

**II. DNY DIAGNOSTICKÉ,
PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ
ONKOLOGIE**

ABSTRAKTA

7. – 9. prosince 2006

OLOMOUC

ISBN 80-239-8240-0



Vážené kolegyně, kolegové, milí přátelé!

Dovolte, abych vás jménem organizátorů konference, jménem Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti ČLS JEP i jménem svým co nejsrdečněji přivítal na druhém ročníku Dnů diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie v Olomouci. Po zkušenostech z předchozího ročníku jsme druhý ročník koncipovali jako třídení konferenci, abychom se vyhnuli paralelním sekcím. V loňském roce jsme totiž sledovali tendenci k separaci klinických a experimentálních onkologů do specificky zaměřených sekcí a nedocházelo tak k dostatečné vzájemné interakci. Věřím, že každý z vás v připraveném programu najde něco zajímavého a podnětného.

Na konferenci bude poprvé vyhlášena Cena za nejlepší práci v oblasti diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie spojená s finanční odměnou. Tuto cenu vyhláší Nadace „Rakovina věc veřejná“ a předpokládáme, že cena bude udělována každoročně při příležitosti této konference. Stejná nadace vyhláší i cenu za nejlepší přednášku a poster v rámci druhého ročníku.

Očekáváme vaše zkušenosti a náměty, které přispějí k dalšímu zlepšení naší společné práce, a těším se na setkání s vámi na Dnech diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie v Olomouci.

Se srdečným pozdravem

MUDr. Marián Hajdúch, PhD.

*koordinátor konference
předseda Sekce diagnostické a prediktivní onkologie
České onkologické společnosti ČLS JEP*

III. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

**28. – 30. 11. 2007
REGIONÁLNÍ CENTRUM OLOMOUC**

PROGRAM / OBSAH

Čtvrtek 7. 12. 2006

14.10–15.10

Předsedající: Hajdúch M., Eckschlager T., Kozubík A.

1. Nová protinádorová léčiva a léčebné postupy 8

1. Kozubík A., Horváth V., Švihálková-Šindlerová L., Souček K., Vondráček J., Sova P., Hofmanová J. High effectiveness of novel platinum derivative with adamantylamine LA-12 and possible mechanisms of its action (20 minut)
 2. Michalka P., Lišková Z., Černá M., Kasan P. Diagnostické úskalia postradiačnej alveolitidy a progresie u pľúcnych tumorov (10 minut)
 3. Cwiertka K., Krejčí E., Beneš P., Kapustová M., Bouchalová K., Kolář Z., Hajdúch M. Co rozhoduje o nasazení trastuzumabu? (10 minut)
 4. Mendoza L. Development of dendritic cell-based vaccines against HPV – associated malignancies (10 minut)
- Diskuze (10 minut)

15.30–16.40

Předsedající: Hoffmanová J., Šmardová J., Džubák P.

2. Molekulární podstata účinku a toxicity protinádorových léčiv 10

1. Hofmanová J., Kozubík A. Mechanizmy působení omega-3 vysoce nenasycených mastných kyselin a jejich využití v nutriční farmakologii (20 minut)
 2. Buršíková E., Veselá R., Kleiblová P., Prchalová M., Špička I., Kleibl Z. Účinky bortezumibu na buněčné linie karcinomu prsu (10 minut)
 3. Fidlerová J., Kleiblová P., Bílek M., Novotný J., Kleibl Z. Molekulární podstata toxicity fluoropyrimidinů u onkologických pacientů (10 minut)
 4. Überall I., Lukáš V., Bláha O., Bouchal J., Hajdúch M., Kolář Z. Vliv cetuximabu® a trastuzumabu® na aktivitu c-erbB receptorů buněčných linií odvozených z karcinomů prostaty a prsu (10 minut)
 5. Čejková S., Trbušek M., Chumchalová J., Ročňová L., Mayer J. Testování monoklonální protilátky rituximab u B-CLL buněk in vitro (10 minut)
- Diskuze (10 minut)

17.00–18.00

Předsedající: Hajdúch M., Eckschlager T., Svoboda M.

3. Chemorezistence nádorů 13

1. Svoboda M., Hajdúch M., Kleinová J., Šimíčková M., Blažková S., Holánek M., Radová L., Lipert J., Gombošová J., Folber F., Chobola M., Andrašínová T., Paseka T., Hanák L., Vyzula R. Lithium, účinný stimulant chemo a radiorezistence (10 minut)
 2. Procházka P., Hraběta J., Poljaková J., Vícha A., Eckschlager T. Změny neuroblastomových linií při experimentální chemorezistenci (10 minut)
 3. Hraběta J., Fígová K., Eckschlager T., Průša R., Baščík O., Křížková S., Adam V., Cínat J., Michaelis M., Kizek R. Obsah metalothioneinu v buňkách neuroblastomu ve vztahu k rezistenci vůči platinovým cytostatikům (10 minut)
 4. Džubák P., Hajdúch M., Gažák R., Svobodová A., Psoťová J., Walterová D., Sedmera P., Kren V. New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity (10 minut)
 5. Grell P., Svoboda M., Šimíčková M., Fabián P., Palácová M., Petráková K., Macková D., Nenutil R., Hajdúch M., Vyzula R. Rezistence a transtuzumab: příčiny a jejich řešení (10 minut)
- Diskuze (10 minut)

Pátek 8. 12. 2006

8.30–10.30

Předsedající: Mihál V., Petráková K., Cwiertka K.

4. Chyby a omyly v diagnostice nádorových onemocnění 15

1. Mihál V., Jarošová M., Holzerová M., Pospíšilová D., Novák Z., Hajdúch M. Relaps akutní lymfoblastické leukémie z minoritního klonu (10 minut)
 2. Beneš P., Kapustová M., Cwiertka K., Schneiderka P. Biochemický marker S100 při sledování pacientů s maligním melanomem (10 minut)
 3. Macháček J., Cwiertka K., Houserková D. Rizika a konkrétní omyly v diagnostice rakoviny prsu (10 minut)
 4. Svoboda M., Kleinová J., Hajdúch M., Blažková S., Hejlová N., Petráková K., Lipert J., Radová L., Hanák L., Vyzula R. Využití vyšetření chemorezistence MTT testem u chronické B-lymfocytární leukémie (B-CLL) (10 minut)
 5. Švébišová H., Gajová B., Cwiertka K., Kučerová L., Tozzi I., Trojanec R. Duplicitní nebo metastatický karcinom? (10 minut)
 6. Šrámek V., Cwiertka K., Krejčí E., Macháček J., Hajdúch M., Kolář Z. Úskalí léčby pokročilého karcinomu prsu (10 minut)
 7. Michalka P., Lišková Z., Černá M., Kasan P. Biologická léčba u nádorů pľúc (10 minut)
 8. Kleiblová P., Ševčík J., Scholzová E. Chyby a omyly ve vyhodnocování kvantitativní PCR (10 minut)
 9. Vašák J. High resolution melting analýza na platformě Light Scanner (10 minut)
- Diskuze (30 minut)

10.40–12.00

Předsedající: Petraková K., Nenutil R., Šmardová J.

5. Prediktivní faktory I 19

1. Petraková K., Vyskočil J., Svoboda M., Fabian P., Knofličková D., Hanzelková Z., Nenutil R.
Progrese a/nebo diseminace mammárního karcinomu během adjuvantní léčby Tamoxifenem. Existuje možnost predikce z parametrů primárního nádoru ? (15 minut)
2. Nenutil R., Fabian P., Knofličková D., Hanzelková Z., Petraková K.
Amplifikace CCND1 u karcinomu prsu v korelaci s proteinem a dalšími prognosticko-prediktivními parametry (15 minut)
3. Šmardová J., F. Zedek, Ravčuková B., Grochová D., Vaňková J., Kroupová I., Fabián P.
Výhody funkční metody FASAY při analýze nádorového supresoru p53 u vybraných případů difúzního velkobuněčného B lymfomu (15 minut)
4. Grochová D., Vaňková J., Damborský J., Šmardová J. Reaktivace proteinu p53 pomocí Amifostinu – experimentální studie v kvasinkovém expresním systému (10 minut)
5. Břizová H., Kalinová M., Krsková L., Kodet R. Kvantitativní stanovení exprese cyklinu D1, spolehlivý nástroj v diagnostice a sledování pacientů s lymfomem z buněk pláště (MCL) (10 minut)
Diskuse (15 minut)

13.00–14.25

Předsedající: Mihál, V., Svoboda M., Ehrmann J.

6. Prediktivní faktory II. 21

1. Březinová J., Zemanová Z., Melicherčíková J., Pavlišťová L., Babická L., Šišková M., Čermák J., Michalová K.
Incidence a prognostický význam chromozomových změn u myelodysplastického syndromu (15 minut)
2. Eckschlager T., Bouček J., Betka J., Chovanec M., Kuchař M., Říhová B., Hladíková M. Vyšetření lymfocytárních subpopulací u nádorů hlavy a krku – možnost predikce
3. Kapustová M., Cwierka K., Minařík J., Krejčí E., Schneiderka P. Význam kostního markru ICTP v diagnostice kostních metastáz (10 minut)
4. Holubec L., Topolčan O., Fínek J. Význam chromograninu A pro diagnostiku a léčbu neroendokrinních tumorů a dalších nádorových onemocnění (10 minut)
5. Bella V., Malatin D., Jusko P. Naše zkušenosti s diagnostikou karcinomu prsníka pomocí mikrovlnné radiometrie (10 minut)
6. Hlavatá I., Vodičková L., Vodička P., Šúsová S., Novotný J., Souček P.
Genetic polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes and their association with colorectal cancer (10 minut)
Diskuse (15 minut)

14.40–15.55

Předsedající: Pešek M., Berkovcová J., Holubec L.

7. Prediktivní faktory III 24

1. Pešek M., Benešová L., Belšánová B., Brůha F., Mukenšnabl P., Jančaříková D., Krejčí J., Minářík M.
Mutace k-ras onkogenu v predikci účinnosti terapie inhibitory tyrosinkinázy (EGFR) u nemalobuněčného karcinomu plic (15 minut)
2. Wiecek S., Berkovcová J., Janošťáková A., Hajdúch M., Radzich P., Danuta R., et al.
Comparative analysis of somatic K-RAS gene mutation frequency in the clinical NSCLC specimens (10 minut)
3. Jančaříková D. Vznik rezistence adenokarcinomu plic na původně úspěšnou biologicky cílenou léčbu v důsledku získané mutace genu EGFR (10 minut)
4. Cvek J., Šeneklová Z., Soumarová R., Sokol V., Blasch P. Prognostické faktory nádorů ORL oblasti (10 minut)
5. Holubec L., Topolčan O., Fínek J., Pešta M., Rupert K., Sutnar A., Liška V., Kormunda S., Vrzalová J., Třeška V.
Prognostický a prediktivní význam nádorových markerů u pacientů s kolorektálním karcinomem (15 minut)
Diskuse (15 minut)

16.10–18.00

Předsedající: Žaloudík J., Mihál V., Hajdúch M.

8. Pokroky v klinické diagnostice zhoubných nádorů I. 26

1. Žaloudík J. Role chirurga v diagnostice nádorových onemocnění (20 minut)
2. Mihál V., Pospíšilová D., Novák Z., Jarošová M., Holzerová M., Hajdúch M. Co předurčuje špatné léčebné výsledky adolescentní ALL? (20 minut)
3. Nový F., Vávra T. a 72 českých patologů. Vyšetřování HER2 receptoru u nově diagnostikovaných případů karcinomu prsu v České republice (15 minut)
4. Berkovcová J., Trojanec R., Radová L., Kolář Z., Janošťáková A., Mlčochová S., Hajdúch M.
Detekce statusu genu her-2/neu z parafinových řezů u karcinomu prsu metodou kvantitativní real-time PCR (15 minut)
5. Krsková L., Augustiňáková A., Hliská I., Kalinová M., Mrhalová M., Břizová H., Neradová M., Kodet R.
Sledování exprese genu ERBB2 v korelaci s proliferací u synoviálních sarkomů (10 minut)
6. Vícha A., Sumerauer D., Procházková P., Kodet R., Kodetová D., Hraběta J., Eckschlager T.
Molekulárně biologické vyšetření Ewingova sarkomu hrudní stěny – výskyt a význam sekundárních změn (10 minut)
Diskuse (20 minut)

Sobota 9. 12. 2006

8.30–10.30

Předsedající: Kovářová H., Svoboda M., Hajdúch M.

9. Nádorová genomika a proteomika 28

1. Hajdúch M., Džubák P., Dziechciarková M., Podolonošová J. Nádorová genomika nebo proteomika? Možnosti a limitace obou metod (15 minut)
2. Kovářová H. Proteomika v biomedicině (15 minut)
3. Svoboda M., Grell P., Fabián P., Palácová M., Foretová L., Hrstka R., Petraková K., Nenutil R., Hajdúch M., Vyzula R. Molekulární taxonomie karcinomu prsu: "basal-like" karcinom (15 minut)
4. Bouchal J., Turashvili G., Baumforth K., Wei W., Dziechciarková M., Hajdúch M., Lukáš V., Bláha O., Kolář Z. Analýza genové exprese duktálních a lobulárních karcinomů a srovnání k normálním duktálním a lobulárním buňkám prsu (10 minut)
5. Brožková K., Knoflíčková D., Bouchal P., Faitová J., Nenutil R., Vojtěšek B. Analýza proteinových profilů karcinomu prsu metodou SELDI-TOF MS (10 minut)
6. Svoboda M., Vášová I., Fabián P., Radová L., Berkovcová J., Křen L., Slabý O., Navrátil M., Klabusay M., Dvořáková D., Rejthar A., Nenutil R. Profilování genové exprese u lymfoidních malignit: Validace vybraných molekulárních markerů u difúzního velkobuněčného B-lymfocytárního lymfomu (DLBCL) (10 minut)
7. Pospíšilová H., Baens M., Michaux L., Stuhl M., De Wolf-Peeters C., Alexander D., Jarošová M., Vermeesch J., Hagemeyer A., Vanderberghe P., Marynen P., Wlodarska I. Mapování delecí na chromozomu 14 u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (CLL) metodou arrayCGH (10 minut)
8. Kizek R., Húska D., Zítka O., Křížková S., Adam V., Eckschlager T., Binková H., Havel L., Trnková L. Možnosti elektrochemie pro studium proteinů (10 minut)
Diskuse (25 minut)

10.40–11.55

Předsedající: Kolář Z., Nenutil R.

10. Patogeneze nádorů 31

1. Culig Z. Interleukin-6 and Suppressor of cytokine signaling-3 in regulation of proliferation and apoptosis in human prostate cancer (20 minut)
2. Laco J., Slaninka I., Jirásek M., Čelakovský P., Ryška A. High risk HPV infekce a exprese proteinu p16 v laryngeálních lézích (10 minut)
3. Čáslava T., Rotterová P., Nenutil R., Hanzelková Z. Porucha exprese regulátorů buněčného cyklu jako prediktivní faktor u karcinomu jazyka a spodiny dutiny ústní (10 minut)
4. Sachová J., Urban M., Heráček J., Kuncová J., Bendlová B., Minárik M. Význam mutací genu pro androgenní receptor v etiopatogenezi karcinomu prostaty (10 minut)
5. Václavíková E., Dvořáková Š., Vlček P., Škába R., Bendlová B. RET proto-onkogen v patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby (10 minut)
Diskuse (15 minut)

13.00–14.50

Předsedající: Kleibl J., Berkovcová J., Hajdúch M.

11. Pokroky v klinické diagnostice zhoubných nádorů II. 33

1. Kleibl Z., Prokopcová J., Havránek O., Stříbrná J., Novotný J., Pohlreich P. Alterace v genech s nízkou penetrancí u pacientek s karcinomem prsu (15 minut)
2. Sýkorová V., Dvořáková Š., Laco J., Ryška A., Kodetová D., Astl J., Veselý D., Novák Z., Bendlová B. Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy (15 minut)
3. Bakala J., Bernátek J., Gatěk J., Hrbáčková L. Možnosti metod nukleární medicíny v onkologické diagnostice (10 minut)
4. Cincibuch J., Strážnická J., Minařík J., Cwierka K. Karcinom jícnu – význam PET/CT pro volbu optimální léčby (10 minut)
5. Babická L., Zemanová Z., Kramář F., Ransdorfová Š., Melicherčíková J., Hrabal P., Kozler P., Michalová K. Význam molekulárně cytogenetické analýzy nádorových buněk pro diagnostiku a léčbu oligodendrogliomů (10 minut)
6. Holzerová M., Lakomá I., Pospíšilová H., Prekopová I., Kropáčková J., Hanzlíková J., Pospíšilová D., Novák Z., Mihál V., Blažek B., Kuhn T., Ptoczková H., Indrák K., Jarošová M. Dicentrické chromozomy u dětských akutních lymfoblastických leukémií (ALL) (10 minut)
7. Balčárková J., Holzerová M., Pospíšilová H., Plachý R., Hanzlíková J., Kropáčková J., Prekopová I., Novosadová A., Papajik T., Kučerová L., Indrák K., Jarošová M. Cytogenetika, molekulární cytogenetika Burkitt-like lymfomu (10 minut)
8. Šálek T. Laboratorní diagnostika mnohočetného myelomu (10 minut)
Diskuse (20 minut)

POSTERY 37

1. Prchalová M., Buršíková E., Kleiblová P., Scholzová E., Matoušková E., Kleibl Z. Expresní analýza nové linie prsních progenitorových buněk EM-G3
2. Horáková Z., Tóthová E., Salzman R., Binková H., Zítka O., Adam V., Fabik I., Kizek R. Hladina metalothioneinu v krvi pacientů se zhoubnými nádory hlavy a krku
3. Tóthová E., Horáková Z., Salzman R., Binková H., Svoboda M., Adam V., Blašík O., Petřlová J., Kizek R. Měření koncentrace metalothioneinu v nádorové tkáni a sliznici pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku
4. Neuwirthová J., Smilek P., Veselý K., Rottenberg J., Kostřica R., Mechl Z. Klinické využití detekce EGFR u spinocelulárních karcinomů hlavy a krku
5. Kuglík P., Vranová V., Nečaslová E., Žežulková D., Štefančíková L., Filková H., Mazánek P., Štěřba J., Veselská R. Možnosti komparativní genomové hybridizace s vyšším rozlišením (HR-CGH) a array-CGH při detekci prognostických markerů u neuroblastomů
6. Loja T., Chlapek P., Zitterbart K., Veselská R. Re-exprese nestinu v nádorově transformovaných buňkách: in vitro studie na vybraných typech solidních nádorů
7. Horáček J.M., Jebavý L., Jakl M., Slováček L. Změny tepové frekvence a tlaku krve při převodu štěpu krvetvorných buněk. Vliv kryokonzervační látky dimethylsulfoxidu
8. Horáček J.M., Tichý M., Pudil R., Jebavý L., Slováček L. Acute cardiotoxicity of idarubicin in patients treated for hematological malignancy
9. Slováček L., Slováčková B., Jebavý L., Blažek M., Horáček J.M. Vliv vybraných zdravotních a psychosociálních aspektů na kvalitu života nemocných s akutní myeloidní leukémií po autologní transplantaci periferních kmenových buněk

10. Nekulová M., Šimíčková M., Čapák I., Pecen L., Frgala T., Pilný R., Valík D. Kostní markery v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prostaty
11. Ludvíková M., Holubec L. jr., Pešta M., Topolčan O., Reischig J., Sutnar A. Sledování exprese galektinu 3 a EGFR v pokročilém kolorektálním karcinomu
12. Součková K., Kovařík A., Adámková L., Fojtová M., Krejčí E., Lauerová L., Matoušková E., Buršíková E., Kovařík J., Boudný V. IFN-gama ovlivňuje expresní a funkční změny vybraných členů signální dráhy JAK/STAT – srovnání normálního a maligního epitelu mléčné žlázy
13. Adámková L., Součková K., Lauerová L., Kovařík J., Boudný V. Profily STAT 1 a SOCS 3 po indukci interferony u pacientů s maligním melanomem
14. Hublarova P., Rotterová P., Rotter L., Hortíková Z., Badal V., Nenutil R., Vojtěšek B. Význam a detekce metylace v promotoru genu E6 lidského papillomaviru 16 u karcinomů a intraepiteliálních lézí děložního čípku (CIN)
15. Dvořáčková J., Nedbálek A., Uvírová M., Žebráková I. Využití FISH metody při diagnostice a monitorování léčby karcinomu močového měchýře
16. Húska D., Zítka O., Fabrik I., Adam V., Hraběta J., Eckschlager T., Horáková Z., Binková H., Kukačka J., Průša R., Havel L., Trnková L., Kizek R. Aplikace katalytických signálů pro rychlé určení koncentrace proteinů významných v onkologii
17. Zítka O., Křížková S., Adam V., Horna A., Beklová M., Kizek R. Jednoduché a rychlé rozlišení nativní a denaturované formy proteinů
18. Zítka O., Húska D., Kukačka J., Křížková S., Horáková Z., Adam V., Binková H., Průša R., Horna A., Beklová M., Havel L., Kizek R. Sledování interakce glutathionu s cisplatinou pomocí průtokové injekční analýzy.
19. Berkovcová J., Dziechciarková M., Trojanec R., Grygarková I., Kolek V., Janošťáková A., Hajdúch M. Aberration of Egfr1, Her2/neu, and K-ras in non-small cell lung cancers (NSCLC) treated with gefitinib in Expanded Access Program
20. Scholzová E., Ševčík J., Kleibl Z. Systém pro in vitro analýzu sekvenčních variací v genu brca1 u pacientek s dědičným karcinomem prsu
21. Slabý O., Garajova I., Svoboda M., Fabian P., Svoboda M., Srovnal J., Vyzula R. Využití profilů genové exprese primárních kolorektálních karcinomů k predikci jejich progresu a metastatického fenotypu
22. Brančíková D., Spurný V., Bednařík O., Mechl Z. Další prediktivní faktor v léčbě karcinomu prsu – Amplifikace topoizomerázy II α – naše zkušenosti
23. Garajova I., Fabian P., Nenutil R., Kocakova I., Grell P., Hanzelkova Z., Knoflickova D., Svoboda M., Vyzula R. Colorectal carcinoma is infiltrated by foxp3-positive lymphocytes
24. Sivoňová M., Matáková T., Dobrota D., Hatok J., Franecková M., Kliment J. jr., Kliment J. An association between glutathione S-transferase gene polymorphism and prostate cancer in the Slovak population
25. Pešta M., Topolčan O., Holubec L. jr., Sutnar A., Liška V., Třeška V., Skalický T., Kormunda S., Černý R. Klinický význam exprese mRNA MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 a CEA ve tkáňových vzorcích metastáz kolorektálního karcinomu
26. Matáková T., Sivoňová M., Hatok J., Franecková M., Strelka L., Žúbor P., Dobrota D. Glutathione S-transferases M1 and T1, and Breast Cancer in the Slovak population
27. Smolej L., Hrudková M., Andrýs C., Peková S., Schwarz J., Žák P., Belada D., Krejsek J., Malý J. Association of IgVH mutation status and plasma levels of angiogenic activators in chronic lymphocytic leukaemia: significantly higher bFGF but not VEGF in IgVH mutated patients
28. Smolej L., Hrudková M., Andrýs C., Belada D., Pour L., Žák P., Krejsek J., Novosad J., Malý J. Plasma soluble endoglin (sCD105) concentrations in patients with lymphoid malignancies - a pilot study
29. Smolej L., Hrudková M., Andrýs C., Kašparová P., Vokurková D., Belada D., Žák P., Krejsek J., Novosad J., Malý J. Komplexní hodnocení angiogeneze u chronické lymfocytární leukémie
30. Krekáč D., Hrstka R., Nenutil R., Muller P., Vojtěšek B. Stanovenie MDM2 SNP309 v súbore rôznych gynekologických nádorov a určenie jeho vzťahu k expresii p53 a MDM2 proteínov

II. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 7. – 9. 12. 2005 Kongresové centrum RCO, Olomouc

POŘADATEL

Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti ČLS JEP
Laboratoř experimentální medicíny a Laboratoř molekulární patologie LF UP a FN Olomouc
Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Fakultní nemocnice v Olomouci
Komplexní onkologické centrum Olomouc
Nadace pro výzkum rakoviny
Sdružení Šance

PROGRAMOVÝ VÝBOR

Mgr. Jitka Berkovcová, Ph.D.; Doc. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.;
MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.; MUDr. Filip Janků; RNDr. Jiří Netočný;
MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.; MUDr. Katarína Petránková;
prof. MUDr. Lukáš Plank, DrSc.; MUDr. Marek Svoboda; RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.

KOORDINÁTOR KONGRESU

MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., LF UP a FN Olomouc

Kongres je ohodnocen certifikátem pro lékaře v rámci kontinuálního vzdělávání ČLK, a pro sestry v rámci vzdělávání ČAS 9 kredity za pasivní účast, 15 kredity za aktivní účast a 10 kredity za spoluúčast.

SOLEN
MEDICAL EDUCATION

Organizátor: SOLEN, s. r. o.
Lazecká 297/51 779 00 Olomouc

Kontaktní osoba:
Marta Křepelová, Solen, s. r. o.,
tel. 582 396 038, mob. 777 557 415,
fax 582 396 099,
e-mail: krepelova@solen.cz,
web: www.solen.cz/seminare

ISBN 80-239-8240-0

1. NOVÁ PROTINÁDOROVÁ LÉČIVA A LÉČEBNÉ POSTUPY

Předsedající: HAJDÚCH M., ECKSCHLAGER T., KOZUBÍK A.

Čtvrtek / 7. 12. 2006 – 14:10–15:10

High effectiveness of novel platinum derivative with adamantylamine LA-12 and possible mechanisms of its action

Kozubík A.¹, Horváth V.¹, Švihálková-Šindlerová L.¹, Souček K.¹, Vondráček J.¹, Sova P.², Hofmanová J.¹

¹Institute of Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, ²Pliva-Lachema, Brno

Using a wide panel of model cancer cell lines, a novel Pt(IV) complex with adamantylamine –LA-12 – was found to be significantly more effective than cisplatin. These effects were confirmed in A2780 (cisplatin sensitive), A2780cis (with acquired cisplatin resistance) and SK-OV-3 (with intrinsic cisplatin resistance) ovarian cancer cells. Moreover, LA-12 overcame both the acquired and the intrinsic resistance to cisplatin. Due to its lipophilicity, we might suppose that some of these favourable effects can be, at least partially, connected with interactions of LA-12 with cell membranes. Our calorimetric data on liposomal structures indicated that while neither cisplatin nor LA-12 alone changed liposomal characteristics, supplementation with either arachidonic (AA) or docosahexaenoic (DHA) acid significantly modulated liposomal properties leading to increased membrane fluidity. Moreover, we showed that combined treatment of ovarian cancer cells with cisplatin (or LA-12) and DHA induced changes of membrane lipid structure (merocyanine 540 fluorescence). These results will be presented together with those describing potential role of molecules involved in the regulation of cytokinetics (cell cycle, proliferation and apoptosis) i. e. cyclins, cdk, cdk inhibitors, p53 etc. Cisplatin is markedly more potent activator of p53 than LA-12, but the type and dynamics of cell cycle perturbation after treatment with cisplatin and LA-12 was different. These results indicate that also other mechanisms of the effects of LA-12 which is independent on DNA damage might exist.

Supported by grant No. 1QS500040507 IGA AS CR.

Diagnostické úskalí postradiačnej alveolitídy a progresie u pľúcnych tumorov

Michalka P., Lišková Z., Marták M., Kasan P. KPaF 1, oddelenie klinickej onkológie, FNsP, Bratislava

Úvod: Alveolitídu možno definovať ako zápal a zhrubnutie stien pľúcnych alveolov. Obmedzuje

pružnosť nevyhnutnú pre dýchanie a zároveň znižuje účinnosť výmeny plynov medzi alveolami a krvnými cievami. Alveolitída býva najčastejšie spôsobená alergickou reakciou III. typu na vdýchnutý prach s častčkami živočíšneho či rastlinného pôvodu, obsahujúceho často spory plesní. Tieto alergické alveolitídy súvisia väčšinou s určitými povolaniami, ako je tomu napr. u chorôb: farmárskych pľúc, pľúc chovateľov holubov atď. Ďalším druhom alveolitídy je fibrotizujúca alveolitída, ktorá môže byť autoimúnne podmienená. V niektorých prípadoch vzniká fibrotizujúca alveolitída súčasne s inou autoimúnnou chorobou, ako je systémový lupus erythematoses alebo reumatická artritída. Zatiaľ čo u predchádzajúcich alveolitíd ide o alergickú reakciu III. typu tj. zápal vyvolaný imunokomplexami, u postradiačnej alveolitídy ide vlastne o zápal alveolov, spôsobený ich radiáciou (žiarením), vznikajúci ako komplikácia rádioterapie. Na rozdiel od alergickej alveolitídy u postradiačnej dochádza k hyperémii a čiastočnej deštrukcii tkaniva pôsobením žiarenia. Poškodené tkanivo svojimi antigénmi privolá obranné bunky, toto u alergickej alveolitídy urobí cytokíny. Ďalej dochádza k zlepšeniu priepustnosti steny ciev pre obranné bunky. Obranné bunky sa vzápätí pokúšajú odstrániť antigén fagocytózou. Pretože sa to kvôli veľkosti a viazanosti na tkanivo nedarí, uvoľňujú svoje enzýmy a tak spôsobujú ďalšie poškodenie tkaniva. Do zápalovej oblasti nie sú prilákané len obranné bunky, ale so zvýšeným prívodom krvi sa dostávajú aj trombocyty. Tie sa môžu tiež zlučovať s antigénmi a takýmto spôsobom tvoriť mikrotromby, čo vedie k upchatiu kapilár a vzniku ďalšej deštrukcii tkaniva na ischemickom základe. Napokon sú do tejto oblasti pomocou cytokínou prilákané fibroblasty, ktoré v rámci reparačných procesov tvoria medzibunkovú hmotu a tým fibrózu tkaniva. Progresia nádoru sa podľa WHO definuje ako nárast tumoru o viac ako 25% jeho najmenšej veľkosti, resp. objavenie sa novej lézie. Najexaktnéjšie a najistejšie potvrdenie progresie je cytologické alebo histologické potvrdenie nádoru. Materiál a metódy: Retrospektívna analýza jednotlivých pacientov vedených na našom oddelení po rádioterapii. Výsledky: Prejavy postradiačnej alveolitídy sa môžu objaviť od 4 týždňov po ukončení rádioterapie až ojedinele do jedného roka. Na rozdiel od alveolitídy sa progresia môže manifestovať hocikedy. Pre alveolitídu je typický suchý kašeľ a výrazné dyspnoe pri námahe s úsilným dýchaním. Čo sa prejaví začervenaním tváre a úsilným dýchaním so zapojením pomocného dýchacieho svalstva.

Na zníženú saturáciu krvi kyslíkom nás upozorní cyanóza. Pri alveolitíde na röntgène hrudníku pľúc badať škvrnitú tieň, najmä v oblasti žiarenia. Ďalšou modalitou je funkčné vyšetrenie pľúc, ktoré poukazuje na zníženú funkčnú kapacitu pľúc. Na vylúčenie progresie a postradiačnej alveolitídy možno využiť PET alebo scintigrafické vyšetrenie. Taktiež treba kontrolovať onkomarkery, ktoré však môžu byť falošne pozitívne. Ako terapia postradiačnej alveolitídy je nevyhnutné podávanie kortikoidov, ktoré sa môžu podávať buď kontinuálne v menších množstvách alebo v pulzoch. Rozhodnutie je prísne individuálne a záleží na aktivite a veľkosti postihnutého parenchýmu pľúc. Ak je terapia zahájená skôr, než dôjde k výraznému poškodeniu pľúcneho tkaniva, nedochádza z pravidla k trvalému obmedzeniu výkonnosti. Terapiou progresie, aj keď nemožno hovoriť o terapii v pravom slova zmysle, je zahájenie chemoterapie. **Záver:** Aj keď ide o odlišné choroby, ich príznaky sú si v niektorých smeroch tak podobné, že môže dochádzať k ich vzájomnému prekrytiu. Aj napriek existencii iných modalít, ktoré nám môžu bližšie špecifikovať diagnózu, nemôžeme na sto percentne vyhlásiť či ide o alveolitídu alebo progresiu, pokiaľ to nemáme biopsicky potvrdené. Preto si táto problematika vyžaduje analytický prístup a spoluprácu s funkčnou diagnostikou a zobrazovacími metódami (CT). Na konci prednášky ukážka dvoch kazuistik našich pacientov.

Co rozhoduje o nasazení trastuzumabu?

Cwierka K.¹, Krejčí E.¹, Beneš P.¹, Kapustová M.², Bouchalová K.³, Kolář Z.⁴, Hajdúch M.³

¹Onkologická klinika FN a LF UP Olomouc

²OKB FN Olomouc, ³LEM FN a LF UP Olomouc,

⁴Ústav patologické anatomie FN a LF UP Olomouc

Úvod: Léčba trastuzumabem (Herceptin®) je v současné době v České republice schválena pro 1. a 2. linii léčby metastatického karcinomu prsu, který má zvýšenou expresi HER2/neu (HER2) a amplifikaci genu pro tento transmembránový protein. Dále v současné době na základě proběhlých studií je zřejmá výhoda podání trastuzumabu i v adjuvantní léčbě karcinomu prsu s overexpresí a/nebo amplifikací HER, rovněž zde nádor musí mít stejnou charakteristiku jako v případě metastatického onemocnění.

Metody: Na příkladě kazuistiky 29leté pacientky léčené pro karcinom in situ nejdříve pravého

prsu, následně s lokální recidivou, druhým ca in situ v levém prsu a současně solitárním metastatickým karcinomem v horním laloku levé plicce, chceme poukázat na některé problémy, které mohou nastat při rozhodování o terapii. Overexpresie HER2 byla stanovena imunohistochemicky sadou DAKO na Ústavu patologie LFUP a amplifikace genu byla stanovena v LEM.

Kazuistika: U 29leté ženy pro rezistenci na hranicích HQQ pravého prsu, dle UZ susp. fibroadenom, provedena v květnu 1999 extirpace rezistence 15x18 mm. Histologicky duktální karcinom in situ (DCIS), nedá se vyloučit mikroinvaze. Nádor byl ER-, PR-, HER2 3+. Doporučena reexcise s revizí axily, ta provedena po 2 týdnech od první operace. Oblast lůžka tumoru opět s nálezem DCIS. Z axily vyšetřeno 12 uzlin všechny bez známek nádoru. V rámci adjuvantní léčby provedeno ozáření pravého prsu do 50 Gy zevní RT + 12 Gy Ir punkturom. Současně zahájila adjuvantní chemoterapii CMF – celkem absolvovala 6 cyklů. Za 40 měsíců od diagnózy přešetřována pro susp. nález v horním laloku levé plicce. V rámci přešetření provedena mammografie, kde susp. recidiva v pravém prsu a duplicitní ložisko v levém prsu, bez známek jiné diseminace. V jedné době provedena horní lobektomie vlevo (metastatický adenokarcinom ER-, PR-, HER2-, metastáza i v hilové uzlině), ablace pravého prsu (vývodový karcinom ER-, PR-, HER2+ hlavně v intraduktální složce), extirpace ložiska z levého prsu (ca in situ ER-, PR-, HER2+). 3 týdny po operaci zahájena léčba trastuzumabem + vinorelbinem v týdenním podání, po 5 měsících úspěšné léčby pokračováno v monoterapii trastuzumabem. Dva měsíce od ukončení vinorelbinu progresse, proto opětovně kombinace trastuzumab + vinorelbin, bez efektu. Změna na 2. linii – epirubicin s cyklofosfamidem – po dvou měsících progresse. 3. linie gemcitabin+cisplatina s dobrým efektem, po 5 měsících léč-

by je zřejmá excelentní odpověď plicních metastáz, bohužel, dle CT perikardiální výpotek – opakované punkce. Vzhledem k tomu, že nedochází k progresi, pacientka si přeje ablaci levého prsu. Měsíc po provedené ablaci PET/CT prokazuje progresi metastáz v plicním parenchymu, kostní metastázy v Th1 a mandibule. Zahájena paliativní chemoterapie 4. linie 3M s přechodnou stabilizací – celkem 5 měsíců. V důsledku rychlé progresse pacientka umírá – 65 měsíců od stanovení diagnózy a 26 měsíců po detekci relapsu onemocnění.

Diskuze: Léčba trastuzumabem u pacientky nebyla ve vztahu k plicnímu postižení příliš úspěšná, což nejspíše souvisí s negativním výsledkem vyšetření exprese HER2. Uvedená kazuistika potvrzuje význam aktuálního vzorku tkáně pro vyšetření statusu HER2, zároveň upozorňuje na zálužnost výrazné exprese v intraduktální složce nádoru. Pokud by nebylo provedeno odstranění plicní metastázy, byla by léčba trastuzumabem logickou volbou. Nicméně vidíme, že HER2 pozitivita primárního nádoru není zárukou pozitivitu metastáz. Při vícečetném metastatickém postižení se navíc můžeme setkat s odlišnými subpopulacemi nádoru v různých lokalitách. Tato skutečnost může v klinické praxi komplikovat hodnocení účinku cílené terapie trastuzumabem.

Development of dendritic cell-based vaccines against HPV – associated malignancies

Mendoza L.

Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika, LF UP a FN v Olomouci

In several types of human tumours a close association with oncogenic viruses has been established. Animal models mimicking these tumours with regard to their aetiology and expression of virus-related mo-

lecules have been developed. The rationale for development of the animal models was to create experimental systems allowing us to compare the efficacy of different therapeutic protocols, with the final aim to optimize these therapeutic procedures prior to clinical trials. Cervical carcinomas (CC) represent one of the aforementioned human oncogenic virus-associated tumour types. High-risk human papilloma viruses (HPV), particularly HPV 16, 18, 31, 33, 45, and 56, are associated with nearly one hundred percent of CC. TC-1 (MHC class I⁺) and MK16 (MHC class I⁻), established and transplantable cell lines in syngeneic C57BL/6 mice which mimicking human HPV 16-associated neoplasms were utilized to investigate the efficacy of DC-based vaccines against HPV-associated tumours in preclinical studies. We have found that the sc administration of bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) vaccines at the site of subsequent MK16 challenge or in 5-day sc tumours inhibited growth of the TC-1 and MK16 tumour transplants and its lung metastasis. In a clinically more relevant setting, mice with surgical minimal residual tumour TC-1 disease were treated with pulsed BMDC. The administration of those DC preparations at the site of surgery significantly inhibited the growth of recurrent tumours. A significant reduction of the tumour growth was observed in groups treated with terminally differentiated BMDC pulsed with the antigen in the form of TC-1 lysate, as well as co-cultured with irradiated TC-1 cells, as compared to the operated control groups. In summary, we have investigated the capacity of cellular vaccines based on dendritic cells loaded with human HPV 16 oncoprotein- antigens induce immune responses to elicit protective immunity in a murine experimental model mimicking human HPV16-associated carcinomas. These results can be used as a basis for translatable research in clinical trials investigating DC-based vaccines against CC.

2. MOLEKULÁRNÍ PODSTATA ÚČINKU A TOXICITY PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV

Předsedající: HOFFMANOVÁ J., ŠMARDOVÁ J., DŽUBÁK P.

Čtvrtek / 7. 12. 2006 – 15.30–16.40

Mechanismy působení omega-3 vysoce nenasycených mastných kyselin a jejich využití v nutriční farmakologii

Hofmanová J., Kozubík A.

Biofyzikální ústav AV ČR, Brno

Z řady experimentálních i epidemiologických studií vyplývá, že **lipidové složky výživy** mohou hrát důležitou úlohu v etiologii některých typů nádorů, zejména tlustého střeva, prostaty či prsu. Kromě zvýšeného energetického příjmu se zde uplatňuje i poměr ω -3 a ω -6 **esenciálních vysoce nenasycených mastných kyselin (VNMK)**. Uvádí se, že zatímco živočišný tuk a rostlinné oleje bohaté na kyselinu linolovou (ω -6) mohou podporovat rozvoj některých nádorů, příjem zvýšeného množství ω -3 VNMK, zejména kyseliny eikosapentaenové a dokosaheptaenové obsažených v **rybím oleji (RO)**, může inhibovat nádorový růst, snižovat tvorbu metastáz i nádorovou kachexii. Lipidy v dietě ovlivňují spektrum lipidů v plasmě i v buněčných membránách, přičemž metabolismus a obrát fosfolipidů v membránách nádorových buněk se zásadně liší od buněk nenádorových. Tyto změny se odrážejí v **biofyzikálních vlastnostech buněčných membrán** a tím ve schopnosti **příjmu a přenosu signálů důležitých regulačních molekul, v modulaci oxidativního metabolismu i produkci eikosanoidů**, což je dále spojeno s produkcí a funkcí cytokinů. VNMK tak hraje důležitou úlohu v přenosu signálů z mimobuněčného prostoru a fungují jako intra- i intercelulární mediátory a modulátory buněčné signalizační sítě. Působení VNMK na různých úrovních buněčné organizace a jejich interakce s dalšími endogenními nebo exogenními faktory může ve svém důsledku významně **ovlivňovat genovou expresi a tak buněčnou proliferaci, diferenciaci a apoptózu** ve tkáních. Změny membrán a růstových vlastností nádorových buněk po působení VNMK mohou modulovat rovněž jejich **citlivost k různým terapeutickým zásahům**. Na základě poznatků z experimentální oblasti **in vitro** a **in vivo** prokazujících účinek ω -3 VNMK na tkáňové, buněčné a subbuněčné úrovni je nutné uvažovat o lipidech jako o látkách, kterými lze ovlivnit řadu patofyziologických procesů a modifikovat účinky léků. Byly prokázány antiproliferační a apoptické účinky ω -3 VNMK na řadu nádorových buněčných linií **in vitro** i protinádorové účinky RO v experimentálních systémech **in vivo** a některých klinických studiích. **Naše výsledky in vitro** prokázaly

že VNMK a lipidové emulze různého složení mohou významně modulovat chování buněk střevního epitelu ve smyslu změn buněčných lipidů, oxidativního metabolismu a cytokinetiky, že VNMK mohou interagovat s endogenními regulátory a že změny závisí na stupni transformace buněk.

Současné poznatky ukazují velké výhody **lipidových přípravků obsahujících RO**. Bylo prokázáno, že **ω -3 VNMK mají imunomodulační, protizánětlivé a terapeutické pozitivní účinky** v experimentálních modelech i u lidí s různými onemocněními. Produkce zánětlivých mediátorů a funkce imunitního systému může sehrát závažnou roli při dalším vývoji onemocnění zejména s ohledem na reziduální chorobu a metastatický proces. Odlišný lipidový metabolismus normálních a nádorových buněk vede k úvahám o selektivním působení VNMK. Dodání RO by tedy mohlo zlepšit standardní klinickou terapii. Porozumění molekulárním mechanismům, které jsou modulovány VNMK, může přispět ke zlepšení dietetických strategií s cílem prevence autoimunitních, kardiovaskulárních onemocnění i vzniku určitých typů nádorů a podpořit terapeutické postupy. **Nutriční terapie** využívající RO může zvýšit šanci na přežití a hojení. Je jasné, že budoucí úsilí v klinické výživě bude směřovat k vytvoření takových typů přípravků, které by mohly být cíleně využity v **terapii specifických diagnóz (disease specific nutrition)**. Je tedy žádoucí spojit poznatky všech dosavadních studií a uvést je do kontextu s požadavky klinických pracovišť.

Práce byla podpořena granty IGA AV ČR 1QS500040507 a GAČR 524/04/0895.

Účinek bortezomibu na buněčné linie karcinomu prsu

Buršíková E.¹, Veselá R.^{2,4}, Kleiblová P.^{2,3},

Prchalová M.¹, Špička I.⁴, Kleibl Z.²

¹Ústav molekulární genetiky AV ČR;

²Ústav biochemie a experimentální onkologie

1. LF UK; ³Gynekologicko-porodnická klinika

1. LF UK a VFN; ⁴I. Interní klinika 1. LF UK a VFN

Úvod: Bortezomib je novým chemoterapeutikem určeným pro léčbu maligního myelomu, které selektivně inhibuje proteasom specifickou reverzibilní interakcí. V preklinických studiích se prokázal vliv bortezomibu **in vitro** na buněčné nádorové linie řady nádorů (non-Hodgkinské lymfomy, nádory ovaria, pankreatu či chronickou lymfatickou leukémií). Po aplikaci bortezomibu dochází u nenádorových buněk k zástavě buněčného cyklu, u nádorových

buněk často dochází k aktivaci apoptózy. Předpokládá se, že klíčovým faktorem inhibice proteasomu je ovlivnění signalizace transkripčního faktoru NF- κ B. V poslední době se studuje použití bortezomibu také pro léčbu solidních nádorů.

Cíle: Cílem práce byla evaluace účinku bortezomibu u vybraných linií karcinomu prsu, zhodnocení jeho vlivu na alterace buněčného cyklu či aktivaci apoptózy a charakterizace změn genové exprese indukovaných bortezomibem.

Metody: Pro práci byly použity čtyři buněčné linie karcinomu prsu: MCF-7, MDA-MB231, HCC1937 a EM-G3. Růstové charakteristiky linií ovlivněných bortezomibem byly stanoveny MTT testem chemosenzitivity. Předléčené buňky byly použity pro analýzu buněčného cyklu pomocí průtokové cytometrie (FACS Calibur) a izolaci celkové RNA (ArrayGrade Total RNA Isolation Kit). Izolovaná celková RNA sloužila jako templát pro syntézu cDNA pomocí SuperScript III (Invitrogene). Účinky bortezomibu na změny genové exprese byly stanoveny pomocí cRNA arrayů zaměřených na signální dráhu NF- κ B a apoptózu (SuperArray) a u vybraných genů validovány pomocí kvantitativního RT-PCR v reálném čase (qPCR; Roche).

Výsledky: Po aplikaci bortezomibu došlo u všech analyzovaných linií k indukci apoptózy, která byla nejmarkantnější v případě linií HCC1937 a MDA-MB231 (zvýšení až o 20%), a zástavě buněčného cyklu. Rozvoj apoptózy po aplikaci bortezomibu se u studovaných linií pohyboval od 4 do 6 dní v koncentracích 2–6 ng/ml. S výjimkou linie MDA-MB231 způsobovala koncentrace bortezomibu 1 ng/ml < 50% inhibici růstu buněk.

Vyšetření genové exprese pomocí NF- κ B arrayů prokázalo významné zvýšení exprese A20 (TNFAIP3), DR4 (TNFRSF10A) a TRADD doprovázené u linie EM-G3 zvýšením TNF α R (TNFRSF1A). Kromě těchto změn ukázaly NF- κ B arraye individuální rozdíly v reakci studovaných buněčných linií na aplikaci bortezomibu: U ošetřených linií EM-G3, HCC1937 a MCF-7 došlo k výraznému snížení exprese genů FOS a EGR1. U linií HCC1937 a EM-G3 došlo k významnému zvýšení exprese genů pro IL-8, GJA1 (connexin 43) a Rel-B. U linií HCC1937 a MCF-7 byl u ošetřených buněk silněji exprimován IL-6. U vybraných genů s výraznou změnou v arrayi byla hodnocena jejich exprese pomocí qPCR. Po aplikaci bortezomibu se u linie EM-G3 prokázalo statisticky významné několikanásobné snížení exprese genů EGR 1 (11x) a FOS (13x) oproti kontrolním buňkám. U linie HCC1937 došlo po aplikaci vyšší koncentrace

k několikanásobnému zvýšení exprese genů GJA1 (200x), IL-6 (20x), IL-8 (23x) a NF-κB2 (8x). U linie MDA-MB231 po ošetření vyšší koncentrací došlo k výraznému statisticky významnému snížení exprese genu GJA1 (240x) a mírnému, ale signifikantnímu poklesu exprese NF-κB2 (2,5x; p = 0,001).

Z celkem 112 vyšetřovaných genů regulujících proces apoptózy se 43 exprimovalo ve všech studovaných liniích. Změny v transkripci jednotlivých genů byly různé u hodnocených linií. Nápadná změna v expresi se projevila např. u tumor supresorového genu p53. qPCR analýza exprese p53 ukázala, že u linie HCC1937 dochází k několikanásobnému zvýšení exprese (50x), naopak ke snížení exprese došlo u linií MDA-MB231 (200x) a MCF-7 (4x).

Závěr: Výsledky analýz ukazují, že všechny studované linie jsou senzitivní na účinky bortezomibu *in vitro*. Zajímavým zjištěním je významné zvýšení exprese A20, negativního regulátoru NF-κB, a genů zúčastněných v modulaci signálu zprostředkovaného zástupci rodiny TNFR (DR4, TNFαR). Tyto změny mohou vést k ovlivnění biologické aktivity NF-κB jiným mechanismem, než je popisovaná inhibice jeho aktivity na základě aktivity IκB. Mimo tento společný jmenovatel je pravděpodobné, že účinek bortezomibu u jednotlivých linií je modulován různými mechanismy. Nejasné je významné zvýšení exprese IL-8 a IL-6 (qPCR: 20–1000x) a jejich úloha v buňkách mamárního karcinomu.

Práce byla podpořena granty IGA MZČR 8456-4 a IGA MZČR 8145-3.

Molekulární podstata toxicity fluoropyrimidinů u onkologických pacientů

Fidlerová J.^{1,4}, Kleiblová P.^{1,2}, Bílek M.³, Novotný J.⁴, Kleibl Z.¹

¹Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK; ²Gynekologicko-porodnická klinika VFN a 1. LF UK; ³Ústav soudního lékařství 1. LF UK; ⁴Onkologická klinika VFN a 1. LF UK

5-fluorouracil (5-FU) a jeho prekurzory (kapecitabin, tegafur) patří mezi nejpoužívanější protinádorová chemoterapeutika. Jsou indikována v léčbě solidních nádorů, zejména kolorektálního karcinomu, karcinomu žaludku, jater, pankreatu, prsu, hlavy a krku. Jedním z limitujících omezení úspěšné léčby fluoropyrimidiny jsou projevy závažné toxicity doprovázející aplikaci těchto chemoterapeutik u nemalé skupiny onkologických pacientů (5–15%). Mezi klasické symptomy toxicity náleží mukositida, průjem a neutropenie. V současnosti se jako příčina těchto

komplikací označuje nedostatečná aktivita dihydro-pyrimidindehydrogenázy (DPD; EC 1.3.1.2), enzymu katalyzujícímu první a zároveň rychlost určující krok degradační kaskády 5-FU. Metabolismus 5-FU probíhá majoritně v játrech. Účinkem DPD vytvořený 5,6-dihydrofluorouracil je substrátem dihydropyrimidinázy (DPYS; EC 3.5.2.2) hydrolyzující pyrimidinový skelet na 5-fluoroureido-propionát, jež je v posledním kroku β-ureidopropionázou přeměněn na fluoro-β-alanin.

Cílem práce je charakterizace molekulárně biologických prediktorů cytotoxicity po podání 5-FU. Pacienti zahrnutí do studie byli vybráni ošetřujícím lékařem na základě výskytu závažné toxicity po podání fluoropyrimidinů (Grade III-IV, NCIC CTC). Genetický materiál neselektované nenádorové populace a pacientů s dobrou tolerancí léčby 5FU (Grade 0-I) pochází z DNA banky pracoviště. DNA a celková RNA byly získány z periferní krve užitím izolačních kitů. Komplementární cDNA byla připravena pomocí Superscript III (Invitrogen). Pro analýzu změn v kódující sekvenci genu **DPD** byla u pacientů s toxicitou cDNA amplifikována s primery ve třech vzájemně se překrývajících fragmentech. PCR amplikony byly následně sekvenovány s BigDye Terminator ver. 3.1 (Applied Biosystems). K mutační analýze genu **DPYS** byly amplifikované exonové oblasti analyzovány metodou DHPLC (WAVE3500, Transgenomic). U souboru 10 pacientů s toxicitou (Grade IV) a 10 kontrolních pacientů s dobrou tolerancí léčby (Grade 0-I) byla pomocí expresních mikroarray (Superarray) stanovena genová exprese 263 genů participujících na metabolizaci farmak a rozvoji lékové toxicity.

Výsledky mutační analýzy genu **DPD** shrnuje tabulka 1. V rámci sekvenace amplikonů mRNA DPD byly odhaleny následující sestřihové varianty: delece exonů 2–8 a současně 3–8 a to u 40,7% vyšetřovaných, s menším zastoupením pak delece exonů 10, 13, 18, 20, 15–20 a 17–20. Jelikož získané mutační spektrum v genu **DPD** neposkytuje přímou odpověď na původ toxické reakce, byla zahájena analýza genu **DPYS**. Současné výsledky získané metodou DHPLC ukazují na přítomnost silent mutací c.15 G > A (S5S), c.216 C > T (F72F) a intronových alterací IVS 1–58 T > C, IVS 1+20 A > G zatím nejasného významu. Zajímavou se jeví záměna c.-1 T>C. Na výsledcích expresních microarray nejsou patrné signifikantní rozdíly v expresním profilu lymfocytů posuzovaných skupin pacientů. Významnější overexpresi u kontrolní populace vykazovaly geny **BRCA1**, **CYP1A2**, **NR1I3**, **HMOX1** a **DPD**. Naopak geny **RXRA** a **CYP2D6** byly exprimovány ve vyšší míře u pacientů s toxickými projevy léčby.

Současné výsledky ukazují, že sekvenční alterace **DPD** jsou nepravděpodobnou příčinou vzniku 5-FU toxicity. Zajímavým zjištěním je častá přítomnost genomových změn **DPYS**, avšak pro jejich validaci je nezbytné provedení funkčních analýz. Data expresních arrayů ukazují, že na rozvoji toxicity se mohou podílet i další genové produkty.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 1A8708-4 a projektem Ligy proti rakovině Praha

Vliv cetuximabu® a trastuzumabu® na aktivitu c-erbB receptorů buněčných linií odvozených z karcinomů prostaty a prsu

Überall I., Lukáš V., Bláha O., Bouchal J., Hajdúch M., Kolář Z.

Laboratoř molekulární patologie, LF UP Olomouc

Úvod: Rodina receptorů c-erbB patří do skupiny transmembránových proteinů s tyrosin kinázovou aktivitou, které hrají jednu ze základních rolí v maligní transformaci buněk. Vazbou ligandu dochází k biochemickým a konformačním změnám receptorů, které vedou k aktivaci intracelulárních signálních drah. Změny na úrovni těchto signálních drah vedou ve svém důsledku ke změně migračního, proliferativního, adhezivního, diferenciativního a apoptotického potenciálu buněk.

Metodika: Byl hodnocen vliv dvou typů monoklonálních protilátek proti c-erbB1 (EGFR) (cetuximab®) a c-erbB-2 (trastuzumab®), popř. jejich kombinace na změnu exprese a funkce receptorů c-erbB. Byly použity dva typy buněčných linií odvozených od karcinomů prostaty (DU 145) a prsu (BT 474), které byly nejprve stimulovány EGF - přirozeným ligandem pro c-erbB-1. Následovala inhibice c-erbB receptorů pomocí monoklonálních protilátek a byly studovány změny exprese jednotlivých receptorů c-erbB a změny jejich fosforylace.

Výsledky: Mammární linie BT 474 vyznačující se vysokou expresí c-erbB2 odpovídala na aplikaci trastuzumabu® snížením proliferace a docházelo ke změnám exprese receptoru c-erbB2. Vliv obou protilátek na proliferativní aktivitu vykazoval mírný kumulativní účinek. U prostatické linie DU 145 vykazující vysokou expresí c-erbB1 docházelo ke snížení exprese c-erbB1 po aplikaci cetuximabu®. Rovněž byl sledován statut receptorů c-erbB3 a c-erbB4, avšak výsledky nebyly stabilní.

Závěry: Účinek obou monoklonálních protilátek byl závislý na stupni exprese receptorů c-erbB. Během další experimentální práce bude přistoupeno ke sledování dimerizačního statutu c-erbB re-

Tabulka 1. Analýza genu DPD u pacientů s toxicitou, dobrou tolerancí léčby a neselektované populace. N: počet analyzovaných vzorků.

Exon / intron	e2	e3	e6	e13	e13	e14	i14	e18
Záměna nukleotidu mRNA	c.85 T>C	c.187 A > G	c.496 A > G	c.1601 G > A	c.1627 A > G	c.1896 T > C	IVS 14+1G > A	c.2194 A > G
Záměna AA proteinu	C29R	K63E	M166V	S534N	I543V	-	e14 del	V732I
Pacienti s toxicitou; N=59; (%)	20 (33,9)	1 (1,7)	19 (32,2)	3 (5,1)	16 (27,1)	3 (5,1)	1 (1,7)	6 (10,2)
Pacienti bez toxicity; N=21; (%)	12 (57,1)	0	8 (38,1)	1 (4,8)	6 (28,6)	0	0	2 (9,5)
Kontroly ; Mutace/N (%)	62/154 (40,2)	0/218 (0)	39/161 (24,2)	0	0	17/138 (12,3)	1/138 (0,7)	9/136 (6,7)

ceptorů, a to zejména c-erbB1 a c-erbB2. Rovněž bude sledován stupeň fosforylace jednotlivých typů receptorů c-erbB a změny exprese dalších molekul zapojených do příslušných signálních drah.

Testování monoklonální protilátky rituximab u B-CLL buněk *in vitro*

**Čejková S. Trbušek M. Chumchalová J.,
Ročňová L. Mayer J.**

Centrum molekulární biologie a genové terapie,
Interní hematologická klinika FN Brno

B-buněčná chronická lymfocytární leukémie (B-CLL) je nejčastější leukémie v západním světě. K její léčbě se stále používají alkylační látky a nuk-

leosidová analoga. I zde se však prosazuje moderní trend v hematologii – použití monoklonálních protilátek (např. rituximab, anti-CD20). V literatuře je popsáno, že rituximab (rtx) má na B-CLL buňky jen omezené účinky, existuje však předpoklad, že by je mohl senzitivizovat pro cytostatika.

Po aplikaci samotného rituximabu na B-CLL buňky v různých koncentracích (10, 20, 30, 40 µg/ml) byla situace heterogenní. U některých vzorků rituximab zvyšoval a u jiných snižoval viabilitu buněk (detekovanou pomocí WST-1). Chování buněk bylo nezávislé na námi sledovaných parametrech: mutacích v genu p53 a delecích lokusu ATM.

Většina B-CLL buněk ovlivněných rituximabem byla signifikantně citlivější k fludarabinu než buňky

neovlivněné. Tato senzitivizace nebyla závislá na statusu p53 a ATM. Vůbec nejcitlivější ke kombinaci rituximab-fludarabin byly buňky s del ATM.

Pro kombinaci rituximabu s fludarabinem (adenosinové analogum) jsme zvolili 2 základní přístupy – aplikovali jsme obě látky současně, nebo jsme po 72 hod ošetření buněk rituximabem přidali fludarabin. Naše průběžné výsledky naznačují, že B-CLL buňky jsou obecně více citlivé k fludarabinu po předchozím ošetření rtx, než pokud se aplikují obě látky současně.

Samotný mechanismus účinku rtx na B-CLL buňky se snažíme objasnit pomocí moderních genomických a proteomických přístupů.

Podporováno grantem IGA MZ č. 8445-3/2005

3. CHEMOREZISTENCE NÁDORŮ

Předsedající: HAJDÚCH M., ECKSCHLAGER T., SVOBODA M.

Čtvrtek / 7. 12. 2006 – 17.00–18.00

Lithium, účinný stimulant chemo a radiorezistence.

Svoboda M.^{1,2}, Hajdúch M.³, Kleinová J.⁴, Šimíčková M.⁵, Blažková S.¹, Holánek M.¹, Radová L.⁶, Lipert J.³, Gombošová J.⁷, Folber F.⁸, Chobola M.², Andrašínová T.², Paseka T.⁹, Hanák L.¹⁰, a Vyzula R.^{1,2}

¹Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav v Brně (MOÚ); ²Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně (LF MU); ³Laboratoř experimentální medicíny FN a LF UP Olomouc; ⁴Hematologická ambulance, MOÚ; ⁵Oddělení laboratorní medicíny, MOÚ; ⁶Fakulta aplikované informatiky, Univerzita Tomáše Bati, Zlín; ⁷Oddělení radiační onkologie, MOÚ; ⁸Interní hematologická klinika FN Brno a LF MU; ⁹Chirurgická klinika FN U sv. Anny a LF MU; ¹⁰Laboratoř prediktivní onkologie, MOÚ.

Úvod: Lithium je v onkologii tradičně využíváno k profylaxi a k léčbě chemoterapií indukované neutropenie, neboť jeho podávání indukuje reverzibilní leukocytózu. Výzkum z posledních let dokazuje, že lithium inhibuje apoptózu a stimuluje proliferaci buněk, a to prostřednictvím přímého vlivu na GSK-3 β a Akt/PKB kinázu. Zřejmě sekundárně dochází při použití lithia i ke zvýšené expresi cyklinu D1 a Bcl-2 antiapoptotického proteinu. Obě kinázy i Bcl-2 protein hrají zároveň důležitou roli v procesu chemorezistence a radiorezistence nádorových buněk. Z tohoto pohledu vzniká riziko iatrogenního poškození onkologického pacienta při podávání lithia.

Soubor, metody: V naší práci jsme u 53 primárních tumorů provedli 151 MTT testů chemorezistence k vybraným cytostatikům (doxorubicin, paklitaxel, cisplatin, melfalan), a to za přítomnosti lithia nebo s cytostatikem samotným. Na souboru 106 pacientů jsme sledovali vliv lithia na hematopoézu a na vývoj nádorového onemocnění. Analyzovali jsme 349 párových vyšetření krevního obrazu a hodnotili jsme čas do progresu choroby.

Výsledky: Prokázali jsme enormní nárůst chemorezistence primárních nádorů testovaných in-vitro k doxorubicinu ($p < 0,0001$) a k paklitaxelu ($p < 0,00028$) za přítomnosti lithia. U vyselektované skupiny pacientů jsme prokázali, že vyšší počet aplikací lithia byl spjatý s časnou progresí nádorového onemocnění ($p = 0,0061$). Podávání lithia vedlo k vzestupu leukocytů a neutrofilů, výsledek však nebyl statisticky významný ve srovnání s kontrolní skupinou pacientů, u které docházelo ke spontánní restituci krvinek ($p = 0,21$ a $0,14$).

Závěr: Užívání lithia u onkologických pacientů není opodstatněné a je spjato s rizikem indukce rezistence tumoru na protinádorovou léčbu.

Poděkování: Práce byla podpořena granty: IGA MZ CR – NR/8335-3, vědeckého záměru MŠM6198959216 a MSM 6198959216, a z finančních prostředků získaných ze sbírky „Nadace Běhu T. Foxe“.

Změny neuroblastomových linií při experimentální chemorezistenci

Procházka P., Hraběta J., Poljaková J., Vícha A., Eckschlagler T.

Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol, Praha

Přes úspěchy pediatrické onkologie zůstává neuroblastom vysokého rizika (HR NBL) jedním z nejhůře léčitelných nádorů dětského věku. Proto je snaha o jeho ovlivnění novými léky. Protože chemorezistence je jednou z hlavních příčin selhání chemoterapie, studujeme rezistenci buněk HR NBL k některým látkám s protinádorovým účinkem. Změřili jsme se na studium rezistence buněk HR NBL k používaným cytostatikům doxorubicinu a vinkristinu a látkám, které vykazují protinádorové účinky – BS-RNáze a ellipticin.

Ellipticin má více mechanismů účinku: interkalaci DNA, inhibici topoizomerázy II a fosforylace p53, odpráhování oxidativní fosforylace v mitochondriích, regulaci exprese cyklinu B1 a Cdc2 a fosforylaci Cdc2. Mechanismus protinádorového účinku **RNáz** není plně objasněn. Předpokládá se inhibice proteosyntézy štěpením tRNA, uplatňuje se i štěpení rRNA, aktivace kaspáz a snížení exprese Bcl-2. Ani mechanismus cytotoxických a antiproliferativních účinků **doxorubicinu** nebyl dosud plně vysvětlen. Doxorubicin je cytostatikem ze skupiny antracyklinů, tvořící komplex s DNA interkalací mezi páry nukleotidových bází, důsledkem je narušení syntézy DNA, DNA-dependentní syntézy RNA a proteosyntézy. Interkalace spouští štěpení DNA pomocí topoizomerázy-II, což naruší terciární strukturu DNA. Doxorubicin se podílí na oxidačních a redukčních reakcích: řada NADPH-dependentních buněčných reductáz je schopna redukovat doxorubicin na volné radikály semichinonu, které reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku vysoce reaktivních sloučenin. Další místo působení doxorubicinu je na úrovni buněčné membrány: váže se na lipidy buněčné membrány a ovlivňuje tak řadu buněčných funkcí. Protinádorový a cytotoxický účinek **vinkristinu** je dán několika mechanismy. Vinkristin interaguje s mikrotubulárním

systémem, přičemž dochází ke zničení mikrotubulů a všech struktur obsahujících mikrotubuly, jako např. dělicí vřetenko. Chromozómy se tak nedostanou do jádra dceřiných buněk. Selektivně inhibuje v nádorových buňkách opravné mechanismy DNA a blokuje účinek DNA-dependentní RNA polymerázy, což inhibuje syntézu RNA.

Primární i získaná rezistence nádorových buněk k cytostatikům je podmíněna řadou mechanismů. Nejčastěji se jedná o zvýšenou schopnost odstranit cytostatika z buňky (P-glykoprotein – produkt genu MDR1, MRP, LRP), detoxifikovat je (glutathion-S-transferáza, metalothioneiny, monooxygenázy), zabránit vzniku apoptózy (zvýšená exprese Bcl-2) nebo zvýšit opravu poškozené DNA (alkylguanin-DNA alkyltransferáza, O6-metylguanin-DNA transferáza). Jindy jsou v nádorové buňce neaktivní enzymy aktivující cytostatika nebo jsou modifikované cíle cytostatik (topoizomeráza I a II, dihydrofolátreduktáza). Metodou komparativní genomové hybridizace (CGH) byly popsány nově vzniklé amplifikace a delecce u buněčných linií u kterých byla experimentálně navozená rezistence k cytostatikům.

Cílem naší práce bylo pomocí CGH vyšetřit čtyři HR NBL buněčné linie rezistentní na BS-RNázu, ellipticin, vinkristin nebo doxorubicin. Při CGH vyšetření jsme porovnali DNA parentální linie UKF-NB4 s DNA zdravého dobrovolníka a prokázali změny odpovídající HR NBL zahrnující amplifikaci N-myc (2p24), zmnóžení 17q a delecce 1p32.2-ter. Dále jsme porovnali DNA parentální linie s DNA rezistentních linií ke zjištění zmnóžení nebo ztráty DNA, které mohou vyvolat chemorezistenci. Pomocí CGH jsme prokázali ztrátu 2p24 u všech čtyřech rezistentních linií odpovídající snížení počtu kopií amplifikovaného N-myc.

Tento úbytek kopií N-myc genu jsme ověřili metodou FISH, kterou bylo možné stanovit přesný počet kopií v každé buňce. Počet nadbytečných kopií byl počítán jako počet kopií N-myc snížený o počet centromer druhého chromozomu. Buňky parentální linie UKF-NB4 mají průměrně 62 kopií. U linie rezistentní k ellipticinu byl počet kopií snížen na 38 kopií, u linie rezistentní k BS-RNáze na 44 kopií, stejně tak k vinkristinu na 44 a k doxorubicinu na 43 kopií. Rozdíly mezi počtem kopií v parentální linii a v jednotlivých rezistentních liniích byly statisticky významné (t-test, $p < 0,05$). Amplifikace N-myc u HR NBL koreluje s agresivním růstem a velmi nepříznivou prognózou. V průběhu léčby se nepopisují významné změny počtu kopií. U rezistentních linií, připravených kultivací v mediu s přidávkou protinádorové látky, se počet kopií snížil. Metodou RT-PCR v reálném čase

jsme zjišťovali expresi mRNA N-myc. Parentální linie má ve srovnání se vzorkem leukocytů periferní krve zdravého dobrovolníka expresi o více než 3 řády vyšší. Všechny čtyři rezistentní linie ve srovnání s parentální linií exprimovaly N-myc přibližně o jeden řád méně.

Ve všech vyšetřovaných liniích byla průtokovým cytometrem měřena intenzita exprese P-glykoproteinu jako průměrná intenzita fluorescence (MEF). Linie rezistentní k vinkristinu a doxorubicinu mají významně zvýšenou expresi P-glykoproteinu. Tento nález je v souladu s amplifikací v oblasti 7q21, kde se nachází gen MDR1. Kromě změn ve stupni amplifikace a exprese N-myc, obě rezistentní linie vykazují ztrátu v oblasti 17q, která může způsobit chemorezistenci delecí genu topoizomerázy II α . Společnou změnou je ztráta oblasti 19q, kde je gen cytochromu P450 (19q13.2).

Závěrem lze shrnout, že chemorezistence k jednotlivým protinádorovým látkám je komplexní děj, který je podmíněn více mechanismy.

Práce vznikla za finanční podpory GA ČR grant č. 523/04/0755 a MŠMT VZ č. 0021620813.

Obsah metalothioneinu v buňkách neuroblastomu ve vztahu k rezistenci vůči platinovým cytostatikům

Hraběta J¹, Figová K¹, Eckschlager T¹, Průša R², Bašík O³, Křížková S³, Adam V³, Cinatl J⁴, Michaelis M⁴, Kizek R³

¹Klinika dětské hematologie a onkologie a ²Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2LF a FN Motol; ³Ústav chemie a biochemie MZLU v Brně; ⁴Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany

Úvod: Metalothioneiny(MT) jsou intracelulární, nízkomolekulární proteiny bohaté na cystein. Na základě sekvenční analýzy bylo popsáno 15 MT rodin a 38 MT podrodin. MT mají klíčovou roli při udržování homeostázy iontů kovů v organizmech. Za jejich hlavní biologickou funkci je považována detoxikace těžkých kovů. MT vyvazují ionty kovů a charakteristickým způsobem je inaktivují nebo transportují do metabolicky neaktivních kompartmentů buňky. Často diskutovanou otázkou je schopnost MT transportovat atomy kovů k apoenzymům a jejich aktivní zapojení do homeostázy esenciálních prvků. Schopnost MT transportovat kov do regulačních proteinů má význam v procesu karcinogeneze a pravděpodobně souvisí s inhibicí některých proapoptotických proteinů (p53, caspasa-3). MT se podílejí na regulaci angiogeneze (MT 1) a ovlivňují aktivitu, tzv. zinc-finger transcription factors, které jsou významné v angiogenezi, proliferaci a diferenciaci buněk.

MT snižují cytotoxicitu cisplatinu a karboplatinu neutralizací Pt iontu a experimentální studie prokazují, že zvýšená exprese metalothioneinu se u ně-

kterých nádorů (ependyom, ca jícnu a ORL oblasti) může podílet na rezistenci k těmto cytostatikům, ale bylo prokázáno, že snižují účinnost i některých dalších cytostatik (etoposid, 5-fluorouracil). MT jsou také důležité látky z hlediska ochrany proti radičnímu a oxidačnímu stresu.

Cíle: Na experimentálním modelu ověřit metodu elektrochemického vyšetření buněčného MT. Určit hladiny MT v neuroblastomové buněčné linii a od ní odvozené linie rezistentní k cisplatině a jejich změny po inkubaci s cisplatinou a karboplatinou.

Metody: Buněčná linie UKF-NB4 (připravena z recidivy neuroblastomu do kostní dřeně, s amplifikací MYCN, del1p34.2-ter, del13 iso 17q) a od ní odvozená linie UKF-NB4^(odp) s *in vitro* navozenou rezistencí k cisplatině. Průkaz delecí a amplifikací v buněčných liniích byl proveden metodou CGH. Buněčné linie jsme kultivovali s různou koncentrací cisplatinu a karboplatinu.

Stanovení MT: Buňky byly zmrazeny kapalným dusíkem a homogenizovány za přidání 1 ml fosfátového pufru (pH 6.8). Takto připravený vzorek byl inkubován při 99 °C. Takto připravené vzorky byly zředěny a analyzovány námi upraveným postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulzní voltmetrií (DPV), na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm²; referenční elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol.dm⁻³ Co(NH₃)₆Cl₃ a 1 mol.dm⁻³ a amonný pufr; NH₃(aq) + NH₄Cl, pH = 9,6) byl po každých pěti analýzách vyměněn. AdTS DPV parametry byly následující: počáteční potenciál -0,6 V, konečný potenciál -1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, E_{ads} = 0 V, teplota 5 °C. Jako standard byl použit MT z králíčích jater (Sigma Aldrich).

Výsledky a závěry: Ověřili jsme použitelnost elektrochemické metody pro stanovení MT v buněčných liniích. Buňky neuroblastomové linie s experimentálně navozenou rezistencí k cisplatině mají zmožnění 16q13-22, kde se nacházejí geny pro MT a neexprimují P-glykoprotein ani neamplifikují gen MDR-1 (BEDRNÍČEK et al, 2005). Tato linie je rezistentní k cisplatině i karboplatině. Inkubace po dobu pěti pasáží bez cisplatinu nesnižuje rezistenci k cisplatině ani ke karboplatině.

Buňky neuroblastomové linie rezistentní k cisplatině mají schopnost odpovídat na expozici cisplatině a karboplatině zvýšením hladin MT. Tato schopnost je u linie na cisplatině senzitivní vyjádřena podstatně méně.

Práce vznikla za podpory MŠMT VZ č. 0021620813

New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity

Džubák P.¹, Hajdúch M.¹, Gažák R.³, Svobodová A.², Psotová J.², Walterová D.², Sedmera P.³, Kren V.³

¹Laboratory of Experimental Medicine, Department of Paediatrics, Faculty of Medicine, Palacký University and University Hospital in Olomouc, Czech Republic;

²Institute of Medical Chemistry and Biochemistry, Faculty of Medicine, Palacký University, Olomouc, Czech Republic;

³Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic

Large series of O-alkyl derivatives (methyl, benzyl) of silybin and 2,3-dehydrosilybin was prepared. Selective alkylation of the silybin molecule was systematically investigated. For the first time we present here, e.g. preparation of 19-nor-2,3-dehydrosilybin. All silybin derivatives were tested for cytotoxicity on panel of drugs sensitive against multidrug resistant cell lines and the ability to inhibit P-glycoprotein mediated efflux activity. We have identified four major groups of compounds. The first group contains the majority of 2,3-dehydrosilybin derivatives and is characterized both by significant *in vitro* anti-cancer activity and the capacity to block Pgp function. The second class of derivatives – both silybin and 2,3-dehydrosilybin derivatives exhibited high cytotoxicity but no Pgp inhibition. Low or absent cytotoxicity but effective inhibition of Pgp was characteristic for the third group of compounds represented by potential chemosensitizers (3,7,20-tri-O-methyl-2,3-dehydrosilybin). Finally, no significant cytotoxic and Pgp inhibitory activities were found for silybin itself compared to its more active derivatives. The presence of double bond in the position C-2 and C-3 of B ring (2,3-dehydrosilybin and its derivatives) and the substitution of C-3 hydroxyl are important for the Pgp-inhibitory activity. Another important requisite for this activity is the benzylation of C-7 hydroxyl.

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (No.11 303/02/1097) and the Czech Ministry of Education (Research concepts No. MSM12 6198959216 and AV0Z50200510).

Rezistence na trastuzumab: příčiny a jejich řešení.

Grell P.^{1,2}, Svoboda M.^{1,2}, Šimíčková M.³, Fabián P.⁴, Palácová M.¹, Petráková, K.¹, Macková D.¹, Nenutil R.⁴, Hajdúch M.⁵, Vyzula R.^{1,2}

¹Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav v Brně (MOÚ); ²Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně (LF MU); ³Oddělení laboratorní medicíny, MOÚ; ⁴Oddělení patologie, MOÚ; ⁵Laboratoř experimentální medicíny FN a LF UP Olomouc

Trastuzumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti extracelulární doméně receptoru Her-2/neu (ErbB2, dále jen Her-2), jehož nadměrná exprese (Her-2+) je detekována přibližně u 15–25 % karcinomů prsu, které se vyznačují agresivním biologickým chováním. Trastuzumab je v současnosti zároveň i jedinou látkou použitelnou k cílené terapii těchto karcinomů, kde v kombinaci s chemoterapií výrazně zvyšuje léčebnou odpověď a prodlužuje čas do progresu onemocnění i celkové přežití pacientek. U většiny pacientek, jejichž onemocnění iniciálně odpovídalo na terapii trastuzumabem, však dochází během jednoho roku k progresi choroby. Pomineme-li situaci, kdy tato progresie nastává v centrálním nervovém systému, tedy v kompartmentu nedostupném pro trastuzumab, je nutné hledat příčiny selhání léčby v mechanismech, které interferují s působením trastuzumabu, nebo obecně působí cytoprotektivním účinkem.

I. ovlivnění vazby trastuzumabu k Her-2 receptoru. K negativnímu ovlivnění vazby trastuzumabu k Her-2 receptoru může docházet : a) mutací genu, která se projeví změnou struktury receptoru, b) maskováním vazebných epitopů receptoru membránovým glykoproteinem mucinem-4 (MUC4), c) štěpením extracelulární domény receptoru prostřednictvím metalloproteináz skupiny ADAM.

- II. změna vazebných interakcí uvnitř receptorové sítě. Po navázání ligandu dochází k homodimerizaci nebo heterodimerizaci mezi receptory ErbB rodiny (EGFR, Her-2, Her-3 a Her-4), což vede k jejich aktivaci. Změna exprese jednotlivých receptorů nebo jejich preferenčních vazeb může vést k dimerizaci, kterou podávání trastuzumabu neovlivní (EGFR/EGFR, EGFR/Her-3).
- III. zvýšená tvorba ligandů receptorů ErbB rodiny. Autokrinní a zejména parakrinní sekrece heregulinu a EGF byla v preklinických studiích jednou z příčin inhibice účinnosti trastuzumabu.
- IV. alternativní aktivace PI3K/Akt a Ras/MAPK signální dráhy. Stimulace řady dalších receptorů vede k aktivaci signálních drah klíčových pro přežívání buňky. Zejména aktivace PI3K/Akt a Ras/MAPK signální dráhy prostřednictvím receptorů adheze (např. integriny) nebo receptorů jiných růstových faktorů (např. IGF-1) vedou k inhibici apoptózy, zvýšení buněčného metabolismu a proliferace. Stálá aktivace PI3K/Akt signální dráhy může být rovněž způsobena ztrátou funkce fosfatázy PTEN, která vzniká nejčastěji na podkladě mutace stejnojmenného genu.

Mechanismy, které přispívají ke vzniku rezistence karcinomu prsu na cílenou terapii trastuzu-

mabem, předurčují i způsoby možného řešení této situace. Do jednotlivých fází klinického zkoušení se již dostaly nové monoklonální protilátky, které jsou schopné blokovat vazbu Her-2 receptoru k několika dimerizačním partnerům (např. pertuzumab), bispecifické protilátky (např. MDX-H210, 2B1), nízkomolekulární inhibitory kinázové aktivity jednotlivých erbB receptorů, nebo jejich skupin (např. lapatinib, CI-1033). K podobné situaci dochází i v případě receptoru pro IGF-1 (monoklonální protilátka CP-751817, inhibitor kinázové aktivity NVP-AEW541). Ve fázi klinického zkoušení jsou rovněž inhibitory kináz: Akt (Perifosine, QLT394, VD0002), MAPK (SCIO-469, PD325901) a mTOR (Temsirolimus, Everolimus, Rapamycin). Z pohledu na výše uvedené je zřejmé, že zásadní úlohu v inidikaci a aplikaci jakékoliv cílené terapie představuje průkaz cílové struktury v nádorových buňkách aktuálního vzorku a případná monitorace prediktivních markerů (např. sérová hladina Her-2, IGF-1/IGF-1R). Cílem přednášky je přehledně shrnout mechanismy vedoucí k rezistenci na trastuzumab, představit možná řešení a zejména první výsledky z projektů řešených v MOU, které se danou problematikou zabývají.

Práce byla podpořena grantovým projektem IGA MZČR NR/8335-3 a MSM 619895216.

4. CHYBY A OMYLY V DIAGNOSTICE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Předsedající: MIHÁL V., PETRÁKOVÁ K., CWIERTKA K.

Pátek / 8. 12. 2006 – 8.30–10.20

Relaps akutní lymfoblastické leukémie z minoritního klonu Mihál V.¹, Jarošová M.², Holzerová M.², Pospíšilová D.¹, Novák Z.¹, Hajdúch M.³

¹Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci

²Hemato-onkologická klinika LF UP a FN v Olomouci

³Laboratoř experimentální medicíny Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci

Autoři prezentují kazuistiku šestileté dívky s akutní lymfatickou leukémií (ALL), která byla v čase diagnózy klasifikována jako common-ALL se standardním rizikem, dobrou odpovědí na prednison (GPR), s velmi dobrou clearance blastů v kostní dřeni (den 15: 2,4% blastů). Cytogenetické vyšetření kostní dřene v době diagnózy prokázalo abnormální klon: 53-55,XX,+X,+4,+8,+9,+17,+18,+21,+22,+1-4M [20].

Klasická cytogenetika byla doplněna metodou mnohobarevné fluorescenční in situ hybridizace (M-FISH) a byly určeny 2 abnormální klony s karyotypem:

1. klon: 55,XX,+X,+4,+8,+9,+14,+17,+18,+21,+21

2. klon: 55,XX,+X,+4,+8,+der(9)t(6;9)(?;q?34),+14,+17,+18,+21,+21

Použitím centromerické a lokusově specifické sondy pro detekci změn, zahrnujících oblast 9p21, bylo upřesněno zastoupení prvního – majoritního klonu a minoritního zastoupení 2. klonu. Pacientka byla léčena protokolem ALL IC-BFM 2002 bez vážnějších komplikací.

36 měsíců od diagnózy pozorujeme v periferním krevním obraze ojedinělé blasty. Vyšetřením kostní dřene byl potvrzen pozdní dřeňový relaps. Cytogenetické vyšetření (hodnoceno 16 mitóz) odhalilo 2 klony:

1. klon: 54,XX,+X,+4,+8,+der(9),+14,+17,+18,+21,+21 [8],

2. klon: 55,XX,+X,+4,+8,+der(9),+14,+17,+18,+21,+21 [8]

Použitím lokusově specifické sondy byly detekovány 3 abnormální klony, z nichž 78% tvořil klon č. 1, který nebyl v době diagnózy prokázán.

Pacientka byla léčena protokolem ALL-REZ BFM 2002 skupina S2. Odpověď na cytostatickou léčbu byla opět velmi dobrá. Clearance blastů v kostní dřeni 15. den byla 0,8%. Hodnocení minimální residuální nemoci po F1 bloku byla: Vd2 1,01x10⁻² a Vb1 1,8x10⁻² (citlivost 10⁻⁴), ale po bloku F2 stoupla Vd2 6,34x10⁻² a Vb1 8,7x10⁻² (vyšetřeno doc. MU-

Dr. J. Trkou, Ph.D. v Laboratoři molekulární genetiky KDHO Praha). Pacientku připravujeme na alogenní nepřibuzenskou transplantaci kostní dřene.

Cílem práce je ukázat významnou roli cytogenetických a molekulárně cytogenetických metod pro přesnou diagnostiku dětských ALL.

Práce na tomto projektu je podpořena grantem MSM6198959216.

Biochemický marker S 100 při sledování pacientů s maligním melanomem

Beneš P.¹, Kapustová M.², Čwierka K.¹,
Schneiderka P.²

¹Onkologická klinika a ²OKB FN Olomouc

Nízkomolekulární protein dimerického charakteru S 100 je exprimován v lidském těle především astroglialními buňkami, ale také melanomy. Výhodný biologický poločas 30–90 minut je využíván při sledování poškození mozku. Patří do skupiny proteinů vázících vápník. V současné době je známo již 21 příslušníků rodiny S 100.

Marker S 100 je využíván při sledování průběhu onemocnění maligním melanomem. Bylo zjištěno, že exprese tohoto markeru je přímo úměrná stupni malignity. Obecně tedy platí, že pokles hodnoty S 100B v séru ukazuje na remisi onemocnění a vzestup naopak progresi. Je popsáno, že stanovení S 100 je využitelné v některých případech také k diferenciální diagnostice vyšetřovaných metastáz. Vzhledem k poměrně krátké době od určení diagnózy k výskytu metastáz může být stanovení S 100 významným vodítkem léčby. Pro screening a diagnostiku se neuzivá. Senzitivita při metastatickém onemocnění je vysoká – až 80%. Hodnoty před primární terapií mají vysokou prognostickou hodnotu. Positivní hodnoty lze nalézt i u mozkových maligních nádorů ektodermálního původu. Vyšetření se stanovuje sendvičovou metodou fy ROCHE na analyzátoru ELECSYS. Soubor sledovaných pacientů je kolem 500 a stanoveno 1800 vyšetření.

Závěr: Sérový diagnostický marker S 100 může být použit při sledování a rozhodování o léčbě pacientů s maligním melanomem (stanovení proteinu S100 není vhodné pro diagnostiku).

Monitorování úspěšnosti léčby: Detekuje opětovný výskyt onemocnění ve stádiích II–IV. Zvýšení hladin může upozornit na recidivu onemocnění dříve, než zobrazovací metody. Snížení hladin odráží příznivý dopad léčby.

Včasná diagnostika metastáz: Na metastázy nás může marker S100 upozornit dříve, než se začnou klinicky manifestovat.

U pacientů s maligním melanomem, zvláště pak ve stadiu II, III a IV indikuje sérová hladina S 100 progresi onemocnění. Stanovení proteinu S 100 není vhodné pro primární diagnostiku maligního melanomu.

Rizika a konkrétní omyly v diagnostice rakoviny prsu

Macháček J.¹, Čwierka K.¹, Houserková D.²

¹Onkologická klinika a ²Radiologická klinika FN a LF UP Olomouc

V posledních letech jsme svědky významného pozitivního obratu v poměru počátečních a pokročilých stádií karcinomu prsu a to z původních 40:60 až na 75:25%. V křivkách nemocnosti a mortality je to dlouho očekávaný, žádoucí příznivý efekt.

Velký podíl na této skutečnosti mají nové diagnostické metody, umožňující detekci raných stádií, organizovaný screening a zvyšování úrovně onkologických znalostí a ostražitosti jak lékařů, tak ženské populace. Přes tyto pozitivní skutečnosti, slibné výsledky současné a zejména pak výhledové, setkáváme se stále s rizikovými situacemi, hrozícími diagnostickými omyly, se zpožděním správné diagnózy, následně adekvátní léčby a tím nezřídkou i s osudnými následky. Z možných rizik jsou to často velmi malicherné příčiny, jako je záměna pacientek a lateralizace, záměna, ztráta či chybné založení bioptických vzorků, rozhodujících nálezů, jindy již i věci odborného rázu, jakými mohou být omyly či nedostatky ve vyhodnocení výsledků biopsie, UZ, RTG snímků apod. Ze strany pacientky to nejčastěji bývá nedostatečná informovanost, nevědomost, nebdalost a nekázeň.

Bohužel velmi často je zdrojem rizik a omylů faktor obtížně ovlivnitelný – samotný nádor. Tis, pT1, T1 – tedy ta nejčasnější stádia- mohou být svojí vnitřní povahou velmi agresivní, se sklonem k lokální invazi a k diseminaci. Z praxe a statistik je dobře známo, že i I. stadium je v 15–20% ve skutečnosti v důsledku mikro-diseminace již systémovou chorobou s hrozící generalizací. Zde by mohl pomoci nový přístup – ultrastaging, upřesňující skutečný rozsah choroby i se zaměřením na minimální reziduální chorobu – mikrometastázy. Už dnes se někde provádí detekce epiteliálních znaků nádorových buněk přes RNA, mamoglobinu, kontrolních genů a příslušných

enzymů jako je glycerolaldehyd dehydrofosfor dehydrogenáza, zkoumá se reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce. Předběžné výsledky ukazují na 100% shodu s tradiční histopatologií. Na druhé straně se nachází až 2x větší počet diseminací, zejména v lymfaticích a kostní dřeni, než s dosavadními běžnými standardními metodami. Výsledek je neradostně překvapivý – víc jak 40% I.–II. stádií je již ve stadiu diseminace, tj. IV. stadiu.

Jako názornou ukázkou možných pochybení dovolíme si prezentovat některé vybrané konkrétní příklady.

Rizika a chyby spočívají jistě v menší míře i na samotných pacientkách, ale hlavně na medicíně – v zobrazovacích metodách, odčítání bioptické verifikace, v organizaci odběrů a vyšetření a taky v záludnosti tkání nádorů samotných. Ke snížení rizik a pochybení v časné diagnostice vede už dnes maximální pečlivost, důslednost, onkologická ostražitost a to všech účastníků, pacientek i zdravotníků. Samozřejmým předpokladem je racionální aplikace všech moderních metod a jejich adekvátní kombinování.

Zvyšování počtu diagnostikovaných nádorů ve stavu *ca in situ* přináší s sebou snížení pravděpodobnosti úrovně a růstu potencionálu invazy a metastázování. Výhledově lze počítat s možností snižování rizika omylů zapojením CT laserové mamografie, metody dynamicko optického zobrazení, pátrání po zbytkové chorobě a vyšetřování genomu – epigenomu.

V souhrnu chceme zdůraznit, že rizika a možnosti chyb a omylů v diagnostice karcinomu prsu existují i dnes, při moderních metodách, postupech *lege artis*, u erudovaných lékařů a na patřičně vybavených pracovištích. Zpoždění diagnózy může být osudným a proto je třeba i při dnešních sofistikovaných možnostech být stále ve střehu před hrozbou rizik a omylů.

Využití vyšetření chemorezistence MTT testem u chronické B-lymfatické leukémie (B-CLL)

Svoboda M.^{1,2}, Kleinová J.³, Hajdúch M.⁴, Blažková S.¹, Hejlová N.³, Petráková K.¹, Lipert J.⁴, Radová L.⁶, Hanák L.⁵, a Vyzula R.^{1,2}

¹Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav v Brně (MOÚ);

²Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně;

³Hematologická ambulance, MOÚ;

⁴Laboratoř experimentální medicíny FN a LF UP Olomouc;

⁵Laboratoř prediktivní onkologie, MOÚ;

⁶Fakulta aplikované informatiky, Univerzita Tomáše Bati, Zlín

Úvod: B-CLL je charakterizována jako lymfoproliferativní onemocnění relativně nízké malignity, nicméně s velmi variabilním průběhem. Ačkoliv existuje řada více či méně účinných prognostických systémů založených jak na běžných klinických a laboratorních parametrech (klasifikace B-CLL navržené Raiem

nebo Binetem), tak i na cytogenetických a molekulárních analýzách maligních lymfocytů (chromozomální aberace, mutační statut genů kódujících variabilní části těžkého řetězce imunoglobulinů, protein ZAP-70, CD38), na základě jejich výsledků nejsme schopni predikovat chemosenzitivitu onemocnění k jednotlivým cytostatikům a kortikoidům. Charakter onemocnění, věk, četné interkurence a předléčenost pacientů širokým spektrem chemoterapeutických režimů, a vysoké riziko komplikací a nežádoucích účinků léčby nás často staví před otázkou, kdy zahájit terapii progredujícího onemocnění a jaký léčebný režim zvolit. Za účelem stanovení vhodného léčebného režimu jsme opakovaně využili možnost *in-vitro* testovat chemosenzitivitu/chemorezistenci populace maligních B-lymfocytů pomocí MTT testu (MTT, 3-4,5-dimethylazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium). V průběhu naší přednášky bude demonstrováno několik případů pacientů s B-CLL, u kterých byla predikce chemosenzitivity pomocí MTT testu použita. Jako příklad vybíráme dva z nich.

Vybrané kazuistiky:

Případ č. 1. Pacient R. R., r. n. 1940, s B-CLL diagnostikovanou v roce 1994 jako klinické stadium I, dle Raiem. Pro progresi choroby byl pacient v roce 1998 léčen chemoterapií Leukeran+Prednison, s efektem stabilizace nemoci (SD). V 09/2005 došlo k další a výrazné progresi (PD) onemocnění, která se projevila generalizovanou lymfadenopatií, hepatosplenomegalií, infiltrací kostní dřeni nad 50%, leukocytózou nad $200 \times 10^9/l$, anémií G2 a trombocytopenií G2. U pacienta byla dne 10. 11. 2005 zahájena 1. série chemoterapie v režimu CHOP, při laboratorních hodnotách: leu $203 \times 10^9/l$, lym $156 \times 10^9/l$. Před 2. sérií chemoterapie onemocnění nejevilo žádné známky regrese (klinicky stacionární lymfadenopatie, hodnoty leu $214,9 \times 10^9/l$ a lym $163,7 \times 10^9/l$). Proto byl před zahájením 2. série proveden odběr periferní krve na vyšetření chemorezistence leukocytární frakce buněk MTT testem. Výsledek testu prokázal *in vitro* senzitivitu leukocytů pouze k fludarabinu ($EC_{50} = 0,31 \text{ ug/ml}$ – koncentrace, při které přežívá 50% nádorových buněk; $C_{max}/\%PB$ 20/0% – maximální testovaná koncentrace/% přežívajících buněk), částečnou vnímavost k vinkristinu, vepesidu a k mitoxantronu, a rezistenci k prednisolonu ($EC_{50} > 0,242,4 \text{ ug/ml}$; $C_{max}/\%PB$ 242,4/85,4%), dexametazonu ($EC_{50} = 0,503 \text{ ug/ml}$; $C_{max}/\%PB$ 5/16,4%), k daunorubicinu ($EC_{50} > 2 \text{ ug/ml}$; $C_{max}/\%PB$ 2/63,2%) a k melfalanu ($EC_{50} > 50 \text{ ug/ml}$; $C_{max}/\%PB$ 50/68,9%). Na základě těchto výsledků byla provedena změna režimu chemoterapie na fludarabin, který byl pacientovi podáván v monoterapii (mono). Po první sérii fludarabinu došlo k poklesu leukocytózy o 50% a po třetí sérii byla hodnota leukocytů $11,27 \times 10^9/l$. Po třetí sérii byla chemoterapie přerušena a její efekt dosud přetrvává.

Případ č. 2. Pacientka A. M., r. n. 1922, B-CLL/SCLL diagnostikována v roce 1992 jako klinické stadium IV.A, dle Ann Arbor klasifikace. Do roku 2004 pacientka pro progresi choroby absolvovala

protinádorovou léčbu chemoterapií založenou na režimech CHOP, Leukeran-mono, dle Goldmanna, COP, fludarabin-mono, OPEN, Prednison+Vepesid. Léčba probíhala vždy s komplikacemi a efekt léčby byl nejčastěji v podobě stabilizace choroby (SD). U pacientky byla vzhledem k dobrému fyzickému stavu navržena léčba chemoterapií v režimu VAD. Před zahájením chemoterapie byl proveden odběr periferní krve na vyšetření chemorezistence MTT testem. Výsledek testu prokázal *in vitro* mimořádnou vnímavost leukocytů k dexametazonu ($EC_{50} < 0,0002 \text{ ug/ml}$; $C_{max}/\%PB$ 6/22,9%), a dále k prednisolonu ($EC_{50} = 0,024 \text{ ug/ml}$; $C_{max}/\%PB$ 242,4/14,8%) a vinkristinu, částečnou vnímavost k daunorubicinu ($EC_{50} = 0,02 \text{ ug/ml}$; 2/5,26% $C_{max}/\%PB$) a fludarabinu ($EC_{50} 0,521 \text{ ug/ml}$; $C_{max}/\%PB$ 20/10%), a rezistenci k vepesidu a dalším cytostatikům. Na základě těchto výsledků byla provedena změna režimu léčby na dexametazon, který byl pacientce podáván od 11/2004 pulzně v monoterapii. Již po první sérii hormonoterapie došlo k poklesu leukocytózy z $214,2 \times 10^9/l$ na $53,73 \times 10^9/l$, a uvedený efekt přetrvával až do 03/2006. Po celou dobu léčby byla pacientka bez významnějších nežádoucích účinků, její fyzický stav a aktivita zhodnocené Karnofského indexem přesahovaly 80%. Bohužel, pacientka umírá v březnu 2006, a to v důsledku dehydratace při akutní kampilobakterové enteritidě.

Závěr: B-CLL reprezentuje maligní onemocnění s minimální molekulární heterogenitou nádorové populace, která je navíc snadno dostupná k laboratorním analýzám. V indikovaných případech je proto za účelem individualizace protinádorové léčby pacienta možné s úspěchem použít metodu *in-vitro* testování chemorezistence pomocí MTT-testu.

Práce byla podpořena vědeckým záměrem MŠM6198959216, MSM 6198959216 a grantem MVTS Bil ČR/SR/UK/06.

Duplicitní nebo metastazující karcinom?

Švébišová H.¹, Gajová B.¹, Čwierka K.¹, Kučerová L.², Tozzi I.³, Trojanec R.⁴

¹Onkologická klinika FN a LF UP Olomouc;

²Oddělení patologické anatomie FN a LF UP Olomouc;

³II. interní klinika FN a LF UP Olomouc;

⁴LEM FN a LF UP Olomouc

Karcinom prsu je celospolečensky závažné onemocnění, v České republice je každoročně diagnostikováno téměř 5 tisíc nových onemocnění. Nádory prsu vznikají ve strukturách mléčné žlázy, jejíž anatomické uspořádání dává vzniku různým histologickým typům nádorů. Lobulární karcinom představuje 10–14% všech invazivních karcinomů prsu, má tendenci vznikat multifokálně. Přednostně metastazuje do meningeálních prostor CNS, na serózní povrchy a do retroperitonea. Metastázy v GIT napodobují karcinom žaludku a jsou histologicky obtížně rozlišitelné. Uvádíme případ nemocné, u níž vyšetření v rámci stagingu odhalilo metastázu

lobulárního karcinomu žaludku, což vedlo ke změně plánované strategie léčby.

Vlastní pozorování: 63letá nemocná, vdova, žijící s dospívající dcerou, dosud nijak vážněji nemocná. Ve 47 letech jí byla provedena abdominální hysterektomie, oboustranná adnexektomie pro myom v děloze, na gynekologii byla poté sledovaná pravidelně. Docházela na kontroly jedenkrát za rok. Tři měsíce pozorovala rezistenci v horním zevním kvadrantu levého prsu, do mamologické poradny ji následně odeslala praktická lékařka. Při vyšetření byla popisována invertovaná bradavka levého prsu, v HZQ tuhá hmatná rezistence nepravidelného tvaru, velikosti asi 6 cm v průměru. Dle mamografie a UZ vyšetření levého prsu – hypoechoгенní okresek, s akustickým stínem, velikosti 27x16x12 mm, v axile bez zvětšených uzlin. Provedena core biopsie s nálezem – invazivní lobulární karcinom, grading II.

V době stanovení dg malignity levého prsu, byla pacientka současně vyšetřovaná na interní ambulanci pro nechutenství, nadýmání, ztrátu hmotnosti – za 6 týdnů kolem 5 kg. CT vyšetření břicha neprokázalo patologii na břišních orgánech. Při gastrokopii byl endoskop volně zaveden do jícnu, kde shledán přiměřený nález, po vstupu do žaludku je makroskopicky patrná těžká gastritida, s dvěma ulceracemi na přední stěně žaludku Forrest III. Byl odebrán materiál na histologii, s nálezem – žaludeční sliznice polypoidně utvářena, v části fragmentů prostoupena nádorovou infiltrací středně až málo diferencovaného adenokarcinomu. Místy nádor dissociuje až do prstencových buněk. Vedlejší nález – intestinální metaplazie. Z dalších vyšetření – laboratorní ukazatele – KO a diff. v normě, hladiny minerálů a kompletní biochemický screening – hodnoty ve fyziologickém rozmezí. FW – 101/117, Onkomarkery – CEA 1,8 ng/ml, CA 125–13,5, CA 15,3-675,6 u/ml, TPA 1,32 ng/ml, CA 72.4 a CA 19,9 – negativní. Scintigrafie skeletu – incipientní osteoplastické leze v žebrech bil., kalvě a Th páteři. Rtg plic – negativní, infiltrace kostní dřevě neprokázána. V rámci plánované strategie léčby, pro v té době verzi duplicitního procesu – karcinomu žaludku a karcinomu prsu – byl vyzván patolog, k opětovnému posouzení histologického nálezu tumoru žaludku.

Dodatečně pak bylo provedeno imunohistochemické vyšetření, kde v nádorových buňkách byla patrná pozitivita CK7, negativita CK20. Nálezy byly srovnány a vysloven závěr, svědčící pro invazivní lobulární karcinom mammy, který metastazoval do žaludku. V současné době prodělává pacientka paliativní chemoterapii, weekly režim, ukončila radioterapii na levý prs a spádová lymfatika. Po 6 měsících léčby došlo k regresi nálezu na žaludeční sliznici, stabilizaci skeletálního postižení a poklesu laboratorních hodnot nádorových markerů – CA 15.3 do negativity.

Diskuze: Víme, že lobulární karcinom prsu je typem nádoru, který může metastazovat do žaludku a dokonce imitovat vzhled primárního tumoru žaludku. Nicméně přesvědčivý závěr patologa nás

vedl v první fázi k domněnce, že se jedná o duplicitní neoplazii, což by samozřejmě znamenalo odlišnou strategii léčby u dané pacientky. Vysoká hladina CA 15,3, při negativitě hodnot ostatních markerů znamenala určitou pochybnost o správnosti histologického závěru a vedla nakonec k jeho upřesnění za pomoci imunohistochemického došetření. Rozvaha ošetřujícího lékaře ve spolupráci s patologem tak vedla k upřesnění rozsahu maligního onemocnění u nemocné a tím i k optimálně vedenému léčebnému postupu.

Úskalí léčby pokročilého karcinomu prsu

Šrámek V.¹, Čwierka K.¹, Krejčí E.¹, Macháček J.¹, Hajdúch M.², Kolář Z.³

¹Onkologická klinika, ²Laboratoř experimentální medicíny, ³Laboratoř molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

V kazuistice prezentujeme případ duplicitního karcinomu dělohy a prsu. Karcinom dělohy byl diagnostikován a léčen v roce 1994 operací a zářením. Dále jen dispenzarizace. V roce 1998 byla provedena ablace levého prsu s exenterací levé axily pro vývodový a lobulární karcinom invazivního typu, G3, se zřetelným šířením do tukové tkáně a invazí do lymfatických cév, místy dosahuje nádorová infiltrace ke značenému resekcijnímu okraji. Pozitivní metastatické lymfatické uzliny z levé axily, ER +/-, PR+, bcl-2 poz., PCNA neg. Uvedený výsledek ukazuje na pravděpodobnou odpověď na hormonální terapii, avšak s nejistou prognózou. Pacientka byla indikována k adjuvantní radioterapii (RT), chemoterapii (ChT) a následné hormonální terapii (HT). Do března 1999 byla provedena RT, dále byly podány 4 cykly ChT a zahájena HT tamoxifenem. Od září 2000 postupný pomalý nárůst onkomarkerů, v březnu 2001 bylo prokázáno metastatické postižení střední třetiny levé stehenní kosti. Změna hormonální terapie na letrozol a zahájeno podávání bisfosfonátů p. os., narůstající bolesti a parestezie v pravé polovině tváře. Provedena scintigrafie skeletu (12/2001) – osteoblastické změny v processus zygomaticus a přilehlé části maxily vpravo, parietookcipitálně vpravo, diafýze levého femuru a 7. žeburu dorzálně vpravo. Odpovídající nárůst nádorových markerů (TUM): 01/2001: CA 15-3: 115,9, TPA: 4,02 a CA 125: 75,4. V tomto období provedeno cytogenetické vyšetření FISH se závěrem: polyploidní nádorové buňky s převahou triploidní populace. Pravé amplifikace HER2/neu ani TOP2A genů nebyly nalezeny. V druhé linii ChT proto doporučujeme zvážit taxanový režim, případně orální fluoropyrimidin. Dle výsledků vyšetření provedena změna léčby. Nejprve zahájena 2. linie HT exemestanem, aplikace paliativní RT na oblast maxily a jařmového oblouku vpravo a dle cytogenetického vyšetření podávána kapecitabin p.os. do května 2002. zaznamenán jen mírný pokles TUM: 06/2002: CA 15-3: 51,3, TPA 1,98, CA 125: 53,1. V lednu 2003 pro mírný nárůst Ca 15-3 změna HT na anastrozol,

pokračování v podávání bisfosfonátů. V červenci po vyšetřeních zjištěna progresse onemocnění v oblasti pravého humeru, v oblasti os sphenoidalis, pravé pyramidy, šířící se plíživě bez větších kostních deformací. Progrese provázena mírně narůstajícími hodnotami TUM. Od srpna 2003 podána 3. linie ChT docetaxel, epirubicin/liposomální doxorubicin, pamidronát, pokračuje v HT. Současně provedena léčba gama nožem na kořen trojklanného nervu. Dle MRI nález meta ložiska pravé orbity s karcinomasou mening střední jámy lební bilaterálně, více vpravo – ve výrazné progresi ve srovnání s minulým vyšetřením. Chemoterapie ukončena v listopadu 2003, kdy dochází k nárůstu hodnot CA 15–3: 64,0. Do září 2004 stabilizace onemocnění, stabilizace TUM, dokonce přechodné snížení hodnot CA 15–3 na 36,1. Podáván anastrozol, klodronát. Při vzestupu TUM znovu změna HT na letrozol. Postupná progresse TUM, zvýšení CA 15–3 na 121, zvýšení TPA, CA 125 i CEA, subjektivní zhoršování dušnosti, dle PET/CT pleurální výpotek. Od dubna 2005 zahájena ChT gemcitabin+cisplatina dle výsledku MTT testu. Po 3. kúře pacientka velmi slabá, v průběhu ChT postupná progresse (CA 15–3). Od července 2005 podána 4. linie ChT vinorelbin+ kapecitabin, při stabilizaci onemocnění a poklesu TUM ukončeno v prosinci 2005. Od února 2006 opět progresse onemocnění v játrech se zvýšením hodnot markerů, zahájena 5. linie ChT v kombinaci paklitaxel weekly a Avastin s postunou odezvou v hodnotách CA 15–3, které se z hodnot 280,0 při zahájení této linie dostávají na hodnotu 119,4 při ukončení léčby. Po krátké době dochází k rychlé progresi a úmrtí nemocné.

Závěr: U nemocné s metastatickým karcinodem prsu byla prováděna náročná systémová léčba, která zahrnuje tři linie hormonální terapie a pět linií chemoterapie. Tyto se řídily cíleně dle citlivosti nádorových buněk. Celkově od doby zjištění metastatické choroby k ukončení léčby uplynulo 63 měsíců. Cíleně podávaná léčba výrazně ovlivnila spolehlivost a účinnost podávané ChT. Pacientka zvládala ChT v ambulantním režimu, což výrazně přispělo k psychické pohodě a konsolidaci celkového stavu. Účelná léčba je přínosem a je nutné využít všech diagnostických možností k upřesnění účinnosti léčebných postupů.

Biologická léčba u nádorů plic

Michalka P., Lišková Z., Černá M., Kasan P. KPaF 1, oddelenie klinickej onkológie, FNŠP, Bratislava

Biologická léčba zahrnuje inhibitory EGFR (Gefitinib (Iressa), Erlotinib (Tarceva)), monoklonální protilátky proti EGFR (Cetuximab (Erbix)) a monoklonální protilátky proti VEGF (Bevacizumab (Avastin)). Erlotinib patří mezi selektivně inhibitory HER1/EGFR tyrozín kinázy. Je vnútrobunkový inhibitor fosforylácie tyrozín kinázy viazanej s EGFR. EGFR je exprimovaný na povrchu normálnych i nádorových buniek, jeho inhibícia vedie k zastaveniu

vývoja buniek alebo k programovanej smrti bunky. Tarceva (erlotinib) je indikovaná na liečbu pacientov s lokálne pokročilým alebo metastatickým nemalobunkovým karcinómom pľúc po zlyhaní najmenej jedného predchádzajúceho režimu chemoterapie. Odporučená denná dávka je 150 mg, najmenej jednu hodinu pred jedlom alebo dve hodiny po jedle. Pri nevyhnutnej úprave dávkovania sa jednotlivé dávky môžu znižovať po 50 mg. Pretože sa erlotinib eliminuje pečevým metabolizmom a biliárnou exkréciou, je potrebná opatrnosť u pacientov s poškodenou funkciou pečene. Silné indukory CYP3A4 môžu znižovať účinnosť erlotinibu, zatiaľ čo silné inhibítory CYP3A4 môžu navodiť jeho zvýšenú toxicitu. U pacientov s miernou alebo strednou poruchou funkcie obličiek nie je potrebné upraviť dávkovanie. U fajčiarov môže dochádzať k zníženiu plazmatických koncentrácií erlotinibu. Preto je potrebné upozorniť fajčiarov aby prestali fajčiť. Tablety obsahujú laktózu a preto by sa nemali podávať pacientom so zriedkavou dedičnou poruchou tolerancie galaktózy, s deficienciou Lapp-laktázy alebo s malabsorpciou glukózy-galaktózy. Erlotinib má zníženú rozpustnosť pri pH vyššom ako 5, preto absorpcia Tarcevy môže byť porušená pri súčasnom užívaní antacid, inhibítorov protónovej pumpy a antagonistov H2 receptorov. Najčastejšie nežiaduce reakcie sú raš, hnačka, anorexia, dyspnoe, infekcie, stomatitída, pruritus. Z nežiadúcich účinkov GIT-u sú krvácanie do gastrointestinálneho traktu, ktoré sa pozorovalo pri súčasnom podávaní warfarínu alebo NSAID. Pri užívaní Tarcevy je potrebné sledovať funkčné pečevé testy (ALT, AST a bilirubín). Mierne až stredne závažné zvýšenie týchto hodnôt sa pozorovalo pri metastázach do pečene. Menej častým nežiadúcim účinkom môže byť intersticiálna choroba pľúc, ktorá môže u senzitivných pacientov byť až fatálna. Percentuálne zastúpenie pacientov s dobou prežitia 12 mesiacov, bolo v skupine liečenej Tarcevou 31,2% a v skupine, ktorá dostávala placebo 21,5%. Medián celkovej doby prežitia v skupine liečenej Tarcevou bol 6,7 mesiacov (95% IS; 5,5 až 7,8 mesiacov) v porovnaní so 4,7 mesiacmi (95% IS; 4,1 až 6,3 mesiacov) v skupine s placebom. Účinok na celkové prežitie bol lepší u pacientov, ktorý nikdy nefajčili, u pacientov ženského pohlavia, u pacientov s adenokarcinómom, alebo bronchioloalveolárnym karcinómom, u pacientov ázijského etnika a u pacientov, ktorým bola choroba diagnostikovaná v štádiu < IV. Maximálne hladiny erlotinibu v plazme po perorálnom podaní sa dosiahnu približne o 4 hodiny. Väzba na plazmatické proteíny je približne 95%. Erlotinib sa viaže na sérový albumín a alfa-1 kyslý glykoproteín. Erlotinib sa u metabolizuje v pečeni ako už bolo skôr spomenuté. K metabolickému klírensu erlotinibu potenciálne prispieva mimopečevý metabolizmus prostredníctvom CYP3A4 v čreve, prostredníctvom CYP1A1 v pľúcach a prostredníctvom 1B1 v nádorovom tkanive. Erlotinib sa vylučuje vo forme metabolitov v stolici (> 90%), pričom obličkami sa z pero-

rálnej dávky vylučuje iba malé množstvo (približne 9%). Podľa populačnej farmakokinetickej analýzy sa zdá, že prítomnosť opiátov zvyšuje expozíciu erlotinibu približne o 11%. Záverom možno povedať, že Tarceva indikovaná ako liečba po zlyhaní najmenej jednej línie u adenokarcinómu, u nefajčiarok prináša benefit a významne predlžuje dobu prežívania.

Chyby a omyly ve vyhodnocování kvantitativní PCR

Kleiblová P.^{1,2}, Ševčík J.¹, Scholzová E.¹

¹Ústav biochemie a experimentální onkologie

1. LF UK; ²Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN

Kvantitativní RT-PCR v reálném čase (qPCR) je často používanou metodou umožňující rychlou a relativně jednoduchou kvantifikaci genové exprese na úrovni syntézy mRNA. Nespornou výhodou této metody je její vysoká specifita i senzitivita a dynamický rozsah kvantifikace v rozmezí několika řádů. Všechna uvedená pozitivita jsou však podmíněna vysokou kvalitou templátové RNA (mRNA), účinnou reverzní transkripcí a technicky bezchybným provedením vlastní qPCR, jak je diskutováno v mnoha odborných publikacích. Přesto, pouhé dodržení kvality jednotlivých kroků qPCR nezaručuje, získání nezkrasleného obrazu expresního profilu sledované buněčné populace.

Standardní součástí qPCR by mělo být též mnohdy opomíjené stanovení efektivity amplifikace každého amplikonu za optimalizovaných podmínek (minimálně anelační teplotě a koncentraci Mg²⁺). Snahou veškerých optimalizací je pochopitelné připravit pokus s co nejjednodušším vyšetřovacím algoritmem (tzn. co nejmenší počet anelačních teplot, při kterých jsou vyšetření prováděna) a s co nejšhodnějšími qPCR efektivitami. Obvyklou metodou je zhotovení kalibrační křivky a z ní následné určení efektivity qPCR.

U qPCR existují dva nejčastější přístupy k vyhodnocování míry exprese sledovaných genů:

- Metodou absolutní kvantifikace je stanovován konkrétní počet kopií mRNA na určitou jednotku (např. počet buněk použitých pro izolaci RNA).
- Častěji užívanou je kvantifikace relativní, při které jsou pro normalizaci množství mRNA vstupujícího do dané reakce použity takzvané housekeeping geny (HK; např. často používané geny pro ribosomální proteiny, B2M nebo GAPDH). Takové geny jsou pro určitou buněčnou populaci charakteristické tím, že míra jejich exprese je málo ovlivněna změnou stavu buňky (nebo na ni nemají vliv okolnosti, které jsou v pokusu vyšetřovány).

Relativní způsob hodnocení exprese má proti kvantifikaci absolutní výhodu v tom, že takto získané výsledky jsou výrazně méně zkrasleny například nepredikovatelnými ztrátami genetického materiálu

RNA. Avšak i relativní kvantifikace genové exprese má svá úskalí. Nežádáka dojde ke zkraslení výsledků jinak zcela perfektně provedeného vyšetření špatnou volbou způsobu vyhodnocení dat získaných z vyšetření na základě tzv. crossing points – CP (nazývaných též cross thresholds – CT). Velmi oblíbenou je pro svou jednoduchost metoda $\Delta\Delta CP$, která je však vhodná výhradně pro PCR probíhající v exponenciální fázi amplifikace se 100% účinností (tzn. za zdvojnásobení počtu amplikonů mezi jednotlivými cykly). Přes frekventní použití je tato kvantifikační metoda bez znalosti efektivity amplifikace konkrétní PCR k vyhodnocování genové exprese relativní kvantifikační zcela nevhodná. Mnohem přesnější a korektnější přístup k posouzení míry exprese je stanovení reálné efektivity konkrétní PCR pro TG a HK, a jejich zohlednění při matematickém hodnocení míry exprese. Toto dnes již umožňují mnohé softwarové programy, které kromě vyhodnocení kalibračních křivek a relativní genové exprese na základě efektivity umožňují i statistickou validaci získaných výsledků (například: REST, GeNorm, qGENE).

Závěr: Pro vyhodnocení exprese sledovaných genů pomocí qPCR je nezbytné nejen správné provedení vlastní qPCR za optimalizovaných reakčních podmínek, ale i následná kvalitní matematická a statistická analýza získaných dat, zvláště pak v případech, kdy qPCR není prováděna na základě validovaných postupů. Pouze na základě tohoto přístupu možné získat údaje o míře genové exprese odpovídající skutečnému stavu ve vyšetřovaném materiálu.

Podpořeno grantovým projektem IGA MZ ČR
1A/8708-4

High resolution melting analýza na platformě Light Scanner

Vašák J.

KRD – obchodní společnost, s. r. o.

High Resolution melting je post PCR technologie pro identifikaci známých a neznámých mutací, resp. SNP. Mutace PCR produktů jsou detekovány pomocí změny tvaru křivky tání. Ultra vysoké rozlišení tohoto přístupu je dané kombinací unikátní optiky přístroje LightScanner™ a barvičky LCGreen® Plus. LCGreen®Plus představuje saturační dsDNA fluorescenční barvičku, která specifickým počtem molekul váže DNA s různým obsahem bazí, což umožňuje detekovat i nejmenší změny sekvence pomocí změny fluorescence při melting curve analýze.

Systém pracuje se standardním formátem 96 nebo 384 jamkového bloku. Mezi hlavní přednosti přístupu s pomocí Light Scanner systému patří:

- vysoká citlivost a přesnost
- nízká cena za analýzu – žádná fluorescenční sondy
- rychlost – 96 vzorků za 5min
- detekce známých a neznámých mutací, SNP
- eliminace sekvenování DNA

5. PREDIKTIVNÍ FAKTORY I

Předsedající: PETRÁKOVÁ K., NENUTIL R., ŠMARDOVÁ J.

Pátek / 8. 12. 2006 – 10.40–12.00

Progrese a/nebo disseminace mammárního karcinomu během adjuvantní léčby Tamoxifenem.

Existuje možnost predikce

z parametrů primárního nádoru?

Petráková K.¹, Vyskočil J.¹, Svoboda M.¹,
Fabian P.², Knoflíčková D.², Hanzelková Z.²,
Nenutil R.²

¹Klinika komplexní onkologické péče;
Masarykův onkologický ústav v Brně;

²Oddělení onkologické a experimentální patologie,
Masarykův onkologický ústav v Brně

Tamoxifen, selektivní modulátor estrogenových receptorů, je v současné době nejvíce používaným lékem v hormonální léčbě pacientek s karcinomem prsu. V současné době však už máme výsledky několika randomizovaných studií III. fáze, které prokázaly lepší léčebný efekt inhibitorů aromatázy proti tamoxifenu jak v adjuvantním podání, tak v léčbě metastatického onemocnění. Na základě toho se na odborných konferencích vedou diskuze o změně adjuvantní hormonální léčby postmenopauzálních pacientek z tamoxifenu na inhibitor aromatázy. Je však otázkou, jestli všechny postmenopauzální pacientky mají být léčeny inhibitorem aromatázy a jestli se nedá definovat skupina pacientek primárně rezistentních na tamoxifen. Pokud by se povedlo pochopit molekulární podstatu tohoto fenoménu, bylo by možné pacientky léčit účinnou endokrinní léčbou a zlepšit tak léčebné výsledky.

Analýzou zdravotnické dokumentace byly vyhledány případy mammárního karcinomu s dostupným minimálně pětiletým sledováním, léčené v MOÚ během let 1993–2001. Podmínkou bylo, aby tyto pacientky měly v průběhu adjuvantní léčby Tamoxifenem biopticky verifikovanou lokální recidivu a/nebo disseminaci nádoru. Ze 40 dostupných bioptických vzorků primárních nádorů byly vytvořeny složené tkáňové bloky (tissue microarrays, TMA) na kterých byla provedena semikvantitativní imunohistologická analýza běžných prediktivních parametrů (estrogenový (ER) a progesteronový (PR) receptor), doplněná o stanovení proliferace (Ki67), Her-2/neu, bcl-2 a cyklinu D1. Výsledky byly srovnány s obdobně zpracovaným souborem ER pozitivních mammárních karcinomů, vybraných z konsektivních případů MOÚ tak, aby co nejvíce odpovídaly věkovým průměrem, gradem a klinickým stadiem v době primární léčby.

Var. 1: Definitivní kompletní výsledky nejsou v době uzávěrky abstraktu dosud k dispozici. Srovnáním byla u nádorů s progresí nebo disseminací zjištěna oproti kontrolnímu souboru nižší exprese

PR, případy Her-2 pozitivity byly v obou souborech sporadické.

Var 2: Definitivní kompletní výsledky nejsou v době uzávěrky abstraktu dosud k dispozici.

Amplifikace CCND1 u karcinomu prsu v korelaci s proteinem a dalšími pro- gnosticko-prediktivními parametry

Nenutil R.¹, Fabian P.¹, Knoflíčková D.¹,
Hanzelková Z.¹, Petráková K.²

¹Oddělení onkologické a experimentální patologie,
Masarykův onkologický ústav v Brně;

²Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův
onkologický ústav v Brně

Cyklin D1 je v kooperaci s estrogenovým receptorem důležitým faktorem odpovídajícím za aberantní proliferaci signální podstatné části mammárních karcinomů. Jeho imunohistologické stanovení bylo přitom donedávna problematické vzhledem k nízké specifitě dostupných protilátek. Předmětem sdělení je studie korelace mezi amplifikací CCND1, imunohistologickým stanovením pomocí nové protilátky SP4 (Labvision) a dalšími parametry.

Studie byla provedena na složených tkáňových blocích (TMA) zahrnujících celkem 110 případů mammárního karcinomu. Kromě řady imunohistologických stanovení byla vyšetřena i amplifikace genů CCND1 a Her2/neu pomocí FISH.

Vysoká hladina proteinu (nad 80% nádorových buněk) byla zjištěna u 30% nádorů, střední (50–80%) u 27%, nízká (10–50%) u 27% a velmi nízká (pod 10%) u 15% nádorů. Amplifikace genu pro cyklin D1 (CCND1) byla nalezena u 14% nádorů a významně pozitivně korelovala s hladinou proteinu, i když zároveň podstatná část karcinomů s vysokou hladinou proteinu amplifikaci nemá. Nebyl zastížen ani jeden případ společné amplifikace CCND1 s Her-2/neu (jeho amplifikace nalezena ve 13%). Hladina cyklinu D1 pozitivně korelovala s estrogením i progesteronovým receptorem, i když existují sporadické nádory s vysokou hladinou cyklinu D1 při negativních receptorech. Neprokázali jsme významnou korelaci cyklinu D1 (amplifikace ani protein) s proliferací a gradem nádoru, potenciálně zajímavá však je vyšší frekvence amplifikace CCND1 u karcinomů s uzlinovými metastázami v době diagnózy (20% oproti 7% u karcinomů bez uzlinových metastáz). Karcinomy se středními a vyššími hladinami cyklinu D1 a/nebo CCND1 amplifikací prakticky neexprimují cytokeratin 5/6 (marker bazálního fenotypu)

Protilátka SP4 se jeví jako dobrý nástroj k imunohistologickému stanovení hladiny cyklinu D1. Vysoké

hladiny proteinu se však jeví být pouze v části nádorů podmíněny amplifikací CCND1. Tato amplifikace by, na rozdíl od pouhého zvýšení hladiny proteinu, mohla být negativním prognostickým parametrem, definujícím rizikovou skupinu odlišnou od nádorů s Her-2 amplifikací a od nádorů bazálního fenotypu.

Práce byla podpořena grantem
IGA MZ ČR NR 8270-3

Výhody funkční metody FASAY při analýze nádorového supresoru p53 u vybraných případů difúzního velkobuněčného B lymfomu

Šmardová J.¹, Zedek F.², Ravčuková B.¹,
Grochová D.^{1,2}, Vaňková J.^{1,2}, Kroupová I.¹,
Fabián P.³

¹Laboratoř molekulární patologie ÚPA FN Brno;

²Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká
fakulta MU, Brno; ³Oddělení patologie MOÚ, Brno

Difúzní velkobuněčné B lymfomy (DLBCL) představují asi 30% všech ne Hodgkinových lymfomů (NHL). Jsou to agresivní, rychle rostoucí tumory. DLBCL tvoří klinicky, prognosticky, patologicky i biologicky heterogenní jednotku. K molekulárním markerům DLBCL patří translokace genu *bcl-6*, translokace *t(14;18)*, která vede k deregulaci genu *bcl-2*, a dále aberace zahrnující geny *rel*, *c-myc* a *p53*. Nádorový supresor *p53* je sekvencně specifický transkripční faktor, který se váže na DNA a řídí expresi mnoha svých cílových genů jako odpověď na buněčný stres.

Aberace *p53* u DLBCL byly opakovaně analyzovány. Frekvence zachycených mutací se pohybovaly mezi 6 a 33%. Vysoká hladina proteinu *p53* byla zaznamenána v rozsahu 13 až 70% a často byla zachycena i v případech bez nalezené mutace *p53*. Některé práce prokázaly, že aberace *p53* mají nepříznivý prognostický význam.

Pro analýzu aberací *p53* lze použít několik různých metod, například imunohistochemickou analýzu, imunobloting, sekvenování DNA, fluorescenční *in situ* hybridizaci a také funkční analýzu separovaných alel v kvasinkách (FASAY). Všechny tyto metody jsme použili k podrobné analýze *p53* u 40 případů DLBCL. Metodou FASAY jsme detekovali 11 mutací (27,5%). Na vybraných případech DLBCL chceme demonstrovat výhody komplexního vyšetření *p53* a několik předností metody FASAY: (1) vysokou citlivost, (2) schopnost zachytit mutace, které jsou například imunochemicky nedetekovatelné, (3) schopnost rozlišit mutace narušující pouze částečně nebo podmíněně funkci *p53*, (4) možnost přípravy templátů pro sekvenování DNA tam, kde

není možná analýza gDNA ani cDNA připravené přímo z nádorové tkáně pro nízké zastoupení mutantní varianty genu p53.

Poděkování: *Práce je podporována grantem NR/8068-3 IGA MZ ČR a MSM 0021622415.*

Reaktivace proteinu p53 pomocí Amifostinu – experimentální studie v kvasinkovém expresním systému Grochová D.^{1,3}, Vaňková J.^{1,3}, Damborský J.², Šmardová J.¹

¹Laboratoř molekulární patologie ÚPA FN Brno;

²Loschmidovy laboratoře, PF MU, Brno; ³Ústav experimentální biologie, Biologická sekce, PF MU, Brno

Reaktivace nádorového supresoru p53 se v poslední době jeví jako jedna z možných strategií specificky cílené, protinádorové terapie. Protein p53 je transkripční faktor, který zajišťuje odpověď buňky na buněčný stres a poškození DNA tím, že aktivuje expresi řady cílových genů. Výsledkem aktivace je ovlivnění regulace důležitých buněčných procesů jako je apoptóza nebo zástava buněčného cyklu. U více než poloviny všech lidských nádorů se nachází mutace v genu *p53*. Tyto nádory často prokazují zvýšenou rezistenci ke konvenční chemoterapii a radioterapii.

Vzhledem k tomu, že existuje vysoká variabilita ve funkčních vlastnostech jednotlivých p53 mutantů, je nutné vyvíjet i odlišné strategie k jejich reaktivaci. Teplotně závislé mutanti proteinu p53 jsou mutanti za restriktivních teplotních podmínek zcela inaktivní, u kterých za permissivních podmínek dochází k částečné nebo úplné obnově jejich transaktivačních schopností. Jsou tedy dobrým cílem strategie reaktivace proteinu p53 pomocí malých molekul. Jednou z těchto molekul je radio- a chemoprotektivní látka Amifostin (S-2[3-aminopropylamino-] ethyl phosphorothioic acid, WR2721, Ethylol®), která indukuje DNA vazebnou aktivitu standardního typu proteinu p53 a zcela nebo částečně obnovuje transaktivační schopnosti některých teplotně senzitivních mutantů exprimovaných za nepermissivních podmínek. V klinické praxi je Amifostin využíván při snižování vedlejších efektů různých druhů nádorových terapeutik.

Při studiu efektu Amifostinu na transaktivační schopnosti 22 teplotně závislých mutantů p53 jsme využili kvasinkového expresního systému, který mimo jiné využívá funkce p53 v buňkách *Saccharomyces cerevisiae* jako transkripčního faktoru, který je schopen na základě zbarvení kvasinkových kolonií semi-quantitativně rozeznat různé funkční p53 mutanty. Bílé kolonie představují kvasinky transformované plně funkční variantou p53 proteinu, červené pak zcela nefunkční variantou. Kvasinkové kolonie, které byly transformované pouze částečně inaktivním mutantem p53 (např. teplotně závislým) vykazují fenotyp růžový. Efekt Amifostinu jsme analyzovali u 22 teplotně závislých p53 mutantů exprimovaných ve třech různých kvasinkových kmenech (s p53 responzivními elementy odvozenými z promotorů genů *p21*, *bax* a *RGC*)

při teplotách 25, 28, 30, 33 a 35 °C. Kvasinky rostly paralelně na médiu s Amifostinem a bez Amifostinu a účinek preparátu se projevil ve změně zbarvení kvasinkových kolonií. Tato změna byla nejlépe pozorována při kultivační teplotě 33°C, kde kvasinkové kolonie rostoucí bez Amifostinu vykazovaly červený fenotyp a kolonie rostoucí na médiu s Amifostinem růžový nebo bílý, což naznačovalo reaktivaci proteinu p53. Tento efekt byl pozorován pouze u některých mutantů p53 (E285K, S215G, P98A, G266E, Y205C, V272G, I195T, M237K, C135G, V216M, Y234C, A159V, V274G), přičemž většina těchto mutací (10/13) se nachází v hydrofobní, „β-sandwichové“ struktuře DNA vazebné domény proteinu p53. Tato doména nese dvě velké smyčky (L2 a L3) a motiv šroubovice-list-šroubovice umožňující přímou vazbu na DNA. Předpokládáme, že WR1065 tuto strukturu stabilizuje, čímž je zcela nebo částečně obnovena funkce celé DNA vazebné domény. Tito p53 mutanti se navíc lišili v odpovědi na účinek působení Amifostinu vzhledem k různým promotorům (*p21*, *bax*, *RGC*).

Výsledky naší práce naznačují, že protein p53 je konformačně flexibilní a jeho funkci lze reaktivovat pomocí malých molekul jako je Amifostin. Při identifikaci látek, které reaktivují transaktivační schopnosti proteinu p53 a mohou tak sloužit jako potenciální terapeutika, může být využita kvasinková funkční analýza. Navíc detailnější analýza funkčních a strukturních vlastností mutantů p53 a jejich podrobná stratifikace mohou být užitečné pro lepší pochopení účinků specifických mutantů na procesy vedoucí k transformaci nádorové buňky.

Poděkování: Tato práce je podporována grantem NR/8068-3 IGA MZ ČR a MSM 0021622415.

Kvantitativní stanovení exprese cyklinu D1, spolehlivý nástroj v diagnostice a sledování pacientů s lymfomem z buněk pláště (MCL)

Břížová H., Kalinová M., Krsková L., Kodet R.
Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

Úvod a cíl práce: Lymfom z buněk pláště (MCL) představuje samostatnou klinicko-patologickou jednotku. MCL patří do kategorie lymfomů z malých buněk a vyznačuje se charakteristickými morfoloickými, imunofenotypovými a genetickými vlastnostmi. Jeho včasné a správné rozpoznání má značný klinicko-terapeutický význam, neboť se jedná o lymfom agresivní, s rychlou progresí onemocnění a špatně reagující na konvenční terapii účinnou při léčbě ostatních non-Hodgkinovských lymfomů z B buněk (B-NHL).

U MCL dochází k transkripční deregulaci genu *CCND1* vedoucí k patologické expresi cyklinu D1 vlivem t(11;14) (q13;q32), v jejímž důsledku dochází ke spojení IgH enhanceru na chromozomu 14 s genem *CCND1* na chromozomu 11. S použitím fluorescenční in situ hybridizace je translokace (11;14) detekována u >90% MCL. Nicméně molekulární sta-

novení translokace pomocí genomické PCR je problematické a umožňuje analyzovat pouze 30–50% MCL. Cílem práce je kvantitativní stanovení exprese mRNA cyklinu D1 (dále jen cyklin D1), které rozšíří spektrum diagnostických možností u MCL, a umožní sledovat rozvoj onemocnění na molekulární úrovni. Navíc množství exprimovaného cyklinu D1, jako klíčové molekuly regulace buněčného cyklu, může mít prognostický význam pro pacienty s MCL. Míru exprese cyklinu D1 jsme tedy korelovali s proliferací aktivitou buněk (měřena stanovením hladiny exprese proliferčního markeru, Ki-67).

Metody: Pro stanovení hladiny mRNA cyklinu D1 a Ki-67 jsme použili metodu reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-RQ-PCR). Metoda kvantitativní PCR je citlivá a vysoce specifický prostředek molekulární analýzy umožňující sledovat přesné množství detekované molekuly ve vzorku a její případné změny v průběhu onemocnění.

Výsledky: Míru exprese cyklinu D1 jsme analyzovali u 118 vzorků primárních nádorů (z toho 74x se jednalo o MCL) v kryostatových a/ nebo parafinových řezech a pro kontrolu u 5 uzlin pocházejících od pacientů s reaktivní lymfadenopatií. V 73/74 MCL jsme našli vysokou expresi cyklinu D1. Expresi cyklinu D1 srovnatelnou s hladinou pozorovanou u MCL jsme nedetekovali v žádném z testovaných B-NHL ani kontrolním vzorku. Výjimku tvoří skupina „mucosa associated lymphoma tissue“ (MALT) lymfomů z plic nebo žaludku, kde je vysoká hladina exprese cyklinu D1 způsobena příměsí epiteliálních buněk přítomných ve směsném biopsickém materiálu. Vztah mezi proliferací a mírou exprese cyklinu D1 ve vzorcích primárních nádorů MCL jsme neprokázali.

Rovněž jsme kvantitativně vyšetřili cyklin D1 u 117 aspirátů kostní dřeně (KD) odebraných v době diagnózy a/nebo v průběhu onemocnění od pacientů s B-NHL (70x se jednalo o KD od pacientů s MCL, z nichž 39 mělo zaznamenanou infiltraci KD lymfomem). Jako kontrolní skupinu jsme použili 10 vzorků KD od zdravých dárců. U žádného vzorku z kontrolní skupiny ani ostatních B-NHL jsme neprokázali zvýšenou hladinu exprese cyklinu D1. Cyklin D1 byl ve zvýšené míře detekován u 35/39 KD infiltrovaných MCL. Nezvýšené množství cyklinu D1 jsme podle očekávání zaznamenali u 29/31 KD bez infiltrace MCL.

Dosud získané výsledky ukazují, že sledování úbytku případně nárůstu hladiny cyklinu D1 je vhodné i pro sledování dynamiky onemocnění.

Závěr: Kvantitativní stanovení exprese cyklinu D1 je vhodným nástrojem diferenciální diagnostiky ve vzorcích primárních nádorů i KD. Metoda RT-RQ PCR umožňuje sledovat pacienty s MCL na molekulární úrovni a poskytuje rovněž slibný nástroj sledování průběhu onemocnění během léčby, včetně stanovení minimální residuální/diseminované nemoci v KD, což má potencionální terapeutický dopad.

Projekt je podporován grantem GAUK 200055, 46/2006/C/2.LF, grantem IG FNM 9756 a výzkumným záměrem MZO 00064203/6704.

6. PREDIKTIVNÍ FAKTORY II

Předsedající: MIHÁL, V., SVOBODA M., EHRMANN J.

Pátek / 8. 12. 2006 – 13.00–14.25

Incidence a prognostický význam chromozomových změn u myelodysplastického syndromu

Březinová J.¹, Zemanová Z.²,

Melicherčíková J.¹, Pavlišťová L.², Babická L.², Šišková M.³, Čermák J.¹, Michalová K.^{1,2}

¹Ústav hematologie a krevní transfuze; ²Centrum nádorové cytogenetiky ÚKB LD a ³1. interní klinika VFN a 1. LF UK Praha

Myelodysplastický syndrom (MDS) je skupina klonálních hematopoetických onemocnění, charakterizovaných hypercelulární kostní dřeví, inefektivní hematopoezou a dysplazií jedné či více myeloidních linií. Onemocnění postihuje především starší pacienty (medián 60–75 let) a až u 30 % z nich přechází v akutní leukemii. Chromozomové změny jsou popisovány u 30–50 % primárních MDS a jsou charakterizovány především ztrátou či nadbytkem genetického materiálu. K nejčastějším ztrátám patří monosomie chromozomů 5, 7, ztráta chromozomu Y a delece dlouhých ramen chromozomů 5, 7, 11 a 20, nejčastější zmnožení genetického materiálu představuje trisomie chromozomu 8. Prognóza nemocných je založena na kombinaci klinických, morfologických a cytogenetických dat. Normální karyotyp či samostatná delece dlouhých ramen chromozomu 5 a 20 jsou spojeny s dobrou prognózou, nálezkem komplexních chromozomových změn a přestavb chromozomu 7 řadí nemocné do rizikové skupiny s těžkým průběhem onemocnění a zkrácenou dobou přežívání.

V naší studii jsme se zaměřili na identifikaci delecí, doprovázejících přestavby chromozomu 7 u nemocných s MDS a AML. Metodou fluorescenční in situ hybridizace se specifickými sondami jsme detekovali delece v oblastech 7q22, 7q31 a 7q35, další aberace chromozomu 7 byly prokázány metodou mnohobarevného pruhování (mBAND 7). Komplexní přestavby karyotypu byly ověřeny pomocí mnohobarevné FISH (mFISH). Strukturální přestavby chromozomu 7 jsme prokázali u 33 nemocných – delece dlouhých ramen (7q) byla potvrzena u 19 nemocných, delece krátkých ramen (7p) u 5 nemocných. U tří nemocných s reciprokou translokací nebyla delece chromozomu 7 prokázána, zlomová místa na chromozomu 7 však byla u dvou z nich lokalizována do oblastí dříve publikovaných minimálních deletovaných segmentů. Nález aberace chromozomu 7 jsme prokázali jako nepříznivý prognostický faktor, medián přežití nemocných s touto změnou byl 7 měsíců. U většiny nemocných byly delece kryptické, klasickou cytogenetickou analýzou nedetekovatelné. Považujeme proto jejich cílené vyšetření metodami

molekulární genetiky za plně indikované a proto by mělo být provedeno jak při prvním diagnostickém vyšetření tak i v průběhu nemoci.

Tato práce byla podpořena granty IGA MZČR NR 7995-3 a GAČR 301/04/407.

Vyšetření lymfocytární subpopulace u nádorů hlavy a krku – možnost predikce

Eckschlager T.^{3,5}, Bouček J.¹, Betka J.¹, Chovanec M.¹, Kuchař M.¹, Říhová B.², Hladíková M.⁴

¹Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku, 1. LF UK, FN v Motole, Praha; ²Mikrobiologický Ústav Akademie věd ČR, Praha; ³Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK, FN v Motole, Praha; ⁴Ústav informatiky, 2. LF UK, Praha; ⁵Prezentující autor

Nádory hlavy a krku představují asi 5 % všech zhoubných nádorů, což v ČR reprezentuje ročně přibližně 2 000 nemocných. Řadíme mezi ně nádory rtů, dutiny ústní, jazyka, dutiny nosní, paranasálních dutin, laryngu, faryngu, slinných žláz a uší. Histologicky se jedná nejčastěji o spinocelulární karcinomy, vzácně o adenokarcinomy, lymfomy, mukoepidermoidní karcinomy, adenoidně cystické karcinomy, melanomy nebo sarkomy.

Schopnost nádorových antigenů vyvolat buněčnou a humorální imunitní odpověď a výsledky experimentální i klinické imunoterapie ukazují na význam protinádorové imunity. Na druhé straně je známo, že působky produkované nádorem působí mnohdy imunosupresivně. V protinádorové imunitě

hraje významnou úlohu řada buněčných subpopulací. Některé se podílejí na likvidaci nádoru (cytotoxické lymfocyty /CD8+ T lymfocyty/, NK buňky /CD3-CD16+CD56+/, jiné mají funkce imunosupresivní (T_{supresory} T_{reg}). Posuzování stavu imunity u onkologicky nemocných je významné pro možnost zpřesnění prognózy a predikci úspěchu imunoterapie. T lymfocyty, které exprimují CD4 (receptor pro MHC II), CD 25 (α řetězec receptoru pro IL-2) a FOXP3 (transkripční faktor), mají imunosupresivní funkci. Tyto buňky jsou důležité pro udržení tolerance k vlastním antigenům. Experimenty ukazují, že T_{reg} inhibují protinádorovou imunitní odpověď. Bylo také prokázáno, že nárůst počtu T_{reg} lymfocytů u progredujících tumorů je jednou z příčin neschopnosti rejekce nádoru a představuje překážku protinádorové imunoterapie. To podporuje hypotézu, že narůstající CD4+CD25+ T_{reg} populace tlumí protinádorovou imunitu a výsledkem může být urychlení progresu nádoru.

Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na vyšetření vybraných lymfocytárních subpopulací (CD3+, CD3-CD16+CD56+, CD4+, CD8+, CD19+, CD4+CD45-RA+, CD3+CD4+CD25+), hladin imunoglobulinů G, A, M a E a nádorových markerů (CEA, AAT, Cyfra 21-1, SCC a CRP) u skupiny 97 pacientů s maligními nádory hlavy a krku (faryngu 49, dutiny ústní a jazyka 20, laryngu 17, ostatní oblasti 8, neznámé primární oblasti 3). Vyšetření jsme prováděli před zahájením protinádorové terapie. Výsledky jsme korelovali s klinickým stavem a s výsledky vyšetření ostatních laboratorních parametrů a s výsledky vyšetření zdravých dobrovolníků.

U pacientů s recidivou bylo nižší zastoupení NK buněk (CD3-CD16+CD56+), stoupal počet trombo-

Tabulka 1. Vztah vyšetřovaných parametrů ke vzniku recidivy – uvedeny pouze statisticky významné rozdíly. Průměr ± směrodatná odchylka.

	trvá kompletní remise	recidiva	zdraví dobrovolníci
% CD25+ z CD4+ lymfo.	14,8 ± 8,1	18,3 ± 16,4	4,38 ± 1,13
%CD3+CD56+CD16+ z lymfo	12,9 ± 7,0	8,44 ± 2,9	11,5 ± 4,6
Trombo 109 / l	217,2 ± 84,3	312,5 ± 85,0	/

Tabulka 2. Vztah vyšetřovaných parametrů k rozsahu primárního nádoru – uvedeny pouze statisticky významné rozdíly. T1–T4 rozsah primárního nádoru podle TNM klasifikace (T1 primární nádor nejmenšího rozsahu). Průměr ± směrodatná odchylka.

	T1	T2	T3	T4
% CD45RA+ CD4+ z lymfo	11,8 ± 5,85	11,57 ± 7,44	15,92 ± 11,42	20,72 ± 11,79
%CD3+CD56+CD16+ z lymfo	14,56 ± 6,58	10,69 ± 5,28	11,86 ± 6,69	9,04 ± 4,16
IgG g/l	10,63 ± 2,25	11,12 ± 2,07	12,4 ± 2,52	12,97 ± 3,8
Cyfra 21-1 µg/l	1,47 ± 0,79	2,24 ± 2,31	2,37 ± 2,09	2,49 ± 1,77
SCC µg/l	0,59 ± 0,28	0,73 ± 0,51	1,24 ± 1,07	1,63 ± 1,24
AAT g/l	1,47 ± 0,32	1,51 ± 0,33	1,75 ± 0,68	1,72 ± 0,43
CRP mg/l	3,03 ± 5,09	9,05 ± 20,1	17,77 ± 24,65	18,02 ± 19,3
Lymfo 109 / l	0,29 ± 0,09	0,3 ± 0,28	0,25 ± 0,1	0,22 ± 0,06

cytů a T_{reg} (CD3+CD4+CD25+) měly větší rozptýl viz tabulka 1. U obou skupin bylo jejich zastoupení ve srovnání se skupinou zdravých dobrovolníků zvýšené: 14,8% respektive 18,3%. S větším rozsahem nádoru (TNM staging) stoupá zastoupení naivních T pomahačských lymfocytů a induktorů supresorů (CD4+CD45RA+), klesá zastoupení NK buněk, stoupají hladiny IgG, stoupá počet granulocytů, klesá počet lymfocytů, stoupají nádorové markery (SCC, AAT, Cyfra 21-1) a CRP viz tabulka 2.

Naše první výsledky na modelu nádorů hlavy a krku naznačují význam imunologického vyšetření zaměřeného zvláště na subpopulace uplatňující se v regulaci imunity pro posuzování prognózy zhoubných nádorů. Zvláště významná se zdá negativní korelace mezi vznikem recidivy i rozsahem onemocnění a zastoupením NK buněk, vyšší hodnoty CD3+CD4+CD25+ buněk u pacientů, jejichž nádor později recidivoval a korelace rozsahu s CD4+CD45RA+. V další fázi tohoto projektu se zaměříme převážně na změny těchto subpopulací v závislosti na vývoji onemocnění.

Práce vznikla za podpory IGA MZ ČR a MŠMT grant IGA č. 8883-3 a výzkumné záměry č. MSM 0021620813.

Význam kostního markeru ICTP v diagnostice kostních metastáz

Kapustová M.¹, Čwierka K.², Minařík J.², Krejčí E.², Schneiderka P.¹

¹OKB a ²Onkologická klinika, FN Olomouc

Úvod: C-koncový telopeptid kolagenu typu I. (Orion Diagnostika) je testem pro kvantitativní stanovení ICTP v séru a EDTA plazmě. Hladina se zvyšuje společně s progresí kostní metastázy zatímco v remisi zůstává v mezích normy. Jak ukazují i naše zkušenosti, ICTP se zdá být citlivým markerem pro časný záchyt kostních metastáz i pro monitorování účinnosti terapie. Tím se může posunout zahájení terapie a zlepšit tak prognostické faktory ve prospěch pacienta.

Výsledky: V našem souboru je zařazeno 95 pacientů převážně s diagnózou karcinomu prsu.

Prozatím jsme provedli 445 vyšetření a prokázali korelaci mezi scintigrafií a výsledkem vyšetření ICTP. U 14 pacientek jsme vyšetřili hladiny ICTP zpětně od roku 2002 a monitorovali průběh onemocnění. 40 pa-

cientů ze souboru mělo negativní ICTP (u některých potvrzeno i scintigrafií). Senzitivita a specifita tohoto vyšetření se pohybuje kolem 80%.

U pacientů s pozitivní hodnotou ICTP byly prokázány kostní metastázy nebo patologická, blastická kostní přestavba. Na vybraných a předvedených kazuistikách lze pozorovat, že progresi onemocnění v souvislosti s kostními metastázami je zřetelná na zvýšených hodnotách naměřených hladin ICTP.

Závěr: Panel nádorových markerů nelze stanovit paušálně, je nutné ho přizpůsobit klinickému stavu a stadiu onemocnění. Je nutné vyhodnotit význam jednotlivých markerů pro nádor.

Literatura

1. Maemura M, et al. Serum concentration of pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen in patients with metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 2000; 7: 1333–1338.
2. Shimozuma K, et al. Biochemical markers of bone turnover in breast cancer patients with bone metastases: A preliminary report. *Carcinoma. Cancer* 1997; 80: 1760–1767.
3. Aman S, et al. Prediction of disease progression in early rheumatoid arthritis by ICTP, RF and CRP. A comparative 3-year follow-up study. *Rheumatology* 2000; 39: 1009–1013.

Význam chromograninu A pro diagnostiku a léčbu neuroendokrinních tumorů a dalších nádorových onemocnění

Holubec L., Topolčan O., Fínek J.

Radioterapeutické a onkologické oddělení Fakultní nemocnice v Plzni a Centrální izotopová laboratoř LF UK v Plzni

Chromogranin A je bílkovinný prohormon o molekulární hmotnosti 49 kDa. Gen kódující jeho protein na 439 aminokyselinách je umístěn na chromozomu 14. Chromogranin A byl poprvé izolován z chromafinních buněk dřene nadledvin, ale později byl nalezen v sekrečních granulech buněk většiny neuroendokrinních orgánů. Proto je v současné době považován za důležitý marker pro identifikaci neuroendokrinních buněk a nádorů. Dle výsledků některých studií se zdá, že měření chromograninu A v plazmě může sloužit jako cenný diagnostický postup u jedinců s tumory, např. u feochromocytomu, neuroendokrinních tumorů (NET), pacientů s neuroblastomem či u malobuněčného karcinomu plic. Sledování hladin chromograninu A se zdá velmi perspektivní také pro neuroendokrinní fenotyp kar-

cinomu prostaty, špatně reagujícího na androgenní deprivaci. Senzitivita tohoto ve vodě rozpustného glykoproteinu, který má význam především při sledování u nemocných s neuroendokrinními tumory je vyšší než bylo zjištěno pro NSE, CEA nebo metabolit serotoninu, 5-hydroxyindolactovou kyselinu (5-HIOK) či vanil mandlové kyseliny (VMK). Význam tohoto nádorového markeru spočívá především v možné monitoraci účinku protinádorové terapie. Jedná se především o neuroendokrinní tumory, kde je možno pomocí chromograninu A sledovat nejen účinek protinádorové léčby u karcinoidu, ale i u méně diferencovaných neuroendokrinních tumorů jiné etiologie. Jedná se především o monitoraci předpokládaného antiproliferačního účinku analog somatostatinu u gastrinomu a dalších NET. Stejně tak se zdá nadějně sledování chromograninu A u malobuněčného karcinomu plic a u karcinomu prostaty, špatně reagujícího na androgenní deprivaci. Autoři podávají ve svém sdělení základní přehled o možnostech stanovení chromograninu A v diagnostice a léčbě neuroendokrinních tumorů, malobuněčného karcinomu plic a karcinomu prostaty, špatně reagujícího na androgenní deprivaci. Základním problémem zůstává omezená dostupnost stanovení tohoto markeru a nedostatek klinických studií potvrzujících přínos tohoto markeru pro diagnostiku a léčbu výše zmíněných nádorových onemocnění.

Tato studie byla podpořena výzkumným záměrem MSM 0021620819, Náhrada a podpora některých životně důležitých orgánů, LF UK v Plzni.

Naše zkušenosti s diagnostikou karcinomu prsníka pomocí mikrovlnnej rádiometrie

Bella V., Malatin D., Jusko P.

Národní onkologický ústav, Bratislava, Slovensko

Karcinóm prsníka je najčastejším onkologickým ochorením v ženskej populácii. Diagnostika tohto ochorenia sa vykonáva samovyšetrením, klinickým vyšetrením, zobrazovacími metódami, cytologickým a histologickým vyšetrením.

U mladších žien je základnou vyšetrovacou zobrazovacou metódou ultrazvukové vyšetrenie a u starších natívna mamografia. Obe metódy žiaľ nedosahujú 100 % hodnoty senzitivity ani špecificity.

Vo svete sa preto vykonávajú štúdie za účelom nahradenia týchto diagnostických metód, alebo metód na zvýšenie hodnôt senzitivity a špecificity.

Skúšajú sa nové morfológické metódy ale i diagnostické metódy na podklade metabolickom.

Medzi takéto metódy patrí:

- Mikrovlnná rádiometria
- Elektromagnetická impedancia
- Transluminiscencia

V našej praxi sme vyšetřili pacientky pomocou mikrovlnnej rádiometrie. Zamerali sme sa hlavne na vyšetřenie prsníkov. Vyšetřenie absolvovalo 221 pacientok. Štatistickým výpočtom sme zistili 89% senzitivitu a 78 % špecificitu.

PŘÍKLAD: PACIENTKA F.L. – HOTNOTY VYŠETŘENÝCH MARKERŮ

F. L. 1972	ICTP	CEA	CA153	
16. 2. 2004	20,6	9,6	37,5	
30. 7. 2004	10,21	22	69,8	SCINTI – LOŽISKA
16. 6. 2005	12,85	10	33,6	PROGRESE
29. 7. 2005	7,15	47,4	77,4	META Th PÁTEŘE
15. 8. 2005	8,65	68,2	80,6	
23. 9. 2005	60,4	109,4	90	CHEMOTERAPIE
24. 10. 2005	14,8	166,1	113,3	
17. 2. 2006	28,7	288,5	161,3	PROGRESE
22. 3. 2006	15,1	285,9	155,1	
7. 4. 2006		285	169,7	

Záver: Vyšetrenie prsníkov pomocou mikrovlnnej rádiometrie má svoje opodstatnenie a je potrebné zaradiť toto vyšetrenie do algoritmu vyšetrovacích zobrazovacích metód ochorení prsníkovej žľazy.

Genetic polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes and their association with colorectal cancer

Hlavatá I.¹, Vodičková L.¹, Vodička P.³, Šůsová S.¹, Novotný J.², Souček P.¹

¹Group for Biotransformations, Center of Occupational Medicine, National Institute of Public Health, Prague; ²1st Medical Faculty of Charles University and Department of Oncology, General Teaching Hospital, Prague; ³Department of Genetic and Molecular Toxicology, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Prague

Background: Carcinogenesis is a complex process associated with genetic and lifestyle factors. One

of the most common forms of cancer is colorectal cancer (CRC). CRC affects approximately 5% of worldwide population. More than 75% of CRC cases represent sporadic forms. Susceptibility to nonhereditary CRC is significantly influenced by polymorphisms and mutations in low-penetrance genes. Genetic polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes may result in variations in detoxification capacity and thus influence the levels of carcinogenic compounds and subsequently the risk of cancer. Therefore, we aimed to study associations of polymorphisms in genes coding biotransformation enzymes with CRC. Based on frequency in Czech population and functional effects we selected polymorphisms in CYP1B1, EPHX1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, NQO1 and SOD2.

Materials and Methods: Through the PCR RFLP and DNA sequencing analysis we followed their prevalence in groups of 500 CRC patients and 500 controls.

Results: Statistical analysis showed: 1) the lack of association of particular polymorphisms with CRC risk in unselected population. 2) Female carriers of

variant genotype in NQO1 were at significantly higher risk of CRC in comparison with those carrying normal genotype. There was no association of this polymorphism with CRC risk in males, but previously we reported its role in breast cancer in Czech and Austrian populations. 3) Age played no role as confounding factor.

Conclusions: First study of this kind on Czech population showed that polymorphisms in xenobiotic-metabolizing enzymes may present risk factors in CRC. Further study should be focused at searching for differences in exposure between genders and assessment of importance of polymorphism combinations. Identified risk modifying factors may be used for formulation of preventive and therapeutic strategies.

This project was supported by grants of the Grant Agency of the Czech Republic, grant no.: 310/05/2626 and Internal Grant Agency of Czech Ministry of Health, grant no.: 8563-5.

7. PREDIKTIVNÍ FAKTORY III

Předsedající: PEŠEK M., BERKOVCOVÁ J., HOLUBEC L.

Pátek / 8. 12. 2006 – 14.40–15.55

Mutace k-ras onkogenu v predikci účinnosti terapie inhibitory tyrosinkinázy (EGFR) u nemalobuněčného karcinomu plic
Pešek M.¹, Benešová L.², Belšánová B.², Brůha F.¹, Mukenšnabl P.¹, Jančaříková D.¹, Krejčí J.¹, Minárik M.²

¹FN Plzeň, klinika nemocí plicních a tuberkulózy

²Genomac Praha

Úvod: Nález mutace onkogenu k-ras je u nemalobuněčných karcinomů stále častěji považován za významný nepříznivý prognostický faktor. Současně je tato mutace pokládána za negativní prediktor účinnosti inhibitorů tyrosinkináz, jako jsou například inhibitory genu pro EGFR (gefitinib a erlotinib).

Metodika a pacienti: Cytologické a histologické preparáty nádorové tkáně nemocných léčených pro nemalobuněčný karcinom plic gefitinibem v rámci programu časného přístupu v letech 2002–2005 byly vyšetřeny na přítomnost mutací genu pro EGFR. Podle typu preparátu a zastoupení tumorózní tkáně byly nádorové buňky vybírány makro- nebo mikrodisekčními technikami. K-ras mutace byly vyšetřovány současně v kodonech 12 a 13 pomocí metody založené na separaci heteroduplexů v teplotním gradientu s použitím multikapilárního DNA sekvenátoru. U nemocných byla hodnocena frekvence léčebných odpovědí, doba do progresu a přežití od zahájení léčby a přínos eventuelní následné terapie.

Výsledky: Soubor zahrnoval 133 nemocných, mutace k-ras onkogenu byly nalezeny u 22 nemocných, 16 mužů a 6 žen. Střední doba léčby gefitinibem činila 63 dní, rozmezí 1–345 dní. Devět pacientů bylo gefitinibem léčeno déle než 5 měsíců, po skončení léčby gefitinibem dostalo další onkologickou léčbu ještě šest nemocných, kteří dále žili 4,6–20 měsíců, medián přežití od ukončení léčby v této podskupině byl 1 rok. U jednoho nemocného byly prokázány jak mutace EGFR, tak i mutace k-ras onkogenu, tento nemocný zemřel devět měsíců od zahájení terapie gefitinibem, příčinou úmrtí byl duplicitní karcinom slinivky břišní.

Závěr: I když jsou mutace k-ras onkogenu nepříznivým ukazatelem prognózy nemalobuněčného karcinomu plic, neznamena jejich zjištění automaticky důvod nepodat nemocnému biologicky cílenou terapii inhibitory tyrosinkinázy EGFR. Jejich podání bude záviset na vyhodnocení dalších parametrů, na možnostech i jiné terapie a především na celkovém stavu pacienta.

Comparative analysis of somatic K-RAS gene mutation frequency in the clinical NSCLC specimens

Wiecek S., Berkovcová J., Janošťáková A., Hajdúch M., Danuta R., et al

Laboratory of Experimental Medicine, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Palacky University and Faculty Hospital in Olomouc. McGill University, Faculty of Medicine, Department of Experimental Medicine and Department of Human Genetics.

Accurate and reliable oncological diagnosis is an important tool that facilitates selection of the most efficient treatment available. Based on the somatic and autosomal genetic makeup of a particular cancer patient, treatment selection can be customised to provide maximum potential benefit to the patient. The identification of somatic mutations in the K-RAS gene can provide very useful information regarding the responsiveness of cancer patients (especially smokers) to selected drugs. However, screening of cancerous tissue specimens collected during biopsies and surgeries is not yet routinely performed due to the lack of a cost-efficient and well-standardized detection method, sufficiently reliable for the detection of somatic mutations in heterogeneous oncological specimens. Several alternative K-RAS mutation detection sequencing and non-sequencing methods have been described in the literature. We have selected three methods and have compared their reliability in detecting K-RAS mutation frequency in clinical specimens. Analysis of seventy one NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) biopsy samples employing the nested-PCR method of DNA amplification failed to detect any K-RAS mutations after direct dideoxy sequencing (BigDye Terminator). The subsequent the same cohort of patients' specimens, using direct genomic DNA as a template for the amplification of a PCR fragment for sequencing, resulted in a finding that 3% of the specimens contained somatic mutations in either codon 12 or codon 13 of the K-RAS gene. This comparison clearly demonstrates the inferiority of a nested-PCR method compared to single PCR amplification of genomic DNA template. A BigDye-termination method following regular PCR amplification of the genomic DNA template represents a reliable and reproducible method that allows finding K-RAS gene mutation(s) but the extracted genomic DNA template should contain at least 30% of mutated at the K-RAS locus DNA. Therefore, in some cases when less than 30% of genomic DNA comes from non-mutated cells, this analysis

may not detect an existent mutation. Furthermore, these results suggest that the nested PCR, which by definition re-amplifies the targeted DNA fragment, should be avoided when using genomic DNA isolated from specimens that are likely to contain both nonmutated normal tissue, and cancer cells that may contain somatic mutations in the K-RAS gene. The observed difference in frequency of detection of K-RAS mutations between the two methods most likely results from preferential amplification of non-mutated DNA. This bias could lead to a distortion of the results when the PCR amplification step is repeated. The ratio between the non-mutated and mutated genomic DNA can be reliably assessed by using a pyrosequencing method. The pyrosequencing method is designed not to be influenced by differences in amplification efficiency. Even when less than 10% of the DNA present in the genomic specimens is mutated, it can still be reliably quantified and sequenced using this method. Therefore, we intend to employ the Biotage PyroMark pyrosequencing method to analyse the same genomic DNA samples that were previously analyzed by the two methods described above. We anticipate that using the pyrosequencing method will allow us to establish the ratio between genomic DNA that is mutated or nonmutated at the K-RAS locus, and will improve our ability to detect K-RAS mutations in our cohort.

The project was supported in parts from grants MSM6198959216 and MPO 1H-PK/45.

Vznik rezistence adenokarcinomu plic na původně úspěšnou biologicky cílenou léčbu v důsledku získané mutace genu EGFR

Jančaříková D.

FN Plzeň

Případ 32letý pacient nekuřák s nevýznamnou rodinnou anamnézou s diagnózou adenokarcinomu levé plic T4N0M0 st. III. B. Pacient prodělal 6 cyklů terapie preparáty Tarceva, Gemzar a Cis DDP a na tuto léčbu zareagoval kompletní remisí onemocnění. 15 měsíců po započetí léčby však došlo k recidivě onemocnění i přes další terapii preparáty Tarceva a poté Iressa. V té době již byly prokázány metastázy ve skeletu a mozku, dále perikardiální výpotek. Za dalších 7 měsíců pacient zemřel. Genetické vyšetření nádorové tkáně při začátku terapie ukázalo mutace dvou exonů genu pro EGFR (prosím přesně uvést typy), později, při relapsu onemocnění tyto mutace byly stále přítomny, ale navíc se nově prokázala mutace T 790M, která je dle literárních údajů prediktorem získané rezisten-

ce na inhibitory tyrozinkinázového receptoru EGFR. Příznivý efekt kombinované chemoterapie a erlotinibu v první linii patrně souvisel s typem nádoru, nekuřáctvím pacienta, výskytem kožního exantému a s přítomností mutací genu pro EGFR. Rezistence nádoru, která se vyvinula při léčbě erlotinibem a byla patrná při změně terapie na gefitinib (je zřejmě důsledkem selekce nádorových buněk nesoucích mutaci T 790 M). Protože tento druh mutace může být přítomen i v době stanovení diagnózy, autoři doporučují vyšetřit přítomnost této mutace u vybraných pacientů před zahájením biologicky cílené léčby inhibitory tyrozinkinázy.

**Prognostické faktory nádorů
ORL oblasti**

Cvek J.¹, Šeneklová Z.¹, Soumarová R.¹, Sokol V.¹, Blasch P.²

¹Onkologické Centrum J.G. Mendela, Nový Jičín;
²Oddělení Patologie, NsP Frýdek-Místek

Léčba pokročilých stádií karcinomů ORL oblasti je svízelná a výsledky jsou stále neuspokojivé.

U resekabilních nádorů se jeví jako optimální provedení primárního chirurgického výkonu s následnou adjuvantní radioterapií, event. radiochemoterapií. V případě, že by chirurgický výkon znamenal neúměrnou mutilaci pacienta, je metodou volby kurativní radioterapie, event. radiochemoterapie. Efekt této léčebné modalitě lze částečně odhadovat s ohledem na rozsah poškození, nicméně léčebná odpověď často nekoreluje s původním předpokladem. Tento příspěvek se zabývá možností predikovat léčebnou odpověď na základě imunohistochemické analýzy epiteliálních karcinomů oblasti hlavy a krku.

Materiál a metody: V období 1–12/ 2005 byly retrospektivně stanoveny imunohistochemické parametry bioptického materiálu u 21 pacientů, kteří podstoupili prim. radioterapii (event. radiochemoterapii) pro lokoregionálně pokročilý (stadium III–IV) epiteliální karcinom ORL oblasti. Stanoveny byly následující parametry: Bcl-2...regulátor apoptózy, Ki67...proliferační marker, cyklin D1...regulátor buněčného cyklu, G1-S checkpoint, CD31...marker angiogeneze, p53...transkripční faktor, regulátor buněčného cyklu a apoptózy.

Radioterapie byla u všech pacientů provedena technikou IMRT, 7 koplanárních polí, 6MeV. Stan-

dardní frakcionace 70–74 Gy: 7 pac. Standardní frakcionace 70–74 Gy s konkomitantní CHT CDDP 40 mg/m² weekly: 8 pac. Konkomitantní boost 72Gy: 6 pac. Léčebná odpověď byla hodnocena 3 měsíce od ukončení léčby za pomoci ORL vyšetření a CT.

Výsledky: Míra exprese Bcl-2 byla skórována stupnicí 0–3, pozitivita (stupně 1–3) byla zaznamenána u 6 pac. Kompletní remise – CR 3 měsíce od ukončené léčby bylo dosaženo u 16 pacientů z 21, tedy 76%. V případě karcinomů vykazujících Bcl-2 pozitivitu bylo CR dosaženo u 6 pac. ze 6, tedy ve 100% případů. Korelace mezi dalšími imunohistochemickými znaky a léčebným výsledkem nebyla v tomto malém souboru zaznamenána. Bcl-2 pozitivitu vykazovala v tomto souboru necelá 1/3 lokoregionálně pokročilých karcinomů ORL oblasti, tato Bcl-2 pozitivita signalizuje dobrou odpověď na primární radioterapii, event. radiochemoterapii.

Závěr: Protein Bcl-2 je znám jako významný regulátor apoptózy, jeho exprese inverzně koreluje s výskytem apoptózy. Na druhé straně byla paradoxně zaznamenána lepší prognóza u některých solidních tumorů exprimujících protein Bcl-2 (karcinom prsu, ovária, plic, kolorektální karcinom a karcinomy ORL oblasti). Tento rozpor ukazuje na komplexní úlohu rodiny Bcl proteinů v regulaci apoptózy.

S ohledem na tyto a některé minulé výsledky (1) lze konstatovat, že v případech, kdy lze obtížně rozhodnout o primární léčebné modalitě (chirurgie vs. radioterapie) lze do rozhodovacího procesu zahrnout imunohistochemické stanovení exprese Bcl-2.

Literatura

1. Buffa FM, et al. Molecular Marker Profiles Predict Locoregional Control of Head and Neck squamous Cell Carcinoma in Randomized Trial of continuous Hyperfractionated Accelerated Radiotherapy. Clin C Research 2004; 10.

**Prognostický a prediktivní význam
nádorových markerů u pacientů
s kolorektálním karcinomem**

Holubec L., Topolčan O., Fínek J., Pešta M., Rupert K., Sutnar A., Liška V., Kormunda S., Vrzalová J., Třeška V.

Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta v Plzni

Indikace vyšetření nádorových markerů u karcinomu tlustého střeva mají své limity. Jedná se o doplňkovou diagnostickou metodu se svým

konkrétním významem a přesností pro každou diagnózu. Pro správnou interpretaci výsledků je proto nezbytná nejen správná volba nádorových markerů, ale především způsob jejich klinického vyhodnocení, které vyžaduje úzkou interdisciplinární spolupráci mezi klinikem a laboratorním pracovníkem.

U nádorů tlustého střeva a konečnicku je hlavním stanovovaným markerem karcinoembryonální antigen (CEA). Jako marker druhé volby je doporučován CA 19–9. Jako optimální je doporučována kombinace těchto dvou markerů. K dalším markerům, které jsou studovány v souvislosti s kolorektálním karcinomem patří CA 72–4, dále pak další nádorové markery CA typu (CA 242, CA195), proliferační markery (TPA,TPS) a řada dalších.

Na základě zkušeností z dlouholetého rutinního sledování a závěrů klinických studií podávají autoři v konfrontaci s literaturou stručný přehled o využití konvenčních nádorových markerů, proliferačních nádorových markerů, cytokeratinů a adhezivních molekul pro prognózu, diagnostiku a léčbu kolorektálního karcinomu. Pro prognózu lokálně pokročilého tumoru se jeví jako nejlepší karcinoembryonální antigen (CEA). Jako nezávislý prognostický faktor před podáním adjuvantní chemoterapie se jeví nádorový marker CA 19–9. Pro kontrolu efektu chemoterapie na bázi 5-FU se jeví jako optimální proliferační marker thymidinkináza. Pro monitoraci úspěšnosti resekce jaterních metastáz se jako optimální jeví cytokeratinové nádorové markery. Pro časnou detekci relapsu onemocnění v průběhu dispenzární péče bylo dosaženo nejvyšších senzitivit u CEA a adhezivní molekuly ICAM-1, jejichž vzájemná kombinace se zdá být perspektivní i pro rutinní použití. Na závěr autoři prezentují algoritmus využití nádorových markerů u kolorektálního karcinomu v rutinní klinické praxi.

Tato studie byla podpořena grantem IGA MZ CR NR 7905-03, IGA NR 7894-3 a výzkumným záměrem MSM 0021620819, Náhrada a podpora některých životně důležitých orgánů, LF UK v Plzni.

8. POKROKY V KLINICKÉ DIAGNOSTICE ZHOUBNÝCH NÁDORŮ I

Předsedající: ŽALOUĐÍK J., MIHÁL V., HAJDÚCH M.

Pátek / 8. 12. 2006 – 16.10–18.00

Role chirurga v diagnostice nádorových onemocnění

Žaloudík J.

Masarykův onkologický ústav v Brně.

Chirurg stojí často před úkolem bioptického odběru tkání od pacienta s nádorovým onemocněním. Význam takového mnohdy drobného zákroku však bývá neprávem podceňován. Důležitost biopsií vystupuje do popředí zejména v současné době individualizace léčby zhoubných onemocnění podepřené vývojem nových diagnostickoterapeutických metod. Bioptický vzorek je stěžejním článkem v základním rozhodování benignita – malignita a dále jedinečným zdrojem pro stanovení prognostických a prediktivních faktorů, na jejichž základě volíme optimální léčebný postup. V kontrastu k běžnému histopatologickému vyšetření, kde princip a zásady správného odběru tkání jsou všeobecně známy, v posledních letech narůstá význam molekulárních vyšetření, pro jejichž úspěšné provedení musí chirurg při odběru zohlednit některé odlišné principy. Přednáška podá přehled úlohy chirurga při správném provádění biopsií a transportu biologického materiálu v návaznosti na novější laboratorní metodiky a na příkladech z vlastní praxe bude demonstrovat, jak může iniciální přístup operátora rozhodujícím způsobem ovlivnit správnost diagnózy a léčebného postupu u onkologických pacientů.

Co předurčuje špatné léčebné výsledky adolescentní ALL?

Mihál V.¹, Pospíšilová D.¹, Novák Z.¹, Jarošová M.², Holzerová M.², Hajdúch M.³

¹Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci;

²Hemato-onkologická klinika LF UP a FN v Olomouci;

³Laboratoř experimentální medicíny Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci

Akutní lymfoblastická leukémie je nejčastějším typem leukémie a nejčastěji léčeným nádorovým onemocněním u dětí. Pokrok v léčbě ALL vedl obecně k lepší míře přežívání, nicméně benefit u dětí je daleko větší než u dospělých. Boissel a spol. upozornili, že významným faktorem může být aplikace odlišných léčebných režimů („rozdílnost v léčebných přístupech/režimech užívaných dětskými a dospělými hematology). Když porovnali výsledky 15–20letých adolescentů s ALL, kteří byli léčeni ve Francii buď „pediatrickým“ protokolem FRALLE-93 nebo „dospělým“ LALA-94, byly velké rozdíly zazna-

menány v přežívání bez události (EFS) po 5 letech léčby (67% vs 41%), ale i v přežívání bez známek onemocnění (72% vs 49%), všechno ve prospěch pediatrické skupiny.

Velmi pečlivě provedenou studii o signifikantní diferenci v přežití adolescentů s ALL v závislosti na druhu léčebného protokolu publikovala holandská hemato-onkologická kooperativní skupina v roce 2004. Adolescenti léčení podle pediatrických DCOG protokolů měli v 5 letech od diagnózy o 35% vyšší pravděpodobnost přežití než dospívající pacienti na protokolech HOVON. Pro adolescenty ve věku 15–18 let bylo na protokolech DCOG 5leté EFS 69%, což bylo statisticky signifikantně vyšší než EFS u pacientů na protokolech HOVON (34%; P = 0,0001).

V České republice jsou pacienti s ALL léčení v dětských onko-hematologických centrech až do věku 18 let. Provedli jsme hodnocení celkového přežití v letech 1995–2003 u starších dětí a dospívajících s ALL ve věku 15–18 let, kteří byli léčeni protokolární léčbou (ALL-BFM 95 a ALL IC-BFM 2002) a celkové přežití mladých dospělých pacientů s ALL (ve věku 19–22 let). Pacienti léčení pediatrickými protokoly vykázali medián přežití 62,3 měsíců, pacienti na protokolech pro dospělé pouze 29,2 měsíců. Deseti procentní rozdíl celkového přežití nebyl statisticky významný (p = 0,494). Jako zdroj informací jsme využili Národní onkologický registr, ÚZIS ČR.

Provedli jsme analýzu rozdílů všech publikovaných srovnávacích studií. Za nejpravděpodobnější vysvětlení rozdílných léčebných výsledků adolescentů a mladých dospělých na „nepediatrických“ protokolech se nabízí následující vysvětlení: a) významně nižší celková kumulativní dávka metotrexátu, b) nekonstantní zařazování části reindukční/intenzifikační léčby, c) krátká nebo žádná udržovací léčba, d) častá indikace autologní transplantace kmenových buněk, e) delší časový interval mezi jednotlivými cykly chemoterapie, f) významné rozdíly v kumulativní dávce některých dalších cytostatik: 6-merkaptopurin, dexamethazon, L-asparagináza a vinkristin aj., g) horší citlivost na chemoterapii a h) menší compliance s léčbou u adolescentů a mladých dospělých.

Analýzy všech retrospektivních studií prokazují, že pacienti v adolescentním věku i mladí dospělí mohou mít značný benefit z pediatrických léčebných přístupů, které mohou být vhodně adaptované pro pacienty této věkové skupiny. Jedinou zemí na světě, kde po vážné konzultaci dětských a dospělých hematologů již byly připraveny speciální léčebné

protokoly pro adolescenty a mladé dospělé (Adolescents and Young Adults – AYA), je zatím pouze Velká Británie.

Vyšetřování HER2 receptoru u nově diagnostikovaných případů karcinomu prsu v České republice

Nový F., Vávra T. a 72 českých patologů ROCHE s.r.o.

Úvod: V České republice je ročně diagnostikováno více než 6000 nových případů karcinomu prsu. HER2 pozitivita nádorových buněk je důležitým negativním prognostickým faktorem při tomto onemocnění a současně prediktivním faktorem účinku léků zaměřených proti HER2 receptoru. V nedávné době publikované studie prokázaly účinnost trastuzumabu v adjuvantní léčbě časného HER2-pozitivního karcinomu prsu. Stanovení HER2 se proto stává nezbytnou součástí vyšetření každého bioptického vzorku karcinomu prsu. Cílem této studie bylo zmapování stavu vyšetřování HER2 v České republice a zjištění četnosti HER2 pozitivivity u nově diagnostikovaných karcinomů prsu.

Metoda: Obrátili jsme se na patologická pracoviště uvedená v adresáři Společnosti českých patologů a požádali je o poskytnutí dat o výsledku histopatologického vyšetření všech případů karcinomu prsu nově diagnostikovaných ve druhém čtvrtletí 2006. V jednoduchém dotazníku byly zaznamenány údaje o histologickém typu nádoru, jeho histopatologickém stupni, velikosti, postižení uzlin, stavu hormonálních receptorů a zejména o způsobu a výsledku vyšetření HER2.

Výsledek: Šetření se účastnilo celkem 72 pracovišť, která poskytla data o více než 1600 nemocných. Při zpracování dat se zaměříme na zjištění četnosti HER2 pozitivivity, její korelaci s histologickým typem, stupněm, velikostí nádoru a stavem hormonálních receptorů. Pokusíme se zjistit, zda existují rozdíly ve výsledcích mezi „malými“ a „velkými“ pracovišti nebo při použití různých metod stanovení HER2 pozitivivity.

Detekce statusu genu her-2/neu z parafinových řezů u karcinomu prsu metodou kvantitativní real-time PCR
Berkovcová J.¹, Trojanec R.^{1,4}, Radová L.¹, Kolář Z.^{3,4}, Janošková A.¹, Mlčochová S.^{1,4}, Hajdúch M.^{1,4}

¹Laboratoř experimentální medicíny, Dětská

klinika FN a LF UP v Olomouci;

²Onkologické oddělení FN a UP v Olomouci;

³Laboratoř molekulární patologie při Ústavu patologie, LF UP v Olomouci;

⁴Referenční laboratoř pro c-erbB-2, LF UP v Olomouci;

*Autoři se na práci podíleli stejnou mírou

Amplifikace a/nebo overexprese genu *her-2/neu*, lokalizovaném na chromozómu 17 (17q11,2–12), předpovídá nepříznivou prognózu u pacientek s karcinomem prsu. Pro tyto pacientky je indikována cílená léčba humanizovanou monoklonální protilátkou trastuzumab (Herceptin®). Pro správnou indikaci pacientek je nutné kvalitní vyšetření Her-2/neu, a to i z důvodu chystaného zařazení Herceptinu do adjuvantní léčby a tím rozšíření počtu léčených případů. V onkologické praxi jsou pacientky vyšetřovány imunohistochemicky na úrovni proteinu Her-2/neu. Případy s detekovanou overexpresí jsou ověřovány metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), určující počet kopií genu *her-2/neu* v jádře. Na základě zkušeností Referenční laboratoře (RL) pro stanovení statusu Her-2/neu, jejíž úlohou je verifikace výsledků vyšetření Her-2/neu u pacientek indikovaných k léčbě Herceptinem, přibližně u 4% pacientek nelze *her-2/neu* pomocí metody FISH stanovit.

Z tohoto důvodu jsme navrhli a standardizovali metodu detekce statusu *her-2/neu* genu pomocí kvantitativní metody real-time PCR (Q-PCR). Zavedená duplexní Q-PCR umožňuje kvantitativní detekci *her-2/neu*, která je porovnávána s kvantitativní detekcí referenčních genů. Jako referenční byly vybrány geny, které leží na chromozómech s nepřilíh častou početní změnou v buňkách karcinomu prsu: gen *gsc1* lokalizovaný na chromozómu 2 (2p13–p12) a gen *dck* lokalizovaný na chromozómu 4 (4q13,3–q21,1). Dále byl použit gen *epn2*, který leží na krátkém raménku chromozómu 17 (17p11,2). Srovnání s genem *epn2* je využíváno pro odlišení polyzomie chromozómu 17. Metoda byla standardizována na sérii 225 patientských vzorků o známém statusu genu *her-2/neu*. Vzhledem k vysoké hladině spolehlivosti (95%) byla metoda Q-PCR zavedena do standardního postupu při vyšetřování genu *her-2/neu*, u případů s neproveditelnou FISH.

Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216 a MPO 1H-PK/45.

Sledování exprese genu ERBB2 v korelaci s proliferací a aktivitou u synoviálních sarkomů

Krsková L., Augustiňáková A., Hilská I., Kalinová M., Mrhalová M., Břízová H., Neradová M., Kodet R.

Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

Cíl práce: Kvantitativní detekce exprese genu ERBB2 u synoviálních sarkomů (SynSa) na RNA úrovni. Korelace výsledků s imunohistochemií, fúzním genem a proliferacním markerem Ki-67.

Materiál a metody: Vyšetřili jsme vzorky 32 pacientů se synoviálním sarkomem (20 mužů, 12 žen) charakterizovaných morfologicky a translokací t(X;18), která je pro synoviální sarkomy specifická. 20 pacientů mělo fúzní gen SYT/SSX1 a 12 fúzní gen SYT/SSX2.

Výsledek: Overexprese proteinu ERBB-2 a amplifikace genu ERBB2 byla popsána jako prognostický faktor u pacientů s invazivním duktálním karcinomem mléčné žlázy. V současné studii jsme prokázali vysokou expresi ERBB2 mRNA u celé skupiny nemocných se SynSa a to ve srovnatelné hladině s karcinomy mléčné žlázy s 2+/3+ pozitivitou stanovenou imunohistochemicky. Vysoká exprese mRNA ERBB2 byla v diskrepanci s imunohistochemickým vyšetřením, které bylo ve všech případech negativní (HerceptTest maximálně 1+). Expese ERBB2 na úrovni mRNA nekoreluje ani s fúzním genem SYT/SSX1 versus SYT/SSX2, ani s pohlavím, věkem pacientů, lokálními recidivami a metastatickým postižením. Vysoká exprese ERBB2 koreluje s vysokou proliferací a aktivitou nádoru měřenou pomocí Ki-67 mRNA a s vysokou expresí mRNA cyklinu D1.

Závěr: Z dosažených výsledků je patrné, že cílená terapie proti ERBB-2 receptoru pomocí monoklonální protilátky trastuzumab nemá u synoviálních sarkomů opodstatnění, jelikož mechanismus trastuzumabu vyžaduje povrchovou expresi ERBB-2 receptoru na většině nádorových buněk.

Tento projekt je podporován grantem GAUK 200 052, 63/2005/C, IGFNM 9756, výzkumným záměrem MSM 0021620813 a výzkumným záměrem FNM MZO 00064203, 6704.

Molekulárně biologické vyšetření Ewingova sarkomu hrudní stěny - výskyt a význam sekundárních změn Vícha A.¹, Sumerauer D.¹, Procházková P.¹, Kodet R.², Kodetová D.², Hraběta J.¹, Eckschlagner T.¹

¹Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK, a FN v Motole; ²Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK, a FN v Motole

Nádory skupiny Ewingova sarkomu (ES) jsou po osteosarkomu druhými nejčastějšími primárními maligními nádory kostí starších dětí a mladých dospělých. Postihují často pánevní kosti, dlouhé kosti dolních končetin a hrudníku a měkké tkáně. Meta-

stazují nejčastěji do plic, kostí a kostní dřeně, vzácněji do uzlin, jater a mozku. ES se vyznačuje specifickými chromozomálními aberacemi postihujícími 22. chromozom – translokací t(11;22), méně často t(21;22), sporadicky se mohou vyskytnout i další. Translokace specifické pro zařazení do skupiny ES spojují část genu EWS lokalizovaného na 22. chromozomu s některým z genů rodiny ETS (FLI-1, ERG, ETV-1, EIAF, FEV).

Kromě těchto specifických translokací nacházíme u ES sekundární změny jako jsou trizomie a tetrazomie 8. a 12. chromozómu a nebalancovaná translokace t(1;16), vedoucí k delecí 16q a ke zmnovění 1q. Význam průkazu těchto změn pro prognózu je v současné době předmětem intenzivního výzkumu. Zdá se, že t(1;16) a zmnovění 8. chromozómu jsou známkou horší prognózy.

V naší práci jsme se zaměřili na nádory hrudní stěny. Tyto nádory se vyskytují asi ve 20% všech případů a jejich prognóza je oproti celé skupině horší i při možnosti resekce nádoru, proto jsme předpokládali, že u této skupiny mohou být časté nebo jiné sekundární aberace. K průkazu translokací specifických pro ES jsme využili RT-PCR. Sekundární změny jsme prokazovali komparativní genomovou hybridizací. Vyšetřili jsme 11 pacientů s mediánem sledování 1 rok (5,8–0,25), v CR je 7, PR 2 a 2 pacienti zamřeli. Primárně byly prokázány metastázy u 3 pacientů (2 exitus). Translokací t(11;22) nebo t(21;22) jsme prokázali u 10 pacientů. Sekundární změny jsme našli u všech pacientů, kromě jednoho. Častějšími byla trizomie 8. (4x), 2. (3x) a 12. (2x) chromozómu, ve dvou případech jsme zastihli změny odpovídající translokaci (1;16). Prokázali jsme oproti literatuře častější výskyt delecí a ve shodě s ní nejčastěji na 16. chromozómu. Velmi zajímavý je nález zmnovění části nebo celého chromozómu 13 u 4 pacientů vždy postihující oblast 13q21.2–31. Na naší skupině pacientů jsme prokázali častěji přítomnost sekundárních změn než je u ES popisované. Nejčastější změnou byla trizomie 8., 2. a 12. chromozómu. Významnou může být zmnovění části 13. chromozómu, které se pokusíme dále studovat. Naše nálezy naznačují, že u ES hrudní stěny by výskyt sekundárních chromozomálních aberací mohl být skutečně častější.

Práce byla podpořena: MSM 0021620813 a MZO 00064203

9. NÁDOROVÁ GENOMIKA A PROTEOMIKA

Předsedající: KOVÁŘOVÁ H., SVOBODA M., HAJDÚCH M.

Sobota / 9. 12. 2006 – 8:30–10:30

Nádorová genomika nebo proteomika?

Možnosti a limitace obou metod

Hajdúch M.^{1,2}, Džubák P.¹, Dziechciarková M.¹, Podolonovičová J.¹

¹Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc;

²Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Proteomika je celosvětově jednou z nejrychleji se rozvíjejících technologií nezbytnou pro pochopení genetické informace získané sekvenováním řady genomů včetně genomu člověka. Naše pracoviště se dlouhodobě zabývá vývojem protinádorových léčiv, identifikací jejich mechanismů účinku a hledáním prognostických a prediktivních markerů nádorových onemocnění na genomické i proteomické úrovni. V letošním roce jsme řešili dilema, kterou z těchto technologií pro další směřování výzkumu na našem pracovišti upřednostníme a finálně jsme se rozhodli pro proteomiku a pořízujeme MALDI-TOF hmotnostní spektrometr s možností klinické proteomiky a zejména MALDI-Imagingu. Důvody byly zejména v lepší možnosti studia nádorových biomarkerů, analýzy post-translačních modifikací, jmenovitě fosforylací, acetylací a glykosylací, případně i jiných zajímavých modifikací u konkrétních proteinů. Nicméně genomické technologie poskytují v současnosti komplexnější pohled na expresní profil nádorové buňky a umožňují profilování i z minimálního množství biologického materiálu díky možností lineární amplifikace DNA/RNA. V našem krátkém sdělení budeme diskutovat výhody a nevýhody obou technologií v klinickém onkologickém výzkumu a demonstrovat je na vlastních výsledcích.

Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216, GAČR 301/05/0418, NR/9076 a FT-TA/027.

Proteomika v biomedicině

Kovářová H., Skalníková H.

Sekce Reprodukční a vývojové biologie

Ústav živočišné a fyziologie a genetiky AV ČR

Rychlý rozvoj řady klíčových technologií a metodologií v průběhu posledních 10 let je podkladem pro dynamický proteomický výzkum. Před mnoha proteomickými pracovišti leží nyní výzva k využití těchto moderních technologií k poznání komplexních biologických systémů. Přednáška se zaměří zejména na biomedicínské aplikace proteomiky.

Molekulární taxonomie karcinomu prsu: „basal-like“ karcinom

Svoboda M.^{1,2}, Grell P.^{1,2}, Fabián P.³, Palácová M.¹, Foretová L.⁴, Hrstka R.⁵, Petráková, K.¹, Nenutil R.³, Hajdúch M.⁶, a Vyzula R.^{1,2}

¹Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav v Brně (MOÚ);

²Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně (LF MU); ³Oddělení patologie, MOÚ; ⁴Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, MOÚ; ⁵Základna experimentální onkologie, MOÚ; ⁶Laboratoř experimentální medicíny FN a LF UP Olomouc

Pacientky s karcinomem prsu sdílející stejná diagnostická a prognostická kritéria stále vykazují značné rozdíly ve vývoji onemocnění, a to i přes jednotnou protinádorovou léčbu. Příčina těchto diskrepancí může být jak ve stávající histopatologické klasifikaci, tak i v prognostických systémech používaných v klinické praxi. V obou případech jsou do stejných skupin zařazovány karcinomy s odlišným molekulárním profilem a biologickým chováním, neboť histopatologická taxonomie je založena výhradně na morfologických parametrech a prognostické systémy zohledňují pouze velmi limitovaný počet molekulárních prediktivních markerů. Platí-li základní dogma biologických systémů, potom lze diverzitu fenotypu nádorových buněk sledovat na úrovni jejich genomu. Komplexnost těchto změn však předpokládala analýzu stovek až tisíců genů, kterou bylo možné realizovat až pomocí DNA čipů. Na podkladě těchto analýz vznikla v roce 2003 dosavadní struktura molekulární taxonomie karcinomu prsu, vytvořená na základě podobnosti genové exprese mezi primárními tumory, tkání ze zdravé prsní žlázy a nádorovými liniemi, jež byly ustaveny z odlišných buněčných komponent tumorů (například z buněk bazálního a lumenálního epitelu). Pro první skupinu takto definovaných karcinomů je charakteristická přítomnost exprese estrogenového receptoru- α a cytokeratinů buněk lumenálního epitelu (cytokeratin 8 a 18), a proto byla pojmenována „luminal-like“. Druhá skupina, označená „ErbB2“ (dále jen Her-2), se vyznačuje vysokou expresí genu kódujícího Her-2 receptor. Třetí skupina vykazuje negativní expresi jak estrogenového, tak i progesteronového a Her-2 receptoru, tzv. „triple-negative“ (trojitě negativní) fenotyp, a naopak má zvýšenou hladinu cytokeratinů a receptorů adheze typických pro buňky bazálního epitelu (cytokeratin 5, 6 a 17, integrin $\beta 4$). Tato skupina byla označena „basal-like“. „Normal breast-like“ skupina je čtvrtou a poslední skupinou mamárních karcinomů, sdílející profil genové exprese podobný

s profilem normální prsní žlázy, ve které převládají adipocyty.

Skupina „basal-like“ karcinomů představuje přibližně 6–20% všech karcinomů prsu a z pohledu klinického onkologa je součástí širší skupiny karcinomů s „triple-negative“ fenotypem. Prognostická stratifikace pacientek na základě běžně používaných indexů tento fenotyp vůbec nezohledňuje, navíc může být negativní exprese Her-2 receptoru vnímána i jako prognosticky příznivý nález, a proto za určitých okolností pacientky s „basal-like“ karcinomem prsu nemusí být vůbec indikovány k adjuvantní chemoterapii. „Basal-like“ karcinomy přitom vykazují agresivní biologické chování, paradoxně však patří k chemosenzitivním tumorům. Jejich biologické vlastnosti lze částečně zdůvodnit vysokou frekvencí mutací genů BRCA1 a p53, hypermetylací BRCA1 promotoru, nadměrnou expresí EGFR receptoru a zvýšenou hladinou Ki-67, jež koresponduje s proliferační aktivitou nádorových buněk. Existuje proto reálný předpoklad, že v případě zavedení individuálního postupu může nastat zlepšení léčebných výsledků „basal-like“ karcinomů. Již v současnosti je možné vůči pacientkám s triple-negativním fenotypem uplatňovat předpoklad agresivního chování choroby a indikovat adjuvantní léčbu chemoterapií i v případě I. klinického stadia. Pacientkám ve věku, který sám o sobě není indikací k vyšetření klinickým genetikem, je vhodné možnost testování na přítomnost mutace BRCA1 genu nabídnout. Vezmeme-li v úvahu molekulární alterace zastoupené u „basal-like“ karcinomů, je vysoce pravděpodobné, že brzy dojde k využití terapií přímo interferujících s těmito změnami. Nabízí se například léčba cíleně zaměřená na signální dráhu EGFR receptoru, kterou v současnosti představují aplikace monoklonálních protilátek nebo nízkomolekulárních inhibitorů jeho kinázové aktivity, přičemž tato skupina léčiv by mohla být za účelem stabilizace onemocnění podávána i dlouhodobě, podobně jako je tomu s tamoxifenem u karcinomů s pozitivní expresí estrogenového receptoru. Jinou možností, v současnosti testovanou v rámci klinických studií, je podávání chemoterapeutických režimů na bázi derivátů platiny, vůči kterým jsou „basal-like“ karcinomy zvýšeně citlivé.

Cílem naší přednášky je seznámit posluchače s molekulární taxonomií karcinomu prsu, se zaměřením na stávající a budoucí možnosti determinace a individualizace přístupu k „basal-like“ karcinomům.

Práce byla podpořena grantovými projekty IGA MZČR: NR/8335-3, NR/8270-3 a MSM 6198959216.

Analýza genové exprese duktálních a lobulárních karcinomů a srovnání k normálním duktálním a lobulárním buňkám prsu

Bouchal J.¹, Turashvili G.¹, Baumforth K.², Wei W.², Dziechciarková M.³, Hajdúch M.³, Lukáš V.¹, Bláha O.¹, Kolář Z.¹

¹Laboratoř molekulární patologie & Ústav patologie, LF UP a FN Olomouc; ²Institute of Cancer Studies, University of Birmingham, United Kingdom; ³Laboratoř experimentální medicíny LF UP a FN Olomouc

V poslední době se v experimentální praxi stále ve větší míře uplatňují metody využívající mikročipové expresní analýzy. Většina expresních analýz v medicinském výzkumu vychází z bioptických vzorků, které obsahují řadu různých typů buněk. Majoritní populace buněk, je určující pro celkovou informaci o genové expresi a znemožňuje tak rozlišení specifické genové exprese jednotlivých typů buněk. Mezi metody, které umožňují selekci přesně definovaných populací buněk patří laserová mikrodisekce.

V naší práci bylo analyzováno pomocí laserové mikrodisekce a následně mikročipů celkem deset pacientek, pět s duktálním a pět s lobulárním karcinomem. Nádorová i normální tkáň byla ihned po operaci zmrazena v kapalném dusíku. Kryorezy fixované v alkoholu a obarvené hematoxylinem byly mikrodisekovány pomocí přístroje Veritas od firmy Arcturus. Od každé pacientky byly mikrodisekovány tři populace buněk (nádorová, normální duktální a normální lobulární). Celková RNA z asi tisíce buněk byla izolována pomocí RNeasy Micro kitu od firmy Qiagen a kvantifikována pomocí spektrofotometru Nanodrop. Následovala amplifikace a značení pomocí Microarray kitů od firmy Roche. Samotná analýza genové exprese byla provedena na čípech HG-U133 Plus 2.0 od firmy Affymetrix.

Dle interních kontrol byla celková kvalita mikročipových dat dobrá a bylo možné přistoupit ke srovnání genové exprese mezi jednotlivými populacemi buněk i mezi pacientkami navzájem. Nejvýraznější rozdíly byly nalezeny v genech se vztahem k extracelulární matrix, a to jak mezi normálními a nádorovými buňkami, tak mezi duktálními a lobulárními karcinomy. Kromě E-cadherinu byly mezi duktálními a lobulárními karcinomy rozdíly v expresi například u trombospondinu 4 a několika typů kolagenů. Řada genů exprimovaných u epiteliálních duktálních i lobulárních karcinomů je překvapivě „mezenchymálního“ původu. Tato zjištění podporují teorii tzv. epiteliálně-mezenchymální přeměny nádorových buněk. V současné době probíhá validace vybraných výsledků pomocí imunohistochemie a in situ hybridizace.

Práce byla podpořena granty NR 7844-3 a MSM 6198959216.

Analýza proteinových profilů karcinomu prsu metodou SELDI-TOF MS

Brožková K., Knoflíčková D., Bouchal P., Faitová J., Nenutil R., Vojtěšek B.

Masarykův onkologický ústav, Oddělení klinické a experimentální patologie, Brno

S rozvojem moderních metod dochází k rozvoji personalizované medicíny umožňující přesnější diagnostiku, nevhodnější výběr terapie, sledování průběhu onemocnění či brzké zachycení relapsu. Znalost kompletní sekvence lidského genomu umožňuje předpovědět dispoziční k určitému onemocnění, ale teprve rozšíření na funkční jednotky – proteiny – poskytuje komplexní obraz stavu daného jedince.

Technologie Ciphergen® založená na principu SELDI-TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry) umožňuje rychlou a efektivní analýzu komplexních proteinových směsí (moč, sérum/plazma, tkáňový lyzát). Část proteinů selektivně interaguje s chromatografickým sorbentem ukotveným na povrchu čipu a následně je analyzována metodou hmotnostní spektrometrie. Specifická interakce je založena buď na principu chemickém (iontoměničce, chelatační povrchy, hydrofóbní povrchy aj.) či biochemickém (vazba na specifický ligand v podobě oligonukleotidu, protilátky, receptoru apod.). Takto získaná proteinová spektra jsou pak vyhodnocována statistickým softwarem.

V první fázi celé studie jsme optimalizovali lyzi tkáně, povrch čipu a nastavení měření. Poté jsme provedli analýzu 110 vzorků nádorové tkáně pacientek s diagnosou karcinomu prsu a 110 odpovídajících vzorků zdravé tkáně prsu. Celý soubor je charakterizován na běžně stanovované klinické znaky spojené s danou diagnosou. Po optimalizaci vyhodnocovacího postupu byly hledány oblasti hmotností se statisticky významným rozdílem podle několika kritérií: morfologie, statutu estrogenních receptorů, progesteronových receptorů a dalších. Na základě statistických hodnocení byly pak vybrány některé píky k následné identifikaci (např. zvýšení v normální tkáni v oblasti 7920 Da či zvýšení v nádorové tkáni v oblasti 8541 Da), která by mohla umožnit výběr aberantně exprimovaných proteinů a jejich další funkční studie.

Tato práce byla sponzorovaná granty IGA MZ CR NR/8338-3/2005 a MZO 00209805.

Profilování genové exprese u lymfoidních malignit: Validace vybraných molekulárních markerů u difúzního velkobuněčného B-lymfocytárního lymfomu (DLBCL)

Svoboda M.^{1,2}, Vášová I.³, Fabián P.⁴, Radová L.⁵, Berkovcová J.⁶, Křen L.⁷, Slabý O.⁸, Navrátil M.³, Klabusay M.³, Dvořáková D.³, Rejthar A.⁹, Nenutil R.⁴

¹Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův

onkologický ústav v Brně (MOÚ); ²Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně (LF MU); ³Interní hematooonkologická klinika FN Brno a LF MU; ⁴Oddělení patologie, MOÚ; ⁵Fakulta aplikované informatiky, Univerzita Tomáše Bati, Zlín; ⁶Laboratoř experimentální medicíny FN a LF UP Olomouc; ⁷Ústav patologie FN Brno a LF MU; ⁸Laboratoř prediktivní onkologie, MOÚ; ⁹Patologicko-anatomický ústav FN U sv. Anny a LF MU

Úvod: DNA čipové analýzy nám umožňují globální pohled na genovou expresi nádoru a detekci molekulárních markerů důležitých pro diagnostiku, klasifikaci a predikci vývoje nádorového onemocnění. Pomocí DNA čipů byly identifikovány dvě základní varianty DLBCL, označené jako: „Germinal Center B-cell like DLBCL“ (GCBC-like DLBCL; B-lymfocytům zárodečného centra podobný DLBCL) a „Activated B-cell like DLBCL“ (ABC-like DLBCL; aktivovaným B-lymfocytům podobný DLBCL). Obě varianty DLBCL se liší jak profilem genové exprese, tak i v parametrech přežití (pětileté přežití ve skupině GCBC-like DLBCL 60% pacientů, ABC-like DLBCL 35%). Paralelně se vznikem molekulární taxonomie byly DNA čipy použity i za účelem studia biologických vlastností DLBCL, které vyústilo v identifikaci prognostických genových profilů, nebo jednotlivých genů, které by zároveň byly vhodnými kandidáty pro cílenou terapii (např. Bcl-6, PRKCB2, PRKCB2, PDE4B).

Cíl: Cílem naší studie bylo: 1. identifikovat skupinu GCBC-like DLBCL a zjistit, zda se liší v parametrech přežití ve srovnání s ostatními případy DLBCL, 2. validovat vybrané molekulární prognostické markery, vzešlé z předchozích DNA čipových analýz.

Pacienti a metody: Pomocí imunohistochemie (IHC) nebo Real-Time PCR (RT-PCR) reakce jsme kvantifikovali proteinovou a/nebo genovou expresi: CD10, CD138, Bcl-2, Bcl-6, MUM1, PKC (protein kináza C)-alfa, PKC-beta, PKC-delta, PKC-gamma, survivinu a p53. Uvedené analýzy byly provedeny na souboru 46 pacientů s DLBCL. U každého pacienta byly shromážděny následující klinické parametry: věk, klinické stádium, PS, sérová hladina LDH, údaje o extranodálním postižení, IPI index, použitá primární léčba, odpověď na primární léčbu, parametry vývoje onemocnění (PFS, OS).

Výsledek: Medián věku pacientů byl 59,5 roku. Klinická stadia onemocnění byla zastoupena následovně: I. 15%, II. 31%, III. 28%, IV. 24%, nespecifikovatelné 2%. Systémové „B“ projevy choroby mělo 67% pacientů, sérová hladina LDH byla elevována u 52%. Extranodální postižení bylo zaznamenáno u 42% případů. PS 0 a 1 dosahovalo 69% pacientů. Třicet procent pacientů mělo hodnotu indexu IPI 3 nebo 4, 44% pacientů hodnotu 0 nebo 1. Primární léčba byla u 96% pacientů založená na aplikaci chemoterapie v režimu CHOP a 17% pacientů podstoupilo vysokodávkovanou chemoterapii s autologní transplantací periferních kmenových buněk. U 54%

pacientů vedla primární léčba ke kompletní remisi choroby, naopak ve 44 % případů pacienti zemřeli na progresi DLBCL. Identifikace GCBC-like DLBCL byla založena na IHC průkazu pozitivní (+) / negativní (-) exprese: A) CD10+/ Bcl-6+, nebo Bcl-6+/MUM1+/Bcl-2-/CD138-; B) CD10+ a/nebo Bcl-6+/MUM1-/CD138-. Fenotyp GCBC-like DLBCL byl v první případě (A) určen u 49 % a ve druhém případě (B) u 27 % pacientů. I přesto, že křivky přežití těchto pacientů vykazovaly příznivější průběh, tento jev nebyl statisticky signifikantní (A: $p = 0,17$; B: $p = 0,15$). V případě analýzy jednotlivých markerů byla s horší prognózou onemocnění (kratší OS) spjata vysoká exprese proteinů Bcl-2 ($p < 0,01$) a survivinu ($p = 0,11$), a genu PKCD ($< 0,015$). Pacienti s vysokou expresí proteinu Bcl-2 a/nebo survivinu měli kratší dobu do relapsu choroby i celkového přežití, než pacienti s nízkou expresí obou těchto proteinů ($p < 0,075$ a $p < 0,02$).

Závěr: Translace výsledků DNA čipových analýz do běžné klinické praxe je možná, ale vzhledem k použití jiných metod, zaměřených především na kvantifikaci proteinové exprese, vyžaduje obezřetnost při jejich interpretaci.

Poděkování: Práce byla podpořena granty: IGA MZČR: NR/8231/3 a výzkumným záměrem MSM 6198959216.

Mapování delecí na chromozomu 14 u pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (CLL) metodou arrayCGH

Pospíšilová H.^{1,4}, Baens M.¹, Michaux L.¹, Stuhl M.¹, De Wolf-Peters C.², Alexander D.³, Jarošová M.⁴, Vermeesch J.¹, Hagemeijer A.¹, Vanderberghe P.¹, Marynen P.¹, Włodarska I.¹

¹Department of Human Genetics and ²Department of Pathology, Catholic University of Leuven, Leuven, Belgium; ³Department of Hematology, Belfast City Hospital, Belfast, Northern Ireland; ⁴Hemato-onkologická klinika, Fakultní nemocnice Olomouc a Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, Česká republika

Podle Knudsonova modelu vzniku nádorů představují delece jednu ze dvou událostí vedoucích k inaktivaci tumor supresorových genů (TSG). Ztráty chromozomálních oblastí jsou spojovány s delecemi TSG, které jsou v těchto oblastech často lokalizovány. Nejznámějšími příklady jsou delece TSG: p15/p16 (9p), ATM (11q), Rb (13q) a p53 (17p). K identifikaci potenciálních TSG v často deletovaných oblastech na chromozomu 14 u pacientů s CLL a dalšími B-buněčnými malignitami, jsme použili array komparativní genomickou hybridizaci (arrayCGH). Vyšetřili jsme 33 případů s cytogeneticky nebo molekulárně cytogeneticky detekovanými delecemi 14q. Array CGH čip byl sestaven z 838 BAC/PAC klonů (Chori 32K set), které pokrývají chromozom 14q s rozlišením

přibližně 42 kb. Pro přípravu čipu byla vyzolována BAC/PAC DNA, amplifikována pomocí DOP PCR a natištěna na CodeLink skla (Amersham Biosciences) podle postupu popsaného Fiegler et al., 2003. Pro přípravu sondy byla DNA pacientů a referenční DNA značena fluorochromy Cy3-/5-dCTPs (Amersham Biosciences) metodou random priming (Invitrogen). Příprava sondy a hybridizace byla prováděna podle standardních postupů. Nahybridizovaná skla byla skenována skenerem GenePix 4000B (Axon), analýza obrazu a dat byla prováděna pomocí softwaru GenePix Pro 6.0 a Excel (Microsoft Inc.).

Výsledky arrayCGH prokázaly delece u 24 pacientů a potvrdily tak předchozí cytogenetická a FISH (fluorescenční in situ hybridizace) data. Metodou arrayCGH byly prokázány dva typy intersticiálních delecí 14q:

- 1) U 15 pacientů byla nalezena distální delece zahrnující konstantní oblast genu pro těžký řetězec imunoglobulinu (IGHC) v oblasti 14q32. 8 pacientů z této skupiny mělo deletovanou přesně stejnou oblast. Ve zbývajících 7 případech s delecí IGHC oblasti se velikost deletované oblasti lišila. Opakující se výskyt delecí 14q postihující IGHC nás vedl k hypotéze, že by tyto aberace mohly představovat nový typ kryptické translokace 14q32, která přesunuje neznámé onkogeny do blízkosti transkripčně aktivních regulačních oblastí IGH genu. V současnosti probíhá analýza kandidátních genů lokalizovaných v blízkosti zlomových míst deletovaných oblastí.
- 2) U 9 pacientů byly nalezeny proximální překrývající se delece. Nejmenší společná deletovaná oblast (SCDR) je velká 3,5 Mb a je lokalizována v oblasti 14q24. V současné době vyšetřujeme další pacienty s cílem upřesnit identifikovanou SCDR oblast a analyzovat vybrané potenciální TSG.

Práce je podporována grantem Česko-vlámská spolupráce ve výzkumu a vývoji: 1-2006-29, Belgium Research Foundation, BIL12/The Czech Republic

Možnosti elektrochemie pro studium proteinů

Kizek R.¹, Húska D.^{1,2}, Zítka O.^{1,3}, Křížková S.¹, Adam V.¹, Eckschlager T.⁴, Binková H.⁵, Havel L.², Trnková L.⁶

¹Ústav chemie a biochemie a ²Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity, Brno; ³Katedra biochemie, a ⁶Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno; ⁴Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF Univerzity Karlovy, Praha; ⁵Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno

Ve třicátých letech minulého století se tehdejší asistent profesora Jaroslava Heyrovského Rudolf Brdička zabýval polarografickým chováním různých solí kobaltu. Během tohoto studia Brdička objevil zajímavé elektrochemické chování biologicky významných sloučenin obsahujících ve své molekule thiolovou skupinu. Brdičkův objev byl později označen jako tzv. Brdičkova reakce (1).

Již samotný Rudolf Brdička byl velmi prozíravý a pokusil se využít svého objevu v medicíně. A dokonce se pokusil vymyslet postup jak celého postupu využít pro diagnostiku pacientů se zhoubnými nádory. O přínosu výsledků práce Rudolfa Brdičky svědčí i to, že byly publikovány v prestižním časopise Nature (2).

Kromě již zmíněné Brdičkově reakci se vývoj elektrochemie samozřejmě nezastavil. Profesor Emil Paleček navrhl na počátku devadesátých let minulého století pro ultrasenzitivní analýzu nukleových kyselin a proteinů velmi zajímavou technologii. Celý postup byl označen jako adsorptivní (na povrch elektrody se zachytává sledovaná látka) přenosová (elektroda se z roztoku sledované látky přesune jím) technika (3).

Uplatnění Brdičkovy reakce v biologickém výzkumu

Naše pozornost je soustředěna na metalothionein. To je malý protein objevený téměř před padesáti lety, jehož hlavním úkolem v organismu je vázat těžké kovy a tímto způsobem kontrolovat jejich množství v těle⁴. Stanovení metalothioneinu není stále jednoduchou záležitostí⁵. Zjistilo se, že právě elektrochemické stanovení představuje velmi vhodný nástroj pro jeho snadné a rychlé určení^{5, 6}. Biologický význam metalothioneinu není zcela rozpoznán. Navíc se ukazuje, že změny jeho hladiny mohou souviset se změnou metabolismu zdravých a nádorových buněk. Zjistili jsme, že hladina metalothioneinu výrazně vzrůstá u pacientů s zhoubnými nádory. Navíc velmi pravděpodobně hraje metalothionein nezanedbatelnou roli také v oblasti vzniku rezistence na protinádorovou léčbu vedenou především platinovými cytostatiky.

Poděkování: Tato studie byla podporována grantem Ligy proti rakovině 2006.

Literatura

1. R. Brdička, Biochemische Zeitschrift 272, 104 (1934); R. Brdička, Coll. Czech. Chem. Commun. 8, 366 (1936).
2. R. Brdička, Nature 139, 1020 (1937); R. Brdička, Nature 139, 330 (1937).
3. E. Paleček and I. Postbieglova, J. Electroanal. Chem. 214 (1–2), 359 (1986); E. Paleček, F. Jelen, and I. Postbieglova, Stud. Biophys. 130 (1–3), 51 (1989).
4. R. Kizek, J. Vacek, V. Adam et al. Klin. Biochem. Metab. 12 (2), 72 (2004).
5. R. Kizek, L. Trnkova, and E. Paleček, Anal. Chem. 73 (20), 4801 (2001).
6. R. W. Olafson and P. E. Olsson, Methods in Enzymol. 205, 205 (1991).

10. PATOGENEZE NÁDORŮ

Předsedající: KOLÁŘ Z., NENUTIL R.

Sobota / 9. 12. 2006 – 10:40–11:50

Interleukin-6 and Suppressor of cytokine signaling-3 in regulation of proliferation and apoptosis in human prostate cancer

Culig Z.

Department of Urology, Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

Interleukin-6 (IL-6) and its receptor are highly expressed in human prostate cancer. IL-6 effects are mediated through signaling pathways of Janus kinases (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) factors, mitogen-activated-protein kinases (MAPK), or phosphoinositol 3-kinase in a cell type-specific manner. IL-6 regulates expression of prostate-specific antigen through activation of the androgen receptor. Growth of most prostate cancer cell lines is up-regulated by IL-6 in an autocrine manner. However, parental LNCaP cells are inhibited by IL-6 that diminishes expression of cyclin-dependent kinases and up-regulates that of tumor suppressors. We have established a novel LNCaP subline (LNCaP-IL-6+) after prolonged treatment with IL-6. In contrast to their counterparts cultured in the absence of IL-6 (LNCaP-IL-6-), LNCaP-IL-6+ acquire growth advantage. We have observed stimulation of phosphorylation of STAT3 solely in LNCaP-IL-6-, whereas proliferation of LNCaP-IL-6+ could be explained by activation of the MAPK pathway. To improve understanding of regulation of the JAK/STAT pathway in prostate cancer cells, we have investigated expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3. Interestingly, we found that SOCS-3 is constitutively expressed in all prostate cancer cell lines that are STAT3-negative (i.e. cell lines with exemption of LNCaP and LNCaP-IL-6-). In those cells, expression of SOCS-3 increases after treatment with a demethylating agent. SOCS-3 was detectable by immunohistochemistry in premalignant and malignant lesions, whereas there was only a weak positive reaction in benign tissue. Expression of SOCS-3 in prostate cancer cells is up-regulated by a cAMP derivative. Most interestingly, siRNA experiments showed that SOCS-3 antagonizes a negative regulation of proliferation and induction of apoptosis by cAMP in prostate cancer cells. Taken together, our results show that IL-6 is in most prostate cancers a target for novel therapies. SOCS-3 appears to be a critical mediator that regulates IL-6 signaling.

High risk HPV infekce a exprese proteinu p16 v laryngeálních lézích

Laco J.¹, Slaninka I.¹, Jirásek M.¹, Čelakovský P.², Ryška A.¹

¹Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové;

²Klinika ušní, nosní a krční Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové

Cílem studie bylo zjistit expresi proteinu p16 (p16) a přítomnost high risk HPV infekce (HPV) v laryngeálních lézích za použití nepřímé imunohistochemie, resp. chromogenní in situ hybridizace (CISH).

Celkem bylo vyšetřeno 91 laryngeálních lézí (23 zpěváckých uzlíků (ZU), 26 papilomů (PA), 18 dysplázií (DY) a 24 karcinomů (CA)). U každého případu bylo zaznamenáno pohlaví a věk pacienta, anamnéza kouření či abuzu alkoholu a lokalizace léze (supraglotis – glotis – subglotis). Soubor tvořilo 65 mužů a 26 žen ve věku od 1–87 let (medián 55 let). 43 pacienti byli kuřáci, 10 pacientů uvádělo abuzus alkoholu. Expres p16 byla detekována ve 2/23 (9%) ZU, 22/26 (85%) PA, 9/18 (50%) DY a ve 14/24 (58%) CA. Přítomnost HPV byla prokázána ve 3/23 (13%) ZU, 21/26 (81%) PA, 12/18 (67%) DY a ve 14/24 (58%) CA. Mezi ZU a PA byl prokázán statisticky významný rozdíl v expresi p16 a v přítomnosti HPV ($p < 0,000001$); mezi jinými skupinami tento rozdíl prokázán nebyl. Dále, nebyl prokázán žádný vztah mezi expresí p16 a přítomností HPV a věkem a pohlavím pacienta, kouřením, abuzem alkoholu a lokalizací léze.

Expres p16 a přítomnost HPV byla prokázána v benigních, premaligních a maligních lézích laryngu. K objasnění přesné úlohy HPV infekce v etiopatogenezi laryngeálních lézí je však třeba dalších studií. Tato studie je první, která zkoumala přítomnost HPV v laryngeálních lézích pomocí CISH.

Studie byla finančně podpořena Výzkumným záměrem Ministerstva Zdravotnictví ČR 00179906.

Porucha exprese regulátorů buněčného cyklu jako prediktivní faktor u karcinomu jazyka a spodiny dutiny ústní

Čáslava T.¹, Rotterová P.², Nenutil R.³, Hanzelková Z.³

¹Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, FN Brno; ²Patologicko-anatomický ústav, FN Pekařská Brno; ³Odd. patologie MOÚ Brno

Vedle pozdní diagnostiky, je zásadním problémem v léčbě onkologického onemocnění orofaciální

oblasti lokoregionální recidiva a metastazování do spádových lymfatických uzlin.

Hlavním prediktivním faktorem do současné doby zůstává TNM klasifikace. Několik studií však upozornilo na nedostatečnost TNM klasifikace jako prognostického faktoru, protože některé rozsáhlé tumory jsou léčeny s dobrým výsledkem, zatímco menší způsobují pacientovu smrt. Z toho důvodu se hledají klinické, histopatologické a molekulární znaky mající vztah k prognóze pacientova onemocnění. Dnes je dobře prozkoumána řada onkogenů a tumorových supresorových genů s rozhodující rolí v kontrole buněčného cyklu, jejichž změněná exprese nebo inaktivace je pozorována u řady lidských karcinomů.

Abnormální exprese regulátorů buněčného cyklu – cyklinu D1 a inhibitoru cyklin dependentní kinázy – proteinu p16, jsou běžné události u mnoha typů primárních tumorů. Avšak jejich význam jako prediktivních faktorů u karcinomů orofaciální oblasti nebyl dosud extenzivně studován. Právě za tímto účelem byla retrospektivně (r. 2000–2004) sestavena databáze 77 pacientů, u kterých byla provedena resekce spinocelulárního karcinomu jazyka nebo spodiny ústní a event. blokovaná krční disekce. Na vybraných blocích z rutinně fixovaného (4% formol) a zpracovaného materiálu, bylo provedeno imunohistochemické vyšetření k průkazu proteinů p16 a D1. Výsledky byly hodnoceny semikvantitativně a stupeň exprese (zvýšená exprese D1 resp. delece p16) byl porovnáván s klinicko-patologickými údaji (věk, pohlaví, grading, staging, období bez projevů onemocnění-diseasefree, přežití – survival, metastazování).

Cílem této práce bylo potvrdit korelaci mezi sníženou expresí p16 resp. overexpresí cyklinu D1 a horší prognózou nádorového onemocnění, včetně vzniku metastáz ve spádových lymfatických uzlinách, což je v souladu s recentními publikovanými výsledky.

Zhodnocení exprese těchto regulátorů buněčného cyklu umožní definovat skupinu pacientů s vyšším rizikem lokoregionální recidivy a šíření nádoru do regionálních lymfatických uzlin, což má bezprostřední vliv na léčbu a na celkový výsledek onemocnění a přežití pacienta.

Význam mutací genu pro androgenní receptor v etiopatogenezi karcinomu prostaty

Sachová J.¹, Urban M.¹, Heráček J.¹, Kuncová J.¹, Bendlová B.², Minářík M.³

¹Urologická klinika 3. LF UK a FNKV Praha;

²Endokrinologický ústav Praha;

³Genomac Praha

Úvod: Karcinom prostaty (KP) je na druhém místě v incidenci nádorových onemocnění u mužů. Karcinom prostaty je považován za androgen-dependentní nádor. Přítomnost androgenů je však pouze nezbytnou podmínkou jeho vzniku a nikoliv vlastní příčinou. Androgeny mají na karcinom prostaty nepochybný vliv akcelerační, což vyplývá i z populačních studií. Androgeny působí na buňky prostaty po navázání na specifický receptor – androgenní receptor (AR). Expresí androgenního receptoru byla prokázána na většině buněk karcinomu prostaty. Vzhledem k zásadnímu významu androgenní regulace u KP jsou v posledních letech její změny studovány v souvislosti se stupněm diferenciace a variabilitou biologického chování nádoru. Přes intenzivní výzkum není význam změn postihujících AR dosud zcela objasněn.

Cíl: Podat aktuální informace týkající se významu genu pro androgenní receptor se zaměřením na jeho mutace, ve vztahu k etiopatogenezi karcinomu prostaty. V přehledu dokumentovat dosavadní výsledky základního výzkumu na tomto poli.

Metoda: Současná dostupná publikovaná literatura zabývající se genem pro androgenní receptor v karcinomu prostaty. K rešerši využity veřejně dostupné databáze – PubMed, Medline atd.

Závěr: Počet CAG repetíci genu pro AR koreluje s vyšší transkripční aktivitou a expresí AR. Předpokládá se, že krátké CAG repetice vedou ke zvýšení AR zprostředkované androgenní aktivity a zvyšují riziko benigní hyperplazie prostaty a KP. Nízký počet CAG repetíci koreluje se stádiem onemocnění a gradingem nádoru.

Podporováno Grantem IGA MZ ČR NR 8096-3, IGA MZ ČR NR.

RET proto-onkogen v patogenezi medulárního karcinomu štítné žlázy a Hirschsprungovy choroby

Václavíková E.¹, Dvořáková Š.¹, Vlček P.², Škába R.³, Bendlová B.¹

¹Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha; ²Klinika nukleární medicíny a endokrinologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha; ³Klinika dětské chirurgie, 2. LF UK a FN Motol, Praha

Úvod: Medulární karcinom štítné žlázy (MTC) vychází z parafolikulárních buněk štítné žlázy, které produkují kalcitonin. Vyskytuje se ve formě sporadické (75–80%) a familiární (20–25%). Familiární forma MTC se dědí autozomálně dominantně a nachází se ve třech variantách. V rodině se může vyskytovat pouze MTC, pak se jedná o familiární medulární karcinom štítné žlázy (FMTC). Další familiární formou MTC je syndrom mnohočetné endokrinní neoplázie typu 2 (MEN 2). V případě MEN 2A je MTC asociován s feochromocytomem či hyperparathyreózou. U MEN 2B je kromě feochromocytomu častý i marfanoidní habitus, ganglioneuromatóza, slizniční neurofibromy, vzácně adenomy přišitých tělísek. Příčinou familiárních MTC jsou změny v sekvenci RET proto-onkogeny. Tento gen kódující tyrozinkinázoový receptor je lokalizován v 10. chromozómu a je tvořen 21 exony. Somatické a zárodečné mutace zodpovědné za vznik MTC se vyskytují převážně v šesti rizikových exonech – v 10., 11., 13., 14., 15. a 16. exonu a způsobují aktivaci RET receptoru. S RET proto-onkogenem je spojena i Hirschsprungova choroba, vrozené onemocnění enterického nervového systému, způsobené absencí gangliových buněk v různých dlouhých částech tlustého střeva. Mutace v RET proto-onkogeny jsou u této cho-

roby naopak inaktivující. V některých případech tak mutace v RET proto-onkogeny způsobují jak MTC, tak i HSCR u téhož pacienta.

Cíl: Naším cílem je v rámci screeningu rizikových exonů RET proto-onkogeny identifikovat mutace zodpovědné za vznik onemocnění u pacientů s MTC a HSCR a zjistit přítomnost mutací u příbuzných pacientů; u rodin s neinformativním výsledkem zavést screening ostatních exonů a nalézt případné minoritní mutace v RET proto-onkogeny.

Materiál a metody: V naší laboratoři byl proveden screening šesti rizikových exonů u 174 rodin s MTC (147 rodin se sporadickým MTC, 10 rodin s FMTC, 12 rodin s MEN 2A a 5 rodin s MEN 2B) a 73 rodin s HSCR. Genetické vyšetření je založeno na obousměrném sekvenování rizikových exonů. U ostatních exonů RET proto-onkogeny jsme zavedli single strand conformation polymorphism (SSCP) analýzu, pozitivní vzorky byly osekvenovány.

Výsledky: Zárodečné mutace byly detekovány u 8 pacientů (5,4%) se sporadickým MTC, 5 rodin (50%) s FMTC, 11 rodin (92%) s MEN 2A a 5 rodin (100%) s MEN 2B. U jedné rodiny byla nalezena minoritní mutace v 5. exonu RET proto-onkogeny způsobující FMTC. U 7 pacientů s HSCR (9,6%) byly detekovány mutace ve zmíněných šesti rizikových exonech pro MTC.

Závěr: Podařilo se zavést rutinní screening rizikových exonů RET proto-onkogeny, díky kterému bylo vyřešeno 81% rodin s familiární formou MTC. Dále jsme zavedli screening ostatních exonů RET proto-onkogeny, který nám umožní zjistit genetickou příčinu MTC některých rodin s dosud neinformativním výsledkem.

Práce byla podporovaná granty IGA MZ ČR NR/7806-3 a GACR 301/06/P425.

11. POKROKY V KLINICKÉ DIAGNOSTICE ZHOUBNÝCH NÁDORŮ II

Předsedající: KLEIBL J., BERKOVCOVÁ J., HAJDÚCH M.

Sobota / 9. 12. 2006 – 13:00–14:50

Alterace v genech s nízkou penetrancí u pacientek s karcinomem prsu

Kleibl Z.¹, Prokopcová J.¹, Havránek O.¹, Stříbrná J.¹, Novotný J.^{2,3}, Pohlreich P.¹

¹Ústav biochemie a experimentální onkologie 1. LF UK v Praze; ²Onkologická klinika 1. LF UK v Praze a VFN; ³Nemocnice Příbram

Dědičné mutace v hlavních predispozičních genech **BRCA1** a **BRCA2** se podílejí na vývoji přibližně 5% karcinomů prsu. Nádorové syndromy, které vznikají u nosiček mutací v těchto genech, jsou charakterizovány vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu a/nebo ovaria. Přibližně 1% hereditárních karcinomů prsu způsobují mutace v dalších vysoce penetrantních genech (např. **p53**, **PTEN**), které jsou zodpovědné za hereditární syndromy zahrnující typicky i další malignity. Familiární výskyt lze prokázat u 10–15% mammárních karcinomů. V nepřítomnosti hereditární alterace v hlavních predispozičních genech lze v těchto případech uvažovat o mutacích v tzv. genech s nízkou penetrancí (např. **ATM**, **CHEK2**, **NBS1**). Tyto mutace se v populaci vyskytují s vyšší frekvencí, avšak u nosičů je nižší predispozice ke vzniku nádorového onemocnění, než je tomu u hlavních predispozičních genů (zvýšení RR ~1,5–3).

U pacientek s hereditárním nebo sporadickým karcinomem prsu jsme studovali význam mutací v genech s nízkou penetrancí se zvláštním zřetelem ke genům angažovaným v reparaci DNA. Studován byl gen **ATM** a výskyt známých patogenních alterací genu **CHEK2** a **NBS1**.

Mutační analýza genu **ATM**, provedená pomocí PTT a sekvenování v souboru 161 rizikových pacientek s karcinomem prsu, odhalila přítomnost tří zřejmě patogenních mutací (1,9%) vedoucích ke zkrácení proteinu. Naopak analýza v kohortě 183 kontrolních vzorků neprokázala výskyt žádné patogenní varianty ($p = 0,065$). Ve dvou případech pacientek s mutací se jednalo o osoby s bilaterálním výskytem karcinomu prsu, u další pacientky byl diagnostikován ductální karcinom prsu ve 37 letech.

Analýza mutace 1100delC genu **CHEK2** založená na DHPLC prokázala její výskyt u 1/358 (0,28%) vysoce rizikových osob s karcinomem prsu. Jednalo se o muže s karcinomem prsu a pozitivní rodinnou anamnézou (karcinomy GIT). Analýza 688 vzorků pacientek se sporadickým karcinomem prsu pak identifikovala mutaci 1100delC ve 3 případech (0,44%). U 2 pacientek se v rodině vyskytovali přímí

příbuzní s nádorovým onemocněním (karcinom cervixu nebo plíc). Karcinomy u všech identifikovaných nosičů mutací byly pozitivní na přítomnost estrogeních i progesteronových receptorů. Populační četnost mutace c. 1100delC genu **CHEK2** (0,27%) byla stanovena na kontrolním vzorku 730 osob (2/730). Pomocí DHPLC byla provedena i analýza exonu 2 a 3 genu **CHEK2** v populaci 323 pacientek se sporadickým výskytem karcinomu prsu, která prokázala přítomnost 10 mutací p.I157T (3,1%). Tato sekvenční varianta se vyskytla u 15/512 osob kontrolní populace (0,29%). Kromě této alterace byly identifikováni 4 nosiči dalších změn (p. T172A, p.R181C, IVS5+51A > T, IVS4 + 24T > C), nezachycených v kontrolní populaci.

Mutační analýza genu **NBS1** (nibrin) byla zaměřená na výskyt mutace c.675del5. Oproti očekávání v 472 vzorcích pacientek se sporadickým karcinomem prsu nebyla mutace nalezena.

Výsledky provedených analýz vypovídají o několika skutečnostech: frekvence alterací ve studovaných genech jsou v ČR nízké a o těch, které mají odlišnou četnost od simultánně studované kontrolní populace nejsou, s výjimkou **ATM**, dostupné zahraniční studie. Na tomto základě se domníváme, že frekvence a charakter alterací genů s nízkou penetrancí má vysoce regionální závislost a pro jejich identifikaci a praktické uplatnění se často nelze vyhnout analýzám celých genů v rozsáhlých souborech.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MSM0021620808.

Diagnostika genetických změn u papilárního karcinomu štítné žlázy

Sýkorová V.¹, Dvořáková Š.¹, Laco J.², Ryška A.², Kodetová D.³, Astl J.⁴, Veselý D.⁴, Novák Z.¹, Bendlová B.¹

¹Oddělení molekulární endokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha; ²Fingerlandův ústav patologie, Hradec Králové; ³Ústav patologie a molekulární medicíny FN Motol, Praha; ⁴ORL klinika FN Motol, Praha

Úvod: Papilární karcinom (PTC) je nejběžnější malignitou štítné žlázy (80–85%). Nejčastější příčinou je aktivace proto-onkogenů **RET** a **BRAF**. **RET** onkogen je aktivován **RET/PTC** přeskupením (rearrangements), které vzniká fúzí intracelulární tyrozin kinázové domény **RET** genu a jiného konstitutivně exprimovaného genu. Výskyt **RET/PTC** přeskupení je velmi variabilní (5–70%) v závislosti na geogra-

fických faktorech a použité metodice. K velkému nárůstu PTC došlo po černobylské havárii (26. duben 1986). **RET/PTC** je spojován s agresivnější formou PTC a častou tvorbou vzdálených metastáz. V současné době je známo několik fúzních forem, které vznikají inverzí nebo translokací. Nejčastější jsou **RET/PTC1** a **RET/PTC3** přeskupení. **BRAF** gen kóduje cytoplasmatickou serin/threoninovou proteinkinázu patřící mezi **RAF** proteiny. K aktivaci dochází substitucí T → A na pozici 1799 v 15. exonu způsobující substituci valinu za glutamát v kodonu 600 (V600E). Tato mutace je nejčastější genetickou změnou u PTC (29–69%) a koreluje s vyšším stupněm TNM klasifikace, agresivnější formou nádoru a s horší prognózou onemocnění.

Cíl: Detekce **BRAF V600E** mutace a **RET/PTC** přeskupení u PTC pacientů v české populaci.

Materiál a metody: Soubor tvořilo 44 odeperovaných čerstvých tkání PTC pacientů, 9 biopsií tenkou jehlou z PTC tkání a 92 parafinových bločků. DNA a RNA z čerstvých tkání a biopsií jsme izolovali pomocí Trizolové metody. Expresi **RET/PTC** přeskupení jsme detekovali v cDNA čerstvých tkání, která byla převedena z RNA pomocí reverzní transkripce. Kvalita a přítomnost cDNA byla ověřena pomocí exprese ubikvitárního genu **GAPDH** a specifického genu pro štítnou žlázu **PAX8**. DNA z parafinových bločků jsme získali pomocí QIAamp DNA Blood Mini Kitu. Mutaci V600E jsme detekovali screeningovou metodou SSCP (single strand conformation polymorphism) a pozitivní vzorky ověřili přímou fluorescenční sekvenací. Pro zjištění vlivu černobylské havárie na výskyt této mutace v České republice jsme vzorky rozdělili do pěti období – jedno období před černobylskou havárií a čtyři období od roku 1986 do současnosti.

Výsledky: Expresi **RET/PTC1** jsme našli u 2 pacientů (4,2%), **RET/PTC3** u 1 pacienta (2,1%) a neurčené fúzní formy **RET/PTCX** u 2 pacientů s PTC (4,2%). Mutaci V600E v **BRAF** genu jsme detekovali u 56 pacientů s PTC (38,6%). Jeden pacient byl homozygotem, ostatní heterozygoty. V období před rokem 1986 (10 pacientů) jsme nedetekovali žádnou **BRAF** mutaci, v následujících obdobích jsme mutaci detekovali u 56 pacientů (41,2%). Zdá se, že tato mutace nekoreluje s věkem diagnózy. Soubor tvořilo 21,4% mužů a 78,6% žen, z toho 48,4% mužů a 36% žen mělo **BRAF** mutaci.

Závěr: **RET/PTC** přeskupení jsme detekovali u 5 ze 48 pacientů (10,4%), mutaci V600E jsme zachytili u 38,6% ze 145 pacientů. Výskyt mutace V600E je vyšší u mužů. Zdá se, že se jedná o ma-

goritní genetickou změnu, která hraje důležitou roli v patogenezi PTC. Toho by se mohlo využít v klinické praxi pro potvrzení diagnózy případně pro určení diagnózy z biopsie tenkou jehlou ještě před operací pacienta.

Tato práce je podpořena grantem IGA MZ ČR NR/7806-3.

Možnosti metod nukleární medicíny v onkologické diagnostice

Bakala J., Bernátek J., Gatěk J., Hrbáčková L.
Oddělení nukleární medicíny, Krajská nemocnice T. Bati a. s., Zlín; Chirurgické oddělení nemocnice ATLAS, Zlín

Metody nukleární medicíny, na rozdíl od jiných zobrazovacích metod, zobrazují hlavně funkční zobrazení metabolismu – buněčné aktivity

- funkce daného orgánu
- funkční zobrazení metabolismu
- buněčné aktivity
- genetické inform
- STÁLE SE VÍCE OBJEVUJE TERMÍN MOLECULAR IMAGING

Zobrazovací metody v computerové tomografii CT lze v obecné rovině rozdělit do dvou kategorií

- emisní
- transmisní

Emisní tomografie patří do nukleární medicíny – **SPECT** (Jednofotonová emisní computerová tomografie), kdy se detekuje gammazáření; nejčastějším izotopem je ^{99m}Tc , ^{123}I a ^{111}In , event. další

- Moderním způsobem je PET **pozitronová emisní tomografie**, kdy zdrojem záření jsou pozitrony, jimiž jsou značeny látky, jako např. glukóza, které se aktivně zapojují do metabolismu, tzn. že dokonale zobrazují metabolismus
- V poslední době se čím dále tím více ve světové literatuře i v praktickém použití objevuje řada článků, kdy se hovoří o hybridním zobrazení (emisní a transmisní), ujal se termín funkční anatomie čím dál častěji též termín MOLECULAR IMAGING, kde se, na základě fúze během jednoho vyšetření, zobrazuje vyšetření **PET/CT** nebo **SPECT/CT**

Zdá se, že tyto metody, zejména v onkologii, již mění přístup k onkologickým pacientům a mohou jednak sledovat pacienty, diagnostikovat onemocnění, staging etc. Dokonce se v poslední době v literatuře objevuje v onkologii název

- kompletní PET remise tumoru.

Metody nukleární medicíny, které se používají, můžeme rozdělit do čtyř skupin

1. primární diagnostika tumorózního ložiska přímé zobrazení hot spot
2. a nepřímé cold spot
3. sekundární postižení, ke zjištění metastáz
4. zjišťování funkce různých orgánů (ledviny a srdce) při chemoterapii, jak ke sledování možnosti

negativních účinků na ledviny a srdce, event. před chemoterapií

5. označení sentinelové při operační výkonech zejména Ca mamy, maligního melanomu
6. v gynekologické operativně
7. v orofaciální operativně maligních tu.
8. i v jiných lokalitách Ca kolorektálního, Ca žaludku

Látky, které přímo zobrazují tumor, jsou takové, které se, po i. v. aplikaci, různým způsobem váží do buněk tumorózní tkáně. Nejčastěji používaný ^{99m}Tc Tetrofosmin a ^{99m}Tc MIBI se váže do mitochondrií, ^{18}F FDG Fluorodeoxy glukóza se zapojuje do metabolismu glukózy a značený somatostatin zobrazuje somatostatinové receptory na povrchu těla nádorové buňky. Nejrozšířenější je **scintigrafie skeletu**, která má zcela pevné, fixované místo v onkologické diagnostice. Slouží jednak ke zjištění primárního, nebo sekundárního postižení dálestagingu, ke sledování pacientů v dlouhodobém časovém období. Provádí se vždy metodou celotělové scintigrafie po i. v. aplikaci ^{99m}Tc MDP, který zobrazuje místa kostní přestavby, která korelují s metastatickým postižením. Na našem oddělení pak většinou k doplnění provádíme planární scintigrafii nebo SPECT, které upřesňují ložisková postižení – např. páteře, obrátů, či v oblasti pánve. Velmi často se vyskytuje při mikrometastatickém postižení u karcinomu prsu tzv. superscan. Jedná se o mikrometastázy, které se znázorňují jako difuzní zvýšené vychytávání v celém skeletu.

Nejznámější metodou je scintigrafie skeletu WB nebo SPECT dále **mammoscintigrafie**, kterou na našem pracovišti provádíme již 8 let. Vyšetření je velmi jednoduché: po aplikaci Tetrofosminu se provádí snímání v levé a pravé poloze vleže a v AP projekci, event. doplňujeme SPECT. Dalšími přímo zobrazovacími metodami je zobrazení pomocí somatostatinových receptorů, kde se využívají dvě látky, z nichž jednou je ^{111}In Indium značený Octreotide anebo, zejména v onkologii používaný, ^{99m}Tc značený Depreotide. Oba dva se dají využít ke scintigrafii tumorózních ložisek prsu, i když jejich využití je spíše v jiné diagnostice. U Octreoscenu jsou to endokrinní tumory, u Depreotidu ložiskové léze plicní. Scintigrafii pomocí ^{99m}Tc Tetrofosminu a ^{99m}Tc MIBI se dá též využít ke sledování a vyjádření MDR (Multi Drug Resistance) genu, kdy koreluje eflux radiofarmaka s přítomností exprese tohoto genu. Dá se rovněž využít ke sledování úspěšnosti různých typů chemoterapie. Z metod, které slouží jako sekundární ke zjištění metastáz, je nejdůležitější **scintigrafie skeletu**, která má zcela pevné, fixované místo v onkologické a mammo-logické diagnostice. Slouží jednak ke stagingu, ke sledování pacientů v dlouhodobém časovém období. Provádí se vždy metodou celotělové scintigrafie po i. v. aplikaci ^{99m}Tc MDP, který zobrazuje místa kostní přestavby, která korelují s metastatickým postižením. Na našem oddělení pak většinou k doplnění provádíme planární scintigrafii nebo SPECT, které upřesňují ložisková postižení – např. páteře, obrátů, či v oblasti

pánve. Velmi často se vyskytuje při mikrometastatickém postižení u karcinomu prsu tzv. superscan. Jedná se o mikrometastázy, které se znázorňují jako difuzní zvýšené vychytávání v celém skeletu. Zde se k diagnostice používá **scintigrafie kostní dřene**, která se provádí dvojnásobným způsobem:

- pomocí preparátu Nanocoll
- pomocí značených bílých krvinek preparátem Scintimun Granulocyte, jenž zobrazuje kostní dřeň, takže v místě metastatického postižení naopak dochází k negativním defektům

K dalším metodám, spíše pomocného charakteru, patří **SPECT jater** (k vyloučení ložiskových lézí), který umožňuje zejména 3D zobrazení. Docela efektivní metoda k diferenciální diagnostice mezi metastatickým postižením a haemangiomy je SPECT krevního poolu. Všechny tyto metody na našem oddělení běžně provádíme. Metodiky v onkologické diagnostice, které jsou zaměřeny na sledování funkce orgánů při chemoterapii:

- scintigrafie ledvin s výpočtem funkčních parametrů; chceme-li vyšetřit glomerulární filtraci, používáme radiofarmakon ^{99m}Tc DTPA, ke zjištění tubulární funkce používáme MAG3. Při tomto vyšetření vidíme jednak tvar, velikost ledvin, vychytávání a transport, jakož i funkční parametry – efektivní průtok plazmy ledvinami anebo glomerulární filtraci. Tyto údaje jsou velmi důležité k monitorování pacienta před či po chemoterapii nebo během ní.
- jedna z metod, která se zcela rutinně používá v mammologii je gatovaný SPECT, při kterém, kromě perfúze myokardu, sledujeme možnosti účinku kardiotoxických cytostatik na depresi systolické funkce, protože při gatovaném vyšetření vidíme jednak poruchy kinetiky, ejekční frakci a objemy systolické a diastolické a systolický volume.
- v poslední době pak zcela nezbytnou součástí nukleární medicíny v onkologii je zobrazení sentinelové uzliny, kdy se používá preparát nanocoll, velikosti částic 80 nanometrů, objem aktivity 2×50 MBq. Používáme dvoudenní protokol. Na našem oddělení aplikujeme peritumorálně a subcutánně na vyznačené místo nad tumorem, po masáži se provádí snímání na gammakameře v přední a zadní projekci. Snažíme se chirurgům označit počet a lokalizaci těchto sentinelových uzlin. Je zejména nutné zaměřit se na uzliny, které nejsou v typické axilární lokalizaci jako jsou parasternální nebo subclaviculární. Druhý den je pacient odvezen na sál, kde pomocí gammasondy operátor sleduje a detekuje sentinelovou uzlinu, která se po extirpaci vyšetří histologicky. Tato metoda je velkým přínosem v moderní léčbě. Zde si dovoluji jen malinkou zmínku o velmi diskutované otázce radiační zátěže na operačním sále. Dovolím si využít studie profesora W. Brennera a H. Ostertaga, která byla přednesena v Neapoli v srpnu 2001 a jmenuje se Radiation exposure to the personnel

during radiguided sentinel lymph node. Vyšetřili 26 pacientů. 15 mělo karcinom prsu, 11 melanom.

Použili aktivitu 30 MBq 99mTc Nanocoll, počítali s délkou operace 30 minut, vzdálenost 2,5 cm byla prstová dávka a vzdálenost 30 cm byla celotělová dávka pro operátora. Vzdálenost pro instrumentální sestru a vzdálenost pro patologa 2,5 cm. Vzdálenost od tumoru 30 cm. Byla vypočítána dávka na jeden rok, kdy se počítalo asi 1 100 operací v délce 30 minut. Celková dávka pro operátora při karcinomu prsu byla 0,17 mSv, pro instrumentální sestru 0,04 mSv, pro patologa 0,06 mSv. Vzhledem k tomu, že celková tělová dávka je menší než 1 mSv, není třeba dalších speciálních opatření.

Další možnosti, které se v mammologické diagnostice objevují, je detekce apoptosy pomocí 99mTc Annexinu. Úplně novým trendem je zobrazení pozitronovou emisní tomografií, v současné době je to pozitronovou emisní tomografií nahrazující vyšetření funkční anatomické, kam patří metody **SPECT/CT a PET/CT**, které umožňují zobrazení buněčného metabolismu, buněčné aktivity a zároveň dokonalou anatomickou lokalizaci. Tato metoda se obrovským tempem rozvíjí v USA – ze všech zařízení, které byly koupeny, bylo 97% přístrojů PET/CT a zbytek PET. Zdá se tedy, že **je jednoznačně rozhodnuto pro PET/CT**. Jde zejména o postižení uzlin, které se lokalizují na CT. Dá se říci, že metoda PET/CT, podle názoru odborníků patří k metodám, které radikálním způsobem mění pohled na léčbu a osud onkologických pacientů, event. jejich další logistiku v celkovém procesu a mají významný ekonomický dopad.

Karcinom jícnu – význam PET/CT pro volbu optimální léčby

Cincibuch J., Strážnická J., Minařík J., Čwierka K.

Onkologická klinika FN Olomouc

Cíl: Vyhodnocení vlastních zkušeností s přínosem PET/CT pro zkvalitnění stagingu karcinomu jícnu a následnou volbu optimální léčby.

Metody: Předléčebné provedení PET/CT u pacientů s předběžně stanoveným operabilním karcinomem jícnu.

Soubor: 10 pacientů s karcinomem jícnu, konvenčními vyšetřovacími metodami shledanými jako operabilní a vhodní pro předoperační chemo-radioterapii. Soubor zahrnuje 8 mužů a 2 ženy s mediánem věku 61 let (53–76 let), histologicky byl spinocelulární karcinom prokázán u 9 pacientů, v jednom případě se jednalo o adenokarcinom.

Výsledky: U 8 pacientů byl pomocí PET/CT potvrzen lokální nebo lokoregionální rozsah tumoru, tito pacienti zahájili plánovanou léčbu. U dvou pacientů (20%), obou se spinocelulárním karcinomem, byla nalezena akumulace radiofarmaka odpovídající vzdáleným metastázám, u jednoho z nich byla

provedena pozitivní biopsická verifikace, u druhého biopsie nebyla provedena pro obtížnou dostupnost ložisek, oba tito pacienti zahájili paliativní chemoterapii (kombinace cisplatinu + fluorouracil).

Závěr: PET/CT je užitečným stážovacím vyšetřením u nově diagnostikovaných pacientů s karcinomem jícnu, protože umožňuje významné části pacientů vyhnout se rizikům pro ně nepřínosné chemo-radiotherapie. Procento zachycených vzdálených metastáz odpovídá výsledkům podobných studií s rozsáhlejšími soubory pacientů.

Význam molekulárně cytogenetické analýzy nádorových buněk pro diagnostiku a léčbu oligodendrogliomů

Babická L.¹, Zemanová Z.¹, Kramář F.², Ransdorfová Š.³, Melicherčíková J.³, Hrabal P.⁴, Kozler P.², Michalová K.^{1,3}

¹Centrum nádorové cytogenetiky, Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. LF UK, Praha; ²Neurochirurgická klinika, Ústřední vojenská nemocnice a 1. LF UK, Praha; ³Ústav hematologie a krevní transfúze, Praha; ⁴Biopsická laboratoř, Ústřední vojenská nemocnice a 1. LF UK Praha

Oligodendrogliomy patří k nejčastějším nádorům centrální nervové soustavy – tzv. difúzním gliomům. Podobně jako u ostatních nádorových onemocnění byla i u mozkových gliomů popsána řada genetických aberací s jasným prognostickým významem. U oligodendrogliomů je z hlediska prognózy významný zejména nález kombinované delecce chromozomových oblastí 1p36 a 19q13,3, který se vyskytuje u asi 50–80% nemocných a je prediktorem dobré chemoterapeutické odpovědi a delšího celkového přežití. Včasný záchyt chromozomových aberací se stal důležitou součástí diagnostiky a prognostické stratifikace nemocných s oligodendrogliomy.

K detekci delecí 1p36 a/nebo 19q13 používáme interfázickou fluorescenční *in situ* hybridizaci (I-FISH) s lokus-specifickými sondami od firmy Abbott-Vysis™. Molekulárně cytogenetickou analýzu provádíme na izolovaných buněčných jádrech z nefixované nádorové tkáně. U vybraných pacientů využíváme k analýze chromozomových aberací v gliálních buňkách metodu komparativní genomové hybridizace (CGH). U všech nemocných porovnááme výsledky molekulárně cytogenetické analýzy s morfologickými a klinickými ukazateli.

Metodou I-FISH jsme vyšetřili vzorky mozkové tkáně 22 nemocných s histologicky diagnostikovaným oligodendrogliomem (7x oligodendrogliom, 14x anaplastický oligodendrogliom, 2x anaplastický oligoastrocytom). I-FISH poskytla informativní výsledek u 21 pacientů (95,5%), u 1 nemocného bylo vyšetření neinformativní z důvodu špatného odběru vzorku. Kombinovanou delecí 1p36/19q13 jsme prokázali u 17 pacientů, u šesti z nich jsme našli další

chromozomové přestavby typické pro astrocytomy vyšších stupňů (grade III, grade IV), u pěti těchto nemocných došlo k progresi onemocnění. U jednoho pacienta jsme detekovali pouze delecí oblasti 1p36 a u dalších tří nemocných jsme nenalezli žádné chromozomové aberace.

Molekulárně cytogenetická analýza (I-FISH, CGH) významně přispěla u nemocných s oligodendrogliomy nejen k upřesnění diagnózy a prognózy, ale i k následné stratifikaci léčby. Prognostický význam dalších chromozomových aberací u nemocných s oligodendrogliomy a kombinovanou delecí 1p36/19q13,3 bude nutné ověřit u větších souborů nemocných.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR 1A/8237-3 a MZO 00064165.

Dicentrické chromozomy u dětských akutních lymfoblastických leukemií (ALL)

Holzerová M.¹, Lakomá I.¹, Pospíšilová H.¹, Prekopová I.¹, Kropáčková J.¹, Hanzlíková J.¹, Pospíšilová D.², Novák Z.², Mihál V.², Blažek B.³, Kuhn T.³, Ptoczková H.³, Indrák K.¹, Jarošová M.¹

¹Hemato-onkologická klinika FN a LF UP Olomouc; ²Dětská klinika UP a LF UP Olomouc; ³Klinika dětského lékařství FN SP Ostrava

Cytogenetické studie dětských leukemií ukázaly, že existuje spojení mezi specifickými chromozomovými změnami a podskupinami nemocných, zvláště ve vztahu k prognose. Přesto, že byly určeny a potvrzeny často se opakující chromozomové změny, existuje stále velká heterogenita získaných strukturních i početních chromozomových změn, které mohou postihnout kterýkoliv chromozom, včetně chromozomů pohlavních. K méně častým strukturním změnám u dětských akutních leukemií (AL) patří nálezy dicentrických chromozomů.

Dicentrický chromozom je derivovaný chromozom, který má dvě centroméry. Tyto centroméry mohou patřit dvěma různým chromozomům nebo patří jednomu chromozomovému páru a derivovaný chromozom je výsledkem translokace mezi homologními chromozomy za vzniku isodicentrického chromozomu. Příkladem nejčastěji se vyskytujícího dicentrického chromozomu u dětských ALL je dic(9;12). Nemocní s dic(9;12) jako samostatnou chromozomovou změnou představují hypodiploidní podskupinu nemocných s excelentní prognosou.

V našem souboru 145 dětských akutních lymfoblastických leukemií jsme metodami cytogenetiky a molekulární cytogenetiky určili dicentrický chromozom celkem u 12 nemocných. Nejčastěji byly do stavby dicentrického chromozomu zapojeny chromozomy 9 a 12, dále pak chromozomy X, 2, 7, 11, 13, 16 a 21. U dvou nemocných byl potvrzen isodicentrický chromozom 21. U žádného nemocného se nevyskytoval dicentrický chromozom jako jediná změna karyotypu, vždy byly součástí komplexních přestaveb karyotypu.

Práce má za cíl ukázat jednotlivé typy dicentrických chromozomů, metody použité pro jejich určení a jejich možný vztah k prognóze onemocnění.

Práce je podporována grantem MSM 6198959205.

Cytogenetika, molekulární cytogenetika Burkitt-like lymfomu

Balcárková J., Holzerová M., Pospíšilová H., Plachý R., Hanzlíková J., Kropáčková J., Prekopová I., Novosadová A., Papajík T., Kučerová L., Indrák K., Jarošová M. Hemato-onkologická klinika FN a LF Olomouc

Burkitt-like lymfom je klinicky a cytogeneticky heterogenní onemocnění, jehož diagnostika je založena na histopatologickém a imunohistochemickém vyšetření, doplněném cytogenetickým a molekulárně cytogenetickým vyšetřením proto, že tento typ lymfomu je charakterizován chromozomovými změnami, které často vedou k deregulaci dvou protoonkogenů C-MYC a BCL-2. Nemocní s deregulací C-MYC genu jsou mladší nemocní s intra-abdominální lokalizací nádoru a krátkým přežíváním, zatímco nemocní s deregulací BCL-2 genu jsou starší nemocní, s postižením uzlin a kostní dřeni a delším přežíváním. Výsledky studií ukazují, že cytogenetické a molekulárně cytogenetické určení podskupiny Burkitt-like lymfomů s deregulací genu C-MYC je klinicky velmi významné, protože tyto nemocní vyžadují intenzivní terapeutický přístup.

Cílem naší práce je ukázat výsledky cytogenetických, molekulárně cytogenetických metod k přesnému stanovení genetických změn na případu 31letého pacienta s histopatologickou diagnózou Burkitt-like lymfomu. Diagnostickým materiálem byly buňky ascitu, získané punkcí peritonea a buňky kostní dřeni. Klasické cytogenetické vyšetření nestimulovaných buněk ascitu odhalilo přítomnost abnormálních buněčných klonů. Komplexní přestavby

v těchto klonech byly dále identifikovány pomocí metod fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a mnohobarevné fluorescenční *in situ* hybridizace (M-FISH). Metodou FISH s LSI IGH/MYC,C8 Tri-color, Dual fusion sondou prokázala přítomnost dvou fúzních signálů, avšak hybridizace s LSI IGH a BAC sondami pro jednotlivé oblasti genu IgH odhalila variantní translokaci, která byla výsledkem inserce duplikované konstantní oblasti IgH genu do oblasti C-MYC genu na obou chromozomech 8.

Práce je důkazem významu použitých cytogenetických metod pro určení genetických změn, které vedou k deregulaci některých genů zahrnutých do patogeneze onemocnění

Práce je podporována grantem MSM 619 895 9205.

Laboratorní diagnostika mnohočetného myelomu

Šálek T.

Oddělení klinické biochemie, Uherské Hradiště

Mnohočetný myelom je nádorové onemocnění vycházející z maligně transformované plazmatické buňky. Je druhou nejčastější hematologickou malignitou po non-Hodgkinských lymfomech. V 99% případů je přítomný paraprotein. To je monoklonální protilátka nebo její část (volné monoklonální lehké řetězce nebo těžké monoklonální řetězce). Paraprotein bývá přítomný také u jiných malignit vycházejících z B lymfocytární řady.

Klinické symptomy jsou velmi pestré. Poškození tkání a orgánů způsobuje buď paraprotein samotný, nádorová masa v kostní dřeni, nebo vzácně nádorové buňky v jiných orgánech.

Nejčastějším symptomem je bolest zad a kostí. Dále bývají změny v krevním obrazu – anémie, leukopenie a trombocytopenie, opakované infekce, hyperviskózní syndrom.

Monoklonální volné lehké řetězce můžou dále způsobit proteinurii, periferní polyneuropatii nebo srdeční selhání.

Pokud má lékař z klinického obrazu podezření na diagnózu mnohočetného myelomu měl by indikovat kombinaci dvou laboratorních testů – elektroforézu proteinů séra a stanovení volných lehkých řetězců v séru. Elektroforéza proteinů séra samotná nezachytí 20% paraproteinů – především paraproteinů z volných monoklonálních lehkých řetězců. Její analytická citlivost je 500–2000 mg/l podle polohy paraproteinu. Elektroforéza séra také neumožňuje monitoraci léčby myelomů z lehkých řetězců, protože mají často po léčbě koncentraci paraproteinu pod tuto mez detekce.

Stanovení volných lehkých řetězců v séru se provádí imunoturbidimetry nebo imunonefelometriky. Diagnostické protilátky jsou namířeny proti fyziologicky skrytým epitopům lehkých řetězců. Epitopům, které jsou v celých molekulách imunoglobulinů překryty těžkými řetězci. Analytická citlivost je 3 mg/l. Metoda je tedy asi 100krát citlivější než elektroforéza a 10krát citlivější než imunofixace. Pro interpretaci výsledku je rozhodující **poměr free kappa : free lambda**. Při zánětu a poklesu glomerulární filtrace stoupají jak kappa, tak lambda řetězce, ale jejich poměr zůstává ve fyziologických mezích. Volné monoklonální lehké řetězce nejprve stoupají v séru, poté poškozují ledviny a do moče se dostávají až při pokročilé devastaci ledvin. Proximální tubuly totiž dokáží reabsorbovat až 30 gramů volných lehkých řetězců za den. Výhodou volných lehkých řetězců při monitorování léčby je jejich krátký biologický poločas kolem 3 hodin. Poměr free kappa: free lambda zůstává v normě pokud nádor produkuje jen celou molekulu monoklonálního imunoglobulinu.

Závěrem lze říci, že při klinickém podezření na mnohočetný myelom by měl lékař ordinovat elektroforézu proteinů séra a stanovení volných lehkých řetězců v séru.

POSTERY

Expresní analýza nové linie prsních progenitorových buněk EM-G3Prchalová M.¹, Buršíková E.¹, Kleiblová P.^{2,3}, Scholzová E.², Matoušková E.¹, Kleibl Z.²¹Oddělení buněčné biologie, ÚMG AV ČR; ²Ústav biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK; ³Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN

EM-G3 je nová klonální linie nádorových progenitorů lidského mamárního karcinomu se zachovalou schopností diferenciaci v myším modelu. Cílem práce bylo hodnocení exprese genů angažovaných v estrogenní signalizaci mamárních nádorových buněk v prostředí s estradiolem (E2) a tamoxifenem (TAM) ve srovnání s estrogen-dependentní linií MCF7.

Metody: Stanovení růstových charakteristik linie EM-G3 v různých koncentracích TAM (antagonisty estrogenního receptoru – ER) a E2 (agonisty ER) bylo provedeno za účelem zjištění závislosti EM-G3 buněk na přítomnosti regulátorů ER v médiu. Růstové parametry byly stanoveny pomocí kolorimetrické analýzy koncentrace proteinů, tzv. sulforhodaminovým testem. Na základě těchto výsledků byla vybrána nejvhodnější/nejúčinnější koncentrace estradiolu (10^{-7} M) a tamoxifenu (10^{-6} M). Těmto koncentracím byly vystaveny EM-G3 buňky stejně jako kontrolní ER pozitivní buňky MCF7 po dobu 16 h a 40 h. Následné vyšetření genové exprese proběhlo pomocí dvou cDNA arrayů „Breast Cancer & Estrogen Receptor Signaling“ a „Cancer PathwayFinder“ (Superarray). Detailnější analýza genů pro ER α , BRCA1, BRCA2 a pS2 (TFF1), což je kódující polypeptid sekretovaný mamárními buňkami stimulovaný estrogenem, byla provedena pomocí kvantitativní real-time PCR (qPCR) se SYBRGreen I (Roche).

Výsledky: Výsledky stanovení růstových charakteristik vypovídají o insenzitivě buněk EM-G3 na přítomnosti E2 (podobně jako je tomu u E2 rezistentní linie MDA-MB231). Pomocí cDNA arraye bylo vyšetřeno celkem 170 genů (22 genů bylo společných pro oba typy arraye). Buněčná linie MCF7 exprimovala 62 genů, buňky EM-G3 linie 55 genů. V buňkách estrogen-dependentní linie MCF7 kultivovaných v přítomnosti E2 (16 h a/nebo 40 h) byla, ve srovnání s kontrolou bez přítomnosti aktivní substance, exprese snížena u 37 genů (např. Apaf-1, Bcl2-L1, CD44, ITGB1, MDM2, PTEN) a zvýšena u 19 genů (např. CDH1, CYP19A1, ErbB2, Muc-18, pS2, PAI-1). Přítomnost TAM způsobovala v buňkách MCF7 snížení exprese u 26 genů (např. CCNE2, PIK3CB, pS2, Raf1) a zvýšení u 15 genů (např. Apaf-1, Bcl2-L1, ER β , MDM2). Přítomnost aktivních substancí ovlivňovala transkriptom kultivovaných EM-G3 bu-

ňek velmi málo: vlivem E2 došlo ke snížení exprese EGFR, ErbB2, PTEN, PAI-1 a zvýšení exprese F3, ITGA6, Muc-18, NME4, maspin. Ještě menší změny byly vyvolány TAM (snížení exprese CD44, PIK3CB a PAI-1; zvýšení exprese ITGA6, Muc-18 a NME4).

Expresí genu pS2 pomocí qPCR vykazovala u linie MCF7 signifikantní změny v závislosti na přítomnosti E2 (zvýšení exprese o 60 %) a TAM (snížení exprese o 65 %). Linie EM-G3, stejně jako linie MDA-MB231, vykazovala nízkou expresi pS2, jejíž míra nebyla ovlivněna přítomností TAM nebo E2. Expresí ER α , BRCA1, BRCA2 v buňkách EM-G3 je nízká a neovlivněná E2 ani TAM.

Závěr: Expresní analýza buněčné linie EM-G3 ukázala, že se jedná o populaci E2 insenzitivních buněk s nízkou expresí ER α a ER β . Tato charakteristika společně s expresí markerů nezralých buněk epitelu prsní žlázy (ITGA6+, CD44+, K18-, K19-, pS2-) podporuje, vedle předchozích imunocytochemických vyšetření a zachovalé částečné schopnosti diferenciaci, předpoklad o původu EM-G3 buněk z imortalizovaných nádorových progenitorů s neúplnou nádorovou transformací.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem č. 93/2005/C/FaF GAUK.

Hladina metalothioneinu v krvi u pacientů se zhoubnými nádory hlavy a krkuHoráková Z.¹, Tóthová E.¹, Salzman R.¹, Binková H.¹, Zítka O.², Adam V.², Fabík I.², Kizek R.²¹Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, FN u sv. Anny v Brně; ²Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně

Úvod: Metalothionein (MT) je intracelulární, nízkomolekulární, na cystein bohatý protein. K jeho primárním rolím v organismu patří udržování homeostázy zinku, detoxikace těžkých kovů a ochrana před oxidativním stresem. Syntéza MT v játrech je indukována při expozici těžkým kovům, při infektu nebo zánětu. Recentní výzkumy ukazují na významný vztah hladiny MT ke karcinogenezi. Overexpresí MT byla imunohistochemicky prokázána u mnoha histologicky rozličných typů tumorů. Většinou korelovala hladina MT s agresivnějším chováním a horší prognózou nádorů. Cílem naší práce bylo sledování obsahu MT v plné krvi u pacientů s maligními nádory hlavy a krku.

Metodika: Zkoumaný soubor tvořili pacienti s histologicky verifikovanými maligními nádory hlavy a krku léčenými od ledna do října 2006 na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice u svatě

Anny v Brně. Elektroanalyticky byla stanovena hladina MT v plné krvi pomocí adsorpční přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulsní voltametrií (DPV). Ke statistickému zpracování naměřených výsledků bylo použito Mann-Whitneyho U-testu.

Výsledky: V souboru onkologických pacientů bylo hodnoceno 44 krevních vzorků odebraných po histologické verifikaci před zahájením onkologické léčby. Průměrný věk pacientů byl $42,6 \pm 8,3$. Koncentrace metalothioneinu v plné krvi nabývaly průměrné hodnoty $6,5 \pm 5,3$, maximum 22,2 a minimum $0,1 \mu\text{l/ml}$.

Dle získaných výsledků nebyl zjištěn vztah mezi TNM a hladinou MT před léčbou. Při porovnání časných a pozdních stadií onemocnění, tj. St I+II vs. III+IV, je patrná vyšší hladina MT u méně pokročilých nádorů ($p = 0,09$). Při zpracování souboru pouze spinocelulárních karcinomů, které jsou histologicky dominantním typem malignit v oblasti hlavy a krku, se naznačená korelace hladiny MT s pokročilostí nádoru dále zvýrazní. Pro tento soubor platí: St I+II >> III+IV ($p = 0,04$) a T 1+2 >> T3+4 ($p = 0,01$).

Závěr: K upřesnění role MT v karcinogenezi bude nutné dlouhodobější sledování většího souboru nemocných. Na momentálně probíhající pilotní práci navážeme prospektivní studii, ve které budeme monitorovat dynamiku hladiny MT v průběhu léčby (chirurgické, radioterapie a chemoradioterapie), sledovat korelaci MT s onkologickými charakteristikami nádorů (histologie, staging, grading) a s parametry přežití (disease free interval, over all survival). Přínosem pro zjištění širších souvislostí by mohlo být srovnání s odpovídající kontrolní skupinou zdravých jedinců, případně s jinými patologickými stavy, u kterých se rovněž předpokládá změna hladin MT (benigní nádory, záněty, hepatopatie). Očekávaným přínosem by mělo být potvrzení nebo vyvrácení významu MT jako možného nádorového markeru při primární diagnostice či při monitoraci dynamiky onemocnění u nádorů hlavy a krku.

Měření koncentrace metalothioneinu v nádorové tkáni a sliznici pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krkuTóthová E.¹, Horáková Z.¹, Salzman R.¹, Binková H.¹, Svoboda M.², Adam V.², Blašík O.², Petrlová J.², Kizek R.²¹Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, FN u sv. Anny, Brno; ²Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity, Brno

Úvod: Metalothionein (MT) je ubikvitní, nízkomolekulární, intracelulární protein, bohatý na cys-

tein, účastníci se homeostázy a detoxikace těžkých kovů. Biologické funkce MT zahrnují metaloregulační funkce v proliferaci, diferenciaci, apoptóze, ochraně proti oxidačnímu stresu a chemorezistenci. V posledních letech je MT intenzivně zkoumán jako potencionální nádorový marker, přičemž se využívají imunohistochemické metody. V naší studii jsme zkoumali koncentraci MT v nádorové tkáni a zdravé sliznici elektroanalyticky.

Cíl studie: Srovnání koncentrace MT v nádorové tkáni a zdravé sliznici a její korelace s klinicko-patologickými parametry.

Metody: 21 pacientům se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku jsme při diagnostické endoskopii nebo onkochirurgickém výkonu odebrali vzorky tumoru a zdravé sliznice. Po homogenizaci vzorků se koncentrace MT stanovovala elektroanalyticky. Rozdíly v hodnotách v uvedených tkáních jsme statisticky vyhodnocovali podle Spearmanova koeficientu korelace a neparametrického Mann-Whitneyho testu.

Výsledky: Průměrná koncentrace MT v nádoru byla 8,67 µl/ml (medián 7,18 µl/ml), ve sliznici 5,17 µl/ml (4,48 µl/ml). Zjistili jsme statisticky významný rozdíl obsahu MT v nádorové tkáni a ve sliznici ($p = 0,04$). Významný vztah mezi hodnotou MT a věkem, pohlavím pacientů, lokalizací tumoru, stagingem a gradingem nebyl naměřen.

Závěr: V ORL oblasti dosud chybí nádorový marker, který by měl praktické využití. V posledních letech byl u malignit v oblasti hlavy a krku i u jiných lokalizací studována exprese MT se slibnými výsledky. Overexprese MT byla většinou asociována s vyšší proliferací a horší prognózou onemocnění. Tyto výsledky se opíraly o imunohistochemické stanovení exprese MT v tkáních.

V naší studii jsme využívali elektrochemického měření koncentrace MT v homogenizované nádorové tkáni a sliznici. MT u tumorů byl signifikantně vyšší než u sliznic. Korelace se stagingem, gradingem a dalšími ukazateli se nepodařilo prokázat.

Pro větší objektivizaci a zjištění dalších souvislostí bude nutné vyšetření většího souboru pacientů a srovnání s imunohistochemickým vyhodnocením výsledků.

Klinické využití detekce EGFR u spinocelulárních karcinomů hlavy a krku

Neuwirthová J.¹, Smilek P.¹, Veselý K.², Rottenberg J.¹, Kostřica R.¹, Mechl Z.³

¹Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku; ²Patologicko-anatomický ústav; ³Oddělení klinické a radiační onkologie, FN MU u sv. Anny, Brno.

EGFR (epidermal growth factor receptor nebo-li HER 1) je jedním ze 4 členů rodiny transmembránových epidermálních receptorů růstových faktorů, kam dále patří HER2, HER 3 a HER4. Tyto receptory mají svoji fyziologickou funkci u normálních tkání,

hrají však i klíčovou roli v kancerogenezi. Po navázání ligandu na receptor následuje jeho dimerizace s dalším receptorem (vytvoření homodimeru nebo heterodimeru). Nejfrekventovanějšími ligandy tohoto receptoru jsou EGF a TGF alfa. Aktivace EGFR signální cesty vede u nádorů k buněčnému dělení, angiogenezi, metastazování a inhibici apoptózy, znamená byla i rezistence na radioterapii, chemoterapii a hormonální terapii. Na rozdíl od receptorů HER2, u kterých je zvýšená aktivace signální cesty způsobena v převážné většině případů fenoménem overexprese receptoru, u EGFR bylo popsáno více možností: overexpresí EGFR cestou zvýšené transkripce, mutovanými formami EGFR, zvýšeným množstvím ligandů anebo heterodimerizací EGFR (s HER2). Signalizace pomocí homodimerů EGFR je slabá následkem downregulace a degradace receptoru po jeho ligandem zprostředkované aktivaci. Receptor HER2 může potencovat funkci EGFR zvýšením vazebné afinity EGF, stabilizací a recyklací EGFR-HER2 heterodimerů. Výše uvedené fakta dávají podklad pro hypotézu o možné souvislosti současné koexprese EGFR a HER2 s negativní prognózou u karcinomů hlavy a krku. U EGFR exprimujících nádorů může vysoká exprese HER2 působit na ve smyslu progresu nádoru a může mít i negativní vliv na účinnost léčby EGFR inhibitory. EGFR inhibitory se v současné době dostávají do popředí onkologického zájmu. Do praxe se zavádí monoklonální protilátky proti extracelulární doméně receptoru a nízkomolekulární intracelulární inhibitory tyrosinkinázy. V našem souboru bylo vyšetřeno 176 pacientů s primárním záchytem spinocelulárního karcinomu hlavy a krku (HNSCC), dle lokalizace se jednalo o 36 karcinomů rtu a dutiny ústní, 94 karcinomů orofaryngu, 23 karcinomů hypofaryngu a 53 karcinomů laryngu. Pro stanovení množství exprimovaného EGFR a HER2 jsme použili metodu imunohistochemické detekce ze vzorku nádoru. EGFR negativních pacientů bylo 39, u ostatních, tj. v 78 %, byla zachycena pozitivní exprese v rozmezí intenzity 1–3+. Pozitivitu HER2 vykazovali pouze 4 pacienti (tj. 2 %). V souboru EGFR negativních HNSCC byl nalezen trend výskytu vyšších stadií onemocnění ve srovnání s EGFR pozitivním souborem. Ze zastoupení vyšších stadií vyplynulo i statisticky významně nižší přežití u EGFR negativních pacientů. Pokud náhodně vyřadíme ze souboru EGFR negativních nádorů případy, kdy nedošlo ke kompletní léčebné odpovědi po primární léčbě, pak je mezi oběma soubory patrný marginálně statisticky významný rozdíl mezi DFI (disease free intervalem), ze kterého lze vyvodit signifikantně vyšší pravděpodobnost časné recidivy u EGFR pozitivních pacientů. Expresi EGFR ve vztahu k pravděpodobnosti časné recidivy onemocnění by proto bylo vhodné hodnotit u pacientů s nižším stadiem onemocnění. Pokud by se tento vztah dále prokázal na větších souborech, mohlo by to mít event. vliv i na individuální úpravu onkologické terapie. Otázkou, proč jsme u EGFR pozitivního souboru zachytili nižší stadia onemocnění, by bylo

hypoteticky možné vysvětlit pozorováním, že pacient při vyhledání lékaře reaguje spíše na dynamiku růstu infiltrace než na aktuální stav. EGFR pozitivní tumory mají prokazatelně rychlejší růst a proto i časnější záchyt ve srovnání s tumory EGFR negativními, které rostou pomaleji a proto pacienta tolik neznepekují. Zda-li se je současná koexprese EGFR a HER2 u HNSCC prognosticky špatným faktorem, nebylo možno určit vzhledem k velmi nízkému výskytu HER2 u těchto nádorů. Využití detekce EGFR v prognóze karcinomu a predikci terapeutické odpovědi na inhibitory EGFR je stále předmětem mnoha výzkumů. Slibné jsou pokusy o nalezení prediktivní hodnoty současné koexprese EGFR s dalšími faktory, ovlivňující chování nádorů.

Možnosti komparativní genomové hybridizace s vyšším rozlišením (HR-CGH) a array-CGH při detekci prognostických markerů u neuroblastomu.

Kuglík P.¹, Vranová V.¹, Nečaslová E.², Žežulková D.¹, Štefančíková L.¹, Filková H.¹, Mazánek P.³, Štěrba J.³, Veselská R.¹

¹Oddělení genetiky a molekulární biologie, Ústav experimentální biologie, PF MU, Brno; ²Biologický ústav, Lékařská fakulta MU, Brno; ³Klinika dětské onkologie FN Brno – pracoviště dětské medicíny

Současný rozvoj molekulární medicíny klade stále vyšší požadavky na vývoj nových cytogenetických a molekulárně biologických metod, které by umožňovaly co nejkompaktnější analýzu genomu nádorové buňky a tím i stále přesnější stanovení vhodných genetických markerů charakterizujících biologické vlastnosti jednotlivých nádorů.

Neuroblastom patří k vysoce maligním embryonálním nádorům dětského věku. Vychází z nezralých, nediferencovaných buněk sympatiku (z buněk primordiální neurální lišty, které v embryonální fázi vývoje osídlují sympatická ganglia, dřeň nadledviny a další oblasti). Neuroblastom je charakteristický svou výraznou genetickou rozmanitostí, která způsobuje jeho různorodé klinické chování, což v poslední době vedlo k odhalení mnoha cytogenetických a molekulárně biologických markerů, pomocí kterých lze predikovat chování tohoto onemocnění a upřesnit volbu individuální terapie.

Ke stratifikaci jednotlivých pacientů v klinické praxi byla doposud užívána následující kritéria: klinické stadium (INSS), věk v době diagnózy, NMYC amplifikace, histologie (tzv. Shimadova klasifikace) a DNA index. V současnosti však do běžné klinické praxe začínají pronikat i další cytogenetické markery ovlivňující stratifikaci pacientů s neuroblastomem. Mezi nové prognostické znaky, které jsou součástí nové léčebné strategie COG (Children's Oncology Group) patří nově i průkaz del 1p a 11q LOH.

Vzhledem ke vzrůstajícímu počtu i důležitosti nových prognostických cytogenetických markerů u neuroblastomu se stává při vyšetřování vzorků

nádorové tkáně stále efektivnější používání nových molekulárně cytogenetických metod zaměřených na celogenomový screening chromozomových abnormalit.

V letech 1998–2006 bylo v Laboratoři molekulární cytogenetiky OLG FN Brno ve spolupráci s Klinikou dětské onkologie FN Brno provedeno molekulárně cytogenetické vyšetření primární nádorové tkáně celkem u 50 dětí s neuroblastomem.

Ke komplexní identifikaci prognosticky významných cytogenetických znaků byly používány techniky interfázni fluorescenční hybridizace (I-FISH), komparativní genomová hybridizace (CGH) a komparativní genomová hybridizace s vysokým rozlišením (HR-CGH). Jsou prezentovány naše první výsledky vyšetření pacientů s neuroblastomem pomocí technologie array-CGH (GenoSensor Array 300).

Naše práce shrnuje cytogenetické nálezy u pacientů ve vztahu ke klinickým údajům a dokumentuje přínos jednotlivých metod k detekci prognostických markerů u neuroblastomu.

Práce byla podpořena VZ MŠMT 0021622415 a grantem IGA NR9125-4/2006.

Re-exprese nestinu v nádorově transformovaných buňkách: in vitro studie na vybraných typech solidních nádorů

Loja T.¹, Chlapek P.¹, Zitterbart K.², Veselská R.³

¹Laboratoř nádorové biologie a genetiky, Oddělení genetiky a molekulární biologie, Ústav Experimentální Biologie, PF MU, Brno; ²Klinika dětské onkologie, LF MU a FN Brno; ³Laboratoř nádorové biologie a genetiky, Oddělení genetiky a molekulární biologie, Ústav Experimentální Biologie, PF MU, Brno

Nestin (neuroepithelial stem cell protein) byl identifikován jako protein třídy VI intermediárních filament. U savců je tento protein exprimován během časných stadií embryogeneze a v průběhu vývoje je postupně nahrazen neurofilamenty, resp. GFAP. V normálním lidském mozku se během dospělosti vyskytuje několik typů nestin-pozitivních buněk v definovaných oblastech předního mozku; výrazná re-exprese nestinu byla rovněž prokázána v reaktivních astrocytech jako důsledek různých typů poškození mozku včetně zánětu.

Změny v expresi specifických proteinů intermediárních filament představují jeden z významných nástrojů pro diagnostiku solidních nádorů. Obnovená exprese nestinu byla podle dosud publikovaných studií detekována především u nádorů centrální nervové soustavy (neurocytomy, gangliogliomy, ependymomy, pilocytické astrocytomy, maligní gliomy včetně multiformního glioblastomu, primitivní neuroektodermální tumory – PNETs, medulloblastomy a medulloepiteliomy), ale i u některých dalších typů solidních nádorů (rhabdomyosarkomy, gastrointestinální stromální tumory a maligní melanomy).

Z uvedeného výčtu vyplývá, že re-exprese nestinu v nádorových buňkách úzce souvisí se stupněm dediferenciace nádoru a jeho malignitou. Je tedy zřejmé, že imunohistochemická, resp. imunocytochemická detekce nestinu může být významnou součástí klasifikace solidních nádorů, zejména těch, které vznikají z nezralých, kmenových nebo progenitorových buněk.

Naše studie byla zaměřena na detekci nestinu v buněčných liniích, které byly derivovány z vybraných typů solidních nádorů dětského i dospělého věku. S využitím nepřímé imunofluorescence jsme prokázali v rámci detekce profilu proteinů intermediárních filament silnou re-expresi nestinu u linií NB-01 (neuroblastom), JE-03 (maligní fibrosní histiocytom, grade III) a JE-04 (osteoplastický osteosarkom) a GM-7 (multifonní glioblastom). Na modelu linie GM-7 byla dále provedena detailní studie exprese nestinu na buněčné i ultrastrukturální úrovni, která prokázala přítomnost nestinu nejen v cytoplazmě, ale i v buněčném jádře nádorově transformovaných buněk. Tyto výsledky naznačují, že přítomnost nestinu může být považována za významný diagnostický marker nádorově transformovaných buněk a že nestin obdobně jako další cytoskeletální proteiny pravděpodobně hraje důležitou roli v metastatickém potenciálu nádorových buněk.

Tato studie byla podpořena granty COST OC B19.001, VZ MSM 0021622415 a IGA NR9125-4/2006.

Změny tepové frekvence a tlaku krve při převodu štěpu krvevorných buněk. Vliv kryokonzervační látky dimethylsulfoxidu

Horáček J. M.^{1,2}, Jebavý L.^{1,2}, Jakl M.³, Slováček L.^{1,2}

¹Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví UO Hradec Králové; ²II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, FN a LF UK Hradec Králové; ³Fakulta vojenského zdravotnictví UO Hradec Králové

Úvod: Jako kryokonzervace štěpu krvevorných buněk se dnes nejčastěji používá dimethylsulfoxid (DMSO). Maximální doporučená denní dávka DMSO je 1 g/kg hmotnosti pacienta. Mezi nejčastější nežádoucí účinky DMSO patří flush obličeje, nauzea, zvracení, kašel, tachypnoe, změny krevního tlaku (TK) a tepové frekvence (TF), většinou ve smyslu zvýšení. Může dojít i k rozvoji arytmií nebo srdečního selhání.

Cíl: Posouzení vlivu DMSO na TK a TF u pacientů transplantovaných na II. interní klinice – Oddělení klinické hematologie FN Hradec Králové v letech 2003 až 2005.

Soubor a metodika: Do studie bylo zařazeno 153 pacientů, kteří podstoupili transplantaci krvevorných buněk (TKB) pro hematologické onemocnění. V souboru bylo 80 mužů a 73 žen, průměrný věk činil 49,1 ± 12,6 let (medián 51 let). V souboru

bylo 42 (27,5%) pacientů léčených pro arteriální hypertenzi.

Ve 115 (75,2%) případech se jednalo o autologní TKB, alogenní TKB byla provedena ve 38 (24,8%) případech. Ve 133 (86,9%) případech byla použita kryokonzervace štěpu s použitím DMSO, ve 20 (13,1%) případech byl proveden přímý převod bez kryokonzervace (kontrolní skupina).

Systolický krevní tlak (STK), diastolický krevní tlak (DTK) a tepová frekvence (TF) byly u obou skupin měřeny bezprostředně před a po podání štěpu krvevorných buněk.

Výsledky: Změny TK a TF při podání štěpu krvevorných buněk s DMSO a bez DMSO jsou zobrazeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1. Změny TK a TF při podání štěpu s DMSO

parametry	před TKB	po TKB	p
STK [mm Hg]	122,3 ± 17,9	127,7 ± 18,1	< 0,0001
DTK [mm Hg]	70,9 ± 12,3	74,1 ± 12,6	< 0,01
TF [/min]	81,5 ± 13,6	81,8 ± 14,2	ns

Tabulka 2. Změny TK a TF při podání štěpu bez DMSO

parametry	před TKB	po TKB	p
STK [mm Hg]	136,3 ± 17,6	138,4 ± 15,6	ns
DTK [mm Hg]	78,1 ± 9,5	76,9 ± 11,3	ns
TF [/min]	81,6 ± 23,0	81,1 ± 21,8	ns

Ve skupině s použitím DMSO došlo ke statisticky významnému vzestupu STK a DTK. Vzestup TK byl více vyjádřen u pacientů s celkovou dávkou DMSO nad 0,8 g/kg. U pacientů s dávkou DMSO nad 0,8 g/kg došlo ve většině případů k vzestupu TF, u pacientů s nižší dávkou DMSO docházelo spíše k poklesu TF. V kontrolní skupině bez použití DMSO nedošlo k významným změnám TK a TF.

Změny TK a TF se statisticky významně nelišily mezi skupinou pacientů léčených pro arteriální hypertenzi a ostatními pacienty.

Závěry: Naše výsledky ukazují, že podání štěpu krvevorných buněk kryokonzervovaného pomocí DMSO vedlo ke statisticky významnému vzestupu STK a DTK. Změna TF nebyla statisticky významná. Změny TK a TF vykazovaly závislost na celkové dávce podaného DMSO.

Změny sledovaných parametrů byly zpravidla přechodné a asymptomatické a nevyžadovaly léčebnou intervenci. Mohou ale být příčinou komplikací, obzvláště u pacientů s preexistujícím kardiovaskulárním onemocněním. Těmto pacientům by měla být věnována zvýšená pozornost a jejich stav před TKB dostatečně kompenzován. Množství DMSO ve štěpu je možné redukovat centrifugací před podáním. Tento postup ale vede ke ztrátě části krvevorných buněk. Další možností je rozdělení převodu štěpu do více dnů.

Acute cardiotoxicity of idarubicin in patients treated for hematological malignancy

Horáček J. M.^{1,2}, Tichý M.^{1,3}, Pudil R.⁴,
Jebavý L.^{1,2}, Slováček L.^{1,2}

¹University of Defence Brno, Faculty of Military Health Sciences Hradec Králové, Czech Republic; Department of Field Internal Medicine; ²Charles University Prague, Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital Hradec Králové, Czech Republic;

³2nd Department of Medicine – Clinical Hematology, Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics;

⁴1st Department of Medicine

Background: Cardiotoxicity is a serious and relatively frequent complication of antitumorous treatment. Anthracyclines represent the greatest risk. Various methods have been recommended for cardiotoxicity monitoring. Biochemical markers of structural and functional myocardial injury have been gaining ground in this field.

Aim: Monitoring of acute cardiac toxicity during induction chemotherapy for acute myeloid leukemia (AML) and assessment of the potential for use of biochemical markers in early diagnostics of cardiotoxicity.

Methods: Fifteen consecutive adult patients with a newly diagnosed AML (mean age 43.7 ± 10.6 years, 9 male and 6 female) were studied. The patients received induction chemotherapy containing intermediate doses of cytarabine and anthracycline agent – idarubicin (IDA) 12 mg/m²/day intravenously on day 1, 3 and 5 (in total 36 mg/m² = one quarter of the maximum recommended cumulative dose).

From biochemical markers of myocardial injury, we used N-terminal pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP), cardiac troponin T (cTnT) and creatine kinase MB (CK-MB mass). Serial measurements of plasma NT-proBNP concentrations were performed at the baseline, the day following each IDA infusion, after 14 days and after circa 1 month, i.e. before the next chemotherapy. Cardiospecific markers (cTnT, CK-MB mass) were measured at the baseline and after the last IDA infusion.

Results: The mean baseline concentration of NT-proBNP in newly diagnosed AML patients was 129.7 ± 59.6 pg/ml. The mean NT-proBNP concentration increased after the first IDA infusion to 307.3 ± 171.4 pg/ml ($p < 0.05$). In most of the patients, the second and the third IDA infusions were not associated with a further increase in the NT-proBNP value and values after 2 or 4 weeks were not significantly different from the baseline. However, in one of the patients the NT-proBNP values were increasing after each IDA infusion (after the last one 786.2 pg/ml) and within 14 days he developed congestive heart failure due to left ventricular diastolic dysfunction as assessed by echocardiography. At that time, the NT-proBNP value was 1184.0 pg/ml; after diuretics it decreased significantly.

In all patients, plasma cTnT and CK-MB mass concentrations were within the reference interval at the baseline and after the induction chemotherapy.

Conclusions: Our results show that induction chemotherapy in AML (IDA 36 mg/m² and intermediate doses of cytarabine):

1. does not cause detectable damage of cardiomyocyte structure,
2. is in most patients associated with acute neurohumoral activation (transient elevation of NT-proBNP) indicating acute subclinical cardiotoxicity,
3. may lead to congestive heart failure and NT-proBNP seems to be a promising early marker and predictor of this complication.

Further follow-up of the patients is required to find out whether these acute changes are predictive for chronic and late anthracycline cardiotoxicity.

The work was primarily supported by the Research Project MO 0FVZ 0000 503.

Vliv vybraných zdravotních a psychosociálních aspektů na kvalitu života nemocných s akutní myeloidní leukémií po autologní transplantaci periferních kmenových buněk

Slováček L.^{1,2}, Slováčková B.³, Jebavý L.^{1,2}, Blažek M.², Horáček J. M.^{1,2}

¹Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové; ²II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, FN, Hradec Králové; ³Psychiatrická klinika, FN, Hradec Králové

Cíle studie:

1. analyzovat vliv vybraných zdravotních a psychosociálních aspektů na kvalitu života dospělých nemocných s akutní myeloidní leukémií po autologní transplantaci periferních kmenových buněk na transplantčním oddělení Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové.
2. zhodnotit globální kvalitu života dospělých nemocných s akutní myeloidní leukémií po autologní transplantaci periferních kmenových buněk na transplantčním oddělení Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové.

Typ studie:

- lokální, transverzální, retrospektivní, deskriptivní.
- data získaná v průběhu roku 2004 (září–prosinec) od 12 dospělých nemocných s akutní myeloidní leukémií po autologní transplantaci periferních kmenových buněk. Studie byla schválena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Pacienti a metodika:

Celkový počet dospělých nemocných s akutní myeloidní leukémií po autologní transplantaci periferních kmenových buněk na transplantčním oddělení Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové v letech 2001–2003 byl 31. Počet zemřelých nemocných byl 7, počet retransplantovaných nemocných byl 5. Počet nemocných k otestování byl 19. Počet respondentů byl 12 (63% návratnost dotazníků). Věkový medián byl 47,5 roku, poměr muži / ženy byl 1,4/1. Hodnotitelných dotazníků bylo 100%.

Nástroje:

K hodnocení kvality života byla použita česká verze mezinárodního generického dotazníku European Quality of Life Questionnaire – Version EQ-5D. Dotazníky s průvodním dopisem vysvětlující danou akci a s ofrankovanou obálkou byl zaslán na adresu respondentů.

Statistická analýza dat:

Vyhodnocení dotazníků bylo provedeno deskriptivní analýzou – v souladu s metodikou European Quality of Life Group. Nezávisle proměnnými byly: věk, pohlaví, vzdělání, rodinný stav, polymorbidita, nikonismus, religiozita, časový odstup od provedení transplantace krvinek (kmenových buněk). Závisle proměnnými byly: dimenze kvality života (EQ-5D skóre) a subjektivní zdravotní stav (EQ-5D VAS). Statistické zpracování získaných dat bylo provedeno analýzou rozptylu ANOVA. Hladina statistické významnosti byla zvolena 5% ($p < 0,05$).

Výsledky:

Z výše sledovaných aspektů byla prokázána statisticky velmi významná závislost kvality života (EQ-5D skóre a EQ-5D VAS) na **věku** ($p < 0,01$), statisticky významná závislost kvality života (EQ-5D skóre a EQ-5D VAS) na **religiozitě** ($p < 0,05$), statisticky velmi významná závislost kvality života (EQ-5D skóre a EQ-5D VAS) na **nikonismu** ($p < 0,01$) a statisticky významná závislost kvality života (EQ-5D skóre a EQ-5D VAS) na **vzdělání** a **polymorbiditě** (v obou případech $p < 0,05$). S přibývajícím věkem a počtem přidružených onemocnění je signifikantně nižší globální kvalita života. Věřící nemocní mají vyšší globální kvalitu života v porovnání s nemocnými bez náboženského vyznání. Nižší globální kvalita života byla zaznamenána u nekuřáků. Vyšší globální kvalita života byla zaznamenána u nemocných se středoškolským a vysokoškolským vzděláním. Globální kvalita života nemocných s akutní myeloidní leukémií po transplantaci krvinek (kmenových buněk) na transplantčním oddělení Oddělení klinické hematologie II. interní kliniky FN a LF UK v Hradci Králové je na velmi dobré úrovni, o čemž vypovídají i průměrné hodnoty EQ-5D skóre (75,1%) a EQ-5D VAS (67,5%).

Limite studie:

1. transversální typ studie podává informace pouze o stávajícím stavu kvality života nemocných s akutní myeloidní leukémií po autologní transplantaci periferních kmenových buněk, neukazuje vývojový trend.
2. studie se zabývá vlivem pouze vybraných zdravotních a psychosociálních aspektů na kvalitu života. Několik dalších aspektů by bylo možno doplnit. Byly voleny ty aspekty, které byli pacienti schopni a ochotni v retrospektivně a anonymně prováděné studii poskytnout.

Kostní markery v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prostaty

Nekulová M.¹, Šimíčková M.¹, Čapák I.¹, Pecan L.², Frgala T.¹, Pilný R.¹, Valík D.¹

¹Masarykův onkologický ústav, Brno;

²Ústav informatiky AV ČR, Praha

Kostní metastázy jsou častou komplikací u karcinomu prsu, prostaty, plic i jiných malignit.

P1NP (N-terminální propeptid kolagenu typu I) je markerem vysoce specifickým pro tvorbu osteoblastických (a tedy i smíšených) metastáz, nevykazuje variaci během dne, lze jej měřit i v séru a vykazuje poměrně nízkou intraindividuální variaci a nemá výraznější závislost na dietě.

β-Cross Laps (beta-CTX) je jedním z markerů kostní resorpce. Srovnávacími studii bylo zjištěno, že β-Cross Laps vykazuje mnohem lepší klinickou citlivost než (deoxy)pyridinolinové spojky. Stanovení beta CTX se doporučuje v souvislosti s monitorováním účinnosti antiresorpční terapie (např. bifosfonáty, HRT) při osteoporóze nebo jiných kostních onemocněních. Těmito prostředky lze účinky terapie monitorovat už v průběhu několika týdnů. Také ICTP (Telopeptid kolagenu typu I) je koncová, nehelikální část kolagenu typu I. Jedná se o části peptidových řetězců, spojených pomocí vazeb (cross-links). Podle nových nálezů existují 2 různé cesty kostní resorpce: zprostředkovaná katepsinem K, která se uplatňuje během fyziologické resorpce kostí a druhá, zprostředkovaná matrix metaloproteinázou 9 (MMP9), která se aktivuje převážně v patologických situacích, tu odráží ICTP.

Pacienti a metody: U 55 mužů s diagnózou karcinomu prostaty ve věku 54–83 let byly vyšetřovány vzhledem k podezření na kostní rozsev kostní markery P1NP a b-CrossLaps (Elecsys 2010, firma ROCHE) někde též ICTP (Orion). Byly hodnoceny parametry validity (senzitivita, specifčnost, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, relativní riziko a ROC křivka). Bodové odhady parametrů validity byly doprovázeny výpočtem 95% konfidenčních intervalů. Ke statistickému hodnocení byl užít Spearmanův korelační koeficient.

Výsledky: U 40 nemocných byly prokázány kostní metastázy.

P1NP u pacientů s kostními metastázami proti souboru bez metastáz metodou ANOVA se signifi-

kantně lišilo (p-value 0,0392), také dle Wilcoxonova testu (p-value < 0,0001) a mediánového testu (p-value < 0,0001). Pro P1NP při referenční hodnotě 62,6 μg/l a specifčnosti 90%, 95% CI (75,7%, 100,0%) jsme kostní rozsev hodnotili se senzitivitou 77,8%, 95% CI (64,2%, 91,4%), PV+ činila 93,3%, 95% CI (84,6%, 100,0%) a PV- = 68,0%, 95% CI (49,3%, 86,7%). AUC (plocha pod křivkou) = 0,86477.

b-CTX u nemocných s kostním rozsevem hodnoceno proti souboru nemocných bez metastáz metodou ANOVA: p-value 0,0032, Wilcoxonův test p-value 0,0004, mediánový test p-value < 0,0001. Pro b-CTX při referenční hodnotě 0,380 μg/l a specifčnosti 90%, 95% CI (74,8%, 100,0%), jsme potvrdili kostní metastázy se senzitivitou 66,7%, 95% CI (51,3%, 82,1%), PV+ byla 91,9%, 95% CI (81,6%, 100,0%), a PV- = 58,6%, 95% CI (40,4%, 76,9%). Běžně udávaná referenční hodnota je však 0,8 μg/l, kdy CTX prokázal při SF 94.4 jen 41,67 SN a PV + 93,4, PV-46,1538.

P1NP s b-CTX významně korelovalo dle Spearmanova korelačního koeficientu s $r_s = 0,78$ při p-value < 0,0001. Pro srovnání v souboru 26 nemocných s kostními meta u C61 byla správná pozitivita 70% při referenční hodnotě 5,3 μg/l.

Kostní markery prokázaly dostatečnou validitu, P1NP o něco vyšší vzhledem k průkazu kostních metastáz u karcinomu prostaty.

Zřejmě tato skutečnost souvisí s typem kostních metastáz, který se u tohoto onemocnění nejvíce vyskytuje, i když často se jedná o typ smíšený.

Práce byla provedena v rámci Vědecko-výzkumného záměru MZ00020980501-5.

Sledování exprese galektinu-3 a EGFR u pokročilého kolorektálního karcinomu

Ludvíková M.^{1,5}, Holubec L. jr.^{2,3}, Pešta M.², Topolčan O.², Reischig J.¹, Sutnar A.⁴

¹Ústav biologie; ²Oddělení nukleární medicíny;

³Oddělení onkologické a ⁴Chirurgická klinika LF

UK a FN, Plzeň; ⁵Ústav patologie 1. LF UK a VFN Praha

Cíl: Kolorektální karcinom je jedním z nejčastějších maligních onemocnění. Důležitou roli ve stanovení jeho biologického chování a při volbě terapie hrají prognostické a prediktivní molekulární markery. Ve studii jsme se zaměřili na profil exprese galektinu-3 a receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) v pokročilém primárním kolorektálním karcinomu a jeho příslušných jaterních metastázách. Exprese EGFR a galektinu-3 byla pouze sporadicky studována současně v primárním a odpovídajícím sekundárním tumoru a publikované výsledky jsou často kontroverzní. Cílem studie bylo analyzovat případné změny v expresi těchto markerů během metastatického procesu a na základě toho stanovit jejich prognostický, event. prediktivní význam.

Materiál a metodika: Exprese galektinu-3 a EGFR byla sledována u 29 pacientů ve vzorcích

z primárního kolorektálního karcinomu a z jaterní metastázy téhož nádoru. Oba markery byly stanoveny imunohistochemicky s primárními monoklonálními protilátkami, navíc v 15 metastatických uzlech z jater byla kvantifikována mRNA galektinu-3 a housekeeping genu (GAPDH) metodou RT real-time PCR.

Výsledky: Galektin-3 vykazoval v nádorových buňkách primárního i sekundárního kolorektálního karcinomu jemně granulární difúzní cytoplazmatickou pozitivitu a index jeho exprese statisticky významně koreloval u obou skupin nádorů (p < 0,0001). Nezaznamenali jsme však statisticky signifikantní korelaci mezi mRNA galektinu-3 a expresí vlastního proteinu v jaterních metastázách (p = 0,4450). Galektin-3 se vyznačoval značnou heterogenitou v intratumorózní lokalizaci. Grading primárních a sekundárních tumorů nekorespondoval s expresí galektinu-3. EGFR byl pozitivní ve 32% (21%) primárních, resp. metastatických kolorektálních karcinomů a exprese EGFR vzájemně korelovala v obou studovaných skupinách nádorů (p = 0,0425). Naopak žádná korelace nebyla zaznamenána v expresi mezi galektinem-3 a EGFR (p = 0,0894; p = 0,5291).

Závěry: Dosažené výsledky demonstrují, že existuje konkordance v indexu exprese mezi primárním kolorektálním karcinomem a jeho jaterními metastázami jak pro galektin-3, tak pro EGFR. Korelace v expresi mezi oběma studovanými markery nebyla prokázána. EGFR status byl v našem souboru nižší než v jiných publikovaných studiích. Galektin-3 může sloužit jako důležitý prognostický marker kolorektálního karcinomu. Objasnění patobiologické role galektinu-3 v progresi kolorektálního karcinomu a ozejmení prediktivního významu exprese EGFR pro použití anti-EGFR terapie je úkolem pro další studie.

Studie byla provedena s finanční podporou sdružení Liga proti rakovině (LPR 756) a částečně byla též podpořena výzkumným projektem VZ MSM 0021620819.

IFN-gama ovlivňuje expresní a funkční změny vybraných členů signální dráhy JAK/STAT – srovnání normálního a maligního epitelu mléčné žlázy

Součková K.¹, Kovařík A.², Adámková L.¹, Fojtová M.², Krejčí E.³, Lauerová L.¹, Matoušková E.⁴, Buršíková E.⁴, Kovařík J.¹, Boudný V.¹

¹Masarykův onkologický ústav, Laboratoř buněčných regulací; ²Akademie věd ČR, Biofyzikální ústav, Brno; ³Oddělení klinické a experimentální patologie, Brno; ⁴Ústav molekulární genetiky, Praha

Úvod: Správný průběh proliferace a diferenciacie epitelu mléčné žlázy je mimo jiné zajišťován aktivitou signálních proteinů multigenové rodiny STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)

a zpětnovazebných negativních regulátorů rodiny SOCS (Supresor of Cytokine Signalig). Expresní nebo funkční změny těchto signálních molekul jsou poměrně často nalézány u celé řady lidských malignit včetně rakoviny prsu. Právě karcinom mléčné žlázy se jeví jako vhodný model pro bližší objasnění aberantního přenosu signálu, který může hrát určitou roli v pozmeněné vnímavosti buněk na externí stimulaci a v procesu vzniku a vývoje nádorové buňky.

Cíl: Práce byla zaměřena na studium účinku interferonu gama (IFN- γ) na expresi vybraných členů rodiny STAT a SOCS a na funkční modifikace (fosforylační změny) proteinů STAT1/3 u normálních a maligních buněk mléčné žlázy.

Materiál a metody: Použili jsme osm dobře definovaných lidských buněčných linií karcinomu mléčné žlázy a primokulturu normálního mamárního epitelu získaného z redukční mamoplastiky. U materiálu byla ověřena přítomnost estrogenových (ER) a progesteronových (PR) receptorů. Fosforylace proteinů STAT1/3 na konzervovaných aminokyselinových zbytcích S727-STAT1, Y701-STAT1, S727-STAT3, Y705-STAT3 byla stanovena metodou Western blotu. Expresní profily STAT/SOCS na úrovni mRNA byly analyzovány pomocí RT-PCR u normálního epitelu a dvou vybraných buněčných linií (MCF-7 a MDA-MB-231).

Výsledky: Western blot analýza proteinů STAT1/3 u osmi stabilizovaných linií karcinomu mléčné žlázy a normálních buněk ukázala, že inkubace s IFN- γ nevedla ke kvantitativním změnám těchto proteinů. U normálních buněk došlo po přidavku IFN k indukci fosforylace proteinu STAT3 na tyrozinovém zbytku (Y705), zatímco u maligních protějšků nikoliv. Fosforylace STAT1 na tyrozinu (Y701) po působení IFN- γ stoupala jak u normálních, tak i u maligních buněk. Fosforylace na konzervovaných serinových zbytcích STAT1/3 byla konstantní. Nenalezli jsme žádný vztah mezi fosforylačními a kvantitativními změnami STAT1/3 a přítomností ER/PR. RT-PCR analýza vybraných zástupců rodiny SOCS ukázala, že se normální mamární epitel a stabilizované buněčné linie karcinomu mléčné žlázy (MCF-7 a MDA-MB-231) navzájem lišily ve výši bazální hladiny transkriptů SOCS2 a SOCS3. Linie MDA-MB-231 obsahovala v porovnání s normálními buňkami a linií MCF-7 relativně vysoké množství SOCS3 mRNA, což naznačuje, že se může jednat o konstitutivní expresi. SOCS2 byl exprimován silně u linie MCF-7 na rozdíl od velmi slabého signálu u ostatních dvou kultur. Ani u jedné analyzované kultury jsme nezískali PCR produkt odpovídající SOCS1. IFN- γ silně indukoval expresi SOCS3 v normálních buňkách v porovnání se slabou (MDA-MB-231) nebo zcela chybějící (MCF-7) indukci u stabilizovaných buněčných linií. Expresní profily všech dosud známých STATů byly srovnatelné a po přidavku IFN- γ se neměnily.

Závěr: Z výsledků naší studie vyplývá, že maligní fenotyp mamárních buněk je spojen s represí fosforylace proteinu STAT3 na konzervovaném tyrozinovém zbytku po aplikaci IFN- γ . Zda se nádoro-

vé buňky liší od normálních buň na úrovni bazální transkripce některých negativních regulátorů rodiny SOCS nebo mírou indukce exprese SOCS3 po inkubaci s IFN- γ blíže objasní RT-PCR analýza většího počtu linií.

Práce byla finančně podporována granty GA ČR 301/06/0912, IGA MZ ČR NR/8341-3, AV ČR KJB502070601 a VZ MZO 00209805.

Profily STAT 1 a SOCS 3 po indukci interferony u pacientů s maligním melanomem **Adámková L., Součková K., Lauerová L., Kovařík J., Boudný V.**

Masarykův onkologický ústav, Laboratoř buněčných regulací, Brno

Signální dráha JAK/STAT je jednou z klíčových kaskád, které zprostředkovávají přenos signálů indukovaných cytokiny a růstovými faktory z buněčného povrchu do jádra. V dnešní době jsou známy dvě skupiny proteinů signální kaskády JAK/STAT, které se podílí na přenosu signálu k cílovým genům. Jedná se o receptorové Janus tyrozinproteinkinázy (Janus Tyrosin Kinases, JAKs) a signální transduktory a aktivátory transkripce (Signal Transducers and Activators of Transcription, STATs). Odpovědí na externí stimulaci je modulace ligand-dependentních genetických programů, které hrají důležitou roli v buněčné homeostáze (základních fyziologických procesech jako jsou například diferenciaci, proliferaci, apoptóza a angiogeneze). Intenzivní pozornost je věnována také negativním regulátorům této signální dráhy. Asi největší a nejdůležitější skupinou inhibitorů jsou supresory cytokinové signalizace (Supresors of Cytokine Signalig, SOCSs).

Analýza signální dráhy JAK/STAT provedená u širokého spektra primárních nádorů a stabilizovaných buněčných linií odvozených z nádorů naznačuje, že tato dráha může být překvapivě často narušena u maligních buněk, a to dokonce na mnoha úrovních. Dále bylo zjištěno, že abnormální signalizace zprostředkovaná JAK/STAT dráhou může ovlivnit vnímavost nádorové buňky na imunoterapeutickou léčbu. Proto je dnes věnována značná pozornost jak objasnění vzájemných vztahů mezi jednotlivými členy této dráhy včetně reakce na externí stimulaci, tak jejímu zapojení do širšího spektra buněčné signalizace. Lze předpokládat, že bližší poznání poruch v signálních dráhách umožní vybrat u onkologických pacientů vhodnou imunoterapeuticky zaměřenou léčbu.

Ke srovnání indukce SOCS 3 interferony na úrovni mRNA a proteinu jsme použili 7 primárních buněčných kultur ustavených z uzlinových metastáz maligního melanomu a 6 lidských nenádorových buněčných kultur (melanocyty, kožní keratinocyty a fibroblasty). Expresí proteinu SOCS 3 byla stanovena přímým imunoblotem, při kterém byla použita polyklonální anti-SOCS 3 protilátka a hladina SOCS 3 na úrovni RNA byla analyzována metodou

Northern blotu. Expresí STAT 1 po působení interferony (IFN) byla stanovena jak na úrovni RNA, tak proteinu. STAT 1 transkripty byly stanoveny pomocí Northern blotu a exprese proteinu STAT 1 pomocí Western blotu s využitím imunoprecipitace a specifických protilátek proti STAT 1.

V primárních buněčných kulturách maligního melanomu byl SOCS 3 indukován IFN gama u většího počtu vzorků než po působení IFN alfa. Existuje dobrá shoda mezi indukci SOCS 3 na obou úrovních. Obecně o něco vyšší výskyt SOCS 3 pozitivních vzorků byl pozorován na úrovni RNA ve srovnání s úrovní proteinu. Nenádorové buňky vykazovaly vyšší hladinu SOCS 3 po působení IFN gama, ale nikoli po IFN alfa. Nebyl pozorován prakticky žádný rozdíl v intenzitách signálu STAT 1 mezi buňkami neovlivněnými a ovlivněnými IFN.

Závěrem lze říci, že IFN gama, na rozdíl od IFN alfa, indukuje SOCS 3 na transkripční úrovni a zdá se, že vykazuje vyšší cytotoxický efekt, který nezávisí na původu buněk. Rovněž byla pozorována dobrá korelace mezi hladinami proteinu a RNA u STAT 1.

Práce byla finančně podporována granty GA ČR 301/06/0912, IGA MZ ČR NR/8341-3 a VZ MZO 00209805.

Význam a detekce metylace v promotoru genu E6 lidského papillomaviru 16 u karcinomů a intraepiteliálních lézí děložního čípku (CIN)

Hublarová P.¹, Rotterová P.², Rotter L.³, Hortíková Z.⁴, Badal V.⁵, Nenutil R.¹, Vojtěšek B.¹

¹Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno; ²1. Patologicko-anatomický ústav, FN u svaté Anny, Brno; ³Gynekologicko-porodnická klinika FN Brno; ⁴Sanatorium Helios, Brno; ⁵Institute of Molecular and Cell Biology, 61 Biopolis Drive, Proteos, Singapore, Malaysia

Karcinom děložního čípku je celosvětově druhé nejčastější nádorové onemocnění žen, primární příčinou jeho vzniku jsou perzistentní infekce lidskými papillomaviry (HPV). HPV se podle schopnosti způsobovat nádorová onemocnění dělí do dvou skupin: na high risk a low risk kmeny; high risk kmeny 16, 18, 31 a 33 se vyskytují nejčastěji. Virové proteiny rané fáze exprese interagují s buněčnými proteiny při infekci a některé z nich (hlavně E5, E6 a E7) jsou schopné nádorově transformovat buňky epitelu inaktivací dvou nejdůležitějších buněčných tumorsupresorů – p53 a pRb. Expresí všech proteinů během životního cyklu viru je přirozeně regulována metylacemi CpG ostrůvků jejich promotorů. Jelikož většina žen během svého života prodělá infekci HPV a u naprosté většiny z nich se nevyvine karcinom, existuje předpoklad, že metylace promotorů E6 a E7 genů se postupně ztrácejí během vývoje CIN. Cílem naší práce je detekovat stav metylace v promotoru

E6 genu u CIN III a karcinomů pomocí endonukleázy McrBc, specifický rozeznávající MeCpG, a prokázat vliv stavu metylace na vznik a vývoj nádoru, popř. tuto metodu zařadit do diagnostiky CIN.

Ve studii je zařazeno 35 pacientek s karcinomem cervixu, 73 pacientek s CIN III a 22 zdravých/asymptomatických pacientek. CIN III a asymptomatické vzorky byly odebrány metodou stěru na kartáček a fixovány ve směsi etanol/kys. octová/PEG. DNA jsme izolovali FASANEM A a následně provedli PCR se specifickými primery pro detekci HPV 16 a 18. Jako kontrol jsme použili DNA buněčných linií SiHa (HPV 16 pozitivní), HeLa (HPV 18 pozitivní) a HT3 (HPV negativní). Potvrdili jsme přítomnost HPV 16 a 18 u 89 % karcinomů, u CIN III jsme detekovali HPV 16 a 18 v 92 %. U zdravých pacientek jsme HPV 16 a 18 našli v 82 %, což dokazuje vysoký výskyt v populaci. Lze předpokládat, že samotná přítomnost high risk HPV v buňce nestačí k její transformaci a ke vzniku CIN. Tyto výsledky podporují naši hypotézu o regulaci vzniku CIN prostřednictvím metylací a demethylací v genomu viru.

Tato práce je podporována granty IGA 5168-2006 a Centrum MŠMT 5169-2006.

Využití FISH metody při diagnostice a monitorování léčby karcinomu močového měchýře

Dvořáčková J.¹, Nedbálek A.², Uvírová M.¹, Žebráková I.¹

¹CGB laboratoř spol. s r. o. Ostrava; ²Oddělení urologie Vítkovická nemocnice Ostrava

Úvod: Karcinom močového měchýře je jedno z nejvýznamnějších maligních onemocnění mužské populace. Jeho incidence je 4krát vyšší u mužů než u žen. V Evropě je nově diagnostikováno 90 000 případů ročně a v celém světě 260 000 za rok. Téměř 80 % případů se vyskytuje v populaci nad 50 let, u 60 % pacientů je objevena rekurence onemocnění v pětileté periodě. Skoro 70 % karcinomů močového měchýře je diagnostikováno ve stadiu superficiálního karcinomu (karcinom in situ, neinvazivní nebo minimálně invazivní karcinom), které je řešitelné chirurgickou intervencí. Proto je časná a vysoce citlivá diagnostika důležitou součástí managementu onemocnění. Pochopení genetických změn, které doprovázejí iniciaci a progresi karcinomu močového měchýře, umožňuje časnou diagnostiku tohoto onemocnění. Progrese karcinomu močového měchýře je spojena se zvýšením chromozomální instability a počtem aneuploidii.

Metoda: K detekci chromozomální alterací byla použita fluorescenční in situ hybridizace (FISH), UroVysion, Vysis Abbott Diagnostics. UroVysion test používá k diagnostice fluorochromy značené sekvence DNA, které přímo detekují chromozomální abnormality asociované s karcinomem močového měchýře. Speciálně test detekuje aneuploidie chromozomů 3, 7, 17 a ztrátu oblasti 9p21 (p16 tumor supresorového genu). Vyšetřovaným materiálem je střední proud moči.

Výsledky: Byl vyšetřen soubor 47 pacientů z toho 23 mužů a 24 žen. Jednalo se o pacienty jednak v období diagnózy, jednak s již dříve diagnostikovaným karcinomem močového měchýře. Bylo analyzováno minimálně 25 morfologicky abnormálních buněk a nález byl ověřen tzv. druhým čtením pro vyloučení subjektivní chyby diagnostikujícího pracovníka. Patologický nález byl nalezen u 40 % pacientů, z toho v 53,85 % se jednalo o aneuploidii chromozomů a v 46,15 % o delecii oblasti 9p21 na obou chromozomech. Normální nález byl u 60 % pacientů. Nehodnotitelných bylo 31,9 % vzorků z důvodu nesplnění kritéria pro hodnocení testem UroVysion z hlediska malé buněčnosti materiálu.

Závěr: Vyšetření metodou FISH testem UroVysion vzorků moče u pacientů s podezřením na diagnózu karcinomu močového měchýře nebo rekurenci tohoto onemocnění je velice citlivou a neinvazivní metodou doplňující standardní vyšetření cytologická a cystoskopická. Kombinovaná senzitivita těchto vyšetření se pohybuje mezi 89 % pro cystoskopii a cytologii a až 97 % pro cystoskopii a FISH. Časná detekce tohoto onemocnění na molekulární úrovni je významným faktorem ovlivňujícím interval přežití pacientů s karcinomem močového měchýře.

Literatura

1. Kevin C. Halling at al., A Comparison of Cytology and Fluorescence in situ Hybridisation for the detection of Urothelial carcinoma. Journal of Urology, vol. 164 No. 5, November 2000.
2. Lukas Bubendorf at al., Multiprobe FISH for Enhanced Detection of Bladder Cancer in Voided Urine Specimens and Bladder Washings. Am. J. Clin. Pathol; 116; 79-86, 2001.

Aplikace katalytických signálů pro rychlé určení koncentrace proteinů významných v onkologii

Húska D.^{1,2}, Zítka O.^{1,3}, Fabrik I.^{1,3}, Adam V.¹, Hraběta J.⁴, Eckschlager T.⁴, Horáková Z.⁵, Binková H.⁵, Kukačka J.⁶, Průša R.⁶, Havel L.², Trnková L.⁷, Kizek R.¹

¹Ústav chemie a biochemie; ²Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity, Brno; ³Katedra biochemie; ⁴Klinika dětské hematologie a onkologie; ⁵Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně; ⁶Ústav klinické biochemie a pathobiochemie, 2. LF Univerzity Karlovy, Praha ⁷Katedra teoretické a fyzikální chemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

Úvod: Před více než osmdesáti lety byly popsány katalytické signály vylučování vodíku ze základního elektrolytu v přítomnosti proteinů. Tyto signály byly označeny jako prenátriová vlna a Brdičkova reakce. Brdičkova reakce byla z počátku velmi hojně využívána v elektrochemické analýze pro svoji poměrně dobrou reprodukovatelnost v porovnání s prenátriovou vlnou. Avšak poměrně nedávno bylo ukázáno, že i prenátriová vlna může

poskytovat velmi dobře reprodukovatelné signály při využití chronopotenciometrické analýzy s konstantním proudem. Takový signál byl označen jako pik H a navíc kromě dobré reprodukovatelnosti umožňuje také vysokou senzitivitu stanovení. Této schopnosti jsme využili pro detekci biologicky významných peptidů a proteinů.

Materiál a metody: Byly studovány redukováný a oxidováný glutathion, metalothionein a albumin. Pro stanovení thiolů bylo využito přístroje AUTOLAB analyser ve spojení s VA standem 663 v klasickém tříelektrodovém zapojení. Námí použitou metodou pro stanovení MT byla adsorptivní rozpouštěcí přenosová technika (AdTS) ve spojení s chronopotenciometrickou rozpouštěcí analýzou (CPSA) anebo ve spojení s diferenční pulsní voltametří Brdičkova reakce (DPV – Brdičkova reakce).

Výsledky a diskuze: Pro stanovení thiolových sloučen byl jako základní elektrolyt používán 0,1 M H₃BO₃ a 0,05 M Na₂B₄O₇; pH = 8. V našich experimentech byla sledována doba akumulace na povrch HMDE. Zjistili jsme, že 120 s a teplota základního elektrolytu (25 °C) jsou nejvhodnější pro rychlé stanovení. Koncentrační závislost vykazovala tvar Langmuierovské adsorpční izotermy. Pomocí této metody bylo možné dosáhnout limitů detekce (3 S/N) různých thiolů v jednotkách atomolů v 5 µl kapce vzorku.

Závěr: Námí popsána elektroanalytická metoda AdTS CPSA umožňuje stanovení thiolů ve velmi nízkých koncentracích v borátovém pufru, pH 8,0 a její možné aplikovat na analýzu reálných vzorků, jako je lidské krevní sérum a moč

Poděkování: Tato studie byla podporována grantem Ligy proti rakovině 2006.

Literatura

1. Kizek R, Trnkova L, and Palecek E. (2001). Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. Anal. Chem. 73, 4801–4807.
2. Petrova J, Blastik O, Prusa R, Kukacka J, Mikelova R, Stiborova M, Adam V, Zitka O, Eckschlager T, and Kizek R. (2006). Determination of metallothionein content in patients with breast and colon cancer, and malignant melanoma. Klinicka Onkologie 19, 138–142.
3. Petrova J, Blastik O, Prusa R, Kukacka J, Potesil D, Mikelova R, Adam V, Zehnalek J, and Kizek R (2005). Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. Biomed. Papers 149, 485–488.

Jednoduché a rychlé rozlišení nativní a denaturované formy proteinů

Zítka O.^{1,3}, Křížková S.¹, Adam V.¹, Horna A.³, Beklová M.⁴, Kizek R.¹

¹Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně; ²Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno; ³Ústav potravinářské technologie a chemie, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Baťi, Zlín; ⁴Ústav veterinární ekologie a ekotoxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně

Proteiny hrají v živých organizmech velmi významné a nezastupitelné role. Při poškození organismu vlivem stresových faktorů může docházet, podobně jako ke změnám na úrovni řetězce nukleové kyseliny, také i ke strukturálním změnám proteinů. To může indukovat narušení biologicky významných cest a vést tak až k zániku celého organismu. Mezi proteiny, jejichž funkce se významným způsobem pojí se strukturou, patří laktoferin. Laktoferin, jenž je také nazýván laktotransferin, byl objeven v roce 1939 v kravském mléku. Jeho jméno je odvozeno podle dřívější klasifikace jako nejvýznamnější železo vázající bílkovina v mléce. V roce 1960 byl poprvé izolován z lidského mateřského mléka. V minulosti byl považován laktoferin pouze za bakteriostatický železo-transportní protein v mléku. Následně se také ukázal velmi významným železo vázajícím proteinem dalších exokrinních sekretů jako jsou žluč, pankreatická šťáva a střevní sekrety.

Strukturálně a chemicky je laktoferin glykoprotein skládající se z 703 aminokyselinových zbytků. Jeho molekulová hmotnost se pohybuje kolem 77 000 Da. Mezi doposud známé biologické funkce laktoferinu patří regulace homeostázy železa. Zajímavý je vztah k regulaci buněčného růstu, diferenciaci buněk a protizánětlivé aktivitě. Z toho také vyplývá možný vztah ke zhoubným dörům a procesu metastazování.

V této práci jsme studovali základní elektrochemické chování laktoferinu pomocí stacionární a průtokové elektrochemické techniky se zaměřením na studium změny struktury proteinu. Nejdříve jsme optimalizovali detekční techniku a dosáhli jsme detekčního limitu stovky 100 nM studovaného proteinu. V dalších experimentech byla sledována změna signálu laktoferinu v přítomnosti různých fyzikálních nebo chemických činitelů vedoucích ke změně struktury. Konkrétně jsme sledovali vliv teploty, methanolu a močoviny po dobu tří hodin. Z našich výsledků je patrné, že jsme schopni pomocí naší techniky sledovat strukturální změny laktoferinu.

V práci je ukázáno že elektrochemická analýza je použitelná nejen pro stanovení ale i pro studium změny struktury proteinu. Elektrochemické techniky tak představují alternativní nástroj pro detekci biologicky aktivních látek především pro svoji jednoduchost, relativně nízkou cenu, rychlost a spolehlivost.

Poděkování: Tato studie byla podporována granty Ligy proti rakovině 2006, Radanal 1/2006 a MSMT 6215712402.

Literatura

1. Potesil D, Mikelova R, Adam V, Kizek R and Prusa R. Change of the protein p53 electrochemical signal according to its structural form – quick and sensitive distinguishing of native, denatured, and aggregated form of the „Guardian of the Genome“, Protein J. 25 (2006) 23R–32.

Sledování interakce glutathionu s cisplatinou pomocí průtokové injekční analýzy

Zítka O.^{1,3}, Húska D.^{1,2}, Kukačka J.⁴, Křížková S.¹, Horáková Z.⁵, Adam V.^{1,7}, Binková H.⁵, Průša R.⁴, Horna A.⁶, Beklová M.⁷, Havel L.², Kizek R.¹

¹Ústav chemie a biochemie a ²Ústav biologie rostlin, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně; ³Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno; ⁴Ústav klinické biochemie a pathobiochemie, 2. LF Univerzity Karlovy, Praha; ⁵Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně; ⁶Ústav potravinářské technologie a chemie, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Baři, Zlín; ⁷Ústav veterinární ekologie a ekotoxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně

Úvod: Glutathion (GSH) byl popsán v roce 1921 a jeho přítomnost byla dokázána nejen u rostlin či živočichů, ale dokonce i u bakterií a kvasinek. Byla rozpoznána jeho významná role při udržování homeostázy těžkých kovů v organismu, jeho antioxidační a detoxikační účinky. GSH vděčí za své redoxní vlastnosti aminokyselině cysteinu, který obsahuje thiolovou skupinu (-SH). Oxidací GSH vzniká dimer označený jako oxidovaný glutathion (GSSG). GSSG je pak v glutathionovém cyklu znovu redukován na GSH. Význam GSH je v ochraně organismu před vlivem oxidačního stresu. Navíc může GSH na své -SH skupiny vázat ionty, včetně iontů těžkých kovů. Tato jeho detoxikační vlastnost může v terapii nádorových onemocnění znamenat významnou komplikaci.

Materiál a metody: Byly studovány redukováný a oxidovaný glutathion. GSH vytvářel komplex s cisplatinou ve fosfátovém pufru, pH 7,8. Pro stanovení thiolů a komplexů bylo využito přístroje AUTOLAB analyser ve spojení s VA standem 663 v klasickém tříelektrodovém zapojení. Nami použitou metodou pro stanovení MT byla adsorptivní přenosová technika. Dále bylo využito průtokové injekční analýzy ve spojení s Coulochem III a uhlíkovou pracovní elektrodou.

Výsledky a diskuze: Redukovaný glutathion poskytoval oxidační signály kolem 0,56 V a oxidovaný glutathion kolem 1,16 V. Pro experimenty byly vybrány koncentrace cisplatin, které jsou běžně terapeuticky využívány. Zjistili jsme, že vytvořený GSPt komplex poskytuje asi o 40–60% nižší proudovou odezvu v porovnání s volným GSH. Průběh hydrodynamických voltamogramů byl také mírně odlišný. Tvorba komplexu byla navíc monitorována spektrofotometricky jako změna absorbance při 280 nm.

Závěr: Nami popsána elektroanalytická metoda umožňuje velmi snadné a rychlé stanovení komplexu glutathionu s cisplatinou.

Poděkování: Tato studie byla podporována grantem Ligy proti rakovině 2006.

Literatura

1. Hopkins FG, Biochem J, 15 (1921) 286.
2 Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Jelen F, Bioelectrochemistry, 63 (2004) 19.
3. Petřilová J., Potesil D, Zehnaek J, Sures B, Adam V, Trnkova L, Kizek R, Electrochim. Acta, 51 (2006) 5169.
4. Kizek R, Vacek J, Trnková L, Klejduš B, Havel L, Chem. Listy, 98 (2004) 160.

Aberration of Egr1, Her2/neu, and K-ras in non-small cell lung cancers (NSCLC) treated with gefitinib in Expanded Access Program

Berkovcová J.¹, Dziechciarková M.¹, Trojanec R.¹, Grygarková I.², Kolek V.², Janošťáková A.¹, Hajdúch M.¹

¹Laboratory of Experimental Medicine, Dpt. of Pediatrics; ²Dpt. of Lung Diseases and Tuberculosis, Faculty of Medicine Palacky University and University Hospital in Olomouc

Egr1 and Her2/neu are members of the EGFR (HER) family and play an important role in the pathogenesis of certain tumors. Indeed, overexpression of the Egr1 was frequently detected in lung cancers. Enhanced gene expression may be due to amplification of the gene, and it is associated with constitutive activation of the EGFR1 signaling. Likewise, somatic mutations in the kinase domain of egfr1 (exons 18–21) result in ligand-independent transduction, particularly in NSCLCs. K-ras mutations contribute to the development of NSCLC independently on egfr1 mutations. Because K-ras is one of the downstream molecules in the EGFR signal transduction, and egfr1 and k-ras mutations are mutually exclusive, and this suggest different carcinogenesis pathways involved in NSCLC. Activating aberrations in egfr1 are associated with clinical responses to tyrosine kinase inhibitors gefitinib and erlotinib. In contrast, mutations in K-ras signify resistance to EGFR1 targeted therapy.

In our retrospective study we analyzed EGFR1 status in NSCLC patients treated with gefitinib within the Expanded Access Program in the Czech Republic. Genomic DNA was isolated from laser capture microdissected tumors cells in order to exclude non-malignant cells from the analysis. Extracted DNA was amplified by nested PCR for the most frequent egfr1 mutations in exon 19 and 21 and K-ras mutations in exon 1. DNA fragment length polymorphism analysis of the PCR product was used to screen samples for egfr1 exon 19 deletion mutations. Direct DNA sequencing was used to detect/confirm egfr1 (exons 19 and 21) and k-ras (exon 1) mutations. The expression of Egr1 and Her2 proteins was assessed by immunohistochemical staining (IHC) and gene amplification was detected using fluorescence in situ hybridization (FISH).

Acknowledgement: Study was supported by projects MŠMT (6198959216), MPO 1H-PK/45 and by AstraZeneca, Czech Republic

Systém pro in vitro analýzu sekvenčních variací v genu *brca1* u pacientek s dědičným karcinomem prsu

Scholzová E., Ševčík J., Kleibl Z.

Ústav Biochemie a experimentální onkologie, 1. LF UK, Praha

Mutace v genu BRCA1 (Breast Cancer 1; OMIM 113705) jsou zodpovědné za vznik více než 50 % dědičných karcinomů prsu a/nebo ovaria. Většina patogenních alterací v genu BRCA1 má charakter posunových mutací s předčasnou terminací translace, avšak do současnosti bylo nalezeno několik tisíc alterací genu s nejasným funkčním významem, který komplikuje klinickou interpretaci těchto variant. Nejasný je i vliv většiny alternativních sestřihových variant BRCA1 mRNA na funkci proteinu v buňce. Pro charakterizaci biologického významu missense mutací a alternativních sestřihů genu BRCA1 doposud chybí spolehlivý test, který umožnil charakterizaci těchto genetických změn in vitro.

Na základě výsledků mutační analýzy populace žen s hereditární formou karcinomu prsu a/nebo ovaria jsme vybrali populačně specifické alterace v genu BRCA1 [c.181T > G, c.1747A > T, c.3700_3704del5, c.5266dupC, D(3), D(5), D(9), D(9, 10), D(14, 15), D(14-18), D(16-23), D(21)]. Analyzované alternativní sestřihové varianty byly vytvořeny v plasmidu pcDNA3.1 a vybrané mutace byly zkonstruovány v systému bakteriálního arteficiálního chromozomu (BAC), nesoucího genomový insert obsahující celou sekvenci genu BRCA1 (~ 100 kb) včetně regulačních sekvencí. Konstrukce mutací v BAC byla zprostředkována rekombinačním systémem bakteriofága λ, kdy s využitím tzv. „hit & fix“ metody je možné zkonstruovat i subtilní genové změny jako jsou jednonukleotidové záměny.

Pro simulaci výpadku funkční wt alely genu BRCA1 v nádorových buňkách byla použita metoda RNAi. Vybrané linie karcinomu prsu (MCF-7, MB-MDA-231) byly infikovány dvěma typy retrovirů (MLP, pSUPER) exprimujícími small-hairpin RNA (shRNA) zaručující dlouhotrvající RNAi efekt. ShRNA byly navrženy specificky na 3'-UTR oblast genu BRCA1 a na sekvence chybějící v alternativně sestřihovaných variantách genu BRCA1. Buněčné klony s trvale sníženou expresí genu BRCA1 byly selektovány puromycinem. Míra snížení exprese BRCA1 byla charakterizována pomocí kvantitativní real-time PCR a western blottingu.

Kvantitativní real-time PCR prokázala snížení exprese BRCA1 mRNA o ~ 50 % pomocí shRNA proti 3'UTR sekvenci v pozici 6009, 6285 a 6806 (ostatní testované shRNA v 3' – UTR a ORF nebyly funkční). Efekt shRNA byl specifický pro buněčné linie (down-regulační efekt v HeLa buňkách v. s. minimální efekt v MB-231 buňkách) a nebyl závislý na použitém expresním systému (pSUPER v. s. MLP retrovirové plasmidy). Efekt shRNA na expresi BRCA1 proteinu bude analyzován pomocí western blottingu.

Konstrukce mutací genu BRCA1 v systému BAC zaručuje jeho expresi ve fyziologických podmínkách se zachovalou intracelulární regulací. Společně s metodou RNA interference (RNAi) tvoří versatilní systém, který umožňující funkční analýzu sekvenčních variant genu BRCA1 s doposud nejasným významem.

Projekt výzkumu byl podporován grantem IGA č. NR/8345-4.

Využití profilů genové exprese primárních kolorektálních karcinomů k predikci jejich progresu a metastatického fenotypu

Slabý O.¹, Garajová I.², Svoboda M.², Fabian P.¹, Svoboda M.¹, Srovnal J.³, Vyzula R.²

¹Masarykův onkologický ústav, Oddělení klinické a experimentální patologie, Brno; ²Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno; ³Fakultní nemocnice Olomouc, Dětská klinika, Laboratoř experimentální medicíny, Olomouc

Kolorektální karcinom je jedním z nejčastěji se vyskytujících nádorových onemocnění. Naneštěstí významná část pacientů v klinických stádiích II a III umírá do pěti let po radikálním chirurgickém zákroku následkem progresu onemocnění. Racionální přístup k indikaci adjuvantní léčby pro tyto pacienty nabízí molekulární charakterizace jejich rizikové podskupiny napříč oběma klinickými stadii pomocí profilů genové exprese. Do studie byly zařazeny bioptické vzorky dvanácti pacientů s histologicky potvrzeným kolorektálním karcinomem (KRK) v klinickém stadiu II a III tvořené minimálně

ze 70 % maligními buňkami. Šest pacientů mělo dobrou prognózu s délkou bezpříznakového přežití (DFS) delší než 36 měsíců (medián 43), šest mělo špatnou prognózu s DFS kratším než 36 měsíců (medián 13). Pomocí nízkohustotních oligonukleotidových makročipů společnosti SuperArray určených k relativní kvantifikaci 128 genů potenciálně zapojených do procesu metastazování byly identifikovány profily genové exprese primárních KRK všech 12 pacientů. Analýzou expresních profilů pomocí t-testu ($\alpha = 0,01$) a metody SAM ($\Delta = 1,5$) jsme identifikovali 10 genů (9 up-regulovaných, 1 down-regulovaný) s minimálně dvojnásobným rozdílem v expresi v primárních nádorech skupiny pacientů se špatnou prognózou. Z hlediska biologické funkce jsou mezi up-regulovanými geny zastoupeny především onkogeny (MYC, MYB, KRAS, SRC) dále hepatální růstový faktor HGF, transkripční faktor ETV4, regulátor buněčného cyklu PTEN a molekuly extracelulární matrix a buněčné adheze (CD82, HPSE). Sníženou expresi vykazoval ve skupině pacientů se špatnou prognózou pouze antiangiogenní inhibitor metaloproteinázy 2 (TIMP2). Naše výsledky potvrzují předchozí pozorování a jsou v souladu biologickou podstatou nádorové invazivity a metastazování. Alterace v expresi genů pro hepatální růstový faktor HGF a transkripční faktor ETV4 byly u kolorektálního karcinomu s nepříznivou prognózou identifikovány poprvé. Po rozšíření zkoumaného souboru pacientů a ověření výsledků metodou qRT-PCR případně imunohistochemicky na proteinové úrovni by nalezená sada genů mohla být jedním z kroků vedoucích směrem k individualizaci terapie pacientů s lokoregionálně pokročilým kolorektálním karcinomem.

Soubor:

Hodnoceno 16 pacientek ve věku 44–69 let, medián 55 let, bez závažných interkurencí IHC HER 2-neu 3+

Rozsah choroby: IIB					3 pacientky
IIIA					6 pacientek
IIIB					6 pacientek
Bilaterální ca prsu u pacientky BRCA 1					1 pacientka
Grading:	G2	2 pacientky	Receptory:	ER+ PR+	6 pacientek
	G3	14 pacientek		ER- PR+	1 pacientka
				ER- PR-	9 pacientek
Pacientky dostávaly v neoadjuvanci 3 serie antracyklinu	režim:	AC			8 pacientek
		EC			2 pacientky
		TAC			6 pacientek

Vyhodnocení

Vyšetřen parafinový blok pomocí HercepTestu metodou FISH s použitím sondy LSI Her 2/ neu přímo značené Spectrum Orange, sondy LSI TOP 2A (gen pro topoizomerazu II alfa), přímo značené Spectrum Orange a centrometrické sondy pro chromozom 17 přímo značené Spectrum Green.

	počet	G2	G3	ER+	ER –	PR	mTTP
TOP 2A+ HER –	0	0	0	0	0	0	0
TOP 2A- HER +	8	1	7	2	5	3	8
TOP 2A+ HER +	6	1	5	4	1	6	
TOP 2A- HER –	4	0	4	0	0	0	2

Poděkování: Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9076 – 4.

Kategorie sdělení: Poster, sekce – Hledání nových prognostických a prediktivních markerů v klinické onkologii.

Další prediktivní faktor v léčbě karcinomu prsu – Amplifikace topoizomerázy II a – naše zkušenosti
Brančíková D., Spurný V., Bednařík O., Mechl Z.

Odd. klinické a radiační onkologie, FN u sv Anny Brno

Hlavním inhibítozem topoizomerázy II alfa jsou antracykliny, léky první volby v adjuvantní chemoterapii karcinomu prsu. Zvýšená amplifikace tohoto genu bývá detekována většinou souběžně se zvýšenou amplifikací HER 2 (jen asi 1,7–11 % pozitivních TOP 2a má negativní expresi HER2), oba jsou lokalizovány na chromozomu 17. Není-li TOP 2a zvýšená, odpověď na antracykliny je málo pravděpodobná, zvýšené hodnoty predikují v neoadjuvanci vyšší odpověď.

Pokusili jsme se tyto literární údaje ověřit na našem souboru HER 2 pozitivních (IHC) pacientek, kde jsme zpětně při disseminaci prováděli stanovení HER 2 a TOP II a v referenční laboratoři Olomouc (DAKO fish).

Závěr: Zvýšená amplifikace TOP 2A byla detekována většinou souběžně se zvýšenou amplifikací HER 2, pacientku s pozitivní TOP 2A a negativní expresí HER 2 jsme nezachytili.

Nepodařilo se nám prokázat, že by normální hladina TOP 2A predikovala nižší odpověď na antracykliny, i když na našem malém souboru skutečně zvýšené hodnoty TOP 2A prokázaly v neoadjuvanci vyšší odpověď.

Nejnižší počet odpovědí a nejkratší dobu trvání efektu prokázala skupina s negativitou obou hodnocených parametrů.

Colorectal carcinoma is infiltrated by FOXP3 – positive lymphocytes

Garajova I., Fabian P., Nenuil R., Kocakova I., Grell P., Hanzelkova Z., Knoflickova D., Svoboda M., Vyzula R.
 Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno

Tumor is a complex tissue composed of cancer cells and stromal cells (e.g. endothelial cells, fibroblasts, dendritic and NK cells, macrophages and lymphocytes). Tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) are found in a variety of solid cancers and they are a possible prognostic factor as it is thought that TILs execute a host immune response against cancer cells. In colorectal carcinoma (CRC), TILs are particularly numerous in cases associated with microsatellite instability and have more favorable clinical outcome. Generally, cytotoxic T-cells (CD8+) are prognostically favorable, whereas recent disco-

vered subgroup of TILs, regulatory T-cells (T-reg, CD4+CD25+FOXP3+) are not. They inhibit anti-tumor activity of CD8+ and CD4+ T-cells. The aim of our study was to investigate if the TIL of CRC include T-reg lymphocytes, which was not proved so far. More recent studies have shown that T-reg lymphocytes are uniquely characterized by expression of transcription factor FOXP3. Therefore we used immunohistochemical staining to detect lymphocytes co-expressing CD4+ and FOXP3+ in 9 cases of CRC primary tumors. All cases of CRC were left-side localized, respecting a different biological behaviour of left/right-side localized CRCs. We used formalin-fixed and paraffin-embedded sections and commercially available monoclonal antibodies. Our preliminary results show that TIL in CRC include in cancer stroma a subset of CD4+ CD25+FOXP3+ lymphocytes. Now, we are interested if T-reg lymphocytes can be used as a prognostic marker for CRC and we analyze a group of 20 patients with CRC in I-IV clinical stage. We are also interested if there is a connection between occurrence of T-reg and other stromal cells, especially cytotoxic T-lymphocytes and NK cells.

Acknowledgment: This project is supported by Internal Grant Agency, Ministry of Health, Czech Republic. No.: NR/9076-4.

An association between glutathione S-transferase gene polymorphism and prostate cancer in the Slovak population.

Sivoňová M.¹, Matáková T.¹, Dobrota D.¹, Hatok J.¹, Franeková M.¹, Kliment J. jr.², Kliment J.²

¹Department of Medical Biochemistry, Jessenius Faculty of Medicine, Martin, Slovakia; ²Clinic of Urology, Jessenius Faculty of Medicine and MFH, Martin, Slovakia

In the metabolism of numerous potential carcinogens are involved biotransformation enzymes, glutathione S-transferases (GSTs). There is evidence that suggests that detoxification enzymes may play a role in the formation of prostate cancer. GSTP1 has a polymorphic site at codon 105 (exon 5), where an adenosine-to-guanosine (A-G) transition causes an Ile-to-Val substitution (Ile105Val) and produces a variant enzyme with lower activity and less capability of effective detoxification. The GSTM1 and GSTT1 genes exhibit null (i.e., deletion) polymorphisms; in specific individuals, homozygous deletion (i.e., both copies lost) of these genes can be detected. In the present study, we investigated the association of GSTP1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms with susceptibility to prostate cancer in the Slovak population. Genotypes of blood specimen DNA were determined for 92 men with incident cases of prostate cancer and for 153 control subjects by age 50. Genomic DNA and the polymerase chain reaction were used to determine the GSTP1, GSTM1 and GSTT1 genotypes in the study subjects. Associati-

ons between specific genotypes and development of prostate cancer were examined by use of logistic regression to calculate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). For GSTP1, the data were suggestive of a trend of increasing risk with higher numbers of codon 105 valine alleles compared with isoleucine alleles, a 2.15-fold increased risk of prostate cancer (95% CI = 0.384–12.09) was associated with Val/Val homozygosity. There was no significant link between Ile/Val genotype and risk of prostate cancer (OR = 1.0; 95% CI = 0.469–2.13). The frequencies of GSTT1 null genotype did not differ between patients and controls (OR = 1.2; 95% CI = 0.606–2.22). The overall frequency of GSTM1 null was lower in cases as compared with controls (OR=0.8; 95% CI = 0.473–1.34).

Our findings suggested that GSTP1 Val/Val genotype may be associated with an increased susceptibility to prostate cancer in the Slovak population. Further, both GSTM1 null and GSTT1 null genotypes did not appear to influence the susceptibility to prostate cancer.

This work was supported by grants UK/264/2006, MVTS Bil/ČR/SR/UK/06 and AV 4/0013/05.

Klinický význam exprese mRNA MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 a CEA ve tkáňových vzorcích metastáz kolorektálního karcinomu
Pešta M.¹, Topolčan O.¹, Holubec L. jr.^{1,3}, Sutnar A.², Liška V.², Třeška V.², Skalický T.², Kormunda S.¹ Černý R.⁴

¹II. interní klinika; ²Chirurgická klinika;

³Onkologické oddělení, FN Plzeň; ⁴Ústav klinické biochemie LF UK Plzeň

Úvod: Radikální resekce jaterních metastáz kolorektálního karcinomu je možná pouze u 15% pacientů s tímto onemocněním. V současné době je známo, že celkové přežití je u pacientů po opakovaných jaterních resekcích stejné jako po úspěšné první radikální resekcí, kdy nádor již dále nerecidivuje. Proto by bylo prospěšné zvýšit počet opakovaných resekcí včasnou diagnózou relapsu onemocnění. Včasná identifikace pacientů s tendencí ke kratšímu bezpříznakovému období (DFI) může zlepšit jejich prognózu a může pomoci ve strategii follow up.

Cíl: Cílem studie bylo stanovení exprese mRNA MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 a CEA ve tkáňových vzorcích jaterních metastáz kolorektálního karcinomu pomocí RT real-time PCR a zhodnocení vztahu exprese a bezpříznakového období (DFI) a celkového přežití (OS).

Metodika: Tkáňové vzorky jaterních metastáz kolorektálního karcinomu byly získány od 40 pacientů, kteří podstoupili radikální chirurgickou léčbu – resekci. Hladinu exprese mRNA CEA, MMPs a TIMPs a housekeeping genu (GAPDH) jsme kvantifikovali metodou real-time RT PCR. Tyto změřené hladiny jsme statisticky zhodnotili

s klinickými daty (tj. délkou bezpříznakového (DFI) a celkového přežití (OS).

Výsledky: Zvýšená hladina exprese CEA, MMP-9 a TIMP-1 v CLM byla statisticky signifikantně asociována s kratším DFI ($p < 0,0225$, $p < 0,0282$ a $p < 0,0175$). Statistická analýza také ukázala že zvýšená hladina exprese MMP-9 a TIMP-1 byla statisticky signifikantně spojena s kratším celkovým přežitím (OS; $p < 0,0302$ a $p < 0,0431$).

Závěr: Tato studie ukazuje potenciální užitečnost stanovení hladiny exprese MMP-9,

TIMP-1 a CEA jako negativního prognostického faktoru kratšího DFI a OS a tím horší prognózy.

Tato studie byla podpořena grantem IGA MZ CR NR 7905-03 a výzkumným záměrem MSM 0021620819, Náhrada a podpora některých životně důležitých orgánů, LF UK v Plzni.

Glutathione S-transferases M1 and T1, and Breast Cancer in the Slovak population

Matáková T.¹, Sivoňová M.¹, Hatok J.¹, Franecková M.¹, Strelka L.², Žúbor P.³, Dobrota D.¹

¹Department of Medical Biochemistry, Jessenius Faculty of Medicine, Martin, Slovakia; ²Clinic of Surgery, Jessenius Faculty of Medicine and MFH, Martin, Slovakia; ³Clinic of Gynaecology, Jessenius Faculty of Medicine and MFH, Martin, Slovakia

The glutathione S-transferase (GST) genes are involved in the metabolism of various carcinogens. Deletion polymorphisms in the genes GSTM1 (Deletions in GSTM1 occur at a frequency of about 15% in human populations. Individuals who are deletion homozygous, i. e., GSTM1 null, exhibit absence of enzyme activity. A null allele at the GSTM1 locus is found in 40%–245% of Caucasians. GSTM1 deficiency may be a risk factor for cancer by providing increased sensitivity to chemical carcinogens. The mechanism of carcinogenicity may be related to an increased formation of DNA adducts in the presence of the null deletion.) and GSTT1 (A proportion of the population, varying from 12%–20% in Europeans to 65% in Asians carries a null polymorphism (deletion). Such people do not express the gene and therefore do not have any GSST1 enzyme activity) were investigated in relation to breast cancer risk. The study population consisted of 115 incident breast cancer cases and 132 age-matched controls with no known malignant diseases. GSTM1/T1 genotypes were determined by a multiplex polymerase chain reaction (PCR) method, and odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated by conditional logistic regression model. The relative odds ratio (95% confidence interval) of breast cancer was 1.227 (0.68–2.22) with the GSTM1 null, 1.08 (0.64–1.81) with the GSTT1 null. The results conclusively show that single gene GST polymorphisms do

not confer a substantial risk of breast cancer to its carriers.

This work was supported by grants AV4/0013/05, MVTS Bil/ČR/S/UK/06, 2005/14-MFN-06 (Slovak Ministry of Health) and VEGA Fund 1/3379/06.

Association of IgVH mutation status and plasma levels of angiogenic activators in chronic lymphocytic leukaemia: significantly higher bFGF but not VEGF in IgVH mutated patients

Smolej L.¹, Hrudková M.¹, Andrýs C.², Peková S.³, Schwarz J.⁴, Žák P.¹, Belada D.¹, Krejsek J.², Malý J.¹

¹2nd Department of Internal Medicine, Department of Clinical Haematology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové; ²Institute of Clinical Immunology and Alergology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové; ³Department of Clinical Haematology, Biochemistry and Immunology, Hospital Na Homolce, Praha; ⁴Institute of Haematology and Blood Transfusion, Praha

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is a disease with an extremely variable clinical course. New prognostic factors such as mutation status of immunoglobulin heavy chain variable region (IgVH) or genetic aberrations can identify patients with high risk disease. Several studies have shown that angiogenesis is increased in B-CLL and may potentially serve as a new prognostic factor. To assess relationship between plasma concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) or basic fibroblast growth factor (bFGF) and IgVH mutational status, we measured VEGF and bFGF using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits in peripheral blood plasma of 49 patients with untreated B-CLL and 50 healthy donors. IgVH mutation status was determined in all B-CLL patients. Mutated IgVH genes (i. e. more than 2% difference from corresponding germline) were present in 26 and unmutated in 23 patients. There was statistically significant increase of both VEGF ($p = 0.006$) and bFGF ($p < 0.0001$) in patients with B-CLL compared to the control group. Patients with mutated IgVH genes had significantly higher concentrations of bFGF ($p = 0.015$) but not VEGF ($p = 0.078$) than those with unmutated IgVH. Conclusions: In our study, crucial angiogenic activators VEGF and bFGF were significantly elevated in peripheral blood plasma over controls. In addition, bFGF was significantly elevated in IgVH mutated vs. unmutated patients. Our findings underline the importance of bFGF signalling in B-CLL and clearly warrant further investigations in a larger patient cohort and to determine the prognostic significance of angiogenic factors on B-CLL patients' clinical outcome.

Supported by grant IGA NR/8373-3 from Ministry of Health of Czech Republic.

Plasma soluble endoglin (sCD105) concentrations in patients with lymphoid malignancies – a pilot study

Smolej L.¹, Hrudková M.¹, Andrýs C.², Belada D.¹, Pour L.³, Žák P.¹, Krejsek J.², Novosad J.², Malý J.¹

¹2nd Department of Internal Medicine, Department of Clinical Hematology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové; ²Institute of Clinical Immunology and Alergology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové; ³Internal Hematooncology Department, Masaryk University Hospital and Medical School, Brno

Increased angiogenesis has been recently reported in acute and chronic leukemias, lymphomas, and myeloproliferative disorders. Endoglin (CD105), a member of transforming growth factor beta (TGF-beta) receptor family, modulates cellular responses to TGF-beta and is absolutely essential for angiogenesis. Its soluble form (sCD105) is increased in patients with various solid tumors. In our pilot study, we measured peripheral blood plasma concentrations of sCD105 using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay in 75 patients with lymphoid malignancies and 13 healthy donors. We found a statistically significant increase in sCD105 concentrations in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia ($n = 42$) compared to the control group ($p = 0.0296$). Surprisingly, patients with multiple myeloma ($n = 13$) had significantly lower concentrations of sCD105 in comparison to controls ($p = 0.0023$). We didn't find significant differences between sCD105 concentrations in patients with follicular lymphoma ($n = 8$) or diffuse large B-cell lymphoma ($n = 12$) and the control group. We conclude that plasma sCD105 is a new angiogenesis marker in lymphoid malignancies and together with other cytokines (such as VEGF – vascular endothelial growth factor and bFGF – basic fibroblast growth factor) might be useful as a part of complex angiogenesis assessment aimed to improve prognostic stratification of these disorders.

Supported by grants IGA NR/8373-3 and IGA NR/8076-3 from Ministry of Health of Czech Republic.

Komplexní hodnocení angiogeneze u chronické lymfocytární leukémie

Smolej L.¹, Hrudková M.¹, Andrýs C.², Kašparová P.³, Vokurková D.², Belada D.¹, Žák P.¹, Krejsek J.², Novosad J.², Malý J.¹

¹II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové; ²Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové; ³Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Úvod: Angiogeneza (AG), tedy novotvorba cév z existující vaskulatury, hraje významnou roli v patogenezi a progresi zhoubných nádorů. V posledních 10 letech došlo k mohutnému rozvoji výzkumu AG v oblasti hematologických malignit. Zvýšená AG byla prokázána u akutních i chronických leukémií, lymfomů, mnohočetného myelomu, myelodysplastických i myeloproliferativních onemocnění. Charakteristickým rysem chronické lymfocytární leukémie (CLL) je vysoká různorodost stran prognózy – třetina nemocných nikdy nevyžaduje léčbu a délka jejich přežití je prakticky shodná se zdravými vrstevníky, naproti tomu někteří nemocní s agresivním průběhem choroby žijí méně než 5 let. Dosavadní stagingové systémy dle Raie a Bineta nejsou schopny identifikovat nemocné prezentující se v úvodu nízkou nádorovou masou, kteří mají přesto velmi nepříznivou prognózu a chemorezistentní onemocnění. Proto se hledají nové prognostické faktory, které by napomohly k přesné stratifikaci nemocných dle rizika a umožnily více individualizovat intenzitu a typ léčby. Recentní publikace vyzdvihují v tomto smyslu význam AG pro progresi CLL a citlivost na léčbu. Cílem studie bylo komplexní hodnocení angiogeneze v periferní krvi i kostní dřeni u nemocných s CLL.

Metodiky: AG jsme hodnotili třemi odlišnými metodami: 1) stanovením koncentrací angiogenních cytokinů (VEGF, bFGF, sCD105, endostatin) v periferní krvi pomocí sendvičové ELISA; 2) hodnocením neovaskularizace v kostní dřeni pomocí imunohistochemického průkazu endoteliálního antigenu vWF a stanovením tzv. mikrovaskulární denzity (MVD); 3) analýzou fragmentů endoteliálních buněk, tzv. endoteliálních mikropartikulí v plazmě CLL pacientů pomocí vícebarevné průtokové cytometrie. Výsledky: U všech cytokinů měřených ELISA v periferní krvi bylo nalezeno statisticky signifikantní zvýšení v porovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků; nejvyšší rozdíl byl zjištěn v koncentracích zásaditého růstového faktoru pro fibroblasty (bFGF). MVD byla statisticky signifikantně zvýšena u CLL v porovnání s kontrolními preparáty; zjistili jsme signifikantní zvýšení neovaskularizace ve dřeni CLL pacientů

nezávisle na typu infiltrace. Počet endoteliálních mikropartikulí stanovených pomocí znaku CD144 a kombinace znaků CD41/144 byl také signifikantně zvýšen u pacientů s CLL.

Závěr: Zjistili jsme zvýšení angiogenních cytokinů a endoteliálních mikropartikulí v periferní krvi i zvýšenou neovaskularizaci ve dřeni u nemocných s CLL a tím potvrdili významnou úlohu angiogeneze v patogenezi CLL. Tento výzkum je důležitý nejen diagnosticky a prognosticky, ale do budoucna bude přínosný i pro volbu typu léčby, terapii, neboť již nyní se v rámci klinických studií používají preparáty s antiangiogenním působením, např. thalidomid a lenalidomid.

Podpořeno grantem č. 8373-3 IGA MZ ČR a grantem Ligy proti rakovině Praha.

Stanovenie MDM2 SNP309 v súbore rôznych gynekologických nádorov a určenie jeho vzťahu k expresii p53 a MDM2 proteínov

Krekáč D., Hrstka R., Nenutil R., Muller P., Vojtešek B.

Oddělení klinické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Degradácia p53 sprostredkovaná MDM2 proteínom spätnoväzobnou slučkou je jedným z najdôležitejších regulačných mechanizmov funkcie p53. V bunkách je podľa momentálnej potreby regulovaná interakcia p53 s MDM2 fosforiláciami na p53 transaktivačnej doméne. Aby došlo k porušeniu tejto interakcie, p53 môže byť fosforylovaná na seríne 15 (S15), treoníne 18 (T18) a seríne 20 (S20), pričom každá z týchto pozícií má odlišnú funkčnú úlohu.

Dôležitosť interakcie p53 a MDM2 bola experimentálne preukázaná na príklade transgénnych myší s funkčne vyradeným génom MDM2, kedy tieto neboli životaschopné a takéto embryá umierali ešte pred implantáciou do matrice. Tento letálny fenotyp sa však neprejavil ak bol zároveň vyradený z funkcie aj gén p53. Zároveň bola u ľudí preukázaná spojitosť zvýšenej expresie MDM2 s akcele-

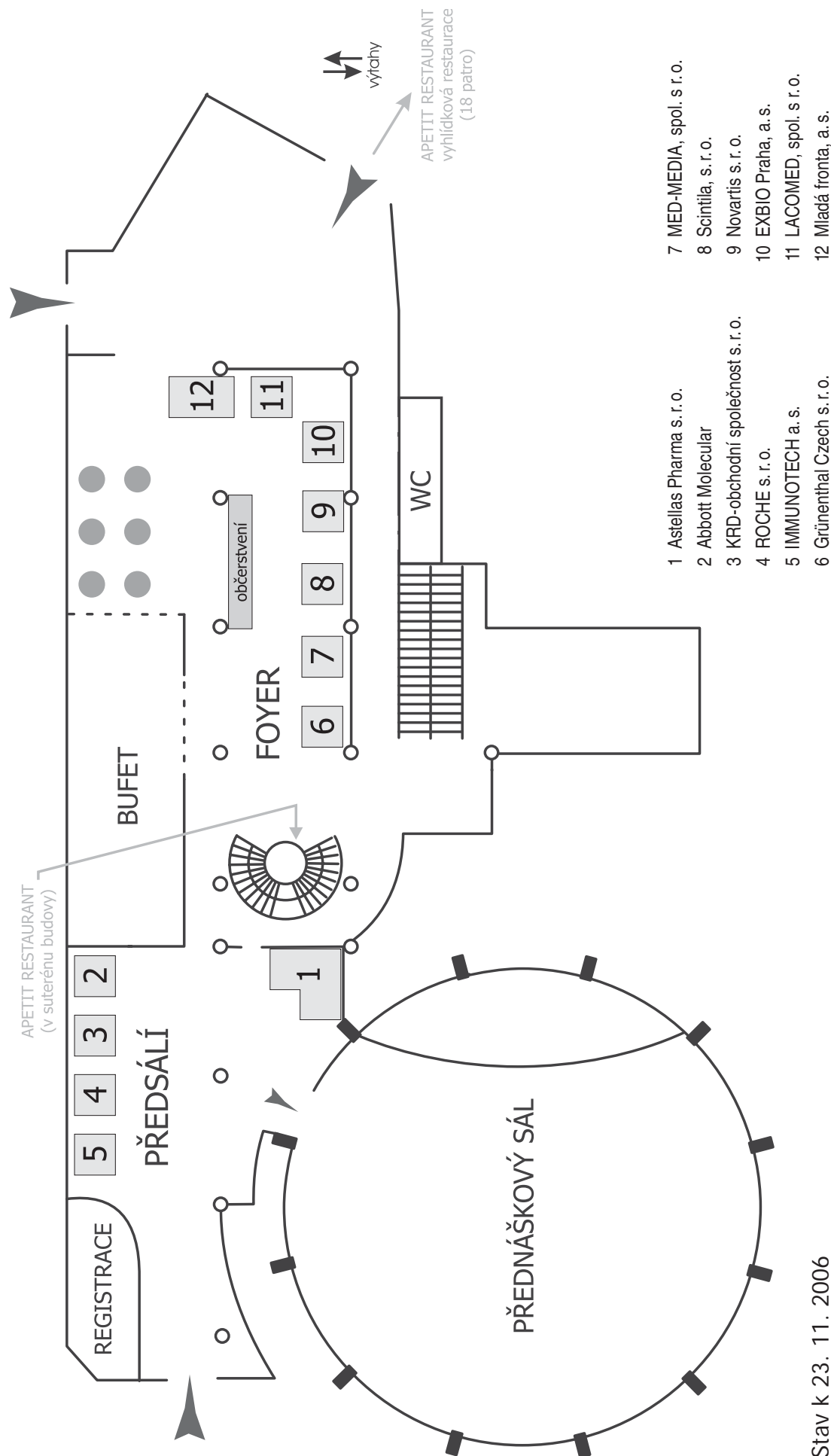
rovaným progresom nádoru ako i nedostatočnou odpoveďou na terapiu. Na základe týchto faktov sa ukazuje hladina expresie MDM2 rozhodujúca pri regulácii p53 signálnej odpovede na poškodenie DNA. Prírodné sa objavujúce variácie sekvencie MDM2 promótoru môžu mať za následok zmenu supresorovú funkciu p53 a teda potencionálne na karcinogézu. Pri identifikácii takýchto alterácií boli objavené dva SNP (Single Nucleotide Polymorphism) z ktorých SNP309 (zámena T za G v prvom intróne na pozícii 309) bol nájdený v relatívne vysokých frekvenciách ako v heterozygotnom tak homozygotnom stave. Funkčnými analýzami tohto polymorfizmu sa zistilo že výrazne zvyšuje väzobnú afinitu transkripčného faktoru Sp1 na jeho konsenzus sekvenciu v promótore obsahujúcu túto G/T substitúciu. Zvýšená expresia MDM2 proteínu následne znemožňuje správnu stabilizáciu wt p53 čím zvyšuje degradáciu p53. Takto narušená regulácia hladiny p53 vyústi do vzrastajúcej tvorby tumorov. Ďalším negatívnym faktorom SNP309 je štatisticky významne zvýšená incidencia vzniku nádoru v závislosti na veku, v priemere o 9–10 rokov. Výsledky kazuistických štúdií sa však rôznia.

V našom prípade sme zisťovali na skupine 139 nádorov v porovnaní so skupinou 75 zdravých darcov percento výskytu G alely v promotore genu mdm2. Podobne ako v predchádzajúcich publikovaných štúdiách nebola zistená výrazne rozdielna frekvencia výskytu alely G oproti kontrolnej skupine pričom v homozygotnom stave v oboch skupinách nepresahovala 8% a v heterozygotnom sa pohybovala okolo 50% (43,8% v kontrolnej skupine a 53,3% v skupine nádorov). Na pozadí publikovaných štúdií sme ďalej zisťovali súvislosť SNP309 s vekom diagnostikovania nádorového ochorenia. Navyše, vzhľadom k vyššej afinity polymorfneho genotypu k transkripčnému faktoru SP1 a p53 regulačnej funkcii MDM2, sme porovnávali výskyt alely a hladiny p53 a MDM2 proteínov.

Táto práca bola podporovaná z prostriedkov IGA MZČR No. NR/8338-3.

II. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

7.–9. prosince 2006, Olomouc / Regionální centrum Olomouc



II. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

OLOMOUC 7.–9. 12. 2006

PARTNEŘI

Abbott Molecular
Astellas Pharma s. r. o.
EXBIO Praha, a. s.
Grünenthal Czech s. r. o.
IMMUNOTECH a. s.
KRD – obchodní společnost s. r. o.
LACOMED, spol. s r. o.
MED-MEDIA, spol. s r. o.
Mladá fronta, a. s.
Novartis s. r. o.
Orion Diagnostica
PROMEDIAMOTION s. r. o.
ROCHE s. r. o.
Scintila, s. r. o.
SETEVA s. r. o.
SCHOELLER INSTRUMENTS, s. r. o.

MEDIÁLNÍ PARTNEŘI

ONKOLÓGIA

KLINICKÁ FARMAKOLOGIE
A FARMACIE 

Pořadatelé děkují výše uvedeným firmám za spoluúčast na zajištění kongresu.

StemCell Technologies

The Cell Experts™

Enrichment • Expansion • Evaluation • Education



scintila



RosetteSep™



EasySep™

And More



- magnetická a nemagnetická separace buněk
- pozitivní a negativní separace
- média pro kultivaci buněk



upstate
now part of Millipore

CHEMICON
now part of Millipore



Neuroscience

Cell Biology

Beadlyte Multiplex Assays

Cytokines

Growth Factors

Cytoskeletal

Stem Cells

Cancer, Apoptosis

Molecular Biology

Masarykovo nám. 44
586 01 Jihlava

tel +420 567 302 681
fax+420 567 330 277

market@scintila.cz
www.scintila.cz