

# NOVÉ TRENDY V CHEMOTERAPII NÁDORŮ MOZKU - LÉČBA DLE HISTOLOGICKÝCH DIAGNÓZ

## NEW TRENDS IN CHEMOTHERAPY OF THE BRAIN TUMORS - TREATMENT ACCORDING TO TUMOR TYPES

<sup>1</sup>KALA M., <sup>2</sup>CWIERTKA K., <sup>3</sup>HAJDÚCH M.

<sup>1</sup> NEUROCHIRURGICKÁ KLINIKA FN, OLOMOUC

<sup>2</sup> ONKOLOGICKÁ KLINIKA LF UP A FN, OLOMOUC

<sup>3</sup> LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, DĚTSKÁ KLINIKA LF UP A FN, OLOMOUC

\* KORESPONDUJÍCÍ AUTOR. NEUROCHIRURGICKÁ KLINIKA FN OLOMOUC, I.P.PAVLOVA 6, 775 20 OLOMOUC

**Souhrn:** Jsou uvedeny základní údaje o využití chemoterapie v hlavních nádorových skupinách - u astrocytomů včetně multiformního glioblastomu a u oligodendrogliomů. Zejména u nádorů s oligodendrogliální složkou se chemoterapie ukazuje být zvláště přínosná. Pozornost je věnována i chemoterapeutickým postupům v léčbě primárního maligního lymfomu mozku. Průnik chemoterapeutik do mozkové tkáně lze zvýšit nitronádorovou aplikací chemoterapeutik. Dosud byl zkoumán efekt této terapie při aplikaci různých preparátů, z nichž se zatím v zahraničí významněji rozšířil pouze jediný - Gliadel (BCNU).

**Klíčová slova:** maligní nádory mozku, astrocytom, glioblastom, oligodendrogliom, maligní lymfom CNS, chemoterapie

**Summary:** Summarised information on the role of chemotherapy in the major brain tumour groups is reported: I. astrocytomas including glioblastoma multiforme, II. oligodendrogliomas and III. primary brain malignant lymphomas. The most significant benefit of chemotherapy was shown in tumours with an oligodendroglioma component and in lymphomas. Other experimental approaches used to increase concentration of chemotherapeutics in brain tumours and thus to improve treatment efficacy, e.g. the intra tumoral application of drugs using different types of reservoirs and the clinically efficient local carmustin (BCNU) - Gliadel were analysed.

**Key words:** malignant brain tumours, astrocytoma, glioblastoma, oligodendroglioma, primary nervous system lymphoma, chemotherapy.

### Chemoterapie maligních astrocytomů

Reagan a spol. (1976) porovnával tři skupiny svých nemocných po operaci gliomu. Nemocní v prvním souboru byli léčeni radioterapií, nemocní ve druhém souboru chemoterapií lomustinem (CCNU) a nemocní ve třetím souboru kombinací radioterapie a chemoterapie. Nemocní, kteří byli po operaci ozářeni, přežívali signifikantně déle než nemocní léčení chemoterapií. Mezi skupinou nemocných, kteří byli po operaci ozářeni a skupinou nemocných, kteří kromě radioterapie prodělali navíc chemoterapii, nebyl zjištěn významný rozdíl. Výsledky Reaganovy studie lze tedy shrnout takto: byl zjištěn zásadní význam radioterapie a popřen význam derivátu nitrozomocoviny (v tomto případě CCNU) v terapii nemocných po operaci maligního gliomu.

Léčba maligního gliomu trojkombinací prokarbazinu (PCB), CCNU a vinkristinu vychází z výsledků studií Gutina a spol. (1975) a Shapira s Youngem (1976). Gutin a spol. uvádí léčebnou odpověď po podání zmíněné trojkombinace u 44 % nemocných, které však vzhledem k tehdejší možnostem vyšetřoval pouze klinicky a pomocí scintigrafie. Své výsledky srovnává se studii založenými na monoterapii buď prokarbazinem anebo karmustinem (BCNU) a vidí je stejně příznivě. Lze se snad právem domýšlet, že tehdejší léčebné úspěchy podlely novým a nekompromisně přesným diagnostickým metodám, jakou je výpočetní tomografie či zobrazení magnetickou rezonancí. Představa o účinnosti této trojkombinace však přežívá do dnešních dnů. (Fine, 1993) (Klener, 1996; Kornblith, 1995; Ushio a Kochi, 1998). Prokarbazin, CCNU a vinkristin pronikají hematoencefalickou bariérou a pravděpodobně rovněž do proliferujících částí nádoru. Je však známo, že na tuto léčbu

neodpovídají se stejným výsledkem všichni nemocní. Jako jedno z možných vysvětlení znovu zmiňují práci Thomase a spol. (1985), který prokázal, že nemocní s maligním gliomem, jejichž nádory byly in vitro citlivé na PCB anebo CCNU měli lepší léčebné výsledky než nemocní, jejichž nádorové buňky byly vůči jednomu anebo oběma cytostatikům rezistentní.

Tvrzení, že chemoterapie maligních gliomů kombinací prokarbazinu, CCNU a vinkristinu je osvědčeným standardem, se tak stává tradovaným dogmatem (Kornblith, 1995; Ushio a Kochi, 1998).

Podívejme se, jak vypadají ve světle či stínu tohoto dogmatu výsledky práce Brady a spol. (1998). Ten se svými spolupracovníky vyhodnotil celkem 674 nemocných z nichž 339 bylo léčeno pro maligní gliom grade III anebo IV radioterapií, 335 radioterapií a poté chemoterapií v kombinaci prokarbazin, CCNU a vinkristin. Autoři zjistili, že efekt chemoterapie nebyl statisticky průkazný. Průměrná doba přežití nemocných po radioterapii byla 9,5 měsíce, po radioterapii s chemoterapií 10 měsíců. Toto zjištění na uvedeném velkém souboru nemocných jistě nelze brát na lehkou váhu.

Naštěstí ne všechny studie hovoří takto pesimisticky. Fine a spol. shrnul výsledky 16 randomizovaných klinických studií zahrnující přes 3000 nemocných s maligními gliomy. Cílem studie bylo vyhodnotit efekt chemoterapie, která byla zjištěna jako přínosná, a to více u nemocných s anaplastickým astrocytomem než multiformním glioblastomem. Určitou slabinou studie je nejednotně prováděná chemoterapie v analyzovaných souborech. Mahaley a spol. (1989) uvádí své zkušenosti s intraarteriální aplikací cisplatinu u recidivujících gliomů. Aplikace se provádí 1x měsíčně. U 34% nemocných bylo dosaženo regrese

nálezu v CT obraze, u 40 % nemocných se nález stabilizoval a u 26 % nemocných došlo navzdory provedené chemoterapii k další progresi nádoru. Použití karboplatiny je provázeno poměrně vysokou ototoxicitou. Jako protektivum se v tomto směru osvědčuje thiosulfát sodný (sodium thiosulfate), což dokládá svým pozorováním Neuwelt a spol. (1996), jenž ověřil příznivý efekt thiosulfátu sodného i v klinické praxi a připravuje se své výsledky publikovat. Vedlejší příznaky, jako nauzea a zvracení (a to značně úporné), lze výrazně utlumit až odstranit pomocí aplikace antiemetik zejména typu antagonistů receptorů 5-HT<sub>3</sub>, tzv. setronů (např. ondasetron, granisetron, tropisetron). Autoři doporučují chemoterapii provádět před zahájením radioterapie, popřípadě v ní lze po ukončení radioterapie opět pokračovat. Přesto, že u většiny nemocných dochází k regresi anebo stabilizaci nálezů při vyšetření výpočetní tomografií, není doba přežití prodloužena nijak výrazně.

Cloughesy a spol. léčil 50 nemocných intraarteriálně aplikovaným RMP-7 a intraarteriálně aplikovanou karboplatinou. Diagnózou byl recidivující gliom typu glioblastomu anebo anaplastického astrocytomu. Bylo dosaženo kompletní odpovědi u 1 nemocného, 4 parciálních odpovědí a 25 stabilizací stavu. Tolerance byla dobrá, přežití v průměru 47 týdnů. V budoucnu bude nutno porovnat výsledky léčby u nemocných léčených pouze intraarteriální aplikací karboplatiny.

Longea a spol. (1990) doporučuje chemoterapii recidivujících maligních gliomů cyklofosfamidem v kombinaci s vinkristinem, a to dokonce i u těch nemocných, u nichž předchozí chemoterapie provedená deriváty nitrozomochoviny zklamala. Z šestnácti sledovaných nemocných zjistil příznivý efekt u osmi. Problémem terapie však byla značná toxicita vedoucí k myelosupresi u sedmi osob. Kúra byla prováděna 1x měsíčně při krátkodobé hospitalizaci.

Jsou testována stále nová a nová cytostatika. Jedním z nich je MX2, což je v tucích rozpustný anthracyklin, u něhož byla prokázána účinnost proti gliomovým buňkám nejen in vitro, ale na zvířecích modelech také in vivo. MX2 prokazuje v klinické studii příznivý efekt asi u 40 % nemocných s recidivujícím maligním gliomem grade III-IV (za příznivý efekt pokládají autoři jak kompletní odpověď, tak stabilizaci choroby). (Underhill a spol., 1998).

Iदारubicin, další ze skupiny anthracyklinových antibiotik je podle testů provedených in vitro, ale i in vivo v pokusech na zvířeti pro buňky maligního gliomu cytotoxický. Bushnow a spol. léčil 30 nemocných s recidivujícím maligním gliomem nitrožilním podáváním idarubicinu. Všichni nemocní již v předchozím období absolvovali radioterapii a 29 z nich prodělalo i chemoterapii. Téměř u poloviny nemocných s anaplastickým astrocytomem či oligodendrogliomem dosáhl příznivou odezvu od parciální odpovědi po stabilizaci stavu v CT obraze anebo alespoň klinické zlepšení stavu. (Parciální odpověď však byla zaznamenána jen u 2 nemocných z celkového počtu 15). U nemocných s multiforním glioblastomem bylo dosaženo u třetiny nemocných stabilizace stavu, ale to pouze krátkodobě. Ze studie vyplývá, že antracyklinové cytostatikum idarubicin může být efektivní u části nemocných s diagnózou anaplastického astrocytomu či oligodendrogliomu. U glioblastomu je efekt minimální, zejména pak časově omezený. Partheni a spol. provedl při reoperaci pro recidivu maligního gliomu grade III - IV implantaci Omayo rezervoáru k aplikaci doxorubicinu. Z 10 nemocných bylo dosaženo kompletní odpovědi v 1 případě, u 4 nemocných parciální odpovědi a v 1 případě stabilizace choroby. Výsledky vypadají sice povzbudivě, ale vyžadují další sledování.

V poslední době je zvláštní pozornost věnována klinickým zkouškám temozolomidu (Newlands a spol., 1992). První výsledky jsou ve srovnání s efekty dosud užívaných chemoterapeutik příznivější. Definitivní závěr však bude moci být učiněn až po získání dalších klinických zkušeností na větším souboru nemocných (Janinis a spol., 1998).

Efekt terapie temozolomidem souvisí, jak lze předpokládat,

s dosaženou koncentrací léku v nádorové tkáni, což lze zjistit pomocí pozitronové emisní tomografie (Brock a spol. 1998). Galanis a spol. zjistil ojedinělý efekt kombinace mechlorethaminu, vinkristinu a prokarbazinu v léčbě anaplastických astrocytomů (efekt v 11 %) a glioblastomů (4,3 %). Poněkud lepší výsledky byly zjištěny u nízkostupňových astrocytomů (19%) a nejpříznivější u oligodendrogliomů a oligoastrocytomů (25 %). Do terapeutické odpovědi však nebyla zahrnuta stabilizace onemocnění. Výsledky autoři pokládají za špatné a staví své výsledky proti výsledkům Coyleho a spol., který uvádí příznivou léčebnou odpověď u 52 % nemocných. Je s podivem, že nemocní léčení Coylem však přes radiograficky nesporně příznivější léčebné odpovědi nežili průkazně déle (20 týdnů nemocní s glioblastomem) než nemocní s glioblastomem Galanise a spol. (19 týdnů). Porovnání obou prací dává tušit celou řadu možných metodických nesrovnalostí ve výběru nemocných, ale zejména v nepřesném radiologickém posuzování léčebné odpovědi.

Chamberlain a Kormanik (1995) podávali paklitaxel 20 nemocným po operaci pro maligní gliom, všichni nemocní již byli ozářeni a u všech byla v minulosti provedena chemoterapie. Soubor zahrnoval nemocné s multiforním glioblastomem. Autoři dosáhli částečnou odpověď u 4 nemocných tj. u 20 %, do těchto 4 nemocných patří 2 s anaplastickým astrocytomem, 1 s multiforním glioblastomem a 1 s anaplastickým oligodendrogliomem. U dalších nemocných došlo k stabilizaci choroby. Příznivá odpověď na chemoterapii se nijak neodrazila ve zlepšení klinického stavu.

Chang a spol. (1998) prokázal, že paklitaxel je lépe tolerován nemocnými, kteří jsou léčení antiepileptiky a to zřejmě z důvodu, že antikonvulziva indukují jaterní enzymy, které paklitaxel metabolizují. Z uvedeného vyplývá nutnost přizpůsobit dávkování paklitaxelu lékovým interakcím, které lze očekávat u jednotlivých nemocných, zejména u těch, kteří užívají antikonvulziva. U účinnosti léčby se autoři nezmiňují, práce měla za cíl posoudit toxicitu v závislosti na aplikované dávce.

Fetell a spol. (1997) použil paklitaxel v maximální tolerované dávce u 15 nemocných, kteří dosud nebyli pro diagnózu multiforní glioblastom ozářeni. Paklitaxel byl podáván v 96 hodinové infúzi, což mělo za cíl dosáhnout vyšší koncentrace léku v mozkové tkáni. Žádný z nemocných neměl na terapii ani kompletní ani částečnou odpověď. Autoři přitom zohlednili dávkování léku v závislosti na současném podávání antikonvulziv, která snižují efekt paklitaxelu. Diskrepance mezi účinností paklitaxelu in vivo a in vitro souvisí zřejmě s jeho špatnou prostupností přes hematoencefalickou bariéru. Ačkoliv je lipofilní, jeho molekulová hmotnost je 850. Autoři pokládají další zkoumání paklitaxelu v uvedené diagnóze za neopodstatněné.

Neúčinnost taxolu v léčbě maligních gliomů mozku již byla, zdá se, dostatečně prokázána i když pokusy o jeho využití v neuroonkologii zatím nekončí. Jednou ze zkoumaných metod je změna vehikula. Zajímavou studii provedl in vitro, ale rovněž v pokusech na zvířeti Ho a spol. (1997), který použil k ovlivnění maligního gliomu paklitaxel, jehož vehikule jsou mikrobubliny tvořené estery cholesterolu a triglyceridy. Byl prokázán protinádorový efekt. Otázkou k řešení však zůstává výrazná hepatotoxicita.

Kornblith (1995) doporučuje provedení chemoterapie před radioterapií, která vede k poškození cévní stěny v nádoru, a tak zřejmě zhoršuje průnik farmaka do tkáně. Rovněž není zanedbatelná skutečnost, že chemoterapie následující po radioterapii se provádí za více než 6 týdnů po operaci, což se vzhledem k vysoké malignitě nádoru jeví nevýhodné.

Rovněž Beck a Hochberg (1985) doporučují chemoterapii před ozářením, odmítají provádění radioterapie a chemoterapie souběžně s tím, že takovýto postup vede ke značné zátěži pro mozkovou tkáň, a proto i k horším terapeutickým výsledkům. Poškození zejména bílé hmoty je ireverzibilní a lze jej prokázat i v CT obraze jako difúzní hypodenzní oblasti.

## Chemoterapie oligodendrogliomů

V posledních letech se objevují zprávy o možnostech chemoterapie v léčbě nízkostupňových oligodendrogliomů. Otázky chemoterapie oligodendrogliomů jsou v současné době živě diskutovány a hledá se optimální kombinace chemoterapeutik. Zprávy o úspěšnosti chemoterapie je však přes pozitivní informace nutno přijímat obezřetně, neboť některé studie jsou dosud předběžné (Glass a spol., 1992). Rovněž počty sledovaných nemocných bývají malé, avšak pozitivních zpráv v posledních letech přibyla celá řada.

Anaplastický oligodendrogliom reaguje příznivě na chemoterapii v kombinaci prokarbazin, CCNU a vinkristin, kdy na tuto léčbu odpovědělo 3/4 nemocných (38 % mělo kompletní odpověď a 38 % parciální odpověď). Nebyl zjištěn rozdíl u nemocných s předchozí radioterapií anebo bez ní (Cairncross a spol., 1994).

Mason a spol. (1996) prokázal, že nízkostupňové oligodendrogliomy jsou k chemoterapii v kombinaci prokarbazin, CCNU a vinkristin (PCV) stejně citlivé, jako anaplastické oligodendrogliomy, tj. asi u 75 % nemocných.

Peterson a spol. (1996) zjistil účinnost chemoterapie v kombinaci prokarbazin, CCNU a vinkristin i u nemocných s recidivujícím oligodendrogliomem, kteří již v minulosti prodělali jiný způsob chemoterapie (buď CCNU anebo BCNU).

Soffietti a spol. (1998) prokázal efekt PCV chemoterapie u recidivujících oligodendrogliomů či oligoastrocytomů u 62 % nemocných. Odpověď na chemoterapii je rychlá, dostavuje se již po 2 cyklech chemoterapie. Soffietti radí provádět u těchto diagnóz chemoterapii namísto radioterapie. Chemoterapie je efektivní bez závislosti na věku pacienta.

Kim a spol. (1996) prokázal, že smíšené gliomy obsahující oligodendrogliální komponentu jsou k chemoterapii kombinací prokarbazin, CCNU a vinkristin stejně citlivé, jako čisté oligodendrogliomy. Stejná odpověď byla získána rovněž u nádorů III. a IV. stupně malignity. Nejdéle však přeživali nemocní s diagnózou anaplastického oligodendrogliomu (nad 76 měsíců), nemocní s diagnózou oligoastrocytomu grade III 50 měsíců a s nálezem oligoastrocytomu grade IV 16 měsíců. (Oligoastrocytomy jsou v Kimově studii definovány jako nádory obsahující od 1 do 99% oligodendrogliálních komponent. V případě přítomnosti mitózy byly označeny stupněm III a v případě nálezu nekrotizace či endotelální proliferace v astrocytární složce stupněm IV.)

## Chemoterapie u primárních maligních lymfomů mozku

Incidence primárního lymfomu CNS dramaticky stoupá (Corn a spol., 1997). Toto se týká nejen pacientů postižených poruchami imunitních funkcí jako je tomu například u AIDS, ale rovněž u osob bez prokázaného onemocnění imunitního systému. Vzestup incidence není možno přičíst na vrub pouze zlepšené dostupnosti diagnostických metod, neboť u jiných typů nádorů (gliomy) tento trend zaznamenaný nebyl. Šíření lymfomu non-Hodgkinova typu do centrální nervové soustavy posti-

huje asi 5-30% nemocných. Méně zkušeností však mívají hematologové s primárním maligním lymfomem mozku. Tento nádor roste infiltrativně v mozkové tkáni a z tohoto důvodu má chirurgický výkon pouze velmi limitovaný význam. Je však známo, že konvenční radioterapie výrazně zlepšuje prognózu nemocných. V souhrnné studii, která metaanalyticky vyhodnocuje 40 prací zahrnujících celkem 1100 nemocných prokázal Fine a Mayer (1993), že je velmi přínosná i chemoterapie, kdy nemocní léčení pouze radioterapií přeživali průměrně 16,6 měsíce zatímco nemocní léčení radioterapií a chemoterapií 29,1 měsíce. Otázky, jaká chemoterapeutika zvolit, nejsou dosud uspokojivě zodpovězeny.

Gabbai a spol. (1989) dosáhl průměrného přežití více než 27 měsíců s 100% responsibilitou (69% kompletních remisí) podáváním vysokých dávek methotrexatu, které předcházely radioterapii.

Neuwelt a spol. (1991) dosáhl velmi dobrých výsledků podáváním methotrexatu, cyklofosfamidu a prokarbazinu po hyperosmolárním otevření hematoencefalické bariéry. Dosáhl 81% kompletních remisí a průměrné přežití 44,5 měsíce.

Vcelku platí, že mladší nemocní reagují na chemoterapii příznivěji.

De Angelis a spol. (1992) dokládá efekt systémové chemoterapie dexamethasonem, methotrexatem a posléze po radioterapii cytosinarabinosidem pro primární maligní lymfom mozku, kdy zjišťují, že kombinace radioterapie s chemoterapií vede k lepším výsledkům než radioterapie samotná. (Uvádějí medián přežití 42,5 měsíce). Jejich léčebný protokol aplikovala u nás Pánková a spol. (1998), ale dosáhla výrazně horších výsledků (6 nemocných s průměrnou dobou přežití 7,5 měsíce). Své výsledky vysvětluje horším klinickým stavem nemocných v době zahájení terapie.

Některé studie však dobrý léčebný efekt chemoterapie popisují, jako je tomu v práci Meada a spol. Do studie bylo zařazeno 38 nemocných léčených radioterapií a poté chemoterapií s kombinací cyklofosfamidu, adriamycin, vinkristin, a prednisolon. Další skupinu tvořilo 15 nemocných léčených pouze radioterapií. Evidentní přínos chemoterapie nebyl prokázán. Počet sledovaných je však malý a proto bude nutno provést další sledování.

Závěrem této souhrnné práce musíme konstatovat, že dle našich současných znalostí se chemoterapie primárních mozkových nádorů jeví jednoznačně přínosná pouze u nemocných s oligodendrogliomy a mozkovými lymfomy, kde navozuje vysoké procento remisí, někdy s kurativním efektem. Na druhé straně, zůstává otevřena otázka chemoterapie u pacientů s maligními gliomy. Přes řadu provedených experimentů zůstává řada nedeřešených otázek, které vyžadují další výzkum. Klíčový význam budou mít výsledky studií zaměřených na ovlivnění hematoencefalicko-nádorové bariéry, lokální aplikace cytostatik, inhibici angiogeneze a zohledňování výsledků testů rezistence in vitro při výběru vhodných cytostatik.

## Literatura

1. Barranco, S. C., Drewinko, B., Humphrey, R. M.: Differential response by human melanoma cells to 1,3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and bleomycin. *Mutat. Res.*, 19, 1973, s. 277.
2. Beck, D. O., Hochberg, F. H.: Rationale for preirradiation chemotherapy in treatment of malignant gliomas. *J. Neurosurg.*, 63, 1985, s. 994-996.
3. Bloom, H. J. G.: Intracranial tumors: response and resistance to therapeutic endeavours, 1970-1980. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 8, 1982, s. 1083.
4. Brada, M., Thomas, D. G. T., Bleehen, N. M., Roberts, J. T., Senanayake, F., Abram, P., Lantos, P. L., Moss, T. H., Ironside, J. W., Whaley, J. B., Stenning, S. P.: Medical research council (MRC) randomised trial of adjuvant chemotherapy in high grade glioma (HGG)-BROS. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 17, 1998, s. 400a.
5. Brem, H., Piantadosi, S., Burger, P. C., Walker, M., Selker, R., Vick, N. A., Black, K., Sisti, M., Brem, S., Mohr, G., Muller, P., Morawetz, R., Schold, S. C.: Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. *Lancet*, 345, 1995, s. 1008-1012.
6. Brock, C. S., Matthews, J. C., Brown, G., Osman, S., Evans, H., Newlands, E. S., Price, P.: Response to temozolamide (TEM) in recurrent high grade gliomas (HGG) is related to tumour drug concentration. 10<sup>th</sup> NCI-EORTC symposium on new drugs in cancer therapy. June 16-19, 1998, Amsterdam, abstract 667.
7. Bullard, D. E., Schold, S. C., Bigner S. H., Bigner, D. D.: Growth and chemotherapeutic response in athymic mice of tumours arising from human glioma-derived cell lines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 40, 1981, s. 410.

8. Bushunow, P., Mechtler, L., Mogensen, K., Winfield, J., Lemke, S., Coyle, T.: Idarubicin for treatment of recurrent malignant glial tumors: a Buffalo-Rochester-Syracuse neuro-oncology study group trial. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 17, 1988, s. 386a.
9. Cairncross, G., Macdonald, D., Ludwin, S., Lee, D., Cascino, T., Buckner, J., Fulton, D., Dropcho, E., Steward, D., Schold, C., Jr., Wainman, N., Eisenhauer, E.: Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. *J. Clin. Oncol.*, 12, 1994, s. 2013-2021.
10. Cloughesy, T. F., Rich, K., Moran, C., Olsen, J., Piepmeyer, J., Mechtler, L., Fenstermaker, R., Watson, V., Spence, A., Hochberg, F., Dion, J., Downing, G., O'Toole, T., Gobin, P., Villablanca, P., Black, K. L.: A multicenter, open label, single arm phase II study of RMP-7 and carboplatin, administered intra-arterially for the treatment of malignant glioma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 17, 1988, s. 378a.
11. Corn, B. W., Marcus, S. M., Topham, A., Hauck, W., Curran, W. J. Jr.: Will primary central nervous system lymphoma be the most frequent brain tumor diagnosed in the year 2000? *Cancer*, 79, 1997, s. 2409-2413.
12. Coyle, T., Baptista, J., Winfield, J., et al.: Mechlorethamine, vincristine, and procarbazine chemotherapy for recurrent high-grade glioma in adults. A phase II study. *J. Clin. Oncol.*, 8, 1990, s. 2014-2018.
13. Dahlborg, S. A., Henner, W. D., Crossen, J. R., Tableman, M., Petrillo, A., Brazier, R., Neuwelt, E. A.: Non-AIDS primary CNS lymphoma: The first example of durable response in a primary brain tumor using enhanced chemotherapy delivery without cognitive loss and without radiotherapy. *Cancer J. Sci. Am.*, 2, 1996, s. 166-174.
14. De Angelis, L. M., Yahalom, J., Thaler, H. T., Kher, U.: Combined modality therapy for primary CNS lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 10, 1992, s. 635-643.
15. Easty, D. M., Wylie, J. A. H.: Screening of 12 gliomata against chemotherapeutic agents in vitro. *Br. Med. J.*, 1, 1963, s. 1589.
16. Ewend, M. G., Sampath, P., Williams, J. A., Tyler, B. M., Brem, H.: Local delivery of chemotherapy prolongs survival in experimental brain metastases from breast carcinoma. *Neurosurgery*, 43, 1998, s. 1185-1193.
17. Fetell, M. R., Grossman, S. A., Fisher, J. D., Erlanger, R., Rowinsky, E., Stockel, J., Piantadosi, S.: Preirradiation paclitaxel in glioblastoma multiforme: efficacy, pharmacology, and drug interactions. *J. Clin. Oncol.*, 15, 1997, s. 3121-3128.
18. Fine, H. A., Dear, K. B. G., Loeffler, J. S., Black, P. McL., Canellos, F. P.: Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer*, 71, 1993, s. 2585-2597.
19. Fine, H. A., Mayer, R. J.: Primary central nervous system lymphoma. *Ann. Intern. Med.*, 119, 1993, s. 1093.
20. Fung, L. K., Ewend, M., Sills, A., Sipes, E. P., Thompson, R., Watts, M., Colvin, O. M., Brem, H., Saltzman, W. M.: Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain. *Cancer Res.*, 58, 1998, s. 672-684.
21. Gabbai, A. A., Hochberg, F. H., Linggood, R. M., et al.: High-dose methotrexate for non-AIDS primary central nervous system lymphoma. *J. Neurosurg.*, 70, 1989, s. 190.
22. Galanis, E., Buckner, J. C., Burch, P. A., Schaefer, P. L., Dinapoli, R. L., Novotny, P. J., Scheithauer, B. W., Rowland, K. M., Vukov, A. M., Mailliard, J. A., Morton, R. F.: Phase II trial of nitrogen mustard, vincristine, and procarbazine in patients with recurrent glioma: North Central Cancer Treatment Group results. *J. Clin. Oncol.*, 16, 1998, s. 2953-2958.
23. Gazzo, L. R., Afra, D.: Study on the effect of actinomycins in tissue cultures from human brain tumours. *Acta Neurochir. (Wien)*, 21, 1969, s. 139.
24. Glass, J., Hochberg, F. H., Gruber, M. L. et al.: The treatment of oligodendrogliomas and mixed oligodendroglioma - astrocytomas with PCV chemotherapy. *J. Neurosurg.*, 76, 1992, s. 741-745.
25. Gutin, P. H., Wilson, Ch. B., Kumar, A. R. V., Boldrey, E. B., Levin, V., Powell, M., Enot, K. J.: Phase II study of procarbazine, CCNU, and vincristine combination chemotherapy in the treatment of malignant brain tumors. *Cancer*, 35, 1975, s. 1398-1404.
26. Hajdúch, M., Mihál, V., Minařík, J., Faber, E., Šafářová, M., Weigl, E., Antálek, P.: Decrease in vitro chemosensitivity of tumour cells in patients suffering from malignant diseases with a poor prognosis. *Cytotechnology*, 19, 1996, s. 243-245.
27. Ho, S. Y., Barbarese, E., D'Arrigo, J. S., Smith-Slatas, C., Simon, R. H.: Evaluation of lipid-coated microbubbles as a delivery vehicle for taxol in brain tumor therapy. *Neurosurgery*, 40, 1997, s. 1260-1268.
28. Chamberlain, M. C., Kormanik, P.: Salvage chemotherapy with paclitaxel for recurrent primary brain tumors. *J. Clin. Oncol.*, 13, 1995, s. 2066-2071.
29. Chang, S. M., Kuhn, J. G., Rizzo, J., Robins, I., Schold, S. C., Spence, A. M., Berger, M. S., Mehta, M. P., Bozik, M. E., Pollack, I., Gilbert, M., Fulton, D., Rankin, C., Malec, M., Prados, M. D.: Phase I study of paclitaxel in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium report. *J. Clin. Oncol.*, 16, 1998, s. 2188-2194.
30. Inamura, T., Black, K. L.: Bradykinin selectively opens blood-tumor barrier in experimental brain tumors. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 14, 1994, s. 862-870.
31. Inamura, T., Nomura, T., Bartus, R. T., Black, K. L.: Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog: A method for selective drug delivery to brain tumors. *J. Neurosurg.*, 81, 1994, s. 752-758.
32. Itoh, Y.: Treatment of malignant brain tumor by local injection of Adriamycin. *Nippon Ika Daigaku Zasshi*, 47, 1980, s. 527-537.
33. Janinis, J., Tsantila, A., Samantas, E., Aravantinos, G., Sitaras, N., Skarlos, D.: Phase II study of temozolamide in patients with glioblastoma multiforme. 10<sup>th</sup> NCI-EORTC symposium on new drugs in cancer therapy. June 16-19, 1998. Amsterdam abstract 694.
34. Kim, L., Hochberg, F. H., Thornton, A. F., Harsh, G. R. IV, Patel, H., Finkelstein, D., Louis, D. N.: Procarbazine, lomustine, and vincristine (PCV) chemotherapy for grade III and grade IV oligoastrocytomas. *J. Neurosurg.*, 85, 1996, s. 602-607.
35. Kimmel, D. W., Shapiro, J. R., Shapiro, W. R.: In vitro drug sensitivity testing in human gliomas. *J. Neurosurg.*, 66, 1987, s. 161-171.
36. Klener, P.: Protinádorová chemoterapie. Galén, 1996, s. 614.
37. Kornblith, P. L., Szytko, P. E.: Variations in response of human brain tumors to BCNU in vitro. *J. Neurosurg.*, 48, 1978, s. 580.
38. Kornblith, P. L., Smith, B. H., Leonard, L. A.: Response of cultured human brain tumors to nitrosoureas: correlation with clinical data. *Cancer*, 47, 1981, s. 225.
39. Kornblith, P. L.: The role of cytotoxic chemotherapy in the treatment of malignant brain tumors. *Surg. Neurol.*, 44, 1995, s. 551-552.
40. Kroll, R. A., Neuwelt, E. A.: Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery*, 42, 1998, s. 1083-1100.
41. Kroll, R. A., Pagel, M. A., Muldoon, L. L., Roman-Goldstein, S., Fiamengo, S. A., Neuwelt, E. A.: Improving drug delivery to intracerebral tumor and surrounding brain in a rodent model: a comparison of osmotic versus bradykinin modification of the blood-brain and/or blood-tumor barriers. *Neurosurgery*, 43, 1998, s. 879-889.
42. Laske, D. W., Ilcail, O., Akbasak, A., Youle, R. J., Oldfield, E. H.: Efficacy of direct intratumoral therapy with targeted protein toxins for solid human gliomas in nude mice. *J. Neurosurg.*, 80, 1994, s. 520-526.
43. Levin, V. A., Edwards, M. S., Wright, D. C., et al.: Modified procarbazine, CCNU and vincristine (PCV 3) combination chemotherapy in the treatment of malignant brain tumors. *Cancer Treat. Rep.*, 64, 1980, s. 237.
44. Longee, D. C., Friedman, H. S., Albright, E., et al.: Treatment of patients with recurrent gliomas with cyclophosphamide and vincristine. *J. Neurosurg.*, 72, 1990, s. 583-588.
45. Mahaley M. S., Hipp, S. W., Dropcho, E. J. et al.: Intracarotid cisplatin chemotherapy for recurrent gliomas. *J. Neurosurg.*, 70, 1989, s. 371-378.
46. Mason, W. P., Krol, G. S., DeAngelis, L. M.: Low grade oligodendroglioma responds to chemotherapy. *Neurology*, 46, 1996, s. 203-207.
47. Matsukado, K., Inamura, T., Nakano, S., Fukui, M., Bartus, R. T., Black, K. L.: Enhanced tumor uptake of carboplatin and survival in glioma-bearing rats by intracarotid infusion of bradykinin analog, RMP-7. *Neurosurgery*, 39, 1996, s. 125-133.
48. Mead, G. M., Bleeher, N. M., Gregor, A., Bullimore, J., Rampling, R., Roberts, J. T., Glaser, M., Lantos, P., Ironside, J. W., Moss, T. H., Whaley, J. B., Stenning, S. P., Brada, M.: Medical research council (MRC) randomised trial of adjuvant chemotherapy in primary CNS lymphoma (PCL)-BRO6. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 17, 1988, s. 401a.
49. Mealey, J., Chen, T. T., Shupe, R.: Response of cultured glioblastomas to radiation and BCNU chemotherapy. *J. Neurosurg.*, 41, 1974, s. 339.
50. Meney, P., Benoit, J. -P., Boisdron-Celle, M., Fournier, D., Mercier, P., Guy, G.: Drug targeting into the central nervous system by stereotactic implantation of biodegradable microspheres. *Neurosurgery*, 34, 1994, s. 1058-1064.
51. Mihál, V., Hajdúch, M.: Rezistencia nádorových buniek na cytotatika a její význam v léčbě dětské akutní leukémie. *Farmakol. Zpravodaj*, 4, 1995.
52. Mihál, V., Hajdúch, M., Videmanová, L., Weigl, E., Šafářová, M.: Naše první zkušenosti s testováním rezistence nádorových buniek na cytotatika. *Čs. Pediat.*, 50, 1995, s. 385-390.
53. Mihál, V., Hajdúch, M., Starý, J., Sedláček, P., Blažek, B., Michálek, T., Kotala, V., Jabali, J., Pospíšilová, D., Klásková, E., Šafářová, M., Janošťáková, A.: Může citlivost nádorových buniek na cytotatika ovlivnit klinickou odpověď dětí s akutní lymfoblastickou leukémií? *Čs. Pediat.*, 51, 1996, s. 515-519.
54. Mihál, V., Hajdúch, M., Dušek, J., Weigl, E., Jarošová, M., Píkalová, Z., Šafářová, M.: Differential chemosensitivity of leukaemic cells in myeloid and lymphoid phase of stem cell leukaemia. *Neoplasma*, 44, 2, 1997, s. 133-136.
55. Mihál, V., Hajdúch, M., Šafářová, M.: What is the prognostic value of in vitro drug resistance assay in childhood ALL in short-term clinical outcome? In: *Diagnostics and therapy in paediatrics III (in Slovak)*, Osveda Martin, 1997, Slovak Republic.
56. Mihál, V., Hajdúch, M., Janošťáková, A., Šafářová, M., Nosková, V., Starý, J., Blažek, B., Pospíšilová, D.: Analysis of correlation between drug resistance and clinical/laboratory measures found in a group of children with ALL treated by ALL BFM 90 protocol. *Elect. J. Oncol.*, 1, 1999, 1-14, [http://ejo.univ-lyon1.fr/Archive/Escripts/1999\\_1\\_80-89/EScript](http://ejo.univ-lyon1.fr/Archive/Escripts/1999_1_80-89/EScript).
57. Morantz, R. A., Kimler, B. F., Vats, T. S., Henderson, S. D.: Bleomycin and brain tumors: a review. *J. Neurooncol.*, 1, 1983, s. 249-255.
58. Nakagawa, H., Maeda, N., Tsuzuki, T., Yamamoto, H., Yamada, M., Fukushima, M., Ikenaka, K.: Intracavitary chemotherapy with 5-fluoro-2-deoxyuridine (FDUR) in the malignant brain tumors. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 17, 1988, s. 408a.
59. Neuwelt, E. A., Goldman, D. L., Dahlberg, S. A., Crossen, J., Ramsey, F., Brazier, R., Brazier, R., Dana, B.: Primary CNS lymphoma treated with osmotic blood-brain barrier disruption: Prolonged survival and preservation of cognitive function. *J. Clin. Oncol.*, 9, 1991, s. 1580.
60. Neuwelt, E. A., Brummett, R. E., Remsen, L. G., Kroll, R. A., Pagel, M. A., McCormick, C. I., Guitjens, S., Muldoon, L. L.: In vitro and animal studies of sodium thiosulfate as a potential chemoprotectant against carboplatin-induced ototoxicity. *Cancer Res.*, 56, 1996, s. 706-709.

61. Newlands, E. S., Blackledge, G. R. P., Slack, J. A. et al.: Phase I trial of temozolomide (CCRG 81045; M and B39831; NSC 362856). *Brit. J. Cancer*, 65, 1992, s. 287-291.
62. Nierenberg, D., Harbaugh, R., Maurer, H., Reeder, T., Scott, G., Fratkan, J., Newman, E.: Continuous intratumoral infusion of methotrexate for recurrent glioblastoma: a pilot study. *Neurosurgery*, 28, 1991, s. 752-761.
63. Nikkhah, G., Tonn, J. C., Hoffmann, O., Kraemer, H. P., Darling, J. L., Schonmayr, R., Schachenmayr, W.: The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system. Part I - evaluation of test - specific variables. *J. Neurooncol.*, 13, 1992, s. 1-11.
64. Nikkhah, G., Tonn, J. C., Hoffmann, O., Kraemer, H. P., Darling, J. L., Schachenmayr, W., Schonmayr, R.: The MTT assay for chemosensitivity testing of human tumors of the central nervous system: Part II-evaluation of patient and drug - specific variables. *J. Neurooncol.*, 13, 1992, s. 13-24.
65. Norgaard, J. M., Jensen P. D., Bendix K., Clausen N., Palshof T.: Relevance of in vitro leukaemia cell survival to short- and long term clinical outcome in AML. *Leuk Lymphoma*, 32, 1999, s. 327-337.
66. Oda, Y., Kamiyo, K., Okumura, T., Tokuriki, Y., Yamashita, J., Handa, H., Aoyama, I., Hashi, K., Mori, K.: Clinical application of a sustained release anticancer pellet (in Japanese). *No Shinkei Geka*, 13, 1985, s. 1305-1311.
67. Oldfield, E. H., Ram, Z., Culver, K. W., Blaese, R. M., DeVroom, H. L., Anderson, W. F.: Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum. Gene Ther.*, 4, 1993, s. 39-69.
68. Olivi, A., Gilbert, M., Duncan, K. L., Corden, B., Lenartz, D., Brem, H.: Direct delivery of platinum-based antineoplastics to the central nervous system: a toxicity and ultrastructural study. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 31, 1993, s. 449-454.
69. Olivi, A., Ewend, M. G., Utsuki, T., Tyler, B., Domb, A. J., Brat, D. J., Brem, H.: Interstitial delivery of carboplatin via biodegradable polymers is effective against experimental glioma in the rat. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 39, 1996, s. 90-96.
70. Olivi, A., Bruce, J., Saris, S., Engelhard, H., Judy, K., Kelly, D., Burak, E., Dal Pan, G., Grossman, S., Fisher, J., Piantadosi, S.: Phase I study of escalating doses of interstitial BCNU administered via wafer in patients with recurrent malignant glioma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 17, 1998, s. 387a.
71. Ott, R. J., Brada, M., Flower, M. A., Babich, J. W., Cherry, S. R., Deehan, B. J.: Measurements of blood-brain barrier permeability in patients undergoing radiotherapy and chemotherapy for primary cerebral lymphoma. *Eur. J. Cancer*, 27, 1991, s. 1356-1361.
72. Partheni, M., Voulgaris, S., Kalofonos, H. P., Dimopoulos, P., Papadakis, N.: Intrathecal chemotherapy with doxorubicin of brain gliomas. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 17, 1998, s. 390a.
73. Pánková, J., Benešová, E., Klener, P., Benešová, K., Bauer, J., Seidl, Z., Zeman, D., Adam, P., Syrůček, M., Campr, V., Cieslar, P., Hořejš, J.: Primární lymfom centrální nervové soustavy. *Klin. onkol.*, 11, 1998, s. 112-115.
74. Peterson, K., Paleologos, N., Forsyth, P., Macdonald, D. R., Cairncross, J. G.: Salvage chemotherapy for oligodendroglioma. *J. Neurosurg.*, 85, 1996, s. 597-601.
75. Rapoport, S. I., Hori, M., Klatxo, I.: Testing of a hypothesis of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.*, 223, 1972, s. 323-331.
76. Rapoport, S. I., Fredericks, W. R., Ohno, K., Pettigrew, K. D.: Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.*, 238, 1980, s. 421-431.
77. Reagan, T. J., Bisek, H. F., Childs, D. S. et al.: Controlled study of CCNU and radiation therapy in malignant astrocytoma. *J. Neurosurg.*, 44, 1976, s. 186-190.
78. Remsen, L. G., McCormick, C. I., Sexton, G., Pearse, H. D., Garcia, R., Mass, M., Roman-Goldstein, S., Neuwelt, E. A.: Long-term toxicity and neuropathology associated with sequencing of cranial irradiation and enhanced chemotherapy delivery. *Neurosurgery*, 40, 1997, s. 1034-1042.
79. Rosenblum, M. L., Gerosa, M., Dougherty, D., et al.: Age related chemosensitivity of stem cells from human malignant brain tumours. *Lancet*, i, 1982, s. 885.
80. Shapiro, W. R., Young, D. F.: Chemotherapy of malignant glioma with CCNU alone and CCNU combined with vincristine sulphate and procarbazine hydrochloride. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 101, 1976, s. 217.
81. Soffietti, R., Ruda, R., Bradac, G. B., Schiffer, D.: PCV chemotherapy for recurrent oligodendrogliomas and oligoastrocytomas. *Neurosurgery*, 43, 1998, s. 1066-1073.
82. Subach, B. R., Witham, T. F., Kondziolka, D., Lunsford, L. D.: Morbidity and survival after BCNU wafer implantation for recurrent glioblastoma: a retrospective case matched cohort series. *Neurosurgery* 43, 1998, s. 678.
83. Taylor C. G., Sargent J. M., Elgie A. W., Reid F. D., Alton P. A., Hill J. G.: The clinical relevance of chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer Detect. Prev.*, 22, 1998, s. 305-312.
84. Thomas, D. G. T., Darling, J. L., Paul, E. A., Mott, T. J., Godlee, J. N., Tobias, J. S., Capra, L. G., Collins, C. D., Mooney, C., Bozek, T., Finn, G. P., Arigbabu, S. O., Bullard, D. E., Shannon, N., Freshney, R. I.: Assay of anti-cancer drugs in tissue culture: relationship of relapse free interval (RFI) and in vitro chemosensitivity in patients with malignant cerebral glioma. *Br. J. Cancer*, 51, 1985, s. 525-532.
85. Tonn, J. C., Schachenmayr, W., Kraemer, H. P.: In vitro chemosensitivity test of malignant gliomas: clinical relevance of test results independent of adjuvant chemotherapy? *Anticancer. Res.*, 14, 1994, s. 1371-1375.
86. Underhill, C., Clarke, K., Green, M., Mitchell, P., Barlett, J. et al.: MX2 (KRN8602), an active new agent with low toxicity in high grade malignant glioma. 10<sup>th</sup> NCI-EORTC symposium on new drugs in cancer therapy, June 16-19, 1998, Amsterdam, abstract 650.
87. Ushio, Y., Kochi, M.: Chemotherapy for oligodendroglioma and glioma containing oligodendroglioma components. *Crit. Rev. Neurosurg.*, 8, 1998, s. 19-24.
88. Valtonen, S., Timonen, U., Toivanen, P., Kalimo, H., Kivipelto, L., Heiskanen, O., Unsgaard, G., Kuurne, T.: Interstitial chemotherapy with carmustine-loaded polymers for high-grade gliomas: a randomised double-blind study. *Neurosurgery*, 41, 1997, s. 44-49.
89. Von Hoff, D. D.: He's not going to talk about in vitro predictive assays again, is he? *Commentary. J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1990, s. 96-101.
90. Walter, K. A., Tamargo, R. J., Olivi, A., Burger, P. C., Brem, H.: Intratumoral chemotherapy. *Neurosurgery*, 37, 1995, s. 1129-1145.
91. Weingart, J. D., Thompson, R. C., Tyler, B., Colvin, O. M., Brem, H.: Local delivery of the topoisomerase I inhibitor camptothecin sodium prolongs survival in the rat intracranial 9L gliosarcoma model. *Int. J. Cancer*, 62, 1995, s. 605-609.
92. Williams, P. C., Henner, W. D., Roman-Goldstein, S., Dahlborg, S. A., Brummett, R. E., Tableman, M., Dana, B. W., Neuwelt, E. A.: Toxicity and efficacy of carboplatin and etoposide in conjunction with disruption of the blood-brain barrier in the treatment of intracranial neoplasms. *Neurosurgery*, 37, 1995, s. 17-28.
93. Xu J. M., Song S. T., Tang Z. M., Jiang Z. F., Liu X. Q., Zhou L., Zhang J., Liu X. W.: Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay in vitro. *Breast Cancer Res. Treat.*, 53, 1999, s. 77-85.
94. Yung, W. K. A., Shapiro, J. R., Shapiro, W. R.: Heterogeneous chemosensitivities of subpopulations of human glioma cells in culture. *Cancer Res.*, 42, 1982, s. 992.
95. Zeller, W. J., Bauer, S., Remmele, T., Wowra, B., Sturm, V., Srickler, H.: Interstitial chemotherapy of experimental gliomas. *Cancer Treat. Rev.*, 17, 1990, s. 183-189.
96. Zlokovic, B. V., Apuzzo, M. L. J.: Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system. *Neurosurgery*, 43, 1998, s. 877-878.
97. Zünkler, B., Carson, R. E., Olson, J., Blasberg, R. G., DeVroom, H., Lutz, R. J., Saris, S. C., Wright, D. C., Kammerer, W., Patronas, N. J., Dedrick, R. L., Herscovitch, P., Oldfield, E. H.: Quantification and pharmacokinetics of blood-brain barrier disruption in humans. *J. Neurosurg.*, 85, 1996, s. 1056-1065.