popsali identifikaci



**Obr. 2. Schéma metody multidimenzionální proteinové identifikace [66].** SCX – latexová kolona, RP – kolona s reverzní fází

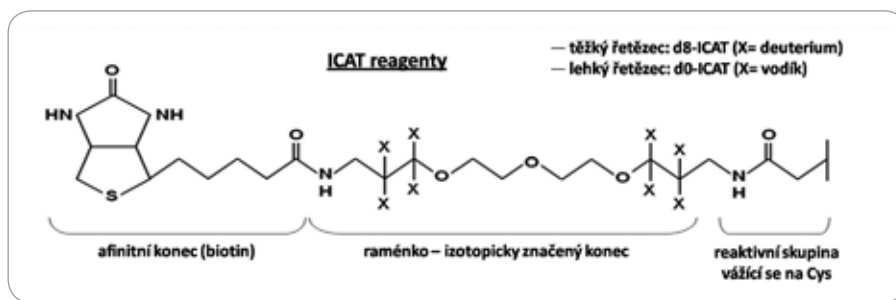


**Obr. 3b. Detail MS spektra s peptidem označeným „lehkou“ (L) a těžkou (H) variantou značky. Z poměru signálů lze určit změnu exprese odpovídajícího proteinu ve srovnávaných vzorcích.**

a kvantifikaci tumor specifických proteinů z aspirátů prsních bradavek žen v časném stadiu rakoviny prsu v porovnání se zdravými kontrolami [43]. Shiio Y et al publikovali efekt proteinu – produktu leukemického onkogenu Myc na proliferaci a morfologii buněk [44].

**SILAC**

Jiný přístup zahrnující relativní kvantifikaci proteinů představuje značení pro-



**Obr. 3a. Schéma ICAT reagentu [39].**

teinů pomocí izotopicky rozdílných aminokyselin během kultivace buněčných kultur (stable isotope labelling by amino acids in cell culture – SILAC). Bylo vyvinuto Matthiasem Mannem a jeho kolegy z univerzity v Jižním Dánsku v roce 2002 [45]. Do kulturačního média, které neobsahuje žádné aminokyseliny, jsou přidány esenciální izotopicky značené aminokyseliny (např. <sup>13</sup>C-arginin, <sup>13</sup>C-leucin), které jsou zabudovány do sekvence proteinů během jejich syntézy v průběhu kultivace. Opět se porovnávají buněčné vzorky v jednotlivých médiích obsahujících těžké nebo lehké formy aminokyselin. Z tohoto důvodu není nutné provádět značení proteinů chemicky nebo je přečišťovat afinitními metodami tak jako v případě ICAT. Tím je zajištěno, že porovnávané vzorky budou během celého experimentu vystaveny stejným podmínkám [46–47]. Porovnání obou metod je uvedeno na obr. 4.

Sun Y et al využili metodu SILAC k hledání rozdílů v proteinové expresi mezi zdravými a rakovinnými buňkami jater (buněčné linie HL-7702 vs HepG2 a SK-HEP-1). Identifikovali 116 potenciálních proteinových markerů, které jsou schopny odlišit rakovinné buňky jater od normálních [48]. Oveland et al, zabývající se stimulací receptoru tyrosinové kinázy FLT3 u buněk akutní myeloidní leukemie, využili metodu SILAC k identifikaci 375 proteinů, které snižují tvorbu receptoru FLT3 v AML buněčné linii THP-1. Dále popsali citlivost buněčných linií THP-1 s down-regulovaným FLT3 na idarubicin a vyslovili hypotézu, že indukovaný ligand modulující receptor může chemicky senzibilizovat některé podskupiny AML [49]. Liang X et al popsali díky této metodě kvantitativní změny spojené s fosforylací kinázy

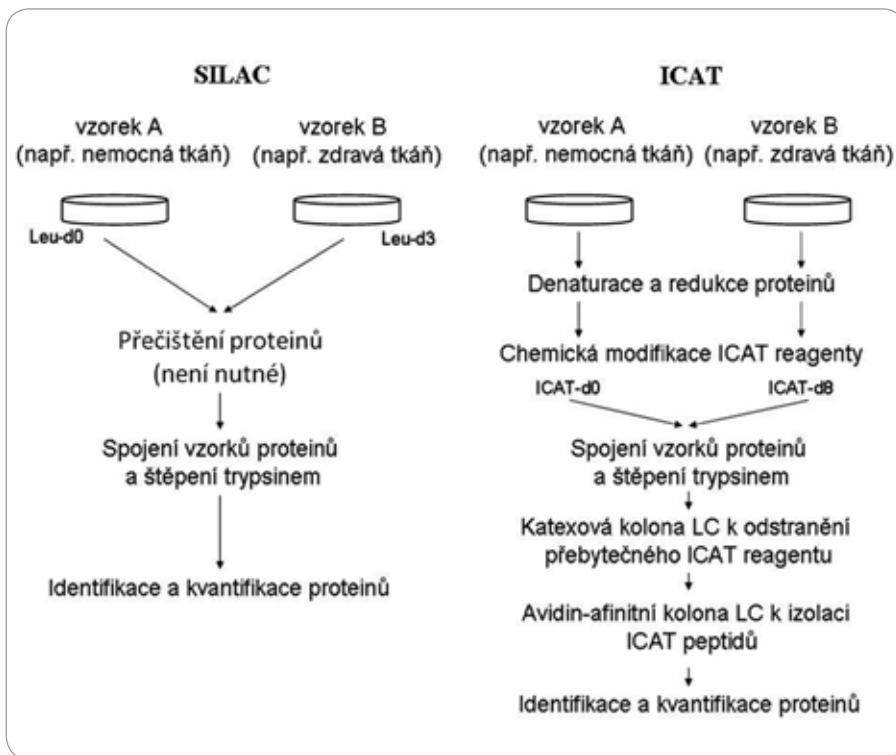
BCR-ABL a jejich substrátů v buňkách chronické myeloidní leukemie během odpovědi na léčbu. Demonstrovali až 90% redukcii fosforylace BCR-ABL kinázy a regulaci fosforylace dalších proteinů spojených s hematologickými chorobami (SHP-2, DOK2, SHC protein, protoonkogen B-lymfomů) v důsledku léčby imatinibem [50].

**iTRAQ**

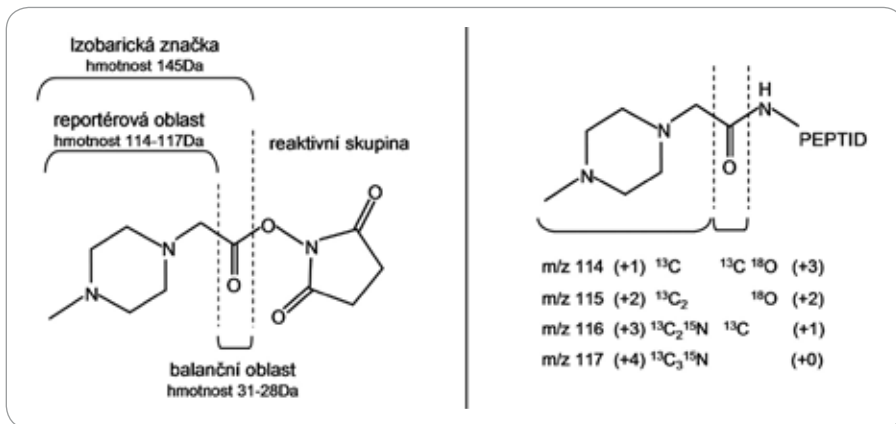
Nová třída izobarických reagentů (isobaric tags for relative and absolute quantitation – iTRAQ) byla vyvinuta Darrylem Papinem a jeho kolegy ve firmě Applied Biosystems. iTRAQ reagenty využívají až osmi izobarických značek o stejné celkové molekulové hmotnosti, kterými se může označit až osm různých proteinových vzorků. Tyto izobarické značky obsahují tři základní oblasti – reaktivní, balanční a reportérovou (obr. 5) [51]. Vzorky jsou označeny před proteolytickým štěpením nebo po něm, smíchány dohromady a analyzovány pomocí LC-MS/MS. Zatímco celková hmotnost značek se neliší, hmotnost reportérových iontů, které se odštěpují při MS/MS z jednotlivých značek, je rozdílná. Takto poměry intenzit jednotlivých reportérových iontů odpovídají relativnímu množství proteinu ve srovnávaných vzorcích [52–53].

Ho et al použili metodu iTRAQ k popisu změn v proteinové expresi rakovinných buněk s cílem objasnit, jakým způsobem se zvyšuje jejich metastázový potenciál. Použili čtyři buněčné linie metastázového modelu rakoviny prsu a z více než 1 000 detekovaných proteinů pozorovali 197 proteinů, které vykazaly odlišnou expresi v buňkách s metastatickým potenciálem. Jednalo se především o kinázy, na které jsou cílena některá léčiva, fostafatázy, proteázy a transkripční faktory. Cel-





Obr. 4. Schematické znázornění a porovnání metod SILAC a ICAT [45].



Obr. 5. Příklad 4 iTRAQ značek [51].

kový počet expresních změn byl rozložen rovnoměrně mezi jemnou (cca 30 %), střední (cca 40 %) a agresivní (cca 30 %) formu metastazujících buněk. K ověření takto získaných výsledků a k dalšímu studiu tato skupina dále využila proteinové čipy [54].

Vysvětlení vzniku metastazujících buněk se snažila objasnit i skupina A. Glena, která metodu iTRAQ použila při sledování buněčných linií rakoviny prostaty. Jako modelový příklad vybrali špatně metastazující buněčnou linii

LNCaP a její vysoce metastazující variantu LNCaP-LN3. Identifikovali 280 proteinů, mezi nimi např. kinázu CKBB (brain creatine kinase), rozpustnou formu catechol-O-metyltransferázy (catechol-o-methyl transferase – S-COMT), tumor reječní antigen gp96 a glukózu regulující protein o velikosti 78kDa (grp78) [55].

Chen Y et al studovali proteomické a fosfoproteomické změny v modelu MC-F10AT, buněčné linie progredující rakoviny prsu, s cílem identifikovat nové substráty tyrozinových kináz. Detekovali

57 proteinů zahrnujících tyrozinokinázy, fosfatázy a další signální proteiny, které podstupují fosforylaci během progresu onemocnění. Sedm z těchto proteinů (SPAG9, TOLLIP, WBP2, NSFL1C, SLC4A7, CYFIP1 a RPS2) bylo následně potvrzeno jako nové substráty tyrozinokináz. SPAG9, TOLLIP, WBP2 a NSFL1C byly dále identifikovány jako spolehlivé cíle signálního epidermálního růstového faktoru a léčiva gefitinibu. SLC4A7 a TOLLIP byly prokázány jako nové tyrozinokinázové substráty, které vykazují spojitost s vývojem rakoviny [56].

### Proteinové čipy

V současné době se pro studium proteinů vyvíjejí různé druhy technologií založené na čipové analýze. Proteinové čipy jako alternativa k běžným proteomickým přístupům se zdají být novou, nadějnou a vysoce kapacitní technikou pro studium proteomu [57]. Základy pro vývoj proteinových čipů položil Roger Ekins na konci 80. let [58]. Z hlediska použití lze proteinové čipy rozdělit na expresní (analytické) a funkční. Expresní čipy jsou používány pro stanovení přítomnosti a koncentrace proteinů v komplexních vzorcích a mají velký potenciál pro tzv. proteinové profilování, tj. monitorování proteinové exprese ve velkém měřítku („large-scale“ přístup). Pomocí funkčních proteinových čipů detekujeme interakce proteinů s jinými proteiny, peptidy, nízkomolekulárními látkami, oligosacharidy nebo nukleovými kyselinami [59]. Z hlediska složení lze odlišit dva základní formáty proteinových čipů. Podle navázaných molekul na povrchu čipu se dělí na proteinové (na svém povrchu mají navázané definované malé proteiny – substráty nebo modifikovaný povrch substrátů pro definované proteiny) nebo protilátkové (na svém povrchu mají navázané protilátky pro vybrané proteiny). Proteinové čipy mohou využívat také různé druhy povrchů – skleněná destička, porézní akrylamidový gel, membrány, mikrovlákná, na nichž jsou jednotlivé molekuly navázané [60]. Protilátkové čipy jsou navrženy k detekci specifických komponent komplexních vzorků. V případě krevní plazmy se na protilátky navázané na povrchu čipu vážou krevní antigeny obsažené v plazmě. Existují dvě metody detekce proteinové ex-

**Tab. 1. Porovnání metod založených na značení stabilními izotopy (upraveno dle [67]).**

	ICAT	SILAC	iTRAQ
používané stabilní izotopy	H/D; <sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C; <sup>16</sup> O/ <sup>18</sup> O; <sup>14</sup> N/ <sup>15</sup> N	<sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C	osm izobarických reagentů
cílová aminokyselina	cystein	lysín, arginin	N-konce primárních aminokyselin
aplikovatelné vzorky	neživé vzorky	tkáňové n. buněčné kultury	neživé vzorky
klinické vzorky (krev)	ano	ne	ano

prese, které využívá čipová analýza. Fluorescenční nebo radioaktivní značení se v prvním případě používá pro navázané antigeny, v druhém případě pro sekundární protilátku. První protilátka se váže na protein navázaný na čipu a následně se druhá „značená“ protilátka naváže na jinou oblast stejného proteinu [61–62].

Výhodou proteinových čipů je schopnost identifikovat jednotlivé izoformy proteinů, které mohou být kritické v patogenezi onemocnění, na druhou stranu největším problémem technologie proteinových čipů je zdroj použitelných molekul, zvláště u protilátkových čipů. Nejčastěji jsou využívány monoklonální protilátky, jejichž produkce je velmi drahá [63].

Analýzu proteinovými protilátkovými čipy využili Ghobrial a kolegové pro pochopení patogeneze lymfomu pláštěvých buněk (mantle cell lymfom – MCL) s výhledem na možné navržení nových terapií. Čipovou analýzou byla porovnáвана proteinová exprese CD19<sup>+</sup> B lymfocytů izolovaných ze zdravé tonsily s B lymfocyty pocházejícími z histologicky potvrzeného MCL. Bylo identifikováno kolem 90 proteinů vykazujících zvýšenou expresi u nádorových buněk. Mezi nimi byly identifikovány regulátory buněčného cyklu (RCC1, MDM2), kinázy (CR1K), chaperony (Hsp90, Hsp10) a regulátory fosfatáz (AKAP149, PP5, inhibitor 2). Zvýšená exprese vybraných polypeptidů identifikovaných pomocí čipů byla potvrzena imunoblottingem nebo imunohistochemicky [64].

Aktuálně byla metoda čipové analýzy využita pro validaci proteinových markerů reakce štěpu proti hostiteli po transplantaci kostní dřeně v práci autorů S. Paczesny et al [65]. Vzorky 466 pacientů s různými hematologickými maligními diagnózami, kteří podstoupili transplantaci kostní dřeně, vyšetřovali na protilát-

kových proteinových čipech. Pozorovali expresní změny u 120 vybraných proteinů. Statistickými metodami určili panel čtyř proteinů –  $\alpha$ -receptor interleukinu-2; receptor 1 tumor nekrotického faktoru, interleukin-8 a hepatocytární růstový faktor, který zřetelně oddělil skupiny pacientů postižené reakcí štěpu proti hostiteli a bez této komplikace [65].

### Závěr

Proteomika je dynamický obor, který se v posledních letech dostává do přední zájmu nejen molekulárních biologů a biochemiků, ale i lékařů. Díky proteomickým přístupům se prohloubily poznatky o významných metabolických nebo signálních procesech souvisejících s rozvojem onkologických nebo hematologických chorob a jejich komplikací.

Nové proteomické přístupy se pravděpodobně budou stále více uplatňovat v individuální péči o pacienta na několika úrovních: včasná detekce choroby, diagnóza s využitím proteinových markerů jako doplňku ke standardním vyšetřovacími metodám, individualizovaný výběr léčby jednotlivým pacientům, sledování účinnosti a toxicity léčby v čase a eventuální změny v léčbě na základě detekovaných změn v proteinovém profilu konkrétního pacienta. V blízké budoucnosti lze očekávat pokračování rychlého rozvoje proteomických technologií a nárůst počtu praktických výstupů pro klinické aplikace.

### Literatura

1. Trifonov EN. Earliest pages of bioinformatics. *Bioinformatics* 2000; 16(1): 5–9. Review.
2. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291(5507): 1304–51. Erratum in: *Science* 2001; 292(5523): 1838.
3. Wasinger VC, Cordwell SJ, Wilkins M et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 1995; 16(7): 1090–1094.
4. Matt P, Carrel T, White M et al. Proteomics in cardiovascular surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133(1): 210–214.

5. Wu W, Hu W a Kavanagh JJ. Proteomics in cancer research. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12: 409–423.
6. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005; 44(45): 7342–7372.
7. Han KK, Martinage A. Post-translational chemical modification(s) of proteins. *Int J Biochem* 1992; 24(1): 19–28. Review.
8. Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* 2004; 103(10): 3624–3634.
9. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 2006; 312: 221–217.
10. Righetti PG. Bioanalysis: its past, present, and some future. *Electrophoresis* 2004; 25(14): 2111–2127.
11. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4(12): 3665–3685.
12. Tannu NS, Hemby SE. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc* 2006; 1(4): 1732–1742.
13. Hanash SM, Strahler JR, Kuick R. Identification of a polypeptide associated with the malignant phenotype in acute leukemia. *J Biol Chem* 1988; 263(26): 12813–12815.
14. Cui JW, Wang J, He K et al. Two-dimensional electrophoresis protein profiling as an analytical tool for human acute leukemia classification. *Electrophoresis* 2005; 26(1): 268–279.
15. López-Pedrera C, Villalba JM, Siendones E et al. Proteomic analysis of acute myeloid leukemia: Identification of potential early biomarkers and therapeutic targets. *Proteomics* 2006; 6(1): 293–299.
16. Unlü M, Morgan ME, Minden JS. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 1997; 18(11): 2071–2077.
17. Lilley KS. 2D DIGE. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. Part 3. Proteomics 3.2. John Wiley & Sons 2005.
18. Wang H, Clouthier SG, Galchev V et al. Intact-protein-based high-resolution three-dimensional quantitative analysis system for proteome profiling of biological fluids. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4(5): 618–625.
19. Jiang YJ, Sun Q, Fang XS et al. Comparative mitochondrial proteomic analysis of Rji cells exposed to adriamycin. *Mol Med* 2009; 15(5–6): 173–182.
20. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT et al. Identifying proteins from 2-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 5011–5015.
21. Rajcevic U, Niclou SP, Jimenez CR. Proteomics strategies for target identification and biomarker discovery in cancer. *Front Biosci* 2009; 14: 3292–3303.
22. Wu HM, Jin M, Marsh CB. Toward functional proteomics of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288(4): L585–L595.
23. Traum AZ, Schachter AD. Transplantation proteomics. *Pediatr Transplant* 2005; 9(6): 700–711.
24. Wiesner A. Detection of tumor markers with Protein-Chip technology. *Curr Pharm Biotechnol* 2004; 5(1): 45–67.

25. Holcakova J, Herynochova L, Bouchal P et al. Identification of alphaB-crystallin, a biomarker of renal cell carcinoma by SELDI-TOF MS. *Int J Biol Markers* 2008; 23(1): 48–53.
26. Brozkova K, Budinska E, Bouchal P et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight proteomic profiling of breast carcinomas identifies clinicopathologically relevant groups of patients similar to previously defined clusters from cDNA expression. *Breast Cancer Res* 2008; 10(3): R48.
27. Zhang X, Guo T, Wang H et al. Potential biomarkers of acute cerebral infarction detected by SELDI-TOF-MS. *Am J Clin Pathol* 2008; 130(2): 299–304.
28. Hong M, Zhang X, Hu Y et al. The potential biomarkers for thromboembolism detected by SELDI-TOF-MS. *Thromb Res* 2009; 123(3): 556–564.
29. Delbosc S, Haloui M, Louedec L et al. Proteomic analysis permits the identification of new biomarkers of arterial wall remodeling in hypertension. *Mol Med* 2008; 14(7–8): 383–394.
30. Zhang YQ, Li W, Wang GJ et al. Effect of low dose radiation on human bone marrow mesenchymal stem cells by using proteomic analysis. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2008; 16: 151–155.
31. Scholl S, Melle C, Bleul A et al. Specific pattern of protein expression in acute myeloid leukemia harboring FLT3-ITD mutations. *Leuk Lymphoma* 2007; 48(12): 2418–2423.
32. Liu H, Lin D, Yates JR 3rd. Multidimensional separations for protein/peptide analysis in the post-genomic era. *Biotechniques* 2002; 32(4): 898–902.
33. Sun S, Lee NP, Poon RT et al. Oncoproteomics of hepatocellular carcinoma: from cancer markers' discovery to functional pathways. *Liver Int* 2007; 27(8): 1021–1038.
34. Delahunty CM, Yates JR 3rd. MudPIT: multidimensional protein identification technology. *Biotechniques* 2007; 43(5): 563–569.
35. Maurya P, Meleady P, Dowling P et al. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. *Anticancer Res* 2007; 27(3A): 1247–1255.
36. McDonald WH, Yates JR 3rd. Shotgun proteomics and biomarker discovery. *Dis Markers* 2002; 18(2): 99–105.
37. Koch HB, Zhang R, Verdoodt B et al. Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle* 2007; 6(2): 205–217.
38. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004; 103(6): 2096–2104.
39. Gygi SP, Rist B, Aebersold R et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol* 1999; 17(10): 994–999.
40. Washburn MP, Wolters D, Yates JR 3rd. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 242–247.
41. Han DK, Eng J, Zhou H et al. Quantitative profiling of differentiation-induced microsomal proteins using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 946–951.
42. Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot* 2006; 57(7): 1501–1508.
43. Pawlik TM, Hawke DH, Liu Y et al. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein. *BMC Cancer* 2006; 6: 68.
44. Shiio Y, Donohoe S, Yi EC et al. Quantitative proteomic analysis for Myc oncoprotein function. *EMBO J* 2002; 21: 5088–5096.
45. Ong SE, Blagoev B, Mann M et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1(5): 376–386.
46. Ong SE, Foster LJ, Mann M. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods* 2003; 29(2): 124–130.
47. Mann M. Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(12): 952–958.
48. Sun Y, Mi W, Cai Jet al. Quantitative proteomic signature of liver cancer cells: tissue transglutaminase 2 could be a novel protein candidate of human hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2008; 7(9): 3847–3859.
49. Oveland E, Gjertsen BT, Wergeland L et al. Ligand-induced Flt3-downregulation modulates cell death associated proteins and enhances chemosensitivity to idarubicin in THP-1 acute myeloid leukemia cells. *Leukemia Research* 2009; 33(2): 276–287.
50. Liang X, Hajivandi M, Veach D et al. Quantification of change in phosphorylation of BCR-ABL kinase and its substrates in response to Imatinib treatment in human chronic myelogenous leukemia cells. *Proteomics* 2006; 16(6): 4554–4564.
51. Ross PL, Huang YN, Marchese JN et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3(12): 1154–1169.
52. Gafken PR, Lampe PD. Methodologies for characterizing phosphoproteins by mass spectrometry. *Cell Commun Adhes* 2006; 13(5–6): 249–262.
53. Aggarwal K, Choe LH, Lee KH. Shotgun proteomics using the iTRAQ isobaric tags. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006; 5(2): 112–120.
54. Ho J, Kong JW, Choong LY et al. Novel Breast Cancer Metastasis-Associated Proteins. *J Proteome Res* 2009; 8(2): 583–594.
55. Glen A, Gan CS, Hamdy FC et al. iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression. *J Proteome Res* 2008; 7(3): 897–907.
56. Chen Y, Choong LY, Lin Q et al. Differential expression of novel tyrosine kinase substrates during breast cancer development. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(12): 2072–2087.
57. Collinsová M, Jiráček J. Current Development in Proteomics. *Chem Listy* 2004; 98: 1112–1118.
58. Ekins R, Chu F, Biggart E. Multispot, multianalyte, immunoassay. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990; 48(9): 655–666.
59. Malčíková J, Tichý B, Kotašková J et al. Od genomu k proteomu – využití proteinových čipů v onkologii. *Klin onkol* 2006; 19 (Suppl): 346–350.
60. Hayduk EJ, Choe LH, Lee KH. Proteomic tools in discovery-driven science. *Current Science* 2002; 17 (83): 840–844.
61. Smith L, Lind MJ, Welham KJ et al. Cancer proteomics and its application to discovery of therapy response markers in human cancer. *Cancer* 2006; 107(2): 232–241.
62. Herosimczyk A, Dejeans N, Sayd T et al. Plasma proteome analysis: 2D gels and chips. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57 (Suppl 7): 81–93.
63. Pierce JD, Fakhari M, Works KV et al. Understanding proteomics. *Nurs Health Sci* 2007; 9(1): 54–60.
64. Ghobrial IM, McCormick DJ, Kaufmann SH et al. Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray. *Blood* 2005; 105(9): 3722–3730.
65. Paczesny S, Krijanovski OI, Braun TM et al. A biomarker panel for acute graft-versus-host disease. *Blood* 2009; 113(2): 273–278.
66. Whitelegge JP. Plant proteomics: BLASTing out of a MudPIT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(18): 11564–11566.
67. Chen EI, Yates JR. Cancer Proteomics by Quantitative Shotgun Proteomics. *Mol Oncol* 2007; 1(2): 144–159.

# Studie evaporace vybraných cytostatik a propustnosti ochranných rukavic v rámci výzkumu profesní zátěže zdravotnických pracovníků exponovaných cytotoxickým protinádorovým léčivům (projekt CYTO)

Evaporation of Selected Cytotoxic Drugs and Permeation of Protective Gloves – Research into the Occupational Risks of Health Care Personnel Handling Hazardous Cytotoxic Drugs (CYTO Project)

Doležalová L.<sup>1</sup>, Odráška P.<sup>1,2</sup>, Gorná L.<sup>1</sup>, Prudilová M.<sup>1</sup>, Vejpustková R.<sup>1</sup>, Bláha L.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústavní lékárna, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup> RECETOX, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

## Souhrn

**Východiska:** Projekt CYTO studuje významný aspekt poskytování zdravotní péče, kterým je profesní zátěž pracovníků dlouhodobě nakládajících látkami s rizikem karcinogenity a mutagenity v prahových a podprahových expozicích s hlavním akcentem na často používaná protinádorová léčiva. V tomto příspěvku jsou představeny výsledky prvních fází experimentální práce projektu, tj. studie fyzikálně-chemických charakteristik cytostatik (evaporační charakteristiky) a propustnosti ochranných rukavic. **Materiál a metody:** Ve spolupráci s výzkumným ústavem IUTA (Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V., Duisburg, Německo) byla hodnocena tenze par paklitaxelu, doxorubicinu a dakarbazinu. Měření bylo realizováno efuzní metodou pomocí vah pro měření tlaku par. V praxi byl evaporační potenciál cytostatických léčiv ověřen stanovením jejich koncentrací ve vzduchu pracovního prostředí za využití metod pasivního vzorkování. Kromě evaporace vybraných léčiv byla také stanovena prostupnost cisplatinu, cyklofosfamidu, doxorubicinu, fluorouracilu a paklitaxelu přes různé typy rukavic (vinyl, latex a nitril). **Výsledky:** Realizované experimenty prokázaly relativně pomalou evaporaci studovaných cytostatik (nejvyšší tlak páry stanoven pro paclitaxel: 0,024 Pa), nicméně v případě dosažení rovnovážného stavu mohou koncentrace ve vnitřním prostředí dosáhnout hodnot řádově až několika miligramů/m<sup>3</sup>. Reálná měření však tyto koncentrace v pracovním ovzduší nepotvrdily. Zkoušky prostupnosti cytostatik přes rukavice prokázali dobrou odolnost nitrilových rukavic (průnik nebyl pozorován ani u jednoho léčiva). Ostatní materiály nelze pro práci s cytostatiky doporučit (např. propustnost latexu pro cyklofosfamid činila až 19 µg/cm<sup>2</sup>/hod). **Závěr:** Ačkoli je volatilita cytostatik nízká, vzhledem k chronickému charakteru expozice ji nelze zanedbat. Pro odhad skutečných expozic pracovníků je však třeba zaměřit pozornost na vývoj citlivých analytických metod. Za hlavní cestu příjmu cytostatik je považován přestup přes kůži a používání ochranných rukavic je nutné pro minimalizaci možných rizik. Naše simulované časově-závislé experimenty prostupnosti cytostatik různými typy ochranných rukavic ukázaly, že dobrou ochranu zaručují pouze nitrilové rukavice. Získané výsledky budou využity pro modelování expozičních dávek a výpočet rizika v dalších fázích řešení projektu CYTO.

## Klíčová slova

cytostatika – odpařování – ochranné rukavice – bezpečnost práce

Práce byla podpořena grantovým projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v rámci národního programu výzkumu II (CYTO 2B06171).

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



PharmDr. Lenka Doležalová  
Ústavní lékárna  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: dolezalova@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 9. 12. 2008  
Přijato/Accepted: 16. 7. 2009



## Summary

**Backgrounds:** The CYTO project studies an important aspect of healthcare provision -long-term occupational exposure, both threshold and below-threshold, to chemical agents with carcinogenic and mutagenic properties, with the major focus on antineoplastic drugs. This contribution presents experimental results from the first stages of the project's experimental work, i.e. an evaluation of the physico-chemical characteristics of cytostatic agents (evaporation) and an investigation into protective glove permeation. **Materials and Methods:** In co-operation with IUTA (Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V., Duisburg, Germany), the vapour pressure of paclitaxel, doxorubicin and dacarbazine was measured following OECD guideline No. 104: Vapour pressure curve – vapour pressure balance. Furthermore, the evaporation of cytostatic drugs was examined in actual laboratory conditions by monitoring the airborne concentration using the passive sampling technique. Besides the evaporation of selected drugs, the permeation of cisplatin, cyclophosphamide, doxorubicin, 5-fluorouracil and paclitaxel through different types of gloves (vinyl, latex, nitrile) was assessed. **Results:** Although our experiments showed relatively slow evaporation of the evaluated cytostatic drugs (the highest pressure in paclitaxel was 0.024 Pa), equilibrium concentrations may go up to milligrams per cubic metre. Nevertheless, analytical measurements of airborne contamination did not confirm these concentration levels. The glove permeation experiments with cytostatics showed good resistance of nitrile gloves (which were impermeable to all five drugs). Other materials should be avoided while handling cytostatic agents (e.g. maximum permeation of cyclophosphamide through latex was 19 µg/sq cm/hr). **Conclusion:** Although the volatility of cytostatic agents is low, it cannot be neglected considering the chronic character of exposure. However, in order to estimate actual occupational exposure, future research should focus on the development of sensitive analytical methods. Nevertheless, dermal uptake is supposed to be the major route of exposure and use of protective gloves is necessary to minimize potential risks. Our simulated time-dependent permeation experiments with cytostatic agents and different glove materials showed that good protection is provided only by nitrile gloves. The results obtained in this study will be used for the modelling of exposure doses and health risk assessment in the subsequent stages of the CYTO research project.

## Key words

cytostatics – vaporization – protective gloves – occupational safety

## Úvod

Chemoterapeutické látky (CL) vykazují mimo vlastní akutní toxicitu i vážné, dlouhodobé efekty jako karcinogenitu, mutagenitu, teratogenitu, hypersenzitivní reakce, endokrinní a imunní supresivní účinky [1–3]. Přestože naše legislativa ukládá povinnost kontroly kontaminace pracovního prostředí [4] a v literatuře lze nalézt odkazy na metody pro měření kontaminace při práci s CL [5], do běžné praxe nebyl doposud systematický monitoring zaveden. Při hodnocení zdravotních rizik vycházíme z obecného konsenzu bezprahového působení CL (dáno mutagenními a karcinogenními účinky) a základním principem omezení rizik je snaha o snížení expozice na co nejmenší dosažitelnou úroveň [6]. Nejčastější praxí je, že pracovníci jsou odkázáni na dodržování pracovních postupů a jsou školeni pro případy úniku kontaminace a havárie.

V literatuře lze najít informace o expozici cytostatikům u různých zdravotnických pracovníků podílejících se na výrobě, přípravě a aplikaci těchto léčiv [7–10]. Kromě přímých expozic se studují také expozice nepřímé, ke kterým dochází při manipulacích s kontaminovaným materiálem, jako jsou obaly léčiv, ložní prádlo z lůžkových oddělení či odpady vznikající při sanitaci pracovního

prostředí a hygienických zařízení [11–12]. I přes některé existující vědecké studie máme v našich podmínkách jen minimum dostupných informací o možných expozicích pracovníků. Na rozdíl např. od práce s ionizujícím zářením neexistují pro CL žádné dozimetrie pro kontrolu expozice (kontaminace přijaté pracovníkem), ať už při přípravě CL, manipulaci s lahvičkami CL, připravenými infuzemi, či kontrolu kontaminace pracovního prostředí izolátoru, přípravny CL, skladu CL, aplikačního křesla apod. I přes řadu výzkumných prací není doposud k dispozici jednotná metodika hodnocení rizik a sledování expozice CL. Tato problematika je aktuálním předmětem výzkumu v Evropě [13] i v ČR prostřednictvím projektu CYTO (grant 2B06171 podporovaný MŠMT v rámci Národního programu výzkumu II v letech 2006–2010, <http://www.cytostatika.cz>).

Významným faktorem, který ovlivňuje zdravotní rizika CL, je vlastní příjem – tedy vstup cytostatik do organismu. Na biologickém příjmu cytostatik při profesních expozicích se může podílet několik cest [14] – především dermální expozice, inhalace cytostatik ve formě aerosolu nebo par a orální příjem (např. při nedůsledném dodržování hygienických standardů či náhodnou ingestí při mimořádných, havarijních událostech).

Konkrétní dávky CL uvnitř exponovaného organismu lze obtížně experimentálně stanovit. Pro jejich odhad lze však využít vhodných modelů expozice, které zohledňují (i) koncentrace látek v pracovním prostředí, (ii) parametry osudu látek (např. stabilita, evaporace a mobilita, prostupnost přes epitel, metabolismus atd.) a (iii) parametry chování exponovaných osob (např. pobyt v kontaminovaném prostředí, četnost a doba kontaktu s kontaminovaným povrchem atd.). Kombinace těchto vstupních údajů ve vhodném modelu pak dovoluje realisticky odhadnout specifickou expoziční dávku, jež je základem výpočtu možného rizika [15].

I přes existenci některých dílčích studií [16–18] chybí doposud detailnější charakterizace fyzikálně-chemických vlastností a dalších parametrů, které ovlivňují např. uvolňování cytostatik v pracovním prostředí a jejich vstupy do exponovaných osob. V tomto příspěvku jsou prezentovány výsledky našich experimentálních prací, které se zaměřily na studium evaporace cytostatik (s ohledem na výzkum možné respirační expozice CL), a studie prostupnosti CL přes různé typy ochranných rukavic (pro racionální odhad expozice dermální cestou). Nové výsledky jsou využitelné pro praktický management (nutnost užívání ochranných rukavic ze specifických materiálů a jejich pravidelné výměny), ale

**Tab. 1. Evaporační charakteristiky vybraných cytostatik (paklitaxelu, doxorubicinu a dakarbazinu) v porovnání s parametry pro vodu a ethanol.**

	Tlak páry (Pa) <sup>1</sup>	Rovnovážná koncentrace <sup>2</sup> (mg/m <sup>3</sup> , 20 °C)
paklitaxel	0,024	7,89
doxorubicin	0,002	0,45
dakarbazin	0,004	0,28
voda	2 337	17 300
ethanol	5 851	110 600

<sup>1</sup> stanovení pomocí metodiky OECD 104<sup>2</sup> vypočtená koncentrace s využitím naměřených hodnot tlaku par [22]

spolu s výstupy navazujících výzkumných aktivit (sledování hladin kontaminace CL na konkrétních zdravotnických pracovištích) poslouží také pro racionální výpočty případných zdravotních rizik.

## Materiál a metody

### Evaporace cytostatik

Důležitým parametrem pro posuzování evaporace chemických látek je tlak nasycených par (TP). Pro naše výzkumy byly vybrány CL z chemicky a strukturně různých skupin (tab. 1). Ve spolupráci s IUTA (Institut für Energie- und Umweltechnik e.V., Duisburg, Německo) bylo provedeno experimentální stanovení evaporace paklitaxelu, doxorubicinu a dakarbazinu dle normované metodiky podle OECD [19]).

### Studie výskytu CL ve vnitřním ovzduší

Návazně na výzkum evaporačních charakteristik byla realizována pilotní studie

sledování CL ve vnitřním ovzduší Masarykova onkologického ústavu v Brně, která měla za cíl ověřit možné metody sledování kontaminace vzduchu. Ve spolupráci s výzkumným centrem RECETOX na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity v Brně bylo provedeno vzorkování vzduchu za pomoci pasivních vzorkovačů založených na bázi polyuretanových filtrů [20]. Vzorkovače byly instalovány do prostor místností intenzivně využívaných k práci s CL (přípravna a sklad CL ústavní lékárny MOÚ a denní stacionář MOÚ, obr. 1), jako negativní kontrola sloužila místnost s jiným využitím a bez kontaminační zátěže (přednášková místnost centra RECETOX, PŘF MU). Filtry vzorkovačů byly exponovány 30 dnů, extrahovány a analyzovány na přítomnost fluorouracilu (UV-fluorescence), cisplatinu (atomová absorpční spektrometrie), doxorubicinu a paklitaxelu (vy-

sokoučinná kapalinová chromatografie, high performance liquid chromatography – HPLC) na společném pracovišti projektu CYTO (společnost Pliva-Lachema a.s., Brno).

### Hodnocení propustnosti rukavic pro CL

Použitá testovací metoda byla založena na měření přestupu studovaných CL z roztoků (připraveny z odpovídajících léčivých přípravků) přes vzorek zkoušených rukavic (vinyl, latex o různé síle, nitril) do receptorového media (pufrovací roztok). Kinetické experimenty byly prováděny po dobu celkem šesti hodin při 30 °C (simulace teploty na povrchu kůže). Detekce a kvantifikace CL v receptorovém mediu byla uskutečněna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na pracovišti MOÚ (Acquity UPLC, Waters). Separace byla provedena na reverzní stacionární fázi (BEH C18 2,1 × 50 cm, průměr částic 1,7 μm) metodou využívající gradientu obsahu acetonitrilu v 7mM fosfátovém pufru (pH = 3) jdoucím od 22 do 47%. K detekci a kvantifikaci analytů byly použity chromatografické záznamy pořízené při λ = 195 (cyklofosamid), 230 (doxorubicin, paklitaxel) a 265 nm (fluorouracil).

Ke stanovení cisplatinu bylo využito atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (Perkin-Elmer 3030/HGA 500) a bylo realizováno na společném pracovišti (Pliva-Lachema, a.s., Brno).



**Obr. 1. Aplikace metody pasivního vzorkování vzduchu při sledování přítomnosti cytotoxických léčiv v prostorách Masarykova onkologického ústavu, Brno. A – Umístění pasivních vzorkovačů v přípravně cytostatik, B – Umístění vzorkovačů v denní stacionáři, C – Detailní pohled na pasivní vzorkovač.**

**Tab. 2. Čas průniku a permeované (prostoupené) množství vybraných cytostatik přes vinylové, latexové a nitrilové rukavice. Pro každou látku je prezentována dávka, která odpovídá koncentracím používaným v aplikačních dávkách sledovaných léčiv.**

	Dávka [mg/cm <sup>2</sup> ]	První čas průniku [min]			Permeované množství* [µg/cm <sup>2</sup> ]		
		vynyl [0,12 mm]	latex [0,12–0,30 mm]	nitril [0,14 mm]	vynyl [0,12 mm]	latex [0,12–0,30 mm]	nitril [0,14 mm]
cyklofosfamid	9	60	60–360	n. d.	32	1–19	< LOD
paklitaxel	3	240	n. d.	n. d.	0,6	< LOD	< LOD
cisplatina	0,5	n. d.	n. d.	n. d.	< LOD	< LOD	< LOD
doxorubicin	1	n. d.	n. d.	n. d.	< LOD	< LOD	< LOD
fluorouracil	22	n. d.	n. d.	n. d.	< LOD	< LOD	< LOD

\*Celkové množství CL prošlé materiálem za 6 hod, LOD – limit detekce pro jednotlivá léčiva (560 ng/cm<sup>2</sup> cyklofosfamid, 90 ng/cm<sup>2</sup> paklitaxel, 90 ng/cm<sup>2</sup> cisplatina, 130 ng/cm<sup>2</sup> doxorubicin, 80 ng/cm<sup>2</sup> fluorouracil), n. d. – nelze definovat (během šestihodinové studie nebyl pozorován průnik studované látky)

## Výsledky a diskuze

V první fázi projektu byla řešena problematika fyzikálních vlastností vybraných cytostatik, konkrétně evaporace, tedy schopnosti pevných látek se odpařovat [21–22]. Naše studie stanovení tlaku nasycených par (TP) se zaměřila na vybraná strukturně odlišná cytostatika a získané hodnoty TP (tab. 1) se řádově pohybovaly od 10<sup>-3</sup> do 10<sup>-2</sup> Pa. Předchozí, omezené literární údaje, které popisovaly studie s fluorouracilem, cisplatinou nebo karmustinem [17,22], ukázaly, že TP těchto sloučenin nejsou zcela zanedbatelné, a pokud dojde k jejich vstupu do pracovního prostředí, lze je v určitých koncentracích očekávat také v ovzduší. Získané hodnoty TP cytostatik se v porovnání s vodou a etanolem jeví jako nízké (tab. 1), nicméně i tyto nízké hodnoty indikují potenciál přechodu CL z pevné či kapalně fáze do ovzduší, a tedy možnou kontaminaci vzduchu v pracovním prostředí. Tab. 1 ukazuje také převod hodnot TP na koncentrace, které mohou dosahovat až 7,9 mg/m<sup>3</sup>.

S ohledem na získané výsledky jsme dále realizovali ověřovací pilotní studii sledování CL ve volném pracovním prostředí. Byly využity pasivní vzorkovače na bázi polyuretanových filtrů [20] vyvinuté ve Výzkumném centru RECETOX na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity. Princip pasivního vzorkování je založen na utváření a udržování rovnováhy mezi plynnou fází a fází sorbovanou na pevnou matici a je uplatňován např.

při dlouhodobém monitoringu prostředí, kdy poskytuje integrující informaci o zátěži a svou podstatou eliminuje jednorázové krátkodobé výkyvy v hladinách sledovaných sloučenin [23]. Analýzy všech sledovaných CL (fluorouracilu, cisplatinu, doxorubicinu a paklitaxelu) byly v této pilotní studii negativní (koncentrace pod limitem detekce použitých metod). Předchozí literární studie však ukázaly, že s využitím velmi citlivých metod (např. voltametrie nebo hmotnostní spektrometrie [9,22,24–27], které nebyly pro naši práci k dispozici, lze v ovzduší v některých případech prokázat detekovatelná množství například cyklofosfamidu (0,02–13 µg/m<sup>3</sup> [22,26–27]) nebo fluorouracilu (0,04–6,3 µg/m<sup>3</sup> [9,25]). Problematika vzdušné kontaminace pracovního prostředí z hlediska profesní expozice CL tedy zůstává otevřena a další výzkum v této oblasti by měl směřovat jak k vývoji nových a citlivějších detekčních metod, tak k optimalizaci vzorkovacích a analytických postupů [7].

Vedle potenciálního vstupu CL do organismu respirační kontaminovaného vzduchu je při profesní expozici další významnou cestou vstupu dermální kontakt a přestup CL přes kůži. Lidské ruce jsou nejvíce exponovanou částí těla nejen při přípravě CL, ale již při příjmu a skladování těchto léčiv, jakož i při aplikaci chemoterapie pacientům, při likvidaci havárií nebo sanitaci či manipulaci s lůžkovinami a exkrety onkologických pacientů [27–29]. Na kvalitu ochranných rukavic by tedy měl

být kladen značný důraz a zdravotníci pracovníci by měli znát vlastnosti a kvalitu jednotlivých typů rukavic.

V rámci námi řešeného projektu bylo provedeno hodnocení propustnosti několika typů ochranných rukavic pro cytostatika. Výsledky prostupnosti pěti nejčastěji používaných CL přes tři typy rukavic, shrnuté v tab. 2, potvrzují, že prostupnost rukavic pro vybraná léčiva závisí jak na konkrétním léčivu, tak na výrobním materiálu a také tloušťce vrstvy tohoto materiálu. Ze zkoušených rukavic byly jako nejúčinnější bariéra pro přestup cytostatik identifikovány rukavice nitrilové, u kterých nebyl pozorován průnik ani jednou z vybraných látek. U vinylových a latexových rukavic byl zjištěn průnik cyklofosfamidu a paklitaxelu. Cisplatina, doxorubicin a fluorouracil nepronikaly ani jedním ze zkoušených materiálů. Pozorované hodnoty prostupnosti (např. první prostupnost cyklofosfamidu přes vinyl po 60 min, celkové množství až 19 µg/cm<sup>2</sup>) ukazují, že pro zajištění ochrany zdravotnických pracovníků před expozicí CL je nutné využívat jen některé z materiálů (tj. nitrilové rukavice [30]) a také zajistit pravidelnou a častou výměnu ochranných rukavic. Naopak nejméně vhodné pro manipulaci s CL jsou velmi rozšířené a často používané rukavice vinylové. Při edukaci, zaškolování a také kontrole pracovníků různých profesí v lékařských zařízeních je tedy třeba zdůrazňovat používání a časté výměny rukavic nejen při přímé manipulaci s CL, ale i při úklidových a sanačních

činnostech vykonávaných v prostorách s potenciální kontaminací CL (přípravna, aplikační místnost, lůžková oddělení, hygienická zařízení pro onkologické pacienty atd. [7]).

## Závěr

Projekt CYTO je v ČR první výzkumnou aktivitou, jejímž cílem je prakticky orientovaný výzkum cytotoxických látek s hlavním akcentem na poznání jejich vlastností, hladin a možných zdravotních rizik u profesně exponovaných osob. Naše experimenty přinesly nové informace o hodnotách nasycených tlaků par cytostatik, které indikují malý, ale nezanedbatelný evaporační potenciál cytostatik. Získané hodnoty mohou být dále využity pro odhady hladin CL v pracovním ovzduší konkrétních pracovišť s využitím matematických modelů. Navazující pilotní studie s využitím pasivních vzorkovačů neprokázala významné koncentrace cytostatik v pracovním ovzduší, avšak literární údaje založené na velmi citlivých metodikách stanovení prokazují výskyt CL v ovzduší (např. ve formě aerosolu nebo vázaných na prachové částice [9,24–27]). Experimenty prostupnosti CL přes rukavice ukázaly, že dobrou ochranu zaručují především rukavice nitrilové, jejichž používání a časté výměny je třeba vyžadovat nejen u pracovníků přípravy CL, ale také např. u zdravotních sester, pracovníků sanitace atd. Získané informace budou v dalších fázích projektu kombinovány s výsledky analýz CL na konkrétních zdravotnických pracovištích (stěry z povrchů [31–33]) a dále využity pro výpočty a rovněž management zdravotních rizik profesně exponovaných pracovníků.

## Literatura

1. IARC. Some antineoplastic and immunosuppressive agents. Vol. 26. IARC. Lyon, Francie, 1981.

2. IARC. Evaluation of carcinogenic risk to humans: Pharmaceutical drugs. Vol. 50. IARC. Lyon, Francie, 1990.  
 3. IARC. Some antiviral and antineoplastic drugs, and other pharmaceutical agents. Vol. 76. Lyon, Francie, 1999.  
 4. §18 nařízení vlády č. 361/2007 Sb., kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci.  
 5. Sessink PJM, Bos RP. Drugs hazardous to healthcare workers. Evaluation of methods for monitoring occupational exposure to cytostatic drugs. *Drug Safety* 1999; 20(4): 347–359.  
 6. §7 zákona č. 309/2006 Sb., kterým se upravují další požadavky bezpečnosti a ochrany zdraví při práci v pracovněprávních vztazích a o zajištění bezpečnosti a ochrany zdraví při činnosti nebo poskytování služeb mimo pracovněprávní vztahy (zákon o zajištění dalších podmínek bezpečnosti a ochrany zdraví při práci).  
 7. Turci R, Sottani C, Ronchi A et al. Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents. *Toxicol Lett* 2002; 134(1–3): 57–64.  
 8. Nygren O, Gustavsson B, Ström L et al. Exposure to anti-cancer drugs during preparation and administration. Investigations of an open and a closed system. *J Environ Monit* 2002; 4(5): 739–742.  
 9. Micoli G, Turci R, Arpellini M et al. Determination of 5-fluorouracil in environmental samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 750(1): 25–32.  
 10. Hedmer M, Georgiadi A, Bremberg ER et al. Surface contamination of cyclophosphamide packaging and surface contamination with antineoplastic drugs in a hospital pharmacy in Sweden. *Ann Occup Hyg* 2005; 49(7): 629–637.  
 11. Nygren O, Gustavsson B, Ström L et al. Cisplatin contamination observed on the outside of drug vials. *Ann Occup Hyg* 2002; 46(6): 555–557.  
 12. Fransman W, Huizer D, Tuerk J et al. Inhalation and dermal exposure to eight antineoplastic drugs in an industrial laundry facility. *Int Arch Occup Environ Health* 2007; 80(5): 396–403.  
 13. Blaha L, Dolezalova L, Odraska P. Safe handling of cytotoxic drugs: the need for monitoring and critical risk assessment. *Hospital Pharmacy Europe* 2008; 40: 73–75.  
 14. Opiolka S, Mölter W, Goldschmidt E et al. Verdampfung von Zytostatika aus Sicherheitswerkbanken, Gefahrstoffe-Reinhal. *Luft* 1998; 58: 291–295.  
 15. Poet TS, McDougal JN. Skin absorption and human risk assessment. *Chem Biol Interact* 2002; 140(1): 19–34.  
 16. Hirst M, Mills DG, Tse S et al. Occupational exposure to cyclophosphamide. *The Lancet* 1984; 323(8370): 186–188.  
 17. Connor T, Shults M, Fraser M. Determination of the vaporization of solutions mutagenic antineoplastic agents at 23 and 37°C using a desiccator technique. *Mutation Research* 2000; 470: 85–92.  
 18. Nygren O, Gustavsson B, Eriksson R. A test method for assessment of spill and leakage from drug preparation systems. *Annals of Occupational Hygiene* 2005; 49(8): 711–718.  
 19. Organizace pro ekonomický spolupráci a rozvoj. Guidelines for the testing of chemicals. 104: Vapour pressure curve – vapour pressure balance. Paris: OECD 1995.

20. Klánová J, Kohoutek J, Hamplová L et al. Passive air sampler as a tool for long-term air pollution monitoring: Part 1. Performance assessment for seasonal and spatial variations. *Environ Pollut* 2006; 144 (2): 393–405.  
 21. Opiolka S, Mölter W, Kiffmeyer TK et al. Dampfdürcke von Zytostatika. *Gefahrstoffe-Reinhal. Luft* 1999; 59: 443–444.  
 22. Kiffmeyer T, Kube Ch, Opiolka S et al. Vapour pressures, evaporation behaviour and airborne concentrations of hazardous drugs: Implications for occupational safety. *The Pharmaceutical Journal* 2002; 268: 331–337.  
 23. Klánová J, Čupr P, Kohoutek J et al. Assessing the influence of meteorological parameters on the performance of polyurethane foam-based passive air samplers. *Environ Sci Technol* 2008; 42(2): 550–555.  
 24. Nygren O, Lundgren C. Determination of platinum in workroom air and in blood and urine from nursing staff attending patients receiving cisplatin chemotherapy. *Int A Occup Environ Health* 1997; 70(3): 209–214.  
 25. Bos RP, Weissenberger BFJ, Anzoin RBM. Alpha-fluoro-beta-alanine in urine of workers occupationally exposed to 5-fluorouracil in a 5-fluorouracil-producing factory. *Biomarkers* 1998; 3(1): 81–87.  
 26. Minoia C, Turci R, Sottani C et al. Application of high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in the environmental and biological monitoring of health care personnel occupationally exposed to cyclophosphamide and ifosfamide. *Rapid Commun Mass Spect* 1998; 12(20): 1485–1493.  
 27. Sessink PJM, Vandekerckhof MCA, Anzoin RBM et al. Environmental contamination and assessment of exposure to antineoplastic agents by determination of cyclophosphamide in urine of exposed pharmacy technicians – Is skin absorption an important exposure route? *Arch Environ Health* 1994; 49(3): 165–169.  
 28. Fransman W, Vermeulen R, Kromhout H. Dermal exposure to cyclophosphamide in hospitals during preparation, nursing and cleaning activities. *Int Arch Occup Environ Health* 2005; 78(5): 403–412.  
 29. Fransman W, Huizer D, Tuerk J et al. Inhalation and dermal exposure to eight antineoplastic drugs in an industrial laundry facility. *Int Arch Occup Environ Health* 2007; 80(5): 396–403.  
 30. Gross ER, Groce DF. An evaluation of nitrile gloves as an alternative to natural rubber latex for handling chemotherapeutic agents. *J Oncol Pharm Pract* 1998; 4(3): 165.  
 31. Bussieres JF, Theoret Y, Prot-Labarthe S et al. Program to monitor surface contamination by methotrexate in a hematology-oncology satellite pharmacy. *Am J Health Syst Pharm* 2007; 64(5): 531–535.  
 32. Kiffmeyer T et al. Monitoring-effect study of wipe sampling in pharmacies. *International Colloquium: Antineoplastic drug monitoring 30. 4. 2008, Hennef, Germany*. [[http://www.pharma-monitor.de/objectfiles/3080/Kiffmeyer\\_Germany\\_Int\\_Colloquium\\_Hennef\\_30.04.2008.pdf](http://www.pharma-monitor.de/objectfiles/3080/Kiffmeyer_Germany_Int_Colloquium_Hennef_30.04.2008.pdf)]  
 33. Odrážka P, Doležalová L, Gorná L et al. Protinádorová léčiva v pracovním prostředí člověka – průběžné výsledky projektu CYTO. 12. kongres nemocničních lékárníků 14.–16. 11. 2008, Hradec Králové.



# Leptin –2548 G/A Polymorphism in Endometrial Cancer

## Polymorfizmus –2548 G/A v genu pro leptin u pacientek s endometriálním karcinomem

Chovanec J.<sup>1</sup>, Bienertová-Vašků J. A.<sup>2</sup>, Dostálová Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Gynecology and Obstetric, The Faculty Hospital Brno

<sup>2</sup> Institute of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno

### Summary

**Background:** Previously, the polymorphism –2548 G/A within the promoter of the leptin (LEP) gene was reported to be associated with overweight and obesity, the factors significantly associated to increased endometrial cancer risk. Leptin has been described to play an important role in signal transduction in endometrial cancer cells indicating that leptin promotes endometrial cancer growth and invasiveness and implicating the JAK/STAT and AKT pathways as critical mediators of leptin action. The aim of the study was to investigate the possible associations of LEP –2548 G/A polymorphism with endometrial cancer and its related traits. **Design:** Using PCR with following restriction analysis, we studied 67 endometrial cancer cases (mean age  $64.3 \pm 10.3$  years) that were enrolled in the study along with 67 controls matched for age, BMI and ethnic origin (mean age  $62.1 \pm 9.8$  years); an additional cohort of 543 healthy individual was recruited to investigate the general population frequencies. **Results:** The present study revealed no significant differences between the genotypes or alleles of investigated polymorphism for endometrial cancer risk or its related traits (age of menarche, menopause, number of spontaneous abortions in personal history or waiting time till the onset of the disease) among the groups, thus indicating that the genetic variants of LEP –2548 G/A is not a relevant marker of endometrial cancer risk in this Czech population. **Conclusions:** To conclude, the polymorphism LEP –2548 G/A doesn't seem to represent a major genetic marker for endometrial cancer in the studied Czech population; however, it was associated with obesity, which finding is in accordance with previous reports.

### Key words

leptin – polymorphism – endometrial cancer – PCR

Study was supported by grant of Ministry of Education of the Czech Republic No. 881/2006 and by project of DANONE/2007 by Danone Institute focused on genetic variability of adipokines in obese individuals.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.



MUDr. Julie Bienertová-Vašků  
Ústav patologické fyziologie  
lékařské fakulty MU  
Kamenice 5  
625 00 Brno  
e-mail: jbienert@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 4. 1. 2009  
Přijato/Accepted: 10. 8. 2009

## Souhrn

**Východiska:** Polymorfismus –2548 G/A v promotoru genu pro leptin (LEP) byl v předchozích studiích asociován s rizikem nadváhy a obezity; faktorů signifikantně asociovaných se zvýšeným rizikem endometriálního karcinomu. Leptin hraje významnou úlohu v signální transdukcii buněk endometriálního karcinomu, přičemž výsledky provedených studií naznačují, že leptin podporuje růst buněk endometriálního karcinomu i jejich invazivitu a předpokládá se, že kritickými mediátory působení leptinu jsou dráhy JAK/STAT a AKT. Cílem naší studie bylo zkoumat možné asociace polymorfismu LEP –2548 G/A s výskytem endometriálního karcinomu a s ním souvisejících znaků. **Design:** Do studie bylo zahrnuto 67 pacientek s endometriálním karcinomem (průměrný věk  $64,3 \pm 10,3$  let) a 67 kontrolních žen párovaných s pacientkami podle věku, BMI a etnického původu ( $62,1 \pm 9,8$  let); pro zkoumání obecných populačních frekvencí genotypů a alel byla navíc zařazena skupina 543 zdravých žen. LEP –2548 A/G byl zkoumán pomocí PCR s následnou analýzou délky restričních fragmentů. **Výsledky:** Předkládaná studie neodhalila významné rozdíly ve frekvenci genotypů nebo alel zkoumaného polymorfismu u endometriálního karcinomu nebo s ním souvisejících znaků (věk menarché, menopauzy, počet spontánních abortů v anamnéze nebo čas do doby propuknutí onemocnění) mezi jednotlivými skupinami, což naznačuje, že genetické varianty polymorfismu LEP –2548 G/A nejsou relevantním markerem rizika endometriálního karcinomu v české populaci. **Závěry:** Nezdá se, že by polymorfismus LEP –2548 G/A reprezentoval důležitý genetický marker rizika endometriálního karcinomu u zkoumané české populace, byl nicméně asociován s obezitou, což je v souladu s dřívějšími pracemi.

## Klíčová slova

leptin – polymorfismus – endometriální karcinom – PCR

## Introduction

Endometrial cancer represents one of the most common gynecological malignancies in developed countries whereas the incidences of endometrial cancer in Western are up to 10-times higher than in Asia of Africa rural regions [1–2]. Obesity represents a significant risk factor for endometrial cancer and the impact of obesity on endometrial cancer development is a very interesting intersection of these major health problems. Although the progress in understanding the genetics of obesity has moved rapidly in the past few years, the role of white adipose tissue (WAT) as a crucial endocrine organ still remains to be elucidated. White adipose tissue is tightly integrated into overall metabolic control, adipocytes being actively involved in extensive cross-talk with other cell types [3–5] and controlling the energy metabolism within the body by secreting biologically active peptides named adipokines produced exclusively or substantially by white adipose tissue pre-adipocytes and mature adipocytes and act by endocrine, paracrine and autocrine mechanisms [6].

The importance of the hypothalamus in control of energy homeostasis has been recognized quite long and it was expected that the brain must receive afferent inputs in proportion to current body fat level. Coleman in 1973 [7] demonstrated the existence of a circulating factor playing a great role in the regulation of body weight. By using parabio-

sis methodology, he observed that obesity in the *ob/ob* mice was due to lack of this factor, whose gene has been consequently cloned and this adiposity factor was named leptin [8].

Leptin is a multifunctional peptide hormone with numerous biological activities including appetite regulation, bone formation, reproductive functions and angiogenesis [9–11]. In the study by Sharma et al [12], leptin has been described to play an important role in signal transduction in endometrial cancer cells indicating that leptin promotes endometrial cancer growth and invasiveness and implicating the JAK/STAT and AKT pathways as critical mediators of leptin action. The promotion of endometrial cancer cell proliferation by leptin involves activation of STAT3 and ERK2 signaling pathways. Moreover, leptin-induced phosphorylation of ERK2 and AKT was dependent on JAK/STAT activation.

In an association study by Petridou et al [13], leptin plasma levels were found to be strongly correlated with endometrial cancer risk. However, it remains unclear whether this association is directly causative or whether increased leptin plasma levels and endometrial cancer are both secondary consequences of obesity. In 2000, Mammes et al [14] reported an association of LEP –2548 G/A polymorphism within the promoter of the leptin gene with overweight. So far, no study focused on the possible relationship of this polymorphism with the increased risk of endometrial cancer has

been published. Considering the important role of LEP-2548 G/A (dbSNP ID rs7799039) in obesity development, we hypothesize that it could also be associated with the endometrial cancer risk and the disease related traits in the Czech Caucasian population.

## Material and methods

### Subjects

A total of 67 endometrial cancer cases (mean age  $64.3 \pm 10.3$  years) were enrolled in the study along with 67 controls matched for age, BMI and ethnic origin (mean age  $62.1 \pm 9.8$  years). The diagnosis of endometrial cancer was confirmed by standard histopathological examination according to the FIGO classification. In controls, the presence of any malignancy or severe chronic diseases was excluded by standardized complex physical examination and personal history evaluation by a specialist. Moreover, additional population of 543 healthy individuals was enrolled in the study to compare the baseline allelic and genotype frequencies within the general Czech population (215 men and 328 women, mean age  $48.5 \pm 13.5$  years). All investigated individuals were Czech Caucasians.

This study was approved by the Committee for Ethics of Medical Experiments on Human Subjects, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, and was performed in adherence to the Declaration of Helsinki Guidelines. Each participant gave her written informed consent which has been archived.

**Tab. 1. The -2548 G/A polymorphism in the investigated groups.**

	Genotype	N	%	Allele	N	%	p
cases	AA	20	30.3	A	73	55.0	
	AG	33	50.0	G	59	45.0	
	GG	13	19.7				
case-matched controls	AA	18	27.2	A	67	50.8	0.26*
	AG	31	47.0	G	65	49.2	
	GG	17	25.8				
healthy controls	AA	131	24.5	A	517	48.3	0.07**
	AG	255	47.6	G	553	51.7	
	GG	149	27.9				

\*cases vs case-matched controls, \*\*cases vs healthy controls

### Genotyping

White cell fraction from the peripheral venous blood sample (5 ml) was used to extract DNA according to the standard procedure using proteinase K. SNP LEP -2548G/A (dbSNP ID rs7799039), 2 548 bp upstream to the beginning of the exon 1 was detected as described previously [15]. Briefly, each of the 12 µl reaction contained 10 ng genomic DNA, 1.5 µl 10X PCR Buffer 1.5 µl MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 2 pmol of each primer and 0.4 U of Taq DNA polymerase (Fermentas). The reactions were performed using XP Cycler (BIOER). PCR amplification conditions were as follows: LEP -2548G/A polymorphism: 95 °C for 5 min, 94 °C for 30 s, 50 °C for 45 s, 72 °C for 50 s for 35 cycles and 72 °C for 10 min. Genotyping reliability was assessed by double-genotyping of approx. 20% samples in independent assays where no differences were found. Negative controls were included in each reaction batch to exclude possible false-positives. The genotypization success rate was approx. 99%.

### Statistical analysis

Differences in genotype distributions and the consistency with Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested using the chi<sup>2</sup> test and the differences in allele frequencies were tested by the two-tailed Fisher's exact test. Differences in parameters studied between the two groups were tested using the Mann-Whitney test. Tukey-Kramer post hoc correction was used to correct for multiple comparisons where appropriate. Logistic regression analysis was used

**Tab. 2. Associations between LEP -2548 genotype and endometrial cancer risk by BMI.**

Compared groups	Compared genotypes	OR	p
cases vs matched controls	AA + AG vs GG	1,41 (0,62–3,21)	NS
	AA vs AG + GG	1,15 (0,54–2,46)	NS
	AA vs GG	1,45 (0,54–3,80)	NS
cases vs healthy controls	AA + AG vs GG	1,57 (0,83–2,97)	NS
	AA vs AG + GG	1,34 (0,76–2,34)	NS
	AA vs GG	1,74 (0,83–3,65)	NS

OR – odds ratio, CI – confidence interval

to analyze the independence of the association between quantitative variables and endometrial cancer. Cumulative hazard function plots were estimated by the Kaplan-Meier method with the log-rank test in order to compare groups. The Statistica v. 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK, USA) program package was employed in all analyses.

### Results

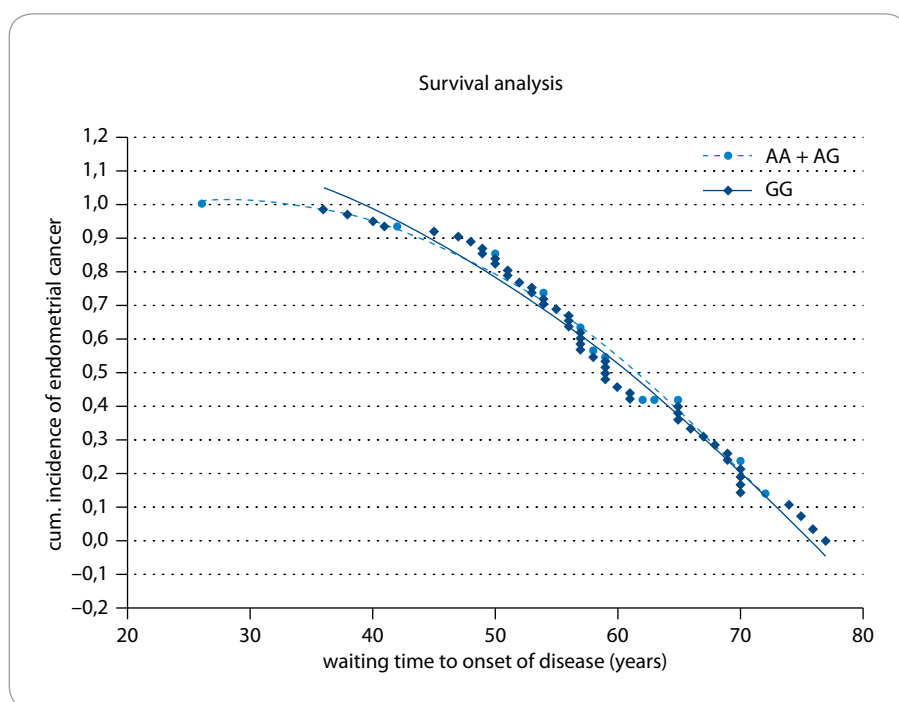
No significant differences in distribution of LEP -2548 G/A genotypes were observed between the endometrial cancer patients and the matched controls ( $p = 0.704$ ). When comparing the genotype distributions of the polymorphism of the cases with the healthy Czech Caucasian population, no differences were observed as well ( $p = 0.248$ , Tab. 1). No significant differences in the age of menarche, menopause, parity and number of spontaneous abortions were observed between the cases and their precisely matched controls. Of these variables, only the number of spontaneous pregnancy losses was significantly associa-

ted with the increased risk of endometrial cancer ( $p = 0.003$ ).

The associations between LEP -2548 genotype and endometrial cancer risk by BMI are summarized in Tab. 2, no significant differences between groups were observed.

In the next step, we tested whether the LEP G/A -2548 G/A had any effect on the characteristics related to endometrial cancer independently on other known risk factors such as hormonal replacement therapy (HRT) or BMI. In the multivariate regression modeling, the LEP -2548 G/A served as an independent predictor for increased BMI ( $\beta = 1.1$ ,  $p = 0.000004$ ). Furthermore, LEP -2548 G/A was also significantly correlated with the body height ( $\beta = -0.39$ ,  $p = 0.00000001$ ). However, the examined polymorphism didn't show independent prediction role for the endometrial cancer development.

In the following analysis, we tested, whether the LEP -2548 G/A exerts an independent prediction role on age of onset of the endometrial cancer; our



**Obř. 1.** Cumulative probabilities for endometrial cancer occurrence and waiting time to onset of disease.

data ( $p = 0.04$ ) suggesting that a remarkable proportion of the gene effect could be dependent upon aging. Therefore, we consecutively tested the possible relation between age at time of endometrial cancer diagnosis and LEP -2548 G/A by subdividing the study group according to individual age (i.e. below or above 64 years, the median value of the entire cases cohort). However, these two subgroups did not differ significantly either in LEP -2548 G/A genotypes nor allele frequency ( $p_g = 0.070$ ,  $p_a = 0.283$ ).

Fig. 1 shows the cumulative probabilities for endometrial cancer occurrence and waiting time to onset of disease. The time to onset of disease wasn't significantly different between the A or G allele carriers ( $p = 0.79$ ).

### Discussion

Recently, leptin has been associated with cancers of the breast, ovary, prostate, small lung cancer and with non-Hodgkin lymphoma and also the important role of leptin in general cancerogenesis has been proposed by observations from the previous studies [16–20].

The endometrium represents a classical hormone-dependent tissue and most

of the endometrial carcinomas are hormone-dependent tumors. Leptin-treated monkeys had higher mean plasma luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) levels than controls, demonstrating the ability of leptin to enhance gonadotropin secretion [21]. Sharma et al [12] suggested that leptin rapidly stimulates the JAK/STAT pathway and induces the phosphorylation of ERK and AKT, thus activating two key signal-transduction pathways associated with cell growth. In addition to this finding, Petridou et al [13] described significant dysregulation in serum leptin levels among cases with endometrial cancer compared to controls, however, it cannot be conclusively inferred, whether leptin levels elevation, developed in the study subjects as a consequence of obesity, played a crucial role in endometrial carcinogenesis or whether it was a simple correlate of obesity.

The common polymorphism in the promoter of the human leptin gene -2548G/A influences leptin expression, possibly at the transcriptional level, and therefore also adipose secretion levels of the hormone [22]; adipose tissue leptin mRNA levels is 60% higher in AA sub-

jects when compared to GA/GG subjects. Taking this into account, we have hypothesized that this polymorphism could modulate the endometrial cancer susceptibility.

In this case-control study carried out in a Czech Caucasian population, we investigated the effects of -2548 G/A polymorphism in the gene encoding for leptin on endometrial cancer risk in the Czech endometrial cancer cases, BMI and age-matched controls and healthy Czech population. The present study revealed no significant differences in genotypes or alleles distribution of investigated polymorphism for endometrial cancer risk or its related traits (age of menarche, menopause, number of spontaneous abortions in anamnesis) among the groups, thus indicating that the genetic variants of LEP -2548 G/A are not a relevant marker of endometrial cancer risk in this Czech population. In the study by Mammes et al [15], the G allele of the polymorphism was associated with overweight, which is well in accordance with our results as the G allele was in our study an independent predictor for increased BMI, but not endometrial cancer, thus suggesting that the LEP -2548 G/A polymorphism is associated rather with obesity itself than endometrial cancer susceptibility.

To conclude, the polymorphism LEP -2548 G/A doesn't seem to represent a major genetic marker for endometrial cancer in the Czech population; however, it is associated with obesity, which is well in accordance with previous reports.

### Acknowledgments

The authors are grateful to Dana Poláková and Petra Pířkrylová for technical assistance, and to all the study participants for participation in the project.

### References

1. Parkin DM. Cancer incidence in five continents. In: Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J et al (eds). IARC Scientific Publication. No. 143, Vol. VII, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 1997: 1–1240.
2. Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 1993; 55: 891–903.
3. Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 5): 1078–1081.
4. Trayhurn P. Adipose tissue in obesity—an inflammatory issue. *Endocrinology* 2005; 146(3): 1003–1005.



5. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92(3): 347–355.
6. Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 892: 146–154.
7. Coleman DL. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*. 1973; 9(4): 294–298.
8. Zhang Y, Proenca R, Maffei M et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425–432.
9. Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M et al. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 1998; 83(10): 1059–1066.
10. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281(5383): 1683–1686.
11. Huang L, Li C. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res* 2000; 10(2): 81–92.
12. Sharma D, Saxena NK, Vertino PM et al. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(2): 629–640.
13. Petridou E, Belechri M, Dessypris N et al. Leptin and body mass index in relation to endometrial cancer risk. *Ann Nutr Metab* 2002; 46(3–4): 147–151.
14. Mammès O, Betoulle D, Aubert R et al. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet* 2000; 64(Pt 5): 391–394.
15. Mammès O, Betoulle D, Aubert R et al. Novel polymorphisms in the 5' region of the LEP gene: association with leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity. *Diabetes* 1998; 47(3): 487–489.
16. Skibola CF, Holly EA, Forrest MS et al. Body mass index, leptin and leptin receptor polymorphisms, and non-hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(5): 779–86.
17. Ribeiro R, Lopes C, Medeiros R. Leptin and prostate: implications for cancer prevention – overview of genetics and molecular interactions. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 359–368.
18. Ribeiro R, Araújo AP, Coelho A et al. A functional polymorphism in the promoter region of leptin gene increases susceptibility for non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42(8): 1188–1193.
19. Caldefie-Chézet F, Damez M, de Latour M et al. Leptin: a proliferative factor for breast cancer? Study on human ductal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334(3): 737–741.
20. Mor G, Visintin I, Lai Y et al. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(21): 7677–7682.
21. Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY et al. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 1998; 139(11): 4652–4662.
22. Hoffstedt J, Eriksson P, Mottagui-Tabar S et al. A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Horm Metab Res* 2002; 34(7): 355–359.



**ivw2010**

Endorsed by

**ESGO**  
European Society of  
Gynaecological Oncology



## 2<sup>ND</sup> INTERNATIONAL VIDEO WORKSHOP ON RADICAL SURGERY IN GYNAECOLOGICAL ONCOLOGY State of the art: Standardization of surgical procedures in gynaecology Prague, Czech Republic | April 8–10, 2010

### MAIN TOPICS

- State of the art: Standardization of procedures
- Pelvic lymphadenectomy
- Paraaortic lymphadenectomy
- Omentectomy
- Radical hysterectomy type B, C, nerve sparing
- Sentinel node biopsy in vulva, endometrial and cervical cancer
- Diagnostic and staging procedures
- Tips and tricks
- Advanced technology
- Vaginal reconstruction
- Bowel surgery

### INVITED FACULTY

Nadeem R Abu-Rustum (USA)  
Masaaki Andou (Japan)  
Ali Ayhan (Turkey)  
Pavel Bartoš (Czech Republic)  
Uzi Beller (Israel)  
Pierluigi Benedetti-Panici (Italy)

Tibor Bielik (Slovakia)  
John F. Bogges (USA)  
David Cibula (Czech Republic)  
Luis Chiva de Augustin (Spain)  
Matias Jurado (Spain)  
Christhard Köhler (Germany)  
Eric Leblanc (France)

Miloš Mlynček (Slovakia)  
Tim Mould (United Kingdom)  
Denis Querleu (France)  
Francesco Raspagliesi (Italy)  
Laszlo Ungar (Hungary)  
Martin Widschwendter (United Kingdom)

### CONGRESS SECRETARIAT

GUARANT International spol.s.r.o., Opletalova 22, 110 00 Prague 1, Czech Republic  
Phone: +420 284 001 444, Fax: +420 284 001 448, Email: iw2010@guarant.cz

FOR MORE INFORMATION: **WWW.IVW2010.CZ**

# Profily nízkomolekulárního proteomového spektra získané pomocí hmotnostní spektrometrie SELDI-TOF v sérech pacientů s diseminovaným maligním melanomem: pilotní studie

## Profiles of Low-Molecular Proteome Spectrum Obtained through SELDI-TOF Mass Spectrometry in the Sera of Patients with Metastatic Malignant Melanoma: Pilot Study

Lakomý R.<sup>1</sup>, Greplová K.<sup>2</sup>, Pilný R.<sup>2</sup>, Budinská E.<sup>3</sup>, Valík D.<sup>2</sup>, Poprach A.<sup>1</sup>, Němeček R.<sup>1</sup>, Vyzula R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup>Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>3</sup>Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno

### Souhrn

**Úvod:** Výzkum na genetické a molekulární úrovni dosahuje v posledních letech nebývalého rozvoje. Od poloviny 90. let se rozvíjí vědní obor – proteomika, která se zabývá studiem genových produktů – bílkovin. Hodnocení bílkovinných profilů v budoucnu pravděpodobně přispěje k přesnější stratifikaci pacientů z pohledu jak predikce léčebné odpovědi, tak i prognózy. S tímto cílem je v dnešní době proteomika využívána k identifikaci nových biomarkerů. Jinak tomu není ani u maligního melanomu, diagnózy bez jasného sérového markeru s vysokou senzitivitou a specifitou. **Metody:** Pomocí surface-enhanced laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) jsme provedli pilotní analýzu proteinového spektra u 25 pacientů s diseminovaným maligním melanomem, léčených paliativní systémovou chemoterapií na našem pracovišti v letech 2004–2006. Soubor byl rozdělen na dvě skupiny: skupina s nádory rezistentními k chemoterapii – 14 pacientů – a skupina, která měla určitý klinický benefit z podané léčby (kompletní a parciální remise, stabilizace onemocnění) – 11 pacientů. Cílem experimentu bylo objevit proteinové profily charakteristické pro tyto skupiny a dále na základě všech proteinových profilů bez ohledu na léčebnou odpověď provést rozdělení celého souboru pacientů do nových podskupin. Závěrem nás zajímaly rozdíly v laboratorních a klinických parametrech, a to jak mezi skupinami chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů, tak i mezi nově vytvořenými podskupinami s podobnými proteinovými profily. **Závěr:** U klinických skupin chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů se nám nepodařilo najít signifikantní rozdíly v proteinových profilech ani laboratorních parametrech. U nově vytvořených podskupin z hlediska podobných proteinových profilů se nám podařilo vytipovat pacienty, kteří se od ostatních lišili v laboratorních i klinických parametrech. Výsledky jsou velmi zajímavé a je vhodné pokračovat v dalším výzkumu.

### Klíčová slova

proteomika – biomarkery – SELDI-TOF-MS

Projekt byl finančně podpořen grantem IGA NR-8338-3/2005, MZ0MOU2005 a MSMT LC06035

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



**MUDr. Radek Lakomý**  
Klinika komplexní onkologické péče  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: lakomy@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 10. 9. 2008

Přijato/Accepted: 26. 11. 2008

## Summary

**Backgrounds:** Recently, research at genetic and molecular levels has extensively accelerated due to advances in new technologies. Since the mid-90s, a relatively new discipline – clinical proteomics, has evolved, which focuses on studying gene products – proteins. The evaluation of protein profiles may contribute to the more accurate stratification of patients in the future, in terms of both prediction of treatment results and prognosis. In pursuing this objective, proteomic approaches are currently used for the identification of new biomarkers. This is also the case with malignant melanoma, a disease without typical serum marker possessing high sensitivity and high specificity. **Methods:** We analyzed human blood serum samples from 25 patients with metastatic malignant melanoma treated with palliative chemotherapy at the Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, in 2004–2006. The analysis was performed by Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS). Our patients were divided into two subgroups: a group relatively resistant to chemotherapy – 14 patients – and a group with certain clinical benefit from the treatment (complete and partial remission, stabilized disease) – 11 patients. We were searching for a new biomarker or typical protein profile in the selected two subgroups. Then, we recategorized our patients into three groups according to the similarity of their protein profiles regardless of sensitivity to chemotherapy. Finally, we evaluated differences in laboratory and clinical parameters, between both the groups of chemo-resistant and chemo-sensitive patients, and newly defined subgroups with similar protein profiles. **Conclusion:** We did not identify any significant differences in protein profiles or laboratory parameters in the predefined chemo-sensitive or chemo-resistant groups of patients. However, with regard to the new groups with similar protein profiles, we identified a subgroup of patients with different laboratory and clinical parameters. The results are very interesting and merit further research.

## Key words

proteomic – biomarkers – SELDI-TOF-MS

## Úvod

Lidský genom je tvořen jen cca 40 000 geny, kdežto proteom – funkční produkt genetické informace (soubor proteinů) – je podstatně složitější a dle odborných odhadů je cca 10–20krát početnější. Jeho podoba je dosti variabilní a je podmíněna mnoha faktory, jako je věk, pohlaví, vnější prostředí, přidružená onemocnění, farmakologická léčba. Jeho dynamičnost je nezbytná pro přežití a je základem adaptačních mechanismů organismu.

V oblasti výzkumu nádorových chorob je stále více úsilí věnováno identifikaci nových biomarkerů, podle kterých by bylo možné relativně rychle, levně a spolehlivě diagnostikovat počáteční stadia nádorových onemocnění, event. jejich recidivu, dále hodnotit léčebnou odpověď, predikovat efekt protinádorové léčby a podat bližší informace stran celkové prognózy pacientů.

Na základě zkušeností z klinické praxe je zřejmé, že prognóza pacientů s disseminovaným maligním melanomem je

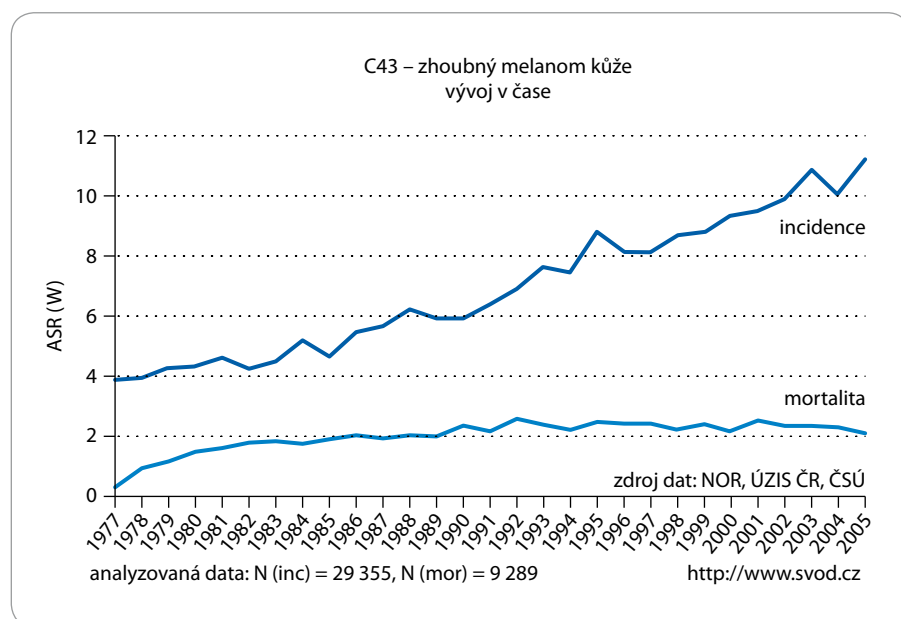
velmi vážná. Onemocnění je obecně považováno za chemo- a radiorezistentní a i multimodální přístup zahrnující kombinovanou chemo-(imuno-)terapii, radioterapii a paliativní chirurgické výkony špatnou prognózu pacientů většinou významně neovlivní.

Přesto se mezi nemocnými s disseminovaným maligním melanomem objeví jedinci s relativně lepší prognózou, bez tendence k časně multiorgánové diseminaci, onemocnění relativně chemosenzitivní, u kterých systémová léčba může prodloužit období bez příznaků nemoci i celkové přežití. Na druhé straně jsou naopak jedinci s evidentně chemorezistentním onemocněním, progredující i přes intenzivní kombinovanou systémovou léčbu a umírající na rychlou progresi během několika málo měsíců.

Dle klinických průběhů onemocnění je jasné, že rozdílné odpovědi k systémové léčbě (chemoterapie, imunoterapie) nespoívají jen s léčbou samotnou, ale jsou též ovlivněny rozdílným biologickým chováním vlastního nádorového onemocnění a složitými vztahy mezi hostitelem a nádorem (graf. 1).

## Materiál a metoda

Předmětem zájmu byli pacienti s disseminovaným maligním melanomem (chemoterapií dosud nepředléčení), kteří podstoupili paliativní chemoterapii (± imunoterapii) 1. linie (tab. 1).



Graf 1. Incidence a mortalita na zhoubný melanom kůže.

**Tab. 1. Popisná charakteristika analyzovaného souboru pacientů.**

Proměnná	Charakteristika
počet pacientů	25
věk – medián v letech (rozmezí)	47,5 (31–70)
pohlaví – muži/ženy	18/7
pozitivní spádové uzliny v době dg. – ano/ne	11/14
adjuvantní INF alfa-2a – ano/ne	12/13
délka podávání adjuvantní INF alfa-2a – medián v měsících (rozmezí)	11,5 (2–12)
disease free survival – medián v měsících (rozmezí)	30 (2–95)
místo relapsu – počet	
kůže a podkoží	11
uzliny	18
plíce	14
játra	5
kosti	6

**Tab. 2. Výsledek léčby v závislosti od použitého režimu.**

	CR + PR	SD	PD
CVD s/bez cytokinů	3	5	6
BOLD	1	2	3
dakarbazin v monoterapii	0	0	5
celkem	4	7	14

CVD – cisplatina-vinblastin-dakarbazin, BOLD – bleomycin-vinkristin-lomustin-dakarbazin, CR – celková remise, PR – parciální remise, SD – stabilizace onemocnění, PD – progresse onemocnění

Volba režimu byla určována celkovým stavem pacienta, věkem, interkurencemi a rozsahem onemocnění. U pacientů v mladším věku, v dobrém celkové stavu, bez závažných kardiovaskulárních onemocnění, s normálními renálními funkcemi byl preferován režim CVD (cisplatina-vinblastin-dakarbazin) ± imunoterapie (interferon alfa-2a, interleukin-2) – režim dle Leghy. Pro pacienty s vysokým rizikem kardiovaskulárních komplikací, renální insuficiencí nebo postižením CNS v dobrém stavu byl indikován režim s nitrosureou – BOLD (bleomycin-vinkristin-lomustin-dakarbazin) a u pacientů starších, polymorbidních byl doporučen pouze dakarbazin v monoterapii.

Do souboru bylo zařazeno celkem 25 pacientů, 18 mužů a 7 žen, kteří započali paliativní systémovou chemo-(imuno) terapii v MOÚ od srpna 2005 do února 2007. Všichni pacienti měli před zahájením paliativní chemoterapie proveden odběr krve, který jsme uskutečnili do uzavřeného odběrového systému Monovette firmy Sarstedt (Německo) do

zkumavky Neutral. Krev jsme nechali sražit po dobu alespoň 45 min, centrifugovali 20 min při 1 000 g a vzniklé sérum jsme zamrazili při  $-70^{\circ}\text{C}$ , z alikvoty dále byly provedeny standardní laboratorní vyšetření včetně CRP, laktátdehydrogenáza – LDH, protein S100b, flowcytometrie a další.

Po absolvování 2–3 cyklů chemoterapie následovalo přešetření zobrazovacími metodami ke zhodnocení léčebné odpovědi.

Na podzim 2007 jsme séra pacientů podrobili proteomické analýze pomocí SELDI-TOF-MS. Měření jsme prováděli na čtyřech typech aktivních chromatografických čipů – a) afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů ( $\text{Cu}^{2+}$ ), tzv. IMAC, b) chromatografie vázající hydrofobní proteiny vazbou na nepolární povrch C12, tzv. H50, a c,d) chromatografickým hydrofilním povrchem, tzv. normální fázi, která byla promývána kyselou nebo zásaditou organickou směsí [1]. Přípravu vzorku jsme provedli denurací séra v roztoku vzniklém smí-

cháním  $9\text{ mol/l}^{-1}$  močoviny (Fluka, USA), v níž jsme rozpustili iontový detergent 3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-propansulfonát (CHAPS, Fluka, USA) v koncentraci  $20\text{ g/l}^{-1}$  a následně přidali dithiothreitol (DTT, Sigma Aldrich, USA) na výslednou koncentraci  $10\text{ mmol/l}^{-1}$ . Sérum jsme smíchali s touto denaturační směsí v poměru 1 + 1. Takto připravený vzorek jsme 30 min inkubovali při laboratorní teplotě, poté 10 min promíchali na třepače a 10 min centrifugovali při  $14\ 000\text{ g}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . Všechny vzorky jsme měřili v triplikátu, tj. celkem jsme naměřili 75 spekter na čtyřech površích, naměřené proteomické profily jsme statisticky vyhodnotili programem Biomarker Wizard dodávaným firmou Ciphergen (USA, dnes Bio-Rad USA). Výsledky našeho měření jsme pak spolu s dalšími laboratorními parametry postoupili statistické analýze.

**Cílem pilotního projektu pomocí SELDI-TOF-MS** bylo nejprve objevit proteomické profily charakteristické pro skupiny pacientů absolutně chemorezistentních a pacientů s určitou léčebnou odpovědí (stabilizace, parciální a kompletní remise), poté celý soubor dle podobnosti proteinových profilů přerozdělit do nových podskupin, bez ohledu na léčebnou odpověď a na závěr zjistit rozdíly mezi laboratorními a klinickými parametry u skupin chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů a též mezi nově vytvořenými podskupinami s podobnými proteinovými profily.

**Pro tyto účely byly použity následující metody:** Significance analysis of microarrays (SAM), shluková analýza s maticí vzdáleností odvozenou od Spearmanovy korelace a algoritmy shlukování – average linkage, complete linkage, Ward a DIANA a Mann-Whitney test pro porovnání parametrů mezi skupinami chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů a Kruskal-Wallis test pro porovnání parametrů mezi nalezenými novými skupinami.

## Výsledky

Převážně byl použit režim CVD – 14 pacientů, režim BOLD – 6 pacientů a dakarbazin v monoterapii – 5 pacientů. U 4 pacientů léčených režimem CVD byly do kombinace přidány cytokiny, ve dvou



případech interleukin-2 a v dalších dvou kromě interleukinu-2 i interferon alfa-2a (režim dle Leghy).

V daném souboru pacientů byla u 14 konstatována progresse onemocnění (PD), u 7 stabilizace onemocnění (SD), u 3 parciální remise (PR) a pouze u 1 pacienta byla zaznamenána kompletní remise (CR) (tab. 2).

Dle očekávání měli pacienti s postižením kůže, podkoží a uzlin delší přežití a vyšší četnost léčebných odpovědí. Výjimkou byli dva pacienti, kteří měli masivní kožní postižení končetiny, bez tendence k orgánové diseminaci, relativně dlouhou dobou přežití (téměř dva roky), a přesto zcela rezistentní k podávané systémové léčbě. V případě postižení vnitřních orgánů na tom byli lépe pacienti s plicními metastázami. Nejhorší výsledky z hlediska léčby i přežití měli pacienti s postižením jater, kostí, střev a mozku.

#### Statistické zhodnocení

a) Hodnocení proteinových profilů u skupin pacientů absolutně chemorezistentních a pacientů s určitou léčebnou odpovědí (stabilizace, parciální a kompletní remise)

Metodou SAM se nám nepodařilo nalézt specifické proteiny nebo proteinové spektrum v daných skupinách pacientů. Celkem bylo hodnoceno 142 píků.

b) Shluková analýza všech proteinových profilů a rozdělení do nových podskupin bez ohledu na léčebnou odpověď.

Metodou shlukové analýzy jsme shlukovali proteinové profily každého povrchu zvlášť a na základě podobnosti daných profilů jsme soubor přerozdělili na 3 podskupiny (tab. 3–4; obr. 2).

c) Porovnání laboratorních a klinických parametrů u pacientů chemorezistentních vs chemosenzitivních a též mezi podskupinami s podobnými proteinovými profily.

- Mezi skupinami chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů jsme neshledali signifikantní rozdíly v laboratorních parametrech, z klinických parametrů měli chemosenzitivní pacienti častěji postižení kůže a podkoží.
- Mezi skupinami 1–3 (rozdělení dle podobných proteinových profilů) jsme našli významné trendy jak v laborator-

**Tab. 3. Rozdělení souboru na tři podskupiny dle podobnosti proteinových profilů a ztah k léčebné odpovědi.**

Shluk	N (počet)	Zastoupení klinické skupiny			
		rezistentní (R)		senzitivní (S)	
1	4	3	75,0%	1	25,0%
2	13	6	46,2%	7	53,8%
3	8	5	62,5%	3	37,5%
celkem	25	14	56,0%	11	44,0%

**Tab. 4. Expres píků definujících shluky vytvořené shlukováním všech povrchů algoritmem DIANA. + znamená zvýšenou, – sníženou hladinou výskytu v oblasti píků oproti ostatním shlukům.**

Píky definující skupiny (M/Z v Da)	Skupina pacientů		
	1	2	3
3 209, 3 308	–	+	+
3 927	–	+	+
4 082, 4 338	–	+	+
4 588	+	+	–
4 693	+	+	–
6 424, 6 622, 6 828	–	+	+
6 875	–	+	+
8 553, 8 681	–	+	+
9 180	+	+	–
9 286	+	+	–
9 340	+	+	–
11 510–11 674	+	–	–
13 747	–	+	+
18 327, 18 356, 18 546	+	+	–

1. skupina 4 pacientů 1, 3, 7, 22 byla definována hlavně zvýšenou hladinou výskytu na pozicích píků 11 510–11 674 kDa a sníženou hladinou výskytu v oblastech 3 209, 3 309, 4 082, 4 340, 6 872, 8 553, 8 681 a 13 747 kDa.

3. skupina 8 pacientů 4, 20, 16, 8, 14, 21, 5, 13 byla definována hlavně sníženou hladinou výskytu v oblasti 4 588 a 4 693 kDa a v oblasti 9 180–9 340 kDa.

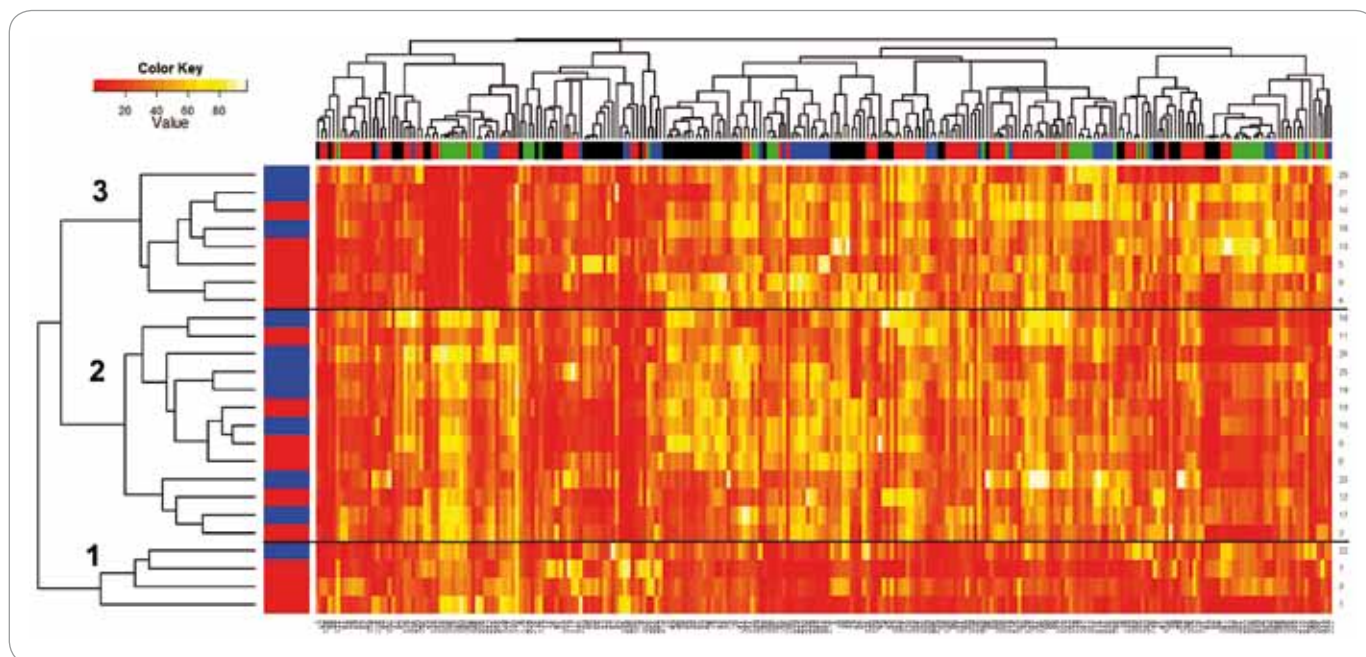
ních, tak i v klinických parametrech, a to především ve skupině 1. Tato skupina čtyř pacientů měla signifikantně vyšší hladinu proteinu S100B ( $p = 0,008$ ), CRP ( $p = 0,021$ ) a signifikantně nižší hladinu albuminu ( $p = 0,007$ ) a hemoglobinu ( $p = 0,013$ ). Z klinických parametrů u 1. skupiny dominovalo postižení jater ( $p < 0,001$ ), plic ( $p = 0,021$ ) a uzlin ( $p = 0,001$ ). Vzhledem k nízkému počtu pacientů ve skupině 1 jsou uvedené  $p$ -hodnoty spíše orientační a nelze z nich vyvozovat obecně platné závěry.

#### Závěr

Ve skupinách chemorezistentních a chemosenzitivních pacientů s disemino-

vaným maligním melanonem se nám metodou SELDI-TOF-MS zatím nepodařilo identifikovat evidentní odlišný protein nebo specifické proteinové spektrum. Pomocí shlukovací analýzy se nám ale podařilo rozdělit soubor na podskupiny s podobnými proteinovými profily, které měly také korelaci v určitých laboratorních a klinických parametrech, což hodnotíme jako zajímavý a nečekaný výsledek. Výsledky našeho pilotního hodnocení mohou být jistě ovlivněny malým souborem pacientů, jeho nehomogenitou jak z pohledu použité léčby, tak z pohledu rozdílného rozsahu onemocnění.

Zavedení analýz proteomových profilů do onkologické praxe k přesnější stratifi-



Obr. 2. Heatmapa zobrazující výsledek shlukování DIANA na všech površích. Řádky představují jednotlivé pacienty, sloupce jednotlivé m/z. Barevně jsou dále odlišeni pacienti (modrá – chemosenzitivní pacient, červená – chemorezistentní pacient) i povrchy (H50 – černá, IMAC – modrá, NP20 kys – zelená, NP20zas – červená). Jednotlivé buňky zobrazují intenzitu výskytu jednotlivých fragmentů na příslušných m/z, a to na barevné škále v rozmezí od nejnižší hodnoty (0 – červená), po nejvyšší (100 – bílá; viz Color Key). Černé horizontální přímky vymezují tři skupiny pacientů.

kaci pacientů a jejich nádorových onemocnění má pravděpodobně obrovský potenciál. Dle typických proteinových profilů bude šance s určitou pravděpodobností odhalit časná stadia onemocnění, optimalizovat léčbu, predikovat a hodnotit její efektivitu, blíže podat informace o předpokládané prognóze. Svě místo může mít potenciálně i k zachycení časného, terapií ovlivnitelného relapsu onemocnění.

#### Literatura

- Pilný R, Michalová E, Brožková K et al. Příprava biologického materiálu pro metodu SELDI TOF MS. Brno: Edukační sborník XXXI. Brněnské onkologické dny 2007: 360.
- Wilson LL, Tran L, Morton DL. Detection of differentially expressed proteins in early-stage melanoma patients using SELDI-TOF mass spectrometry. *Ann NY Acad Sci* 2004; 158: 40–50.
- Helanová S, Vyzula R, Žaloudík J et al. Technologie ciphergen – nová perspektiva v proteomice. *Klinická onkologie* 2004; 17 (5): 157–161.
- Liotta LA, Petricoin EF. General keynote: proteomic patterns in sera serve as biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2003; 88(1Pt 2): S25–S28. Discussion S37–S42.
- Mian S, Ugurel S, Parkinson E. Serum Proteomic Fingerprinting Discriminates Between Clinical Stages and Predicts Disease Progression in Melanoma Patients. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5088–5093.
- Litvak A, Gupta R, Yee R. Endogenous Immune Response to Early and Intermediate-Stage Melanoma Is Correlated with Outcomes and Is Independent of Locoregional Relapse and Standard Prognostic Factors. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 27–35.
- Ding Y, Prieto V, Zhang P. Nuclear Expression of the Antiapoptotic Protein Survivin in Malignant Melanoma. *Cancer* 2006; 106: 1123–1129.
- Geilen Ch, Georgieva J, Milling A. Malignant Melanoma – Markers for Progression and Prognosis in Malignant Melanoma. *Front Radiat Ther Oncol*. Basel: Karger 2006; 39: 120–126.
- Češková P, Brožková K, Hernychová L et al. Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limitace. *Chem listy* 2006; 100 (11): 974–979.
- Brožková K, Knofličková D, Hernychová L et al. Identifikace potenciálních biomarkerů karcinomu prsu metodou SELDI-TOF-MS. *Klin onkol* 2007; 20(6): 377–383.
- Pilný R, Bouchal P, Borilova S et al. Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometry Reveals Significant Artifacts in Serum Obtained from Clot Activator-Containing Collection Devices. *Clin Chem* 2006; 52(11): 2115–2116.
- Dušek L, Mužík J, Kubásek M et al. Český národní webový portál epidemiologie nádorů [online]. Masarykova univerzita. Přístup z 2. 2. 2008. <http://www.svod.cz.Verze 7.0>.
- Tusher VG, Tibshirani R et al. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(9): 5116–5121.

# Chronická gastrointestinální toxicita po zevní radioterapii karcinomu prostaty

## Chronic Gastrointestinal Toxicity after External-Beam Radiation Therapy for Prostate Cancer

Šefrová J.<sup>1</sup>, Paluska P.<sup>1</sup>, Odrážka K.<sup>2,3,4,5</sup>, Jirkovský V.<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Klinika onkologie a radioterapie, FN Hradec Králové

<sup>2</sup> Multiscan s. r. o., Oddělení klinické a radiační onkologie, Pardubická krajská nemocnice, a. s., Pardubice

<sup>3</sup> Onkologická klinika 1. lékařské fakulty UK a VFN, Praha

<sup>4</sup> Radioterapeutická a onkologická klinika 3. lékařské fakulty UK, Praha

<sup>5</sup> Katedra radiační onkologie, Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha

<sup>6</sup> Oddělení gastroenterologie, II. interní klinika FN Hradec Králové

### Souhrn

**Východiska:** Chronická gastrointestinální (GI) toxicita je významným faktorem limitujícím eskalaci dávky záření na prostatu. Její incidence se mění v závislosti na dávce a použité technice ozáření, ale spolupodílejí se i faktory další. Přes veškerou snahu je stále nežádoucím účinkem, který může významně zhoršovat kvalitu života pacientů po proběhlé kurativní radioterapii karcinomu prostaty. **Cíl:** Cílem této práce je blíže popsat chronickou GI toxicitu po zevním ozáření karcinomu prostaty, její příčiny, rozvoj, projevy a incidenci při různých technikách ozáření. Dále pak porovnat časový vývoj od začátků kurativní radioterapie karcinomu prostaty až do dnešní doby. **Závěry:** Výskyt chronické GI toxicity je dnes díky moderním technikám radioterapie relativně nízký i při použití celkové dávky záření až 80 Gy. Další snižování radiačních komplikací lze očekávat od zavedení obrazem řízené radioterapie (IGRT), která umožňuje přesnější doručení dávky přímo do prostaty, zmenšení bezpečnostního lemu kolem klinického cílového objemu (CTV), a tím i menší zatížení okolních rizikových orgánů.

### Klíčová slova

toxicita – radioterapie – proktitida – karcinom prostaty

### Summary

**Backgrounds:** Chronic gastrointestinal (GI) toxicity is an important dose-limiting factor of prostate cancer treatment. Its incidence varies with the dose of radiotherapy and the external beam treatment technique; however, there are also other factors that should be considered. Despite all the efforts to diminish the incidence, chronic toxicity still remains an adverse event which can affect the quality of life in patients after prostate cancer radiotherapy. **Design:** The aim of this review is to provide a detailed description of chronic GI toxicity after external beam radiation therapy for prostate cancer, its causes, development, symptoms and incidence in different treatment techniques, and to compare the development of GI toxicity from the beginning of curative prostate cancer radiotherapy to now. **Conclusion:** Thanks to up-to-date radiotherapy techniques, the incidence of chronic GI toxicity is relatively low despite high doses of about 80 Gy used in prostate cancer treatment. Further reduction of radiation complications could be achieved by using image-guided radiotherapy (IGRT), which enables more precise delivery of the radiation dose to the prostate, reduction of the margin around the clinical target volume (CTV) and the sparing of organs at risk.

### Key words

toxicity – radiotherapy – proctitis – prostate cancer

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Jana Šefrová  
Klinika onkologie a radioterapie  
FN Hradec Králové  
Sokolská 581  
500 05 Hradec Králové  
e-mail: sefrova@fnhk.cz

Obdrženo/Submitted: 27. 5. 2009

Přijato/Accepted: 4. 9. 2009



## Úvod

Akutní nebo chronické poškození zdravých tkání je významným limitujícím faktorem radioterapie. U karcinomu prostaty bylo v několika randomizovaných studiích prokázáno, že eskalace dávky záření na prostatu vede ke zlepšení lokální kontroly, doby do biochemické progresse [1–5], doby do vzniku metastáz [6], v retrospektivních studiích i k prodloužení celkového přežití [7], a to zejména u pacientů se středním a vysokým rizikem. V dalším zvyšování dávky jsme ale omezení právě toxicitou léčby.

S rozvojem technických možností jsme od začátků používání radioterapie jako kurativní metody pro léčbu karcinomu

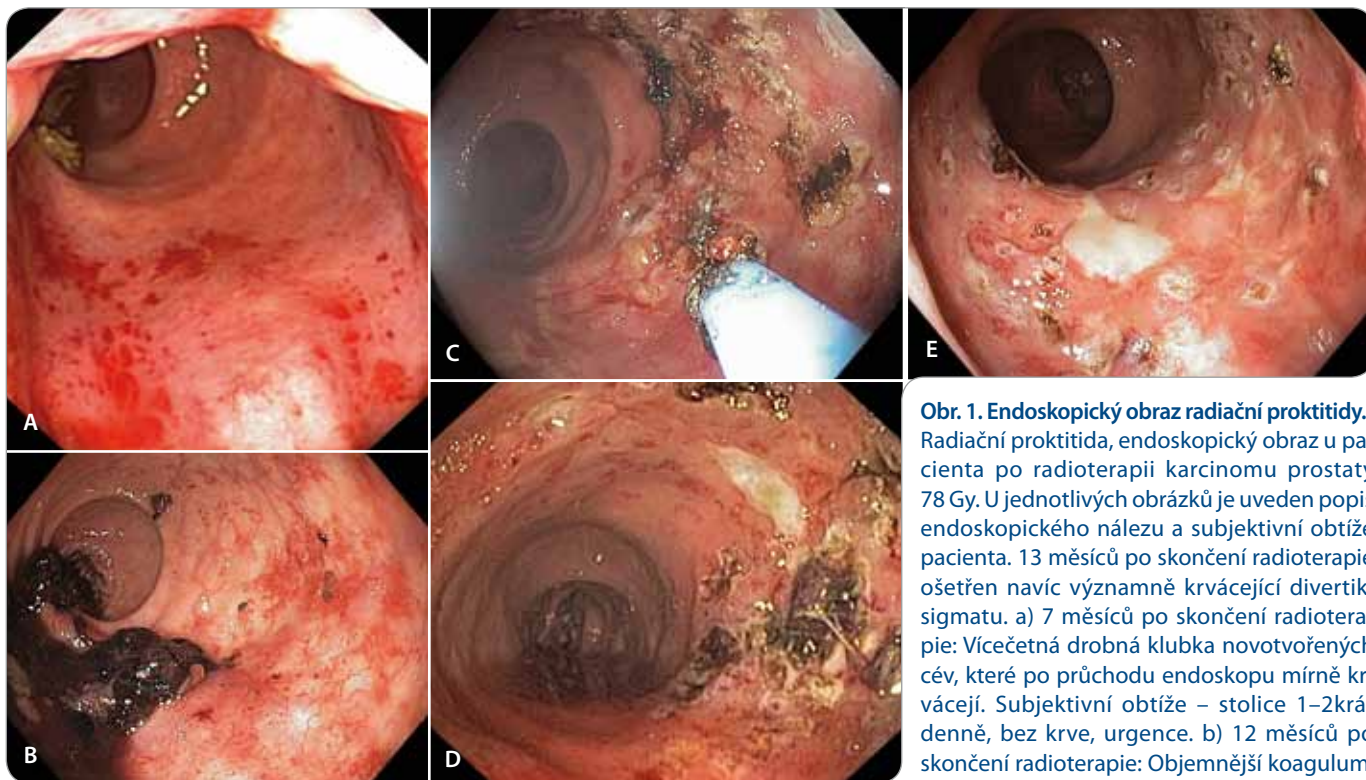
prostaty dospěli k významnému zlepšení lokální kontroly. Jak se přitom změnila gastrointestinální toxicita a co o ní víme, se pokouší zmapovat následující přehled.

## Definice

Jako chronické označujeme komplikace vyskytující se za 90 a více dní od ukončení radioterapie. Pro ozáření prostaty je typické postižení genitourinární (GU) a gastrointestinální (GI). V oblasti gastrointestinální se pak ve většině případů jedná o postižení rekta – radiační proktitidu. Méně často se při ozáření samotné prostaty setkáme s postižením anu a sigmatu a jen výjimečně s postižením tenkého střeva (narozdíl od ozáření celé pánve).

## Patofyziologie chronické GI toxicity

Chronické změny jsou způsobeny zejména progredujícím poškozením cév. Vlivem záření dochází k uvolňování růstových a inhibičních faktorů, dysregulaci na buněčné úrovni, apoptotické smrti buněk i změnám genové exprese. Rozvíjí se zánětlivá odpověď s převládající fibrotickou aktivitou. Mikroskopické změny se nachází v mukóze a submukóze, v pojivové tkáni se objevují atypické fibroblasty, přibývá kolagenních vláken, dochází k zeslabení stěny arterií a teleangiektaziím cév [8]. Zvýšená trombogenní aktivita endotelu vede k tvorbě fibrinových trombů v drobných arterio-



**Obr. 1. Endoskopický obraz radiační proktitidy.** Radiační proktitida, endoskopický obraz u pacienta po radioterapii karcinomu prostaty 78 Gy. U jednotlivých obrázků je uveden popis endoskopického nálezu a subjektivní obtíže pacienta. 13 měsíců po skončení radioterapie ošetřeno navíc významně krvácející divertikl sigmatu. a) 7 měsíců po skončení radioterapie: Vícečetná drobná klubka novotvořených cév, které po průchodu endoskopu mírně krvácejí. Subjektivní obtíže – stolice 1–2krát denně, bez krve, urgence. b) 12 měsíců po skončení radioterapie: Objemnější koagulum, čerstvá krev, setřelá podslizniční cévní kresba,

klubka novotvořených cév, místy s čerstvým krvácením. Ošetřeno argonovou plazmakoagulací. Subjektivní obtíže – odchod krve a koagul 2krát do týdne, stolice 2–3krát denně. Nutnost substituce erymasami. c) 14 měsíců po skončení radioterapie: V rektu koagula čerstvá krev, sliznice s klubíčky novotvořených cév, některé s ronícím krvácením, ulcerace kombinované etiologie (radiační + předchozí ošetření argonovou plazmakoagulací), v okrajích lne koagulum nebo roní krev. Ošetřeno argonovou plazmakoagulací. Subjektivní obtíže – stolice 1–3krát denně, odchod krve a koagul denně. Nutnost substituce erymasami. d) 15 měsíců po skončení radioterapie: Sliznice s klubíčky novotvořených cév, některé s ronícím krvácením, drobné hojící se ulcerace s jizvami v okolí kombinované etiologie (radiační + předchozí ošetření argonovou plazmakoagulací). Subjektivní obtíže – stolice 1–3krát denně, odchod tmavší krve 2krát do týdne. Bez nutnosti substituce erymasami. e) 16 měsíců po skončení radioterapie: Hojící se ulcerace po předchozím ošetření argonovou plazmakoagulací s fibrinovou spodinou, největší 12 mm. Mezi ulceracemi normální sliznice s jizvami a drobnými zbytky novotvořených cév. Jedno Inoucí koagulum, po odstranění patrna krvácející céva, ošetřena argonovou plazmakoagulací. Subjektivní obtíže – malé množství krve ve stolici 1–2krát do týdne. Bez nutnosti substituce erymasami.

Obrazová dokumentace byla zapůjčena laskavostí MUDr. Jirkovského z archivu oddělení gastroenterologie II. interní kliniky Fakultní nemocnice Hradec Králové.



lách, ischemii, případně ulceraci a krvácení. Časem začínají převažovat fibrotické změny, dochází k jizvení, mohou se objevit striktury, píštěle, vzácně obstrukce [9].

### Projevy chronické GI toxicity

Projevem chronické radiační proktitidy je nejčastěji enteroragie [10], vzácněji se objevují průjmy, časté stolice, tenesmy, odchod hlenu z konečníku nebo inkontinence stolice.

Endoskopicky můžeme pozorovat okrsky zarudnutí, křehkou sliznici, rozšířené, někdy i krvácející cévy, případně ulcerace (obr. 1).

Projevy se objevují nejčastěji v období prvních dvou let po léčbě s mediánem 12 měsíců [10–11]. U dvou třetin pacientů dochází do dvou let od projevů toxicity ke zlepšení až úplnému vymizení obtíží [9,12], některé studie uvádějí přetrvávání příznaků od 6 měsíců do konce života v závislosti na stupni postižení [13–14]. Toxicita druhého stupně odpovídá na medikaci nebo koagulaci v 90 %, toxicita třetího stupně v 75 % s mediánem trvání obtíží 10 měsíců [14]. U jedné čtvrtiny pacientů ovšem krvácení i přes léčbu pokračuje [14–15].

### Hodnocení chronické GI toxicity

Existuje několik stupnic pro hodnocení chronické radiační toxicity. Nejčastěji jsou používána RTOG/EORTC (Radiation Therapy Oncology Group/European Organisation for Research and Treatment of Cancer) Common Toxicity Criteria rozdělující toxicitu do pěti nepříliš konkrétně specifikovaných stupňů [16]. Podrobnější je klasifikace LENT-SOMA (Late Effects Normal Tissue Scale – Subjective, Objective, Management, Analytic) [17], další změny v hodnocení G2 a G3 toxicity přináší její modifikace FC-LENT (Fox Chase Modification of Late Effects Normal Tissue Scale) (tab. 1).

V publikacích uváděná procenta toxicity se podle použité škály hodnocení mohou lišit až o několik jednotek. Např. ve studii Hanlonové et al [15] se toxicita G3-4 objevuje během 5 let u 0,7 % pacientů při hodnocení dle RTOG/EORTC kritérií, u 2 % při použití klasifikace LENT a u 6 % při použití jimi navržené modifikace FC-LENT.

Pro popis chronických změn může být použita i některá z endoskopických klasifikací, např. Vienna Endoscopy Scoring (tab. 2), stanovená na základě standardního popisu endoskopického nálezu na sliznici rektu [18]. Bývá používána v kombinaci s některým z výše uvedených skórovacích systémů, neboť samostatný endoskopický nálezu nemusí odpovídat tíži klinických projevů a subjektivním obtížím pacienta. Navíc rektoskopické nebo sigmoidoskopické vyšetření pro pravidelné a dlouhodobé hodnocení toxicity není pro svou invazivitu vhodné.

### Faktory ovlivňující rozvoj GI toxicity

#### Faktory vázané na radioterapii

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro vznik radiačního poškození rektu je aplikovaná dávka záření, respektive absolutní a relativní objem rektu ozářený určitou dávkou, kde významnější roli hrají dávky vyšší. Tento fakt byl potvrzen v mnoha pracích zabývajících se eskalací dávky a různými technikami ozáření.

Vliv jednotlivé dávky byl potvrzen ve studii RTOG 9406, a to hned ve dvou ramenech, kde zvýšení denní dávky o 10 % (z 1,8 na 2,0 Gy) vedlo k signifikantnímu vzestupu G2 toxicity (21 % při dávce 74 Gy po 2 Gy vs 11 % při dávce 79,2 Gy po 1,8 Gy) a mírnému, leč statisticky nevýznamnému zvýšení G3 toxicity [19].

Z hlediska celkové dávky se spolehlivým nástrojem k predikci toxicity ukázal být dávkově-objemový histogram (dose volume histogram – DVH), který znázorňuje pokrytí cílového objemu a zatížení vyznačených rizikových orgánů pro každou dávku [10,20–23]. V randomizované studii s eskalací dávky z 68 na 78 Gy [20] byl prokázán významný rozdíl ve výskytu krvácení z rektu a inkontinence stolice. Největší rozdíly DVH pro rektum mezi oběma rameny jsou v dávkách 65–78 Gy, pod 20 Gy jsou křivky shodné, v oblasti 20–65 Gy jsou lehce vyšší dávky v rameni s eskalací na 78 Gy. Jako signifikantní pro výskyt  $\geq$  G2 krvácení z rektu vyšly objemy ozářené do 55, 60 a 65 Gy (V55, V60, V65). Hazard ratio při vzestupu V65 o 1 % je 1,052. Ve zmíněné studii byla toxicita  $\geq$  G2 1 % u pacientů, kteří měli V65 19 % vs 9 % u pacientů, kde V65 bylo 43 %. Autoři uzavírají,

že udržení V65 < 30 % vede k rozumné redukci rizika toxicity.

V práci Storeyho et al [21] byl výskyt toxicity 21 % pro dávku 78 Gy vs 14 % pro dávku 70 Gy. Analýza DVH u pacientů ozářených 78 Gy ukázala korelaci s objemem rektu ozářeného 70 Gy a vyšší dávkou. Pacienti s  $\geq$  25 % rektu ozářeného dávkou  $\geq$  70 Gy měli riziko komplikací G2 a horších 37 %, kdežto pacienti s objemem ozářeným  $\geq$  70 Gy menším než 25 % měli riziko komplikací 13 %. Všechny G3 komplikace se objevily u pacientů, kde dávku  $\geq$  70 Gy obdrželo  $\geq$  30 % objemu rektu. Podobně Boersma et al [22] popisují korelaci DVH s G3 krvácením. Obdobné závěry a doporučení činí ve své práci i Huang et al [10], v jejichž studii se korelace rizika s relativním objemem rektu objevuje pro všechny dávky, absolutní objem rektu hraje roli pouze pro dávky vyšší (70, 75,6 a 78 Gy), riziko komplikací stoupá v závislosti na sledovaných dozimetrických charakteristikách exponenciálně. Autoři pro snížení rizika doporučují dodržovat limity V60  $\leq$  40 %, V70  $\leq$  25 %, V75,6  $\leq$  15 %, V78  $\leq$  5 %. Pro absolutní objemy pak 75,6 Gy  $\leq$  4 cm<sup>3</sup>, 78 Gy  $\leq$  2 cm<sup>3</sup> [10]. O něco přísnější jsou limity vyplývající z práce Fiorina et al [23], kteří jako nejsilnější prediktory pro krvácení z rektu prokázali V40, V70 a předchozí břišní nebo pánevní chirurgický výkon. V limitu pro V60 a V70 se s Huangem et al [10] shodují, pro V75 doporučují udržet objem rektu ozářeného touto dávkou pod 5 %.

Pro riziko inkontinence vyžadující používání vložek se jako rizikové ukázalo ozáření stěny análního kanálu [20], kde dávky nad 46 Gy vedou k signifikantnímu zvýšení rizika, zatímco při dávce < 46 Gy je výskyt inkontinence do 10 %. Není zde žádná korelace s dávkou na stěnu rektu. Nejsilnějším prediktorem je střední dávka v anu Dmean a anální V65, korelace se ale objevuje pro všechny dozimetrické parametry, proto k minimalizaci rizika je nutné redukovat dávku na nejnižší možnou [20]. Fiorino et al [23] pro riziko inkontinence prokázali vliv V40 a předchozího chirurgického výkonu, doporučují dodržování limitu V40 < 65–70 % objemu rektu.

Pro zvýšenou frekvenci stolice ( $\geq$  6krát denně) je signifikantní korelace s obje-

Tab. 1. Stupnice hodnocení chronické gastrointestinální toxicity.

Grade	RTOG	LENT	FC-LENT
G 1	<p>stolice &lt; 5krát/den</p> <p>mírné křeče</p> <p>mírný průjem</p> <p>mírný dyskomfort</p> <p>mírné krvácení</p>	<p>stolice 2–4krát/den</p> <p>odchod hleny ≤ 1krát/týden</p> <p>bolest vyžadující podání neopioidních analgetik &lt; 1krát/týden</p> <p>tenesmy a nucení na stolicí vyžadující podání antidiaroika ≤ 2krát/týden</p> <p>okultní krvácení vyžadující preparáty železa nebo projímadla</p> <p>povrchová ulcerace ≤ 1 cm<sup>2</sup> vyžadující úpravu diety nebo projímadla</p> <p>striktura na &gt; 2/3 průměru vyžadující úpravu diety</p> <p>inkontinence vyžadující použití vložek &lt; 1krát/týden</p>	<p>stolice 2–4krát/den</p> <p>odchod hleny ≤ 1krát/týden</p> <p>bolest vyžadující podání neopioidních analgetik &lt; 1krát/týden</p> <p>tenesmy a nucení na stolicí vyžadující podání antidiaroika ≤ 2krát/týden</p> <p>okultní krvácení vyžadující preparáty železa nebo projímadla</p> <p>povrchová ulcerace ≤ 1 cm<sup>2</sup> vyžadující úpravu diety nebo projímadla</p> <p>striktura na &gt; 2/3 průměru vyžadující úpravu diety</p> <p>inkontinence vyžadující použití vložek &lt; 1krát/týden</p>
G 2	<p>stolice &gt; 5krát/den</p> <p>středně závažný průjem a dyskomfort</p> <p>výrazný odchod hleny</p> <p>intermitentní krvácení</p>	<p>stolice 4–8krát/den</p> <p>odchod hleny &gt; 2krát/týden vyžadující podání antidiaroik &gt; 2krát/týden</p> <p>intermitentní bolest vyžadující pravidelné užívání neopioidních analgetik</p> <p>tenesmy a nucení na stolicí vyžadující antidiaroika &gt; 2krát/týden</p> <p>krvácení &gt; 2krát/týden vyžadující občasné transfuze</p> <p>povrchová ulcerace &gt; 1 cm<sup>2</sup> vyžadující podání kortikoidů &lt; 1krát/týden</p> <p>striktura na 1/3–2/3 průměru vyžadující občasné dilatace</p> <p>inkontinence vyžadující používání vložek &gt; 1krát/týden</p>	<p>stolice 4–8krát/den</p> <p>odchod hleny &gt; 2krát/týden vyžadující podání antidiaroik &gt; 2krát/týden</p> <p>intermitentní bolest vyžadující pravidelné užívání neopioidních analgetik</p> <p>tenesmy a nucení na stolicí vyžadující antidiaroika &gt; 2krát/týden</p> <p>krvácení &gt; 2krát/týden vyžadující ≤ 2 koagulace</p> <p>povrchová ulcerace &gt; 1 cm<sup>2</sup> vyžadující podání kortikoidů &lt; 1krát/týden</p> <p>striktura na 1/3–2/3 průměru vyžadující občasné dilatace</p> <p>inkontinence vyžadující používání vložek &gt; 1krát/týden</p>
G 3	<p>obstrukce nebo krvácení vyžadující chirurgickou intervenci</p>	<p>stolice &gt; 8krát/den</p> <p>trvalý odchod hleny</p> <p>trvalá intenzivní bolest vyžadující pravidelné užívání opioidních analgetik</p> <p>trvalé nucení na stolicí vyžadující antidiaroika &gt; 2krát/den</p> <p>krvácení denně, vyžadující časté transfuze</p> <p>hluboká ulcerace vyžadující podání kortikoidů v klyzmatu nebo hyperbaroxii</p> <p>striktura na &lt; 1/3 průměru vyžadující pravidelné dilatace</p> <p>inkontinence vyžadující trvalé používání vložek</p>	<p>stolice &gt; 8krát/den</p> <p>trvalý odchod hleny</p> <p>trvalá intenzivní bolest vyžadující pravidelné užívání opioidních analgetik</p> <p>trvalé nucení na stolicí vyžadující antidiaroika &gt; 2krát/den</p> <p>krvácení vyžadující &gt; 2 koagulace nebo transfuzi</p> <p>hluboká ulcerace vyžadující podání kortikoidů v klyzmatu nebo hyperbaroxii</p> <p>striktura na &lt; 1/3 průměru vyžadující pravidelné dilatace</p> <p>inkontinence vyžadující trvalé používání vložek</p>



## » Pokračování tab. 1.

Grade	RTOG	LENT	FC-LENT
G 4	nekróza	nekontrolovatelný průjem vyžadující kolostomii	nekontrolovatelný průjem vyžadující kolostomii
	perforace	trvalý odchod hleny refrakterní na léčbu	trvalý odchod hleny refrakterní na léčbu
	píštěl	vyčerpávající bolest refrakterní na léčbu nebo vyžadující chirurgické ošetření	vyčerpávající bolest refrakterní na léčbu nebo vyžadující chirurgické ošetření
		trvalé nucení na stolicí vyžadující kolostomii	trvalé nucení na stolicí vyžadující kolostomii
		výrazné krvácení vyžadující chirurgické řešení nebo kolostomii	výrazné krvácení vyžadující chirurgické řešení nebo kolostomii
		perforace nebo píštěl vyžadující chirurgické řešení nebo kolostomii	perforace nebo píštěl vyžadující chirurgické řešení nebo kolostomii
G 5	fatální toxicita – úmrtí	kompletní obstrukce vyžadující chirurgické řešení nebo kolostomii	kompletní obstrukce vyžadující chirurgické řešení nebo kolostomii
		inkontinence vyžadující kolostomii	inkontinence vyžadující kolostomii
		fatální toxicita – úmrtí nebo kolostomie	fatální toxicita – úmrtí nebo kolostomie

RTOG – Radiation Therapy Oncology Group, LENT – Late Effects Normal Tissue Scale, FC-LENT – Fox Chase Modification of Late Effects Normal Tissue Scale

Tab. 2. Vienna Rectoscopy Score.

Skóre	Kongesce sliznice	Teleangiektasie	Ulcerace	Striktura	Nekróza
0	1 – fokální zarudnutí a otok	0 – žádné	0 – bez ulcerace	0 – žádná	0 – bez nekrózy
1	2 – difuzní nesplývající zarudnutí a otok	1 – jednotlivé	0 – bez ulcerace	0 – žádná	0 – bez nekrózy
2	3 – difuzní splývající zarudnutí a otok	2 – mnohočetné nesplývající	0 – bez ulcerace	0 – žádná	0 – bez nekrózy
3	0 – 3	3 – mnohočetné splývající	1 – povrchová ulcerace < 1 cm <sup>2</sup>	0 – žádná	0 – bez nekrózy
4	0 – 3	0 – 3	2 – povrchová ulcerace > 1 cm <sup>2</sup>	1 – zúžení na > 2/3 průměru	0 – bez nekrózy
5	0 – 3	0 – 3	3 – hluboká ulcerace 4 – píštěl, perforace	2 – zúžení na 1/3–2/3 průměru 3 – zúžení na < 1/3 průměru 4 – kompletní obstrukce	1 – jakákoliv nekróza

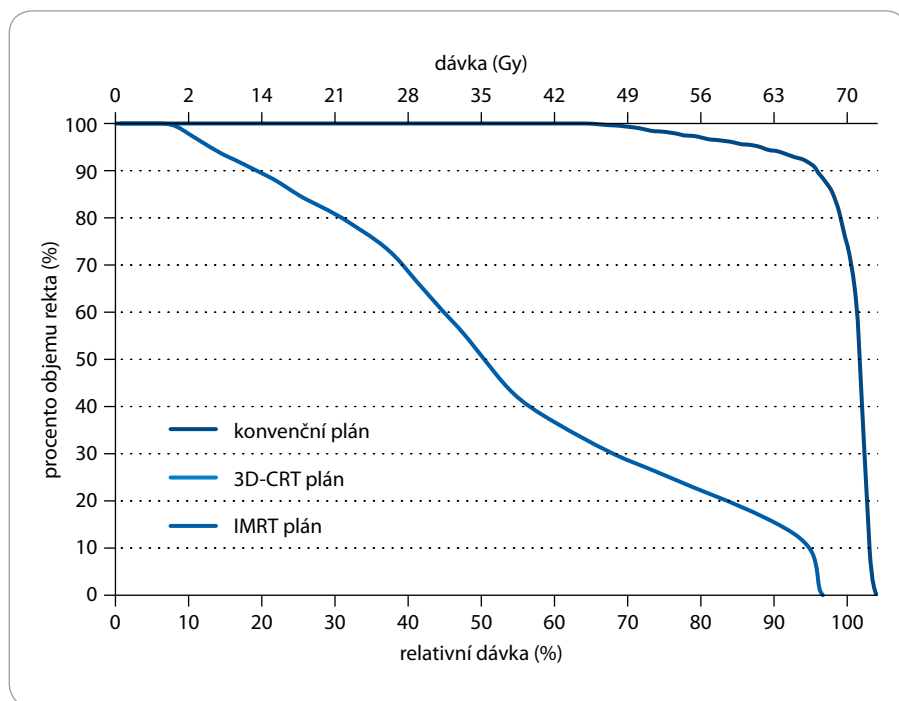
mem ozářeným do dávky 40 Gy a Dmean na anorektum [20] a s předchozím chirurgickým výkonem břišním nebo pánevním [23]. Pro křeče, tenesmy a bolesti G3 nebyla nalezena asociace s DVH [20], opět vyšší riziko se objevuje u pacientů po prodělaném chirurgickém zákroku [23], proto je doporučováno u pacientů

po předchozích břišních a pánevních operacích limity pro dávku na rektum udržovat přísněji, V 70 < 15% [23].

#### Faktory vázané na pacienta

Ze zkoumaných komorbidit, které by mohly zvyšovat riziko pozdní toxicity, byl v některých studiích prokázán vliv

diabetu na vznik G2 toxicity. Ve studii Herolda et al [24] byl rozdíl incidence G2 toxicity u diabetiků a nediabetiků 28% vs 17%. Pro G3 a G4 stupně toxicity nebyl prokázán statisticky významný rozdíl. Jiné práce však vyšší riziko toxicity nepotvrzují [10], sami autoři ale poukazují na to, že populace diabetiků v jejich



**Obr. 2. Dávkově-objemový histogram pro rektum.**

Porovnání dávkově-objemových histogramů pro rektum při celkové dávce 70 Gy. Znázorněny jsou křivky pro konvenční plán (vpravo), plán konformní (3D-CRT, uprostřed) a plán pro radioterapii s modulovanou intenzitou (IMRT, vlevo).

souboru byla minoritní a nedosahovala počtu potřebného k průkazu významných rozdílů. Riziko GI toxicity signifikantně zvyšuje výskyt hemoroidů před léčbou [10], výskyt GI symptomů před zahájením radioterapie [25], předchozí chirurgické břišní výkony, a to jak pánevní lymfadenektomie pro stanovení stadia, tak i jiné, s tumorem prostaty nesouvisějící operace [23,25]. Výskyt radiační proktitidy je též popisován častěji u pacientů s divertikulitidou nebo střevními zánehy (Crohnova choroba, colitis ulcerosa),

ale počty pacientů s anamnézou těchto chorob jsou příliš malé [26–27]. Jako nezávislý prediktivní faktor se ukazuje i výskyt akutní toxicity. Ve studii Zelefskeho et al [28] je incidence chronické GI toxicity v 10 letech 42% u pacientů, kteří měli projevy akutní toxicity, a 9% u pacientů, kteří akutní projevy neměli. Někteří autoři dokonce v této souvislosti hovoří o chronické toxicitě jako o následku iniciačního poškození tkání [29], ač vysvětlením může být např. i zvýšená reaktivita pacienta k záření, a to jak ve fázi akutní,

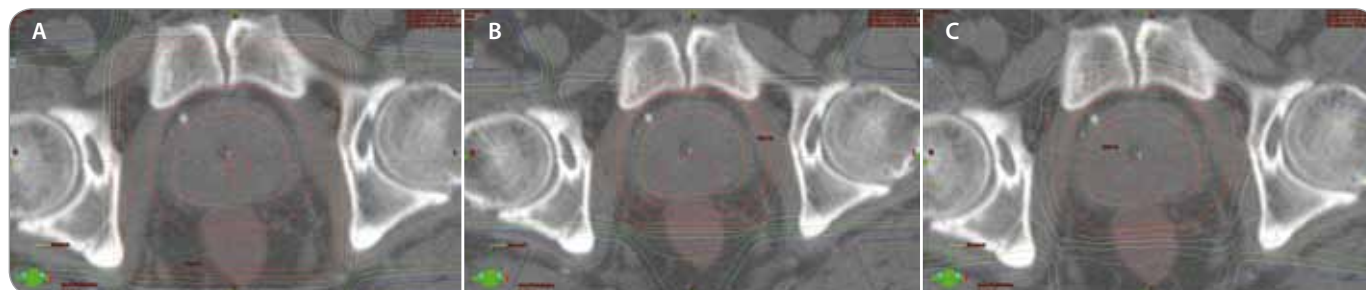
tak chronické. Přítomnost více rizikových faktorů současně riziko pozdní toxicity násobí [20].

**Redukce rizika chronické GI toxicity technikou ozáření**

**Konvenční vs konformní radioterapie karcinomu prostaty**

Konvenční radioterapie byla v kurativní léčbě karcinomu prostaty používána od 70. let 20. století, dostala se ale do pozadí s rozvojem modernějších a bezpečnějších metod. V 80. letech to byla trojrozměrná konformní radioterapie (3D-CRT), jejíž zavedení do praxe bylo možné díky rozšíření počítačové tomografie (CT). V dalším desetiletí se potom rozvíjela radioterapie s modulovanou intenzitou svazku (intensity modulated radiotherapy – IMRT). Obě tyto metody umožňují větší šetření zdravých tkání při doručení stejné nebo dokonce vyšší dávky do cílového objemu (obr. 2 a 3).

Existuje více prací srovnávajících konvenční a konformní ozáření. Pro ilustraci redukce toxicity je na prvním místě uvedena randomizovaná studie porovnávající toxicitu konvenční a konformní radioterapie při dávce 64 Gy [30]. Mezi oběma rameny nebyly rozdíly v lokální kontrole ani v celkovém přežití, jak lze při stejné dávce předpokládat. V konformních plánech bylo ozářeno o 48% objemu rekta (a 38% objemu močového měchýře) méně než v plánech konvenčních. Toxicita byla hodnocena dle RTOG kritérií. V genitourinární toxicitě  $\geq$  G2 nebyly signifikantní rozdíly. V GI toxicitě bylo nejčastějším projevem krvácení. Gastrointestinální toxicita G1 se objevila u 56% pacientů ozářených kon-



**Obr. 3. Porovnání izodozových plánů pro různé techniky radioterapie.**

Porovnání izodozových plánů – a) konvenční technika 4 polí (0°, 90°, 180°, 270°); b) konformní technika (3D-CRT) 4 polí (30°, 90°, 270°, 330°); c) technika radioterapie s modulovanou intenzitou (IMRT) 5 polí (45°, 100°, 180°, 260°, 315°). Všechny plány jsou spočítány pro stejnou celkovou dávku 70 Gy. Hnědě rektum, oranžově prostata (CTV – klinický cílový objem), červeně prostata s lemem 1 cm (PTV – plánovací cílový objem).



venční technikou a pouze u 37 % ozářených konformně. Nejčastějším projevem bylo krvácení,  $\geq G1$  se vyskytlo u 51 % vs 34 %,  $\geq G2$  u 12 % vs 3 % pro konvenční vs konformní techniku.

Podobný výskyt toxicity uvádějí i další autoři. Lee et al [31] porovnávali též konvenční a konformní ozáření, přičemž pacienti ozáření konvenční technikou obdrželi dávku 66 Gy, pacienti ozáření 3D-CRT dávku 74 Gy. Toxicita byla hodnocena dle modifikovaných RTOG a LENT kritérií, kde incidence  $\geq G2$  byla 21 % u konvenčních plánů a 1 % u 3D-CRT plánů, hodnoceno dle modifikované RTOG/LENT stupnice, 12 % vs 1 % při hodnocení dle RTOG stupnice.

Rozsáhlý soubor pacientů ozářených konvenční technikou 4 polí, dávkou 50 Gy na pánev s boostem 20 Gy na prostatu přinesla analýza studie EORTC 22 863 určená primárně k vyhodnocení efektu adjuvantní hormonální terapie. GI toxicita se vzhledem k dávce a velikosti polí objevuje u menšího procenta pacientů, než by se dalo očekávat,  $G2$  u 9,5 %,  $G3$  u 0,3 % pacientů hodnoceno dle RTOG [32].

Obdobné hodnoty pro 3D-CRT 70–74 Gy uvádějí i Huang et al [10], riziko toxicity  $\geq G2$  25 % v 6 letech ( $G2$  21 %,  $G3$  6 %).

Konvenční radioterapie se ukázala nevhodná pro eskalaci dávky kvůli enormnímu riziku toxicity při dávkách nad 75 Gy. Smit et al [33] ve své práci uvádějí riziko  $\geq G2$  GI toxicity 22 % při dávce na přední stěnu rekta  $< 70$  Gy, 20 % při dávce 70–75 Gy, ale 60 %, pokud dávka na přední stěnu rekta přesáhla 75 Gy, což je riziko neakceptovatelné.

#### Konformní vs IMRT radioterapie karcinomu prostaty

Další redukci rizika toxicity přineslo zavedení IMRT do praxe v 90. letech 20. století. Pro porovnání konformní radioterapie a IMRT prostaty neexistuje prospektivní randomizovaná studie, pomineme-li data z holandské studie s eskalací dávky na 78 Gy, kde ale porovnání obou metod nebylo primárním cílem. Podskupina ozářená do 78 Gy technikou 3D-CRT se sekvenčním boostem nebo IMRT se simultánním integrovaným boostem (SIB) čítá pouze 78 pacientů, u nichž akutní

GI toxicita  $\geq G2$  byla 61 % pro 3D-CRT vs 20 % pro IMRT. Pro chronickou toxicitu byl sice výskyt v rameni IMRT nižší (toxicita  $\geq G2$  21 % vs 37 %, toxicita  $G3$  0 % vs 7 %), ale ne statisticky významně [34].

Signifikantních rozdílů dosahují údaje Zelefskeho et al [28], kteří porovnávali data od více než 1 500 pacientů ozářených dávkou 68–81 Gy po 1,8 Gy technikou 3D-CRT nebo IMRT. Toxicita byla hodnocena podle NCI kritérií (National Cancer Institute's Common Terminology Criteria for Adverse Events, version 3.0). Toxicitu  $\geq G2$  mělo 6 % pacientů, toxicitu  $G3$  1 % pacientů. Pravděpodobnost výskytu toxicity  $\geq G2$  v 10 letech byla 9 %, signifikantně méně pro skupinu IMRT oproti 3D-CRT (5 % vs 13 %). Pro pacienty ozářené dávkou 70,2 Gy to bylo 7 %, při dávce 75,6 Gy 18 %, při 81 Gy pouze 5 %. Pokles v toxicitě při eskalaci dávky na 81 Gy vysvětluje právě použití IMRT u všech pacientů v této podskupině. Riziko  $G3$  toxicity v 10 letech bylo 1 %, při použití IMRT  $< 1$  %.

#### Redukce rizika chronické GI toxicity nastavením pacienta při ozáření

Dávka záření, která se dostane na rektum při samotném ozáření, závisí do značné míry na tom, jak dobře je pacient nastaven do plánované polohy. Je jasné, že pokud bude rektum posunuto směrem do ozařovaného objemu, bude dávka vyšší, než jsme předpokládali dle plánovacího CT a než jsme spočítali v námi zvoleném plánu. Existují různé způsoby, jak můžeme tento posun, způsobený chybou v nastavení nebo pohybem vnitřních orgánů, omezit.

Nejjednodušší je korekce nastavení na kostěné struktury, lepší potom korekce nastavení na samotnou prostatu, ať už s použitím kontrastních markerů zavedených do prostaty nebo bez nich. Takovou korekci umožňuje metoda obrazem řízené radioterapie (image-guided radiotherapy – IGRT). Přesné nastavení umožňuje zmenšit bezpečnostní lem nutný k dostatečnému ozáření klinického cílového objemu (clinical target volume – CTV), a tím i objem ozářených okolních zdravých tkání. Jaké lemy je nutno zvolit pro různé typy korekce nastavení, vyhodnocovali Meijer et al [35]. Pokud bylo pro-

vedeno nastavení pacienta na značky na kůži bez další korekce, byl by pro dostatečné ozáření CTV u 90 % pacientů nutný lem 11 mm kolem prostaty a 15 mm kolem semenných váčků. Byla-li provedena korekce na kostěné struktury, zmenšil se lem na 8 a 13 mm. Při korekci na zlatá zrna zavedená do prostaty na 3 a 8 mm [35].

Jak vyplývá z výše uvedeného, je nejbezpečnější korekce nastavení na prostatu za použití IGRT, už proto, že orgány v malé pánvi se vůči kostěným strukturám pohybují [36–38]. Největší změny polohy prostaty jsou udávány v předozadním (anterioposteriorní – AP) směru, méně v laterálním (left-right – LF) a kraniokaudálním (superioinferiorní – SI) [36–39]. Ve studii Bylunda et al [36] byl průměrný vektor celkové odchylky 6,7 mm. Střední chyba nastavení byla 4,8 mm ve směru předozadním, 2,9 mm v laterálním a 2,1 mm v kraniokaudálním. Ve studii Brittona et al [38] to bylo 3,78 cm v AP směru, 1,76 cm v RL a 3,14 cm v SI směru. V práci Wonga et al [37] mělo odchytku  $< 3$  mm, tedy bez nutnosti další korekce, v AP směru 44 % pacientů, v LR 65 % a v SI 81 % pacientů. Pohyblivost semenných váčků je o něco vyšší než pohyblivost samotné prostaty, proto je doporučován větší bezpečnostní lem. V práci Lianga et al [40] za použití IG-IMRT s korekcí na prostatu denně je to 4,5 mm na semenné váčky, na prostatu pouze 3 mm. Při volbě PTV, případně jeho redukci, je ale nutno brát v úvahu kromě pohybu prostaty mezi frakcemi, který můžeme minimalizovat správnou korekcí, i další faktory, mezi něž patří nepřesnost při konturování CTV, interobserver variabilita (tj. rozdíl kontur zakreslených různými, i když zkušenými radiačními onkology), intraobserver variabilita (tj. rozdíl kontur zakreslených týměž radiačním onkologem s časovým odstupem), nepřesnost provedení fúze při korekci nastavení (fúze na prostatu nebo markery zavedené do prostaty) a konečně pohyb prostaty během ozáření (intrafraction motion – IM). Ten byl již celkem podrobně zdokumentován, odpovídá peristaltice střev a rekta, pohybuje se většinou v řádu několika milimetrů, ale může dosáhnout i více než 1 cm. Takovéto velké odchytky se ale objevují výjimečně a mívají velmi krátké trvání,

proto není nutno s nimi při stanovování lemu pro PTV počítat [41]. Ve studii Maha et al [41] byla IM < 1 mm, Britton et al [38] uvádějí odchylky 0,45 mm ve směru LR, 1,08 mm v SI a 1,45 mm v AP směru, Beltran et al [39] 2,4 mm v LR, 3,4 mm v SI a 5,2 mm v AP směru. Tito autoři ve své práci hodnotili i interobserver variabilitu, která činila ve všech směrech < 0,5 mm. Doporučení pro lem kolem CTV zahrnuje součet všech odchylek, v případě práce Beltrana et al [39] (korekce denně na zavedená zlatá zrna) činí doporučené lemy 4,8 mm v LR směru, 5,4 mm v SI a 5,2 mm v AP směru. Z těchto údajů lze soudit, že lem kolem CTV by se při denní korekci na kontrastní markery v prostatě neměl dostat pod 5 mm. Je na zvážení každého pracoviště, jaké má technické možnosti redukce chyb v jednotlivých krocích, a tedy jak velký lem kolem CTV by měl být zvolen.

Začínají se objevovat práce porovnávací toxicitu za použití IGRT. Skala et al [42] vyhodnotili toxicitu zpětně za použití dotazníků zasláných pacientům po skončení ozáření. Návratnost byla 63 %, toxicita při dávce 75,6 Gy nebo 79,8 Gy byla G1 25,2 %, G2 2,5 %, G3 0,7 %. Chung et al [43] porovnávali 25 pacientů ozářených na prostatu a pánev ve dvou centrech, v jednom IMRT s lemem 1 cm kolem CTV ve všech směrech kromě 0,5 cm směrem k rektu, v druhém IG-IMRT s lemem 2–3 mm kolem CTV. Dávka na rektum i močový měchýř byla pro IG-IMRT signifikantně nižší, akutní GI toxicita G2 dle RTOG byla 80 % vs 13 % pro IMRT versus IG-IMRT, zhodnocení chronické toxicity zatím chybí. Obě tyto práce mají bohužel řadu nedostatků – různé dávky záření, malá návratnost dotazníků se zpětným vyhodnocením, kde lze předpokládat větší spolupráci u pacientů, kteří nemají obtíže, malý počet pacientů ve druhé studii, v rameni IMRT pouze 10, kde toxicita u jediného pacienta znamená rozdíl 10 %.

Ačkoliv je zřejmé, že využití IGRT umožňuje zmenšit lem kolem CTV, čímž vede k redukci dávky na rizikové orgány, přesvědčivé důkazy o snížení chronické toxicity zatím chybí.

## Závěr

Chronická GI toxicita zůstává stále jedním z hlavních problémů zhoršujících

kvalitu života pacientů po radikální radioterapii karcinomu prostaty. Její výskyt se podařilo znatelně snížit moderními metodami radioterapie, kdy při dávkách 75–80 Gy dnes standardně používaných je riziko  $\geq$  G2 toxicity 20–25 % při použití 3D-CRT a obvykle nižší než 20 % při použití IMRT. Při ozáření konvenční technikou by při stejné dávce bylo postiženo minimálně 50 % pacientů. Vliv na riziko postižení má i jednotlivá denní dávka záření. Významné rozdíly můžeme pozorovat při použití různých škál hodnocení, z nichž nejpodrobnější, a tím i nejcitlivější, je stupnice FC-LENT, případně ještě doplněná popisem endoskopického obrazu.

Riziko postižení lze predikovat, ale zároveň redukovat pomocí DVH, resp. dodržováním limitů dávky, kterou obdrží určité procento objemu rekta. Z doporučovaných limitů jsou to hlavně objemy  $V60 \leq 40\%$ ,  $V70 \leq 25\%$ ,  $V75 \leq 5\%$ . Nutno dodat, že u tří čtvrtin pacientů jsou projevy toxicity reverzibilní, reagují na léčbu nebo spontánně mizí během dvou let od svého vzniku.

Slibnou metodou pro snížení toxicity radioterapie obecně se zdá být IGRT, práce potvrzující redukci chronické GI toxicity při radioterapii karcinomu prostaty však zatím chybí.

## Literatura

- Al-Mamgani A, van Putten WL, Heemsbergen WD et al. Dutch multicenter dose-escalation trial of radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72(4): 980–988.
- Peeters ST, Heemsbergen WD, Koper PC et al. Dose-response in radiotherapy for localized prostate cancer: results of the Dutch multicenter randomized phase III trial comparing 68 Gy of radiotherapy with 78 Gy. *J Clin Oncol* 2006; 24(13): 1990–1996.
- Zietman AL, DeSilvio ML, Slater JD et al. Comparison of conventional-dose vs high-dose conformal radiation therapy in clinically localized adenocarcinoma of the prostate: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 294(10): 1233–1239.
- Deamaley DP, Sydes MR, Graham JD et al. Escalated-dose versus standard-dose conformal radiotherapy in prostate cancer: first results from the MRC RT01 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2007; 8(6): 475–487.
- Zelevsky MJ, Leibel SA, Gaudin PB et al. Dose escalation with three-dimensional conformal radiation therapy affects the outcome in prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41(3): 491–500.
- Zelevsky MJ, Yamada Y, Fuks Z et al. Long-term results of conformal radiotherapy for prostate cancer: impact of dose escalation on biochemical tumor control and distant metastases-free survival outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 71(4): 1028–1033.
- Jacob R, Hanlon AL, Horwitz EM et al. The relationship of increasing radiotherapy dose to reduced distant meta-

stases and mortality in men with prostate cancer. *Cancer* 2004; 100(3): 538–543.

8. Perez CA, Brady LW, Halperin EC et al (eds). *Principles and Practice of Radiation Oncology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins 2004: 357–361, 379–383.

9. Garg AK, Mai WY, McGary JE et al. Radiation proctopathy in the treatment of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66(5): 1294–1305.

10. Huang EH, Pollack A, Levy L et al. Late rectal toxicity: dose-volume effects of conformal radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54(5): 1314–1321.

11. Pilepich MV, Krall J, George FW et al. Treatment-related morbidity in phase III RTOG studies of extended-field irradiation for carcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1984; 10(10): 1861–1867.

12. Cho KH, Lee CK, Levitt SH. Proctitis after conventional external radiation therapy for prostate cancer: importance of minimizing posterior rectal dose. *Radiology* 1995; 195(3): 699–703.

13. Gilinsky NH, Burns DG, Barbezat GO et al. The natural history of radiation-induced proctosigmoiditis: an analysis of 88 patients. *Q J Med* 1983; 52(205): 40–53.

14. Teshima T, Hanks GE, Hanlon AL et al. Rectal bleeding after conformal 3D treatment of prostate cancer: time to occurrence, response to treatment and duration of morbidity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39(1): 77–83.

15. Hanlon AL, Schultheiss TE, Hunt MA et al. Chronic rectal bleeding after high-dose conformal treatment of prostate cancer warrants modification of existing morbidity scales. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 38(1): 59–63.

16. Cox JD, Stetz J, Pajak TF et al. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31(5): 1341–1346.

17. Pavy JJ, Denekamp J, Letschert J et al. EORTC Late Effects Working Group. Late Effects toxicity scoring: the SOMA scale. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31(5): 1043–1047.

18. Wächter S, Gerstner N, Goldner G et al. Endoscopic scoring of late rectal mucosal damage after conformal radiotherapy for prostatic carcinoma. *Radiother Oncol* 2000; 54(1): 11–19.

19. Michalski JM, Winter K, Purdy JA et al. Toxicity after three-dimensional radiotherapy for prostate cancer on RTOG 9406 dose Level V. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62(3): 706–713.

20. Peeters ST, Lebesque JV, Heemsbergen WD et al. Localized volume effects for late rectal and anal toxicity after radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 64(4): 1151–1161.

21. Storey MR, Pollack A, Zagars G et al. Complications from radiotherapy dose escalation in prostate cancer: preliminary results of a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48(3): 635–642.

22. Boersma LJ, van den Brink M, Bruce AM et al. Estimation of the incidence of late bladder and rectum complications after high-dose (70–78 Gy) conformal radiotherapy for prostate cancer, using dose-volume histograms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41(1): 83–92.

23. Fiorino C, Fellin G, Rancati T et al. Clinical and dosimetric predictors of late rectal syndrome after 3D-CRT for localized prostate cancer: preliminary results of a multicenter prospective study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70(4): 1130–1137.

24. Herold DM, Hanlon AL, Hanks GE. Diabetes mellitus: a predictor for late radiation morbidity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1999; 43(3): 475–479.

25. Peeters ST, Heemsbergen WD, van Putten WL et al. Acute and late complications after radiotherapy for prostate cancer: results of a multicenter randomized trial comparing 68 Gy to 78 Gy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61(4): 1019–1034.

26. Willett CG, Ooi CJ, Zietman AL et al. Acute and late toxicity of patients with inflammatory bowel disease under-

going irradiation for abdominal and pelvic neoplasms. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46(4): 995–998.

27. Song DY, Lawrie WT, Abrams RA et al. Acute and late radiotherapy toxicity in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 51: 455–459.

28. Zelefsky MJ, Levin EJ, Hunt M et al. Incidence of late rectal and urinary toxicities after three-dimensional conformal radiotherapy and intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70(4): 1124–1129.

29. Heemsbergen WD, Peeters ST, Koper PC et al. Acute and late gastrointestinal toxicity after radiotherapy in prostate cancer patients: consequential late damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66(1): 3–10.

30. Dearnaley DP, Khoo VS, Norman AR et al. Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial. *Lancet* 1999; 353(9149): 267–272.

31. Lee CM, Lee RJ, Handrahan DL et al. Comparison of late rectal toxicity from conventional versus three-dimensional conformal radiotherapy for prostate cancer: analysis of clinical and dosimetric factors. *Urology* 2005; 65(1): 114–119.

32. Ataman F, Zurlo A, Artignan X et al. Late toxicity following conventional radiotherapy for prostate cancer:

analysis of the EORTC trial 22863. *Eur J Cancer* 2004; 40(11): 1674–1681.

33. Smit WG, Helle PA, van Putten WL et al. Late radiation damage in prostate cancer patients treated by high dose external radiotherapy in relation to rectal dose. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18(1): 23–29.

34. Al-Mamgani A, Heemsbergen WD, Peeters ST et al. Role of intensity-modulated radiotherapy in reducing toxicity in dose escalation for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73(3): 685–691.

35. Meijer GJ, de Klerk J, Bzdusek K et al. What CTV-to-PTV margins should be applied for prostate irradiation? Four-dimensional quantitative assessment using model-based deformable image registration techniques. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72(5): 1416–1425.

36. Bylund KC, Bayouth JE, Smith MC et al. Analysis of interfraction prostate motion using megavoltage cone beam computed tomography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72(3): 949–956.

37. Wong JR, Gao Z, Uematsu M et al. Interfractional prostate shifts: review of 1 870 computed tomography (CT) scans obtained during image-guided radiotherapy using CT-on-rails for the treatment of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72(5): 1396–1401.

38. Britton KR, Takai Y, Mitsuya M et al. Evaluation of inter- and intrafraction organ motion during intensity modulated radiation therapy (IMRT) for localized prostate cancer measured by a newly developed on-board image-guided system. *Radiat Med* 2005; 23(1): 14–24.

39. Beltran C, Herman MG, Davis BJ. Planning target margin calculations for prostate radiotherapy based on intrafraction and interfraction motion using four localization methods. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70(1): 289–295.

40. Liang J, Wu Q, Yan D. The role of seminal vesicle motion in target margin assessment for online image-guided radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73(3): 935–943.

41. Mah D, Freedman G, Milestone B et al. Measurement of intrafractional prostate motion using magnetic resonance imaging. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54(2): 568–575.

42. Skala M, Rosewall T, Dawson L et al. Patient-assessed late toxicity rates and principal component analysis after image-guided radiation therapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 68(3): 690–698.

43. Chung HT, Xia P, Chan LW et al. Does image-guided radiotherapy improve toxicity profile in whole pelvic-treated high-risk prostate cancer? Comparison between IG-IMRT and IMRT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 73(1): 53–60.

# Úvaha nad vývojem screeningu kolorektálního karcinomu

## Reflection about the Colorectal Carcinoma Screening Evolution

Šachlová M.<sup>1</sup>, Novák J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Gastroenterologická ambulance, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup> Úsek správy Národního onkologického registru, Masarykův onkologický ústav, Brno

Sekundární prevence kolorektálního karcinomu (KRCA) je jedním z potenciálně účinných nástrojů ke snížení mortality na toto zhoubné nádorové onemocnění.

Počátky snah o sekundární prevenci KRCA v České republice sahají k přelomu 70. a 80. let minulého století. Od 1. 7. 2000 je vyšetření stolice na okultní krvácení (OK) guajakovou metodou součástí preventivní prohlídky u praktického lékaře. Provádí se u asymptomatických osob ve věku nad 50 let ve dvouletých intervalech. Pacienti s pozitivním testem na OK jsou indikováni ke kolonoskopii.

Informace o počtech kolonoskopických vyšetření v návaznosti na vyšetření OK a o záchytu adenomu či karcinomu byly do roku 2005 shromažďovány v listinné podobě. Od roku 2006 jsou údaje o screeningu KRCA v ČR vedeny v databázi přístupné přes internet [1]. Databáze je doplňována on-line od roku 2007. Základní přehledné informace z této databáze shrnuje tab. 1.

Ukazuje se, že podíl populace zapojené ve screeningu KRCA u nás stagnuje na skromných cca 20%. Příčinou nízké účasti

je pravděpodobně několik. Jsou jak ze strany pacientů (nezájem podstupovat vyšetření na OK, neochota k event. dalšímu vyšetření), tak ze strany praktických lékařů (pacienti zpravidla nejsou k vyšetření stolice na OK aktivně zváni). Není vyloučeno, že v předchozích letech byly počty vyšetřených osob nadhodnoceny.

Rezervy v oblasti prevence KRCA jsou také na straně státu, ministerstva zdravotnictví a zdravotních pojišťoven. Do výsledků screeningu KRCA se promítá celková situace ve zdravotnictví, nejasnosti ohledně financování vyšetření a chabá mediální podpora projektu. Poměrně nízký počet evidovaných screeningových kolonoskopií může být způsoben také tím, že některá endoskopická pracoviště údaje do databáze nehlásí.

Domníváme se, že nemůžeme očekávat, že by účast v kolonoskopickém screeningu byla stejná jako u screeningu mamografického. Jedná se přece jen o invazivní, někdy i nepříjemné vyšetření, které vyžaduje přípravu. Dalším důvodem nižší účasti je skutečnost, že muži mají zpravidla menší zájem o prevenci než ženy.



MUDr. Milana Šachlová, CSc., Ph.D.  
Gastroenterologická ambulance  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: sachlova@mou.cz

Existuje několik možností, jak efektivitu screeningu KRCA v České republice zvýšit. Vedle zavedení vyšetřování stolice na OK imunochemickými metodami může být užitečná úprava designu screeningového programu. Pozitivním krokem je zavedení screeningové kolonoskopie v ČR od 1. 1. 2009 [2]. Program nabízí od 50–54 let každý rok vyšetření testu na OK, v 55 letech si klient zvolí buď kolonoskopii (1krát za 10 let) nebo test na okultní krvácení ve dvouletém intervalu. Při pozitivitě testu na OK je indikována kolonoskopie.

Je třeba se pokusit o navození lepší komunikace a spolupráce mezi praktickými lékaři a gastroenterology a podporovat kontinuální vzdělávání laické veřejnosti.

Jedině tak může celoplošný systematický screeningový program přinést výsledky, které si od něho slibujeme.

### Literatura

1. Screening kolorektálního karcinomu. [https://trials.cba.muni.cz/crca/interface\\_forms/StartTrialdb\\_crca.asp](https://trials.cba.muni.cz/crca/interface_forms/StartTrialdb_crca.asp).
2. Věstník Ministerstva zdravotnictví České republiky. 2009; Částka 1.

Tab. 1. Počty a výtěžnost screeningové kolonoskopie.

rok	2007	2008
počet osob s provedenou kolonoskopií	5 249	6 940
počet pacientů s odstraněnými polypózními lézemi	2 010	2 145
počet screeningově diagnostikovaných karcinomů	302	383



# Pohled na vývoj onkologie ve 3. tisíciletí

## View of the Development of Oncology in the 3rd Millennium

Petruželka L.

Onkologická klinika VFN a 1. lékařské fakulty UK, Ústav radiační onkologie FNB a 1. lékařské fakulty UK, Katedra klinické onkologie IPVZ, Praha

Nádorová onemocnění se postupně stávají největším problémem pro zdravotnické systémy v celém světě a lze očekávat, že zhoubné nádory budou ještě více ohrožovat lidskou populaci i v třetím tisíciletí její existence. V krátkodobém výhledu nadcházejícího čtvrtstoletí lze očekávat další dramatický nárůst nových onemocnění. **Odhaduje se, že v roce 2030 může dojít až ke ztrojnásobení celkového počtu nemocných s nádorovým onemocněním.**

Počet úmrtí v souvislosti s nádorovým onemocněním bude pravděpodobně vyšší než doposud převažující úmrtí na kardiovaskulární onemocnění. Příčinou je hlavně stárnutí populace. Věk je největším rizikovým faktorem. Paradoxně tak pokrok lékařské péče o nenádorová onemocnění (především kardiovaskulární choroby) vede k prodloužení střední doby života, a tím přispívá k početnému navýšení nádory více ohrožené populace.

**Nárůst incidence nádorových onemocnění ve vyšším věku je při prodloužení průměrného věku stále zřetelnější zejména ve vyspělých zemích.** V současnosti se přibližně 50% všech nádorových chorob vyskytuje u osob ve věku 65 let a vyšším. Vzestup incidence je při zvyšujícím se věku strmější u mužů než u žen. Ve většině evropských zemí jsou nejčastěji se vyskytujícími nádory ve věkové skupině nad 70 let bronchogenní karcinom nebo karcinom prostaty u mužů a u žen karcinom prsu a tlustého střeva a konečníku. Těsná vazba mezi věkem a nádorovým onemocněním je výsledkem delšího časového období působení karcinogenních faktorů, zvýšené vnímavosti stárnoucích tkání ke karcinogenům ze životního prostředí a vlast-

ních změn stárnutí usnadňujících vývoj nádoru. Dlouhodobá kumulativní expozice karcinogeny a kumulativní efekt endogenních procesů způsobujících poškození DNA jsou hlavní příčiny zvýšeného rizika vzniku nádorového onemocnění ve vyšším věku.

**Nádorová onemocnění můžeme přiřadit k civilizačním chorobám, a tak další významný faktor vysvětlující nárůst nových onemocnění je změna životního stylu.** Kouření a špatné dietetické návyky jsou základní nepříznivé civilizační faktory prokazatelně spojené s rizikem vzniku nádorového onemocnění. Nedostatek fyzické aktivity, nadváha, zvýšená konzumace alkoholu, stálý stres – to jsou další faktory zvyšující riziko vzniku nového onemocnění. Nadměrné slunění a solária jsou dalšími rizikovými faktory pro vznik kožních nádorů.

Na nárůst nových onemocnění karcinomem prsu může mít vliv i změna reprodukčního chování. Je známo, že doba expozice mléčné žlázy k estrogenům je rizikovým faktorem. Nepříznivým faktorem je snižující se počet porodů, pozdní těhotenství, zvýšená expozice k estrogenům v rámci hormonální substituce [1]. Nezanedbatelný je i počet hereditárně podmíněných (7–10%) nádorů, které mohou souviset s nepříznivým vývojem genofondu. Máme-li porovnat situaci před 100 lety, pak v té době byla rozhodně střední doba života významně kratší a stejně tak životní styl byl méně nezdravý [2].

**Onkologie jako vědecký a medicínský obor zabývající se nádorovým onemocněním zaznamenala v posledním čtvrtstoletí mimořádný rozvoj.** Ještě v devadesátých letech minulého století byla onkologie považována za ponuru me-



doc. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.  
Onkologická klinika  
VFN a 1. LF UK  
U nemocnice 2  
128 08 Praha  
e-mail: petruzel@vfn.cz

dicínsky bezmocnou lékařskou disciplínou a byla téměř na okraji zájmů lékařské veřejnosti. V průběhu let se situace radikálně změnila. Diagnostika a léčba zhoubných nádorů zaznamenala překotný rozvoj počínaje molekulární diagnostikou a cílenou terapií na molekulární úrovni konče. Nemocní mají mnohem větší šanci na uzdravení nebo na delší a zejména kvalitnější život než před dvaceti lety.

**Onkologie již dávno není izolovaná lékařská disciplína, ale prostupuje napříč všemi obory.** Onkologická léčba ani vědecko-výzkumné projekty nejsou uskutečnitelné bez úzké mezioborové spolupráce. S narůstající potřebou aktivní účasti více spolupracujících odborníků v diagnosticko-terapeutickém procesu nezanká v současnosti aktuální koncept personalizované (adresné) péče. **Koncept personalizované (adresné) komplexní péče v onkologii vychází z filozofie jedinečnosti každého pacienta.** Nejedná se pouze o tzv. správnou léčbu, ve správný čas, pro správného pacienta, ale navíc je třeba respektovat jedinečnost každého nemocného z hlediska jeho rodinného, sociálního a ekonomického zázemí. Individualizovaný přístup by měl být uplatněn v každém stadiu nádorové choroby včetně terminálních fází choroby. Budoucnost personalizované medicíny je v rovnováze mezi všeobecnou odborností a superspecializací.

Multidisciplinární léčebný přístup, který je základem současné onkologické léčby a zcela v souladu s cíli projektů Evropské unie, vyžaduje rovnoměrný rozvoj všech onkologických modalit v každém zařízení, kde je poskytována komplexní onkologická péče. **Vize onkologické léčby budoucnosti je: 1) plná vyléčitelnost časných stadií onemocnění a 2) léčitelnost diseminovaného onemocnění.**

Souběžně s rozvojem léčebných modalit a zaváděním nových technologií vzrůstají ekonomické nároky na zdravotnický systém. Pro všechny léčebné modalit platí, že individualizace léčby by měla zároveň vést k redukci nákladů na léčbu. V budoucnu bude pro každého nemocného vypracován individuální plán komplexní léčby na základě analýzy vyšetřených molekulárních biomarkerů.

**Pozitivní dopad na udržení a zvýšení úrovně kvality péče o pacienty s onkologickým onemocněním bude mít i realizace projektu „Modernizace a obnova**

**přístrojového vybavení specializovaných pracovišť komplexní onkologické skupiny VFN v Praze“** (nyní dle Věstníku MZ ČR ze dne 5. 12. 2008 „Komplexní onkologické centrum Fakultní nemocnice Na Bulovce ve spolupráci se Všeobecnou fakultní nemocnicí a Fakultní Thomayerovou nemocnicí s poliklinikou“), **na který získala Všeobecná fakultní nemocnice v Praze téměř 65 mil. korun v rámci 1. výzvy Integrovaného operačního programu, oblast intervence 3.2 – Služby v oblasti veřejného zdraví, podporované aktivitou – 3.2a Řízená modernizace a obnova přístrojového vybavení (zdravotnických prostředků) národních sítí zdravotnických zařízení včetně technického zázemí. Tento projekt je spolufinancován Evropskou unií z Evropského fondu pro regionální rozvoj a z rozpočtu Ministerstva zdravotnictví ČR.**

Z finančních prostředků projektu bude v první fázi rozvoje pořízen CT simulátor, brachyterapeutický přístroj, RTG přístroj

s C-ramenem a skener magnetické rezonance. Obnova a modernizace zdravotnických prostředků a jejich příslušenství v rámci projektu je zaměřena na zvýšení úrovně standardu poskytované komplexní péče v oblasti radiační terapie a na zvýšení kvality zobrazovacích diagnostických technologií. **Realizace projektu povede ke zvýšení efektivity poskytování zdravotní péče prostřednictvím využívaných technologií.** Projekt je přínosem pro modernizaci existující infrastruktury sloužící přímo a pouze k péči o zdraví obyvatel, přičemž včasná diagnostika a účinná léčba onkologických onemocnění je jednoznačným přínosem pro zdraví a zvýšení kvality života pacientů.

#### Literatura

1. Ahlgren M, Melbye M, Wohlfahrt J et al. Growth patterns and the risk of breast cancer in women. *N Engl J Med* 2004; 351: 1619.
2. Petruželka L. Necílené podávání cílené biologické léčby aneb proč nemusí platit, kdo léčí více nemocných, léčí lépe. Edukační sborník XIV. dny profesora Staška 2009: Editorial.



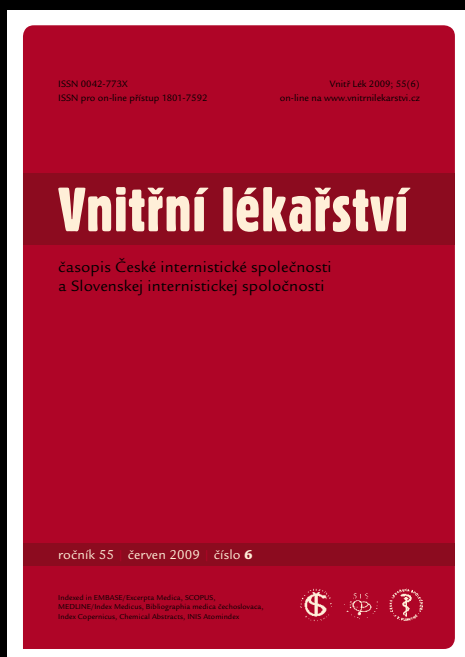
EVROPSKÁ UNIE  
EVROPSKÝ FOND PRO REGIONÁLNÍ ROZVOJ  
ŠANCE PRO VÁŠ ROZVOJ



# Předplatné se Vám vyplatí

www.vnitrnilekarstvi.cz

12x ročně



1 308 Kč

www.urologickelisty.cz

4x ročně



600 Kč

www.praktickagynekologie.cz

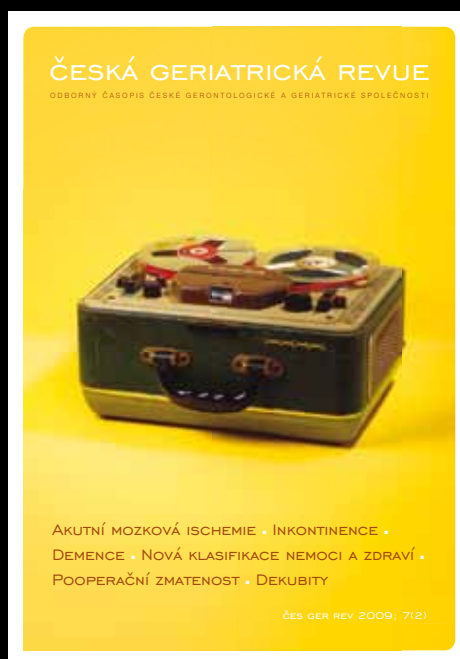
5x ročně



825 Kč

www.geriatrickarevue.cz

4x ročně



420 Kč

Naše časopisy si můžete objednat na adrese: [casopisy-predplatne@mhw.cz](mailto:casopisy-predplatne@mhw.cz)

Medica Healthworld, a. s., Media Hall, Bidláky 20, 639 00 Brno

**MedicaHealthworld**

An Ogilvy Healthworld Affiliate

# ERBITUX – účinná individualizovaná léčba

- 1. linie léčby metastazujícího kolorektálního karcinomu  
Významné prodloužení přežití bez progresu onemocnění a zvýšení odpovědi na léčbu u pacientů s nemutovanou formou genu KRAS\* 1,2
- 1. linie léčby recidivujícího a/nebo metastazujícího karcinomu hlavy a krku  
Erbix přidaný k chemoterapii na bázi platiny významně zvyšuje celkové přežití 3

Merck Serono Oncology | *Combination is key™*

## ERBITUX® 5 mg/ml infuzní roztok – Zkrácená informace o přípravku

**Léčivá látka:** cetuximabum **Složení:** 5 mg cetuximabu v 1 ml infuzního roztoku. **Indikace:** K léčbě pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem (mCRC) exprimujícím receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) a vykazujícím gen KRAS divokého typu. Erbitux přidaný k chemoterapii na bázi platiny významně zvyšuje celkové přežití a/nebo jako samostatnou látku k léčbě pacientů, u kterých selhala léčba na základě oxaliplatinu a irinotekanu, a pacientů, kteří nesnáší irinotekan. Erbitux je indikován v kombinaci s radiační terapií k léčbě pacientů s lokálně pokročilým spinocelulárním karcinomem hlavy a krku a/nebo v kombinaci s chemoterapií na bázi platiny k léčbě opakovaného a/nebo metastazujícího onemocnění. **Dávkování a způsob podání:** Erbitux je podáván 1x týdně. Úvodní dávka cetuximabu je 400 mg/m<sup>2</sup> tělesného povrchu, následující týdenní dávky jsou každá 250 mg/m<sup>2</sup>. Pacienti musí být premedikováni antihistaminiky a kortikosteroidy. U kolorektálního karcinomu je doporučeno provádět léčbu cetuximabem do progresu základního onemocnění. U pacientů s lokálně pokročilým spinocelulárním karcinomem hlavy a krku se cetuximab používá souběžně s radiační terapií. Doporučuje se zahájit terapii cetuximabem jeden týden před radiační terapií a pokračovat v terapii cetuximabem do konce období radiační terapie. Erbitux se podává intravenózně pomocí infuzní pumpy, infuzí po spádu nebo injekční pumpou. **Kontraindikace:** Erbitux je kontraindikován u pacientů se známou závažnou (stupeň 3 nebo 4) přecitlivělostí na cetuximab nebo radiační terapii. **Nežádoucí účinky:** **Hypersenzitivní reakce:** Mírné až středně závažné reakce (stupeň 1 nebo 2) zahrnují příznaky jako je horečka, třesavka, nevolnost, vyrážka nebo dušnost. K těžkým formám reakcí z přecitlivělosti (stupeň 3 nebo 4) dochází obvykle v průběhu nebo do 1 hodiny po ukončení úvodní infuze. Mezi příznaky patří rychlý nástup obstrukce dýchacích cest (bronchospasmus), kopřivka a/nebo hypotenze. Častý je výskyt hypomagnezémie, který je reverzibilní po vysazení přípravku. V kombinaci s lokální radiační terapií se objevily nežádoucí účinky, které jsou pro radiační terapii typické: mukositida, radiační dermatitida a dysfagie nebo leukopenie, převážně ve formě lymfocytopenie. **Kožní reakce:** Zahrnují zejména akneiformní vyrážku a/nebo poruchy nehtů (paronychium). **Zvláštní upozornění:** U pacientů léčených cetuximabem byly zaznamenány závažné (stupeň 3 nebo 4) reakce z přecitlivělosti. Příznaky se objevily v průběhu nebo do 1 hodiny po ukončení úvodní infuze, ale mohou se objevit po několika hodinách. Výskyt závažných reakcí z přecitlivělosti vyžaduje úplné a trvalé přerušování léčby cetuximabem. **Interakce:** V kombinaci s infuzí 5-fluorouracilu se zvyšuje četnost výskytu srdeční ischemie, včetně infarktu myokardu a městnavého srdečního selhání, stejně jako četnost výskytu syndromu ruka-noha. Nejsou k dispozici údaje o tom, že bezpečnostní profil cetuximabu je ovlivněn irinotekanem nebo naopak. **Léková forma a balení:** Infuzní roztok. Balení obsahuje jednu 20 ml lahvičku s obsahem 100 mg cetuximabu. **Uchování:** Uchovávejte v chladničce (2 – 8°C). Chraňte před mrazem. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Německo. **Registrační číslo:** EU/1/04/281/003. **Datum poslední revize textu:** 11/2008. Výdej přípravku je vázán na lékařský předpis a je hrazen z prostředků zdravotního pojištění po selhání cytostatické léčby irinotekanem u mCRC a v kombinaci s radiační terapií k léčbě pacientů s lokálně pokročilým spinocelulárním karcinomem hlavy a krku. O úhradě v léčbě 1. linie se zatím jedná.

\* v kombinaci se standardní chemoterapií

KRAS protein kódovaný proto-onkogenem KRAS je součástí signální dráhy receptoru pro epidermální růstový faktor

1. Van Cutsem *et al.* KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. ASCO Annual Meeting 2008: Abstract 2.
2. Bokemeyer *et al.* Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2008; epub ahead of print <http://jco.ascopubs.org/cgi/doi/10.1200/JCO.2008.20.8397>
3. Vermorken *et al.* Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. N Eng J Med 2008; 359:1116-27.

Úplnou informaci o přípravku obdržíte na adrese:

Divize Merck Serono, Merck Pharma k.s.,  
Na Hřebenech II. 1718/10 140 00 Praha 4  
Tel.: +420 272 084 211, Fax: +420 272 084 307

erbitux@merck.cz, www.erbitux.cz, www.erbitux-international.com



# Zápis ze schůze výboru České onkologické společnosti dne 8. 9. 2009 v Liberci

**Přítomni:** Vorlíček, Abrahámová, Aschermannová, Bartoš, Jelínková, Petruželka, Příbylová, Stáhalová

**Omluveni:** Cwiertka, Fínek, Feltl, Petera, Vyzula, Žaloudík

**Host:** prof. Babjuk (urologická společnost), doc. Dušek (IBA MU)

1. Přítomné přivítal ředitel Nemocnice Liberec MUDr. Luděk Nečesaný.
2. Prof. Vorlíček zahájil schůzi výboru ČOS.
3. Informace o grantové podpoře Tesco – realizace financování probíhá prostřednictvím ČLS bez problémů.
4. **Kongres prevence a časná diagnostika onkologických onemocnění v ordinaci praktického lékaře, Brno 21. 10. 2009. Program** je dostupný na stránkách linkos.cz, účast onkologů vhodná.
5. Doc. Dušek: informace o získání grantu Grant Bristol-Myers Squibb Foundation: Addressing Cancer Disparities in Central and Eastern Europe, který byl podán prostřednictvím doc. Duška v zastoupení ČOS. Grant bude řešen panelem expertů ČOS, institucionálně ve spolupráci s Masarykovou univerzitou v Brně.
 

Rada původních koordinátorů připravujících projekt (doc. Dušek, prof. Vyzula, doc. Fínek) byla rozšířena tak, aby zapojení odborníci reprezentativně zastupovali všechny modalití protinádorové terapie (převzato z návrhu projektu, abecedně):

  - J. Abrahámová, M.D., Ph.D. (Professor of Oncology at Thomayer University Hospital in Prague)
  - M. Babjuk, M.D., Ph.D. (Professor of Urology at University Hospital Motol in Prague)
  - L. Dušek, M.Sc., Ph.D. (Associate Professor of Computational Biology at Masaryk University)
  - D. Feltl, M.D., Ph.D. (Department of Radiotherapy at University Hospital Ostrava)
  - J. Fínek, M.D., Ph.D. (Associate Professor of Oncology at University Hospital Plzen)
  - J. Hoch, M.D., Ph.D. (Professor of Surgery at University Hospital Motol in Prague)
  - J. Petera, M.D., Ph.D. (Professor of Oncology at Faculty Hospital in Hradec Kralove)
  - L. Petruželka, M.D., Ph.D. (Professor of Oncology at Faculty Hospital in Prague)
  - M. Ryska, M.D., Ph.D. (Professor of Surgery at Central Military Hospital Prague in Prague)
  - J. Vorlíček, M.D., Ph.D. (Professor of Oncology, Director of the Masaryk Memorial Cancer Institute in Brno)
  - R. Vyzula, M.D., Ph.D. (Professor of Oncology at the Masaryk Memorial Cancer Institute in Brno)
  - J. Žaloudík, M.D. (Professor of Oncology at the Masaryk Memorial Cancer Institute in Brno)

Panel expertů bude při detailním rozpracování cílů projektu zřejmě dále rozšířen. Rozšíření panelu expertů i věcný návrh zámeru projektu byly schváleny i ze strany USA – poskytující nadace, rozhodující telekonference s americkou stranou se zúčastnili prof. Vyzula a doc. Dušek. Další postup: doc. Dušek rozpracuje detailně věcný plán řešení projektu – termín: 30. 9. 2009.
6. Semináře v Bruselu: **Evropské partnerství v boji proti rakovině** se zúčastní za ČOS doc. Fínek. Na akci se může přihlásit každý člen ČOS – viz linkos.cz.
7. Prof. Vorlíček: informace o setkání zástupců výboru s plátcí péče VZP: nové léky a nové indikace starých léků. Nelze očekávat navýšení financí na onkologické léky, nelze vyloučit i snížení finančních prostředků. Další schůzka je 18. 9. 2009 v 10.00 na VZP.
8. Na **JOD** uspořádá výbor ČOS setkání s právníky na téma: o ukotvení struktury KOC v organizačním řádu poskytovatelů zdravotní péče, termín bude oznámen na linkos.cz. Přednášející právníci: Mgr. Polícar a JUDr. Těšínová.
9. Prof. Abrahámová: informovala o financování NOR, letošní požadavky byly splněny.
10. Informace o projektu cesta ke zdraví žen. Genetické vyšetření pro všechny ženy. Výbor ČOS bere na vědomí připomínky, které k tomuto projektu poslal řediteli VZP prof. Vorlíček – výbor všemi hlasy tuto myšlenku podpořil.
11. Výbor ČOS jednomyslně nominoval jako styčnou osobu pro **Českou společnost paliativní medicíny** prim. MUDr. A. Aschermannovu.
12. Projednání žádosti společnosti HOSPIMED o spolupráci v oblasti prevence rakoviny prostaty, dělohy a tlustého střeva. Výbor ČOS bere na vědomí a jakoukoliv aktivitu na poli prevence podporuje.
13. Vyjádření výboru k dopisu Sekce nemocničních lékárníků – výbor ČOS má neměnné stanovisko, podporuje zřizování centrálního ředění cytostatik na všech onkologických pracovištích.
14. Na příští schůzi 6. 10. 2009 proběhne na přání současného pokladníka volba nového pokladníka.
15. Vyjádření výboru ČOS k problematice LHRH analog v léčbě karcinomu prostaty – existující klinická data podporují indikaci goserelinu jako jediného LHRH analogu v kurativní indikaci (adjuvantní a neoadjuvantní) léčby karcinomu prostaty. Pro paliativní indikace zůstávají k dispozici kromě goserelinu i leuprorelin a triptorelin.
16. Konferenci **Best of ASCO** 3. 10. 2009 v Bratislavě pořádá Slovenská onkologická společnost, viz linkos.cz. Všichni členové společnosti jsou zváni.

17. Výbor ČOS souhlasí s podmínkami pro poskytnutí záštity ČOS: zaslání sborníku a souhlas se zařazením abstrakt odborných sdělení do **databáze tuzemských onkologických abstrakt** na linkos.
18. Doc. Dušek podal informaci k zahajované sérii regionálních odborných seminářů o screeningu, prevenci a včasné diagnostice kolorektálního karcinomu – **první seminář proběhne 8. 10. v Brně**. Smyslem seminářů je společné setkání všech lékařských odborností, které jsou zapojeny do diagnostiky kolorektálního karcinomu nebo do péče o pacienty s kolorektálním karcinomem. Semináře probíhají pod záštitou Komise pro screening kolorektálního karcinomu MZ ČR.
19. MUDr. Ivana Kaderková z We Make Media s. r. o. poslala žádost o záštitu ČOS nad 1st Prague Interdisciplinary Oncology Congress pořádaný 1. LF UK ve spolupráci s 2. a 3. LF UK v lednu 2010 v Praze. Prof. Petruželka doporučil tuto žádost projednat až poté, co obdržíme oficiální žádost od programového výboru připravovaného kongresu. Jeho doporučení jsme respektovali.
20. Udělená záštita ČOS odborným akcím:
  - 6. konference radiační onkologie**, 19. 2.–20. 2. 2010 Hradec Králové
  - XII. Symposium of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners**, 5.–8. 5. 2010 Praha
  - Jihočeské onkologické dny**, 22. 10.–24. 10. 2009 Český Krumlov
21. Noví členové:
  - Forster Jiří, Šedo Jiří, Zezulová Michaela, Machová Karolína

Tarceva = pokrok ve 2. linii léčby nemalobuněčného karcinomu plic  
Tarceva + gemcitabin = pokrok v 1. linii léčby karcinomu pankreatu

1 tableta denně prokazatelně prodlužuje život Vašich nemocných

 **Tarceva**<sup>®</sup>  
erlotinib



Více informací o Tarcevě  
naleznete na

[www.tarceva.cz](http://www.tarceva.cz)

#### Základní informace o přípravku Tarceva<sup>®</sup>

**Držitel rozhodnutí o registraci:** Roche Registration Limited, 40 Broadwater Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire, AL7 3AY, Velká Británie. **Léčivá látka:** erlotinibum.  
**Schválená indikace pro použití:** Léčba pacientů s lokálně pokročilým nebo metastazujícím nemalobuněčným karcinomem plic v případě, že alespoň jednou došlo k selhání předchozí chemoterapeutické léčby. V kombinaci s gemcitabinem léčba pacientů s metastazujícím karcinomem pankreatu. Při předepisování přípravku Tarceva by měly být brány v úvahu faktory spojené s prodloužením doby přežití. **Kontraindikace:** Vážná přecitlivělost na erlotinib nebo na kteroukoliv z pomocných látek. Léčba Tarcevou se nedoporučuje u nemocných s těžkou poruchou funkce jater a/nebo ledvin. **Zvláštní upozornění:** Silné induktory CYP3A4 mohou snižovat účinnost erlotinibu, zatímco silné inhibitory CYP3A4 mohou navodit jeho zvýšenou toxicitu. Kuřákům je třeba doporučit přerušit kouření, protože jinak může dojít ke snížení plazmatických koncentrací erlotinibu. Při akutním výskytu nových a/nebo progresivních nevysvětlených plicních symptomů jako např. dyspnoe, kašel a horečka, by měla být terapie přípravkem Tarceva přerušena až do vyhodnocení diagnózy. Pokud je diagnostikována intersticiální plicní nemoc, je třeba podávání přípravku Tarceva přerušit a zahájit potřebnou léčbu. Byly zaznamenány vzácné případy výskytu hypokalémie a renálního selhání (včetně fatálního) jako následek těžké dehydratace, především u pacientů současně léčených chemoterapií. Vzácně byly během podávání Tarcevy hlášeny případy jaterního selhání (včetně fatálního). Léčba Tarcevou se nedoporučuje u nemocných s těžkou poruchou funkce jater a/nebo ledvin. Tarceva se nedoporučuje podávat současně s léky ovlivňujícími pH v horní části trávicího traktu. **Klinicky významné interakce:** Viz platné Souhrny údajů o přípravku Tarceva. **Hlavní klinicky významné nežádoucí účinky:** Nejčastěji hlášenými nežádoucími účinky byly únava, vyrážka a průjem. **Další nežádoucí účinky:** infekce, anorexie, dyspnoe, paronychie, xerodermie, krvácení do zažívacího traktu, abnormální funkční jaterní testy, keratitida. **Dávkování a způsob podávání:** Viz platné Souhrny údajů o přípravku Tarceva. **Dostupná balení přípravku:** Potahované tablety 30 × 150 mg erlotinibu, 30 × 100 mg erlotinibu a 30 × 25 mg erlotinibu. **Datum poslední revize textu:** 27.1.2009. **Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis. Přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Podmínky uchování:** Žádné zvláštní podmínky nejsou vyžadovány. Další informace o přípravku získáte z platných Souhrnů údajů o přípravcích Tarceva nebo na adrese: Roche, s.r.o., Dukelských hrdinů 52, 170 00 Praha 7, telefon 220 382 111.

# KLINICKÁ ONKOLOGIE

Časopis České onkologické společnosti a Slovenskej onkologickej spoločnosti  
The Journal of the Czech and Slovak Oncological Societies

## REDAKČNÍ RADA

### Výkonná redakční rada (Brno)

#### vedoucí redaktor

doc. MUDr. Vuk Fait, CSc.

MUDr. Petr Čoupek  
MUDr. Lenka Foretová, Ph.D.  
prof. MUDr. Roman Hájek, CSc.  
MUDr. Ivo Kocák, Ph.D.  
Mgr. Dana Králová

#### výkonný redaktor

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

MUDr. Jiří Novák  
prof. MUDr. Aleš Rejthar, CSc.  
doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D.  
prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc.  
prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.

### Širší redakční rada

prof. MUDr. Zdeněk Adam, CSc., Brno  
MUDr. Olga Babušíková, DrSc., Bratislava  
MUDr. Otakar Bednařík, CSc., Brno  
MUDr. Karel Cwiertka, Ph.D., Olomouc  
prof. MUDr. Ľudovít Jurga, DrSc., Trnava  
doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc., Bratislava  
prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., Praha  
prof. RNDr. Jan Kovařík, DrSc., Brno  
prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc., Bratislava

doc. MUDr. Jozef Mardiak, CSc., Bratislava  
prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc., Brno  
prof. MUDr. Zdeněk Mechl, CSc., Brno  
prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D., Olomouc  
prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc., Bratislava  
doc. MUDr. Zdeněk Pačovský, CSc., Brno  
prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., Praha  
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc., Brno  
doc. MUDr. Mária Wagnerová, CSc., Košice

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2009

## KLINICKÁ ONKOLOGIE

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně ve spolupráci s nakladatelstvím Medica Healthworld, a.s.

Registrační značka MK ČR 5158. ISSN 0862-495 X. ISSN pro on-line přístup 1802-5307.

On-line verze je přístupná na adrese [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz) nebo [www.mou.cz](http://www.mou.cz).

#### Nakladatel:

Medica Healthworld, a.s., Media Hall, Bidláky 20, 639 00 Brno, tel./fax: +420 533 337 340/312, e-mail: [medica@mhwc.cz](mailto:medica@mhwc.cz).

Odpovědná redaktorka: Mgr. Jana Lounová. Grafická úprava: Pavel Richter. Jazyková korektorka: Mgr. Alena Šmídová.

Vychází 6krát ročně. Předplatné na rok 2009 činí 540 Kč (22 eur).

#### Informace o předplatném podává a objednávky předplatitelů přijímá:

Medica Healthworld, a.s., e-mail: [casopisy-predplatne@mhwc.cz](mailto:casopisy-predplatne@mhwc.cz).

#### Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá:

Mgr. Dana Stripaiová, e-mail: [dana.stripaiova@ambitmedia.cz](mailto:dana.stripaiova@ambitmedia.cz), tel.: 725 778 001.

#### Rukopisy zasílejte na adresu:

Redakce časopisu Klinická onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, e-mail: [klinickaonkologie@mou.cz](mailto:klinickaonkologie@mou.cz).

Sekretář redakce: Brian Fait, tel.: 775 368 144

Pokyny pro autory naleznete na [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz) v sekci časopisu.



# nová hvězda na onkologickém trhu

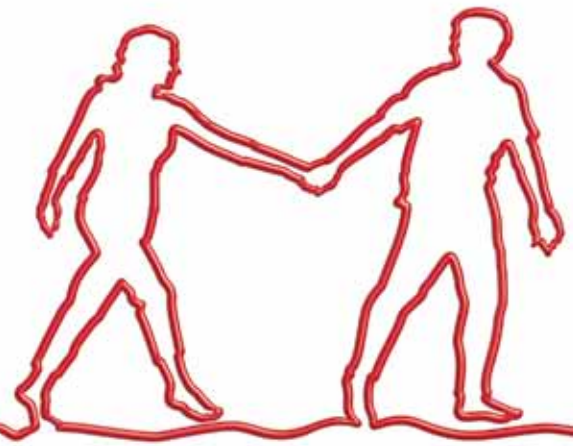
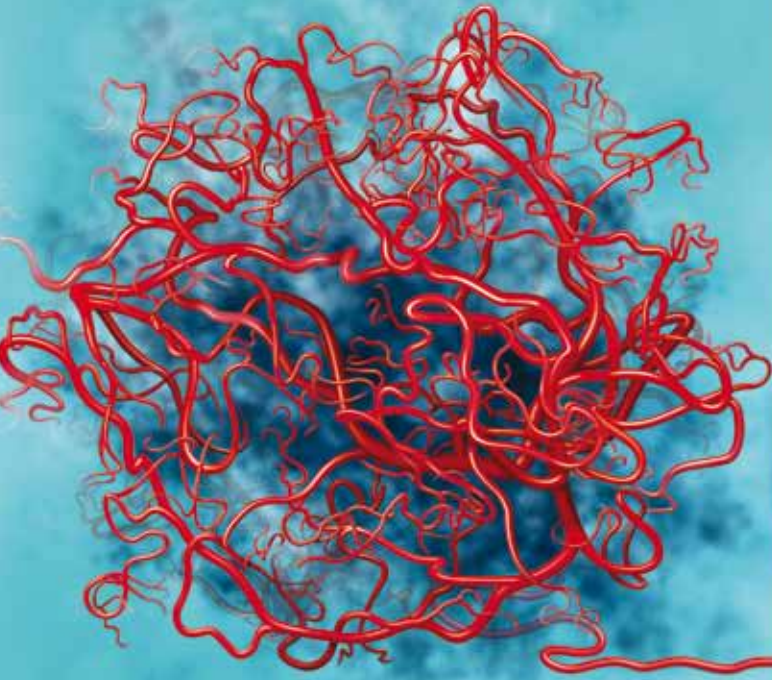


## SPOLEHLIVÁ GENERIKA OD ORIGINÁLNÍ SPOLEČNOSTI

### kompletní onkologická péče



# Kontrolou angiogeneze...



## ...k prodloužení přežití

**AVASTIN JE HRAZEN PRO PRVOLINIOVOU LÉČBU NEMOCNÝCH S POKROČILÝM KOLOREKTÁLNÍM KARCINOMEM.**

**AVASTIN UMOŽŇUJE VÍCE KURATIVNÍCH RESEKČÍ JATERNÍCH METASTÁZ.**

**PROKAZATELNĚ ZVYŠUJE ČETNOST LÉČEBNÉ ODPOVĚDI, PRODLUŽUJE DOBU PŘEŽITÍ BEZ PROGRESE A DOBU CELKOVÉHO PŘEŽITÍ NEZÁVISLE NA STAVU K-RAS ONKOGENU.**

**ZE SEZNAMU KONTRAINDIKACÍ PODÁNÍ AVASTINU BYLY VYŇATY NELÉČENÉ CNS METASTÁZY.**

<http://avastin.registry.cz>  
[www.avastin.cz](http://www.avastin.cz)

**AVASTIN<sup>®</sup>**  
bevacizumab  
Leading angiogenesis  
inhibition

**AVASTIN<sup>®</sup> 25 mg/ml koncentrát pro přípravu infuzního roztoku**  
- Základní informace o přípravku

**Účinná látka:** bevacizumabum. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Roche Registration Limited, Velká Británie. **Registrační čísla:** EU/1/04/300/001-002. **Schválené indikace pro použití:** Terapie metastazujícího karcinomu tlustého střeva nebo rekta v kombinaci s chemoterapeutickým režimem obsahujícím fluoropyrimidin. Avastin v kombinaci s paklitaxelem nebo docetaxelem je indikován jako léčba první linie u nemocných s metastazujícím karcinodem prsu. Avastin přidáný k chemoterapeutickému režimu s platinou je indikován k léčbě první linie nemocných s neresekabilním pokročilým, metastatickým nebo rekurentním nemalobuněčným plicním karcinodem jiného histologického typu, než predominantně z dlaždicových buněk. Avastin v kombinaci s interferonem alfa-2a je indikován jako léčba první linie u nemocných s pokročilým a/ nebo metastazujícím karcinodem ledviny. **Kontraindikace:** Přecitlivělost na léčivou látku nebo jakoukoli pomocnou látku přípravku, na látku produkované ovariálními buňkami čínských křečků nebo na jiné rekombinantní lidské nebo humanizované protilátky. Těhotenství. **Upozornění:** Zvýšená pozornost u pacientů s intraabdominálním zánětlivým procesem (zvýšené riziko vzniku perforace a píštěle GIT), po operaci (možné

komplikace při hojení ran), s nekontrolovanou hypertenzí (riziko hypertenzní krize a proteinurie), ve věku nad 65 let (zvýšené riziko vzniku arteriálních tromboembolic- kých příhod), u pacientů s kongenitální hemoragickou diatézou, získanou koagulopatií nebo u pacientů léčených plnou dávkou antikoagulancií k léčbě tromboembolismu před zahájením léčby Avastinem. V případě vzniku tracheoesofageální píštěle nebo jakékoli píštěle 4 stupně trvale ukončit léčbu. Ukončení léčby zvážit v případě vnitř- ní píštěle mimo oblast GIT. **Klinicky významné interakce:** Bevacizumab neovlivňuje v klinicky závažném rozsahu farmakokinetiku 5-fluorouracilu, karboplatiny, paklitaxelu a doxorubicinu. U některých pacientů léčených kombinací bevacizumabu a suniitib malátu byla hlášena mikroangiopatická hemolytická anemie (MAHA). **Hlavní klinicky významné nežádoucí účinky** (u pacientů léčených jak v monoterapii, tak v kombinaci s chemoterapií): Nejzávažnější pozorované nežádoucí účinky - gastrointestinální perforace, píštěle, hemoragie, arteriální a žilní tromboembolismus, syndrom rever- zibilní zadní leukoencefalopatie, proteinurie. Nejčastější nežádoucí účinky - astenie, průjem, dysfonie, nevolnost a jiné nespecifikované bolesti. **Dávování a způsob podání** - Obecná doporučení: První dávka Avastinu by měla být podávána během 90 minut ve formě nitrožilní infuze. Jestliže je první infuze dobře snášena, druhá infuze může

být podávána během 60 minut. Jestliže je dobře snášena infuze podávána během 60 minut, všechny následující infuze mohou být podávány během 30 minut. Nepodávej- te jako bolus v nitrožilní injekci nebo bolusovou injekci. Infuze nesmí být podávány nebo míchány s roztoky glukózy. Snížení dávky při výskytu nežádoucích příhod se nedoporučuje. V případě nutnosti musí být léčba buď trvale ukončena nebo dočas- ně pozastavena. **Doporučené dávkování pro jednotlivé diagnózy:** Viz platný Souhrn údajů o přípravku. **Dostupná balení přípravku:** 1x100mg bevacizumabu ve 4ml; 1x 400mg bevacizumabu v 16ml koncentrátu pro přípravu infuze. **Podmínky uchování:** Uchovávejte v chladničce (2 °C-8 °C). Chraňte před mrazem. Uchovávejte injekční lahvičku v krabičce, aby byl přípravek chráněn před světlem. **Datum poslední reví- ze textu:** 23. 7. 2009. **Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis. Léčivý přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění** (o úhradě v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic, karcinomu prsu a karcinomu ledviny zatím nebylo rozhodnuto). **Další informace** o přípravku získáte z platného Souhrnu údajů o příprav- ku Avastin nebo na adrese: Roche, s.r.o., Dukelských hrdinů 52, 170 00 Praha 7, telefon 220 382 111. Podrobné informace o tomto přípravku jsou uveřejněny na webových stránkách Evropské lékové agentury (EMA) <http://www.emea.europa.eu/>.

**Literatura:** 1) Hurwitz H et al. NEJM 2004; 350:2335-2342; 2) Hurwitz H et al; The Oncologist. 2009 Jan;14(1):22-8. Epub 2009 Jan 14. 3) Van Cutsem E et al, Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study; Ann Oncol 2009 - in press. 4) Van Cutsem, et al. Safety and efficacy of bevacizumab plus standard first-line chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: First BEAT; ESMO 2008. 5) Cassidy J et al, Surgery with curative intent in patients (pts) treated with first-line chemotherapy (CT) + bevacizumab (BEV) for metastatic colorectal cancer (mCRC): First BEAT and NO16966 abstr. 4022. ASCO 2008.