

VYDÁVÁ
ČESKÁ LÉKAŘSKÁ
SPOLEČNOST J. E. PURKYNĚ
IČO 444359

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

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

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

Grafická a technická úprava:
Bohuslav Havlíček

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

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

Expedici na základě roční objednávky
vyřizuje redakce

Ministerstvo kultury ČR
MK ČR 5158
ISSN 0862-495 X

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

INDEXED IN EXCERPTA MEDICA

ČASOPIS ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI
A SLOVENSKEJ ONKOLOGICKEJ SPOLOČNOSTI

THE JOURNAL OF THE CZECH AND SLOVAK
ONCOLOGICAL SOCIETIES

VEDOUcí REDAKTOR: REJTHAR ALEŠ

ZÁSTUPCE VEDOUcíHO
REDAKTORA: KOZA IVAN
VÝKONNÝ REDAKTOR: FAIT VUK

REDAKTOŘI:

ČOUPEK PETR
HÁJEK ROMAN
KOCÁK IVO

VALÍK DALIBOR
VORLÍČEK JIŘÍ
ŽALOUĐÍK JAN

REDAKČNÍ RADA:

ADAM ZDENĚK, Brno
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava
BEDNAŘÍK OTAKAR, Praha
BEŠKA FRANTIŠEK, Ostrava
BILDER JOSEF, Brno
ČOUPEK PETR, Brno
DRBAL JOSEF, Brno
ECKHARDT SANDOR, Budapešť
FAIT VUK, Brno
HÁJEK ROMAN, Brno
JURGA LUDOVIT, Trnava
KALLAY JOZEF, Bratislava
KAUŠITZ JURAJ, Bratislava
KLASTERSKÝ JAN, Brusel
KLENER PAVEL, Praha
KOCÁK IVO, Brno
KOUTECKÝ JOSEF, Praha

KOVAŘÍK JAN, Brno
KOZA IVAN, Bratislava
MAYER JIŘÍ, Brno
MECHL ZDENĚK, Brno
NĚMEC JAROSLAV, Brno
ONDRUŠ DALIBOR, Bratislava
PAČOVSKÝ ZDENĚK, Brno
PLEŠKO IVAN, Bratislava
PETRUŽELKA LUBOŠ, Praha
REJTHAR ALEŠ, Brno
SPURNÝ VLADIMÍR, Brno
UJHÁZY VILIAM, Bratislava
VORLÍČEK JIŘÍ, Brno
VYZULA ROSTISLAV, Brno
WAGNEROVÁ MÁRIA, Košice
ŽALOUĐÍK JAN, Brno

Přehled	
Fait V., Chrenko V., Gatěk J. Sentinelová biopsie a neoadjuvantní chemoterapie	77
Hájek R., Kunická Z., Skleničková M., Dvořáčková M., Fajkus J., Smejkalová J., Krejčí M., Pour L., Očadlíková D., Weisssová D., Vigášová J., Kovářová L., Dudová S., Heinigová J., Vidláková P., Adam Z., Penka M. Stanovení aktivity telomerázy u mnohočetného myelomu	80
Mego M. Nové poznatky z molekulární biologie germinativních tumorů	84
Katolická J., Rovný A., Filipenský P. Docetaxel – nová možnost terapie hormonálně rezistentního karcinomu prostaty	89
Vítek P., Rosina J., Taltyňov O., Hozák P. Chemoradioterapie – mechanismus zvýšené aktivity cytostatik během poradiační reakce	92
Původní práce	
Kleibl Z., Novotný J., Malík R., Bezdíčková D., Kleiblová P., Foretová L., Krutílková V., Cínek M., Ilenčíková D., Petruželka L., Matouš B., Pohlreich P. Výskyt a význam mutace <i>CHEK2</i> *1100delC u pacientek s karcinomem prsu a v kontrolní skupině zdravých žen v České republice	98
Kazuistika	
Ryška A. Extraspinální myxopapilární ependymom sakrokokcygeální oblasti	102
Sdělení	
Jandík P. Možnosti a meze chirurgické léčby duktálního karcinomu mléčné žlázy in situ (dcis)	105
Jandík P. Sonda do psychologické situace onkochirurgického pacienta	107
Doleželová E., Büchler T., Fabian P., Pour L., Křen L., Moulis M., Adam Z., Krejčí M., Křivanová A., Hájek R. Expresie antigenu cd56 na maligních plazmocyttech a kostní postižení u pacientů s mnohočetným myelomem	110
Pála M.: Komentář k článku: Kovařík J.: Může být radiochemoterapie lokálně pokročilých nádorů hlavy a krku považována za standardní léčbu? <i>Klinická onkologie</i> 2005, 18, 1, 27-28	113
Zpráva	
Horváth T. Lasery v medicíně 2005	114
Informace	
Seminář: Karcinom děložního těla	104
Otevření Centra dětské hematologie a transplantologie Raisy Gorbačovové v St. Petersburgu	115
Onkologické společnosti	116
<hr/>	
CONTENTS	
Reviews	
Fait, V., Chrenko, V., Gatěk, J. Sentinel node biopsy and neoadjuvant chemotherapy in breast cancer	77
Hájek R., Kunická Z., Skleničková M., Dvořáčková M., Fajkus J., Smejkalová J., Krejčí M., Pour L., Očadlíková D., Weisssová D., Vigášová J., Kovářová L., Dudová S., Heinigová J., Vidláková P., Adam Z., Penka M. Telomerase activity in multiple myeloma	80
Mego M. Updates in molecular biology of germ cell tumors	84
Katolická J., Rovný A., Filipenský P. Docetaxel - new therapeutic possibility in prostate carcinoma resistant to hormonal therapy	89
Vítek P., Rosina J., Taltyňov O., Hozák P. Chemoradiotherapy - mechanism of increased cytostatics activation during the post-radiation reaction	92
Original publications	
Kleibl Z., Novotný J., Malík R., Bezdíčková D., Kleiblová P., Foretová L., Krutílková V., Cínek M., Ilenčíková D., Petruželka L., Matouš B., Pohlreich P. The incidence and relevance of the <i>CHEK2</i> *1100delc mutation in breast cancer patients and in healthy women in the Czech Republic	98
Case report	
Ryška A. Extraspinal myxopapillary ependymoma of the sacrococcygeal region	102
Communications	
Jandík P. Probe into psychological situation of an oncological patient in surgery	105
Jandík P. Possibilities and limitations of surgical treatment of ductal carcinoma in situ of the breast	107
Doleželová E., Büchler T., Fabian P., Pour L., Křen L., Moulis M., Adam Z., Krejčí M., Křivanová A., Hájek R. The expression of cd56 on malignant plasmocytes and bone disease in patients with multiple myeloma	110
Pála M.: Commentary on the article: Kovařík J. (<i>Klinická onkologie</i> 2005,18,1,27-28)	113
Report	
Horváth T.: Lasers in medicine, 2005	114
Notification	
Seminar: Carcinoma of the corpus uteri	104
Oncological associations	116

SENTINELOVÁ BIOPSIE U KARCINOMU PRSU A NEOADJUVANTNÍ CHEMOTERAPIE

SENTINEL NODE BIOPSY AND NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY IN BREAST CANCER

FAIT, V.¹, CHRENKO, V.¹, GATĚK, J.²

¹ MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO, ODDĚLENÍ CHIRURGICKÉ ONKOLOGIE

² NEMOCNICE ATLAS, ZLÍN

Souhrn: Sentinelová biopsie se stává standardem u časných karcinomů prsu a umožňuje vypustit disekci axilly u značného procenta pacientek. Otázkou je možnost využití tohoto konceptu v kombinaci s neoadjuvantní chemoterapií, která je dalším moderním trendem léčby mamárních nádorů. V zásadě je možné vyhledání sentinelové uzliny před a po chemoterapii. Řada studií prokazuje, že schůdné jsou obě cesty, větší pozornost je věnována možnosti sentinelové biopsie po chemoterapii, jak odpovídá klinické potřebě. Analýza studií ukazuje, že sentinelová biopsie po chemoterapii je ve zkušených rukou bezpečná a přesná metoda, plně srovnatelná se standardní sentinelovou biopsií a přehnaná skeps vůči tomuto postupu je zbytečná.

Klíčová slova: karcinom prsu, neoadjuvantní chemoterapie, sentinelová biopsie

Summary: Sentinel node biopsy is becoming a standard procedure in early breast cancer and allows to omit axillar dissection in a substantial percentage of patients. The use of this concept in combination with neoadjuvant chemotherapy, which represents another modern therapeutic trend, is being discussed. There are two possible ways of such sentinel node biopsy application: before and after chemotherapy. Numerous studies show that both are usable. Greater attention is given to the post-chemotherapy way, according to the clinical need. Study analysis demonstrates that sentinel node biopsy after chemotherapy in experienced hands is a safe and accurate procedure, fully comparable with standard sentinel biopsy. An exaggerated scepticism towards this procedure appears unnecessary.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, sentinel node biopsy

Úvod

Neoadjuvantní chemoterapie je standardem léčby pro pacientky s pokročilejším karcinomem prsu a je stále častěji uplatňována i u časnějších stádií.

Dalším moderním přístupem k terapii karcinomu prsu je aplikace sentinelové biopsie s možností vypuštění disekce axilly. Důslednou aplikací sentinelové biopsie lze u časných karcinomů disekci axilly vypustit u 70-80% pacientek. Vzhledem k tomu, že disekce axilly je hlavní příčinou pooperační morbidit pacientek s karcinomem prsu s mnohdy velmi komplikovanou a jen částečně účinnou léčbou, je toto číslo zajímavé jak z hlediska prospěchu jednotlivých pacientek, tak i z hlediska celospolečenského.

Oba tyto přístupy se v některých případech vzájemně kříží, a při současném trendu posunu neoadjuvantní chemoterapie do časnějších stádií se s těmito situacemi setkáváme stále častěji. Běžný je spíše skeptický přístup k použití sentinelové biopsie v kombinaci s neoadjuvantní chemoterapií, ve starších publikacích je předchozí chemoterapie přímo udávána jako kontraindikace k sentinelové biopsii. Indikace sentinelové biopsie se stále rozšiřují a donedávna jasné kontraindikace jsou již jen relativní, nebo dokonce vůbec neplatí. Skutečností je i to, že některé pacientky v těchto případech i samy aktivně použití sentinelové biopsie vyžadují. Je tedy na místě stručně zmapovat současný stav problematiky.

Za jakých situací nám tedy může být sentinelová biopsie nápomocna v kombinaci s neoadjuvantní chemoterapií?

Vyhledání a vyšetření sentinelové uzliny je přínosné pro diagnostiku a terapii v případech, kdy nejsou klinicky ani subklinicky detekovatelné uzlinové metastázy.

V kombinaci s neoadjuvantní systémovou terapií může tato situace nastat ve dvou případech:

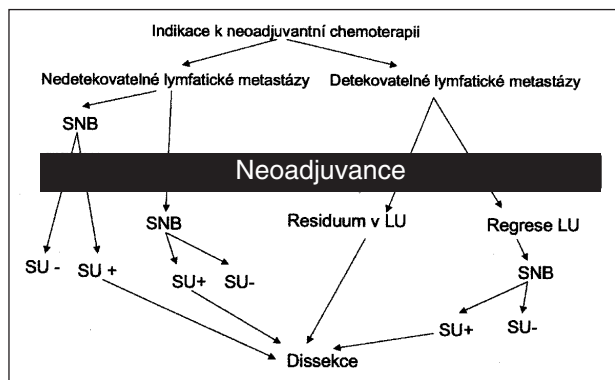
1. Velký primární tumor, bez metastáz v axille
2. Stav po úspěšné systémové terapii s kompletní regresí uzlinových metastáz.

V případě sub 1. se nabízejí dvě možnosti:

- a) předřadit sentinelovou biopsii systémové terapii
 - b) sentinelovou biopsii použít po skončení systémové terapie
- V případě sub 2. je pak pochopitelně možností pouze sentinelovou biopsii zařadit po systémové terapii.

Každý z předestřených postupů má svoji logiku, ale také své specifické problémy.

Obrázek: Schéma možností použití sentinelové biopsie v kombinaci s neoadjuvancí.



Sentinelová biopsie před aplikací neoadjuvance

U velkého tumoru v prsu bez detekovatelných metastáz může zařazení sentinelové biopsie před neoadjuvancí znamenat získání asi nejpřesnější možné informace o skutečném patologickém předléčebném stadiu.

Problémem však může být samotné technické uskutečnění u rozměrného tumoru. To, že i při rozměrném tumoru je identifikace sentinelové uzliny přesně prokázali například Bedrosian a spol.(2), kteří ve skupině pacientek s tumorem od 2 do 5 cm našli sentinelovou uzlinu (kombinací barvení a radio-navigace) a u 87 pacientek doplnili disekci, při falešné negativitě 2 %.

Dalším nezanedbatelným problémem je operační výkon navíc. V případě negativního nálezu a úspěchu systémové terapie by bylo hodnocení asi nejjednodušší. Otázka však vzniká, co dělat v případě pozitivní sentinelové uzliny? Doplnit disekci axilly po neoadjuvanci?

Přesnost tohoto postupu hodnotí Schrenk et al, kteří u 21 pacientek před aplikací chemoterapie našli sentinelovou uzlinu, (u 11 pacientek pomocí barvíva, u 10 pacientek kombinací s radionavigací) se 100% úspěšností nálezu, s 9 pozitivními nálezy. Po chemoterapii následoval definitivní chirurgický výkon na prsu s disekcí axilly. Další axilární uzliny byly negativní u všech pacientek s negativní sentinelovou uzlinou a u tří pacientek s pozitivní sentinelovou uzlinou (25).

Sabel et al. metodu zavedli do praxe, pacientky podstupují sentinelovou biopsii před chemoterapií, dle výsledku sentinelové biopsie pak po aplikaci chemoterapie je nebo není doplňována disekce axilly, hodnotí 55 pacientek s 56 karcinomy prsu, s úspěšností nálezu 100 %.(23)

Tab. 1.

Autor	Rok	Počet pacientů	Identifikace %	Falešná negativita %
Schrenk et al.	2003	21	100	0
Sabel et al.	2003	25(26)	100	nehodnoceno

Sentinelová biopsie po neoadjuvanci

a) Pokud u velkého tumoru bez primárně detekovatelných uzlinových metastáz bude aplikována sentinelová biopsie po neoadjuvanci, lze se domnívat, že bude nalezena skutečná sentinelová uzlina a nález v této bude pravděpodobně odrážet skutečný stav v axille, byť s jistou pochybností.

b) Logicky nejobtížněji interpretovatelná situace nastává v situaci, kdy dojde k regresi detekovatelných lymfatických metastáz. Logicky vznikají další otázky:

1. Může po neoadjuvantní terapii dojít k patologické regresi lymfatických metastáz? Pokud ano, tak jak často?
2. Je lymfatický systém po regresi tumoru anatomicky odpovídající stavu před terapií?
3. Může sentinelová uzlina, byť správně identifikovaná skutečně odrážet stav všech uzlin v axille po neoadjuvantní terapii? Jinak řečeno, jestliže kompletně regredovala metastáza v sentinelové uzlině, učinila nutně totéž i metastáza v uzlině jiné?
4. Otázka heretická: potřebujeme v tomto případě vůbec informaci o stavu uzlin?

Může po neoadjuvantní terapii dojít k patologické regresi lymfatických metastáz? Pokud ano, tak jak často?

První otázka je poměrně zásadní. Odpověď lze najít ve studii Kuerera et al.(1999). Souboru 191 pacientek s klinicky a cytologicky verifikovanými lymfatickými metastázami v axille byla podána neoadjuvantní chemoterapie s doxorubicinem. Následoval chirurgický výkon s disekcí axilly. 43 (23%) pacientek již nemělo histologický průkaz metastáz v axille. Při revizi histologických nálezů u negativních uzlin byly extenzivním vyšetřením nalezeny další 4 (10%) okultní metastázy(12).

Je lymfatický systém po regresi tumoru anatomicky odpovídající stavu před terapií?

Tato otázka souvisí především se stavem lymfatického systému a tudíž s tím, zda uzlinu lze vůbec technicky identifikovat a dále, zda identifikujeme skutečně sentinelovou uzlinu nebo alternativní cestu.

Některé studie ukazují, že problém s nalezením sentinelové uzliny a s její přesností nastává především u pacientek s původně inflamatorním karcinomem. Počty těchto pacientek ve studiích jsou poměrně malé, je však u nich největší procento neúspěšných identifikací i nejvyšší falešná negativita.

Může sentinelová uzlina, byť správně identifikovaná skutečně odrážet stav všech uzlin v axille po neoadjuvantní terapii? Jinak řečeno, jestliže kompletně regredovala metastáza v sentinelové uzlině, učinila nutně totéž i metastáza v uzlině jiné?

Pokud je otázka formulována takto sugestivně, pak se asi nevyhneme negativní odpovědi. De facto se však jedná o nejčastější klinickou situaci a umožnění redukce chirurgického zásahu v tomto případě má tedy opět největší dopad. Tomu odpovídá i množství studií, které se problémem zabývají.

Přehled dostupných studií je v tabulce, jejich výsledky z valné části prokazují přesnost sentinelových biopsií i po neoadjuvantní chemoterapii.

Je nutno se blíže zastavit u studií Nasona et al a Fernandez et al, které vykazaly neúnosně vysoký počet falešně pozitivních uzlin a které patří k oblíbeným argumentům odpůrců sentinelových biopsií po neoadjuvanci. V obou případech se jednalo o poměrně malé skupiny pacientek a stav uzlin před operací byl hodnocen pouze klinicky. Poměrně nízké je i procento úspěšnosti nálezu, v druhém případě dokonce i v kontrolní skupině pacientek bez chemoterapie. Komentář si dále zaslouží například studie Aiharova, který metodu použil nejen u pacientek po neoadjuvantní chemoterapii, ale i po neoadjuvantní hormonoterapii. Dle předpokladu byla funkčnost stejná, při mírně vyšším procentu úspěšnosti nálezu ve srovnání s chemoterapií.

Zajímavě působí studie Langa, který aplikoval sentinelovou biopsii s následnou disekcí bez ohledu na klinický stav uzlin. Jedním z výsledků je to, že u klinicky pozitivních uzlin je menší úspěšnost nálezu a přesnost, nicméně i v těchto případech jsou překvapivě vysoké (13).

Tab. 2.

Autor	Rok	Počet pacientů	Identifikace %	Falešně negativní (počet)	Falešná negativita %
Breslin et al.(4)	2000	51	84	3	12
Nason et al.(16)	2000	9	87	3	33
Cohen et al. (5)	2000	38	82	3	17
Haid et al.(7)	2001	33	88	0	0
Fernandez et al.(6)	2001	40	90	4	22
Julian et al.(8)	2001	31	93	0	0
Tafra et al.(28)	2001	29	93	0	0
Stearns et al(27)	2002	34	85	3	14
Miller et al(15)	2002	35	86	0	0
Julian et al.(9)	2002	34	91	0	0
Brady et al.(3)	2002	14	93	0	0
Piato et al.(20)	2003	42	98	3	17
Reitsamer et al. (21,22)	2003	36	87	2	7
Schwartz et al.(26)	2003	21	95	1	9
Aihara et al.(1)	2004	36	85	1	8
Shimazu et al.(24)	2004	47	94	4	12
Patel et al.(18)	2004*	42	95	0	0
Lang et al.(13)	2004**	53	96	0	0
Kang et al.(10,11)	2004*	80	76	3	3

* Přímé srovnání se SNB bez neoadjuvance – stejné výsledky

** SNB bez ohledu na klinický stav axilly

Otázka heretická: potřebujeme (v tomto případě) vůbec informaci o stavu uzlin?

Tato otázka je trochu kacířská, nicméně v souvislosti s výkony na lymfatickém systému u karcinomu prsu se od vyvrácení Virchowovy koncepce stále znovu v různých obměnách vynořuje. Argumentace tuto otázku podporující je celkem jednoduchá a pádná: pokud informace o stavu uzliny nemá vliv na terapii, tak ji v podstatě nepotřebujeme. Pokud informaci nepotřebujeme, tak její zjišťování je přinejmenším zbytečné a pacientku v podstatě poškozuje.

Prozatímní zkušenosti prozatím ukazují, že chirurgická eradikace okultních metastáz má vliv na přežívání, tedy stále platí, že tuto informaci potřebujeme, neboť nás nutí k chirurgickému odstranění i okultních metastáz. Na tuto otázku možná odpoví čas. Zkušenosti center, které masivně uplatňují sentinelovou biopsii bez disekce při negativním nálezu prozatím neukazují výskyt uzlinových relapsů, jak-

koliv nelze pochybovat o určitém procentu falešně negativních nálezů.

Závěr:

Sentinelová biopsie v kombinaci s neoadjuvantní systémovou terapií je prozatím vnímána jako nevhodný postup, fakta však dokazují, že i v tomto případě lze dosahovat velmi vysoké přesnosti jak nálezu, tak i velmi dobré shody stavu sentinelové uzliny se stavem celé axilly. (14,17,19).

Je nutno počítat s lehce nižší úspěšností nálezu, a lehce vyšší falešnou negativitou, i když některé studie i tuto skutečnost nepotvrzují. Horších výsledků se pak můžeme dočkat u pacientek s původně inflamatorním karcinomem, u pacientek s klinicky postiženými uzlinami před chemoterapií a pochopitelně u pacientek, u nichž se lymfoscintigraficky nezobrazuje sentinelová uzlina(7).

Literatura

- Aihara, T., Munakata, S., Morino, H., Takatsuka, Y.: Feasibility of sentinel node biopsy for breast cancer after neoadjuvant endocrine therapy: a pilot study. *J Surg Oncol.* 2004 Feb;85(2):77-81.
- Bedrosian, I., Reynolds, C., Mick, R., Callans, L.S., Grant, C.S., Donohue, J.H., Farley, D.R., Heller, R., Conant, E., Orel, S.G., Lawton, T., Fraker, D.L., Czerniecki, B.J.: Accuracy of sentinel lymph node biopsy in patients with large primary breast tumors. *Cancer.* 2000 Jun 1;88(11):2540-5.
- Brady, E.W.: Sentinel lymph node mapping following neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Breast J.* 2002 Mar-Apr;8(2):97-100.
- Breslin, (tm), Cohen, L., Sahin, A., Fleming, J.B., Kuerer, H.M., Newman, L.A., Delpassand, E.S., House, R., Ames, F.C., Feig, B.W., Ross, M.L., Singletary, S.E., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G.N., Hunt, K.K.: Sentinel lymph node biopsy is accurate after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Clin Oncol.* 2000 Oct 15;18(20):3480-6.
- Cohen, L.F., Breslin, T.M., Kuerer, H.M., Ross, M.L., Hunt, K.K., Sahin, A.A.: Identification and evaluation of axillary sentinel lymph nodes in patients with breast carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Am J Surg Pathol.* 2000 Sep;24(9):1266-72.
- Fernandez, A., Cortes, M., Benito, E., Azpeitia, D., Prieto, L., Moreno, A., Ricart, Y., Mora, J., Escobedo, A., Comin, M.J.: Gamma probe sentinel node localization and biopsy in breast cancer patients treated with a neoadjuvant chemotherapy scheme. *Nucl Med Commun.* 2001 Apr;22(4):361-6.
- Haid, A., Tausch, C., Lang, A., Lutz, J., Fritzsche, H., Peschina, W., Breitfellner, G., Segal, W., Aufschneider, M., Sturn, H., Zimmermann, G.: Is sentinel lymph node biopsy reliable and indicated after preoperative chemotherapy in patients with breast carcinoma? *Cancer.* 2001 Sep 1;92(5):1080-4.
- Julian, T.B., Dusi, D., Wolmark, N.: Sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Am J Surg.* 2002 Oct;184(4):315-7.
- Julian, T.B., Patel, N., Dusi, D., Olson, P., Nathan, G., Jasnosz, K., Isaacs, G., Wolmark, N.: Sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Am J Surg.* 2001 Oct;182(4):407-10.
- Kang, S.H., Kang, J.H., Choi, E.A., Lee, E.S.: Sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer.* 2004;11(3):233-41; discussion 264-6.
- Kang, S.H., Kim, S.K., Kwon, Y., Kang, H.S., Kang, J.H., Ro, J., Lee, E.S.: Decreased identification rate of sentinel lymph node after neoadjuvant chemotherapy. *World J Surg.* 2004 Oct;28(10):1019-24. Epub 2004 Sep 29.
- Kuerer, H.M., Sahin, A.A., Hunt, K.K., Newman, L.A., Breslin, T.M., Ames, F.C., Ross, M.L., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G.N., Singletary, S.E.: Incidence and impact of documented eradication of breast cancer axillary lymph node metastases before surgery in patients treated with neoadjuvant Chemotherapy. *Ann Surg.* 1999 Jul;230(1):72-8.
- Lang, J.E., Esserman, L.J., Ewing, C.A., Rugo, H.S., Lane, K.T., Leong, S.P., Hwang, E.S.: Accuracy of selective sentinel lymphadenectomy after neoadjuvant chemotherapy: effect of clinical node status at presentation. *J Am Coll Surg.* 2004 Dec;199(6):856-62.
- Mamounas, E.P.: Sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant systemic therapy. *Surg Clin North Am.* 2003 Aug;83(4):931-42.
- Miller, A.R., Thomason, V.E., Yeh, I.T., Alrahwan, A., Sharkey, F.E., Stauffer, J., Otto, P.M., McKay, C., Kahlenberg, M.S., Phillips, W.T., Cruz, A.B. Jr.: Analysis of sentinel lymph node mapping with immediate pathologic review in patients receiving preoperative chemotherapy for breast carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2002 Apr;9(3):243-7.
- Nason, K.S., Anderson, B.O., Byrd, D.R., Dunnwald, L.K., Eary, J.F., Mankoff, D.A., Livingston, R., Schmidt, R.A., Jewell, K.D., Yeung, R.S., Moe, R.E.: Increased false negative sentinel node biopsy rates after preoperative chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer.* 2000 Dec 1;89(11):2187-94.
- Patel, N.A., Dusi, D., Bragdon, G., Julian, T.B.: Technical limitations of sentinel node biopsy in breast cancer: a single surgeon's experience. *Am Surg.* 2003 Feb;69(2):111-6.
- Patel, N.A., Piper, G., Patel, J.A., Malay, M.B., Julian, T.B.: Accurate axillary nodal staging can be achieved after neoadjuvant therapy for locally advanced breast cancer. *Am Surg.* 2004 Aug;70(8):696-9; discussion 699-700.
- Pendas, S., Jakub, J., Giuliano, R., Gardner, M., Swor, G.B., Reintgen, D.S.: The role of sentinel lymph node biopsy in patients with ductal carcinoma in situ or with locally advanced breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Control.* 2004 Jul-Aug;11(4):231-5.
- Pioto, J.R., Barros, A.C., Pincerato, K.M., Sampaio, A.P., Pinotti, J.A.: Sentinel lymph node biopsy in breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. A pilot study. *Eur J Surg Oncol.* 2003 Mar;29(2):118-20.
- Reitsamer, R., Peintinger, F., Rettenbacher, L., Prokop, E.: Sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol.* 2003 Oct;84(2):63-7.
- Reitsamer, R., Menzel, C., Peintinger, F., Cimpoa, W., Glück, S., Sinzinger, G., Rettenbacher, L., Kässmann, H., Hoffmann, A., Prokop, E., Strasser, F., Kiesler, J., Hutarew, G., Dietze, O.: Die Sentinellymphknotenbiopsie beim Mammakarzinom Ergebnisse und Erfahrungen nach 500 Sentinellymphknotenbiopsien. *Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau* 2003;43:98-103.
- Sabel, M.S., Schott, A.F., Kleer, C.G., Merajver, S., Cimmino, V.M., Diehl, K.M., Hayes, D.F., Chang, A.E., Pierce, L.J.: Sentinel node biopsy prior to neoadjuvant chemotherapy. *Am J Surg.* 2003 Aug;186(2):102-5.
- Shimazu, K., Tamaki, Y., Taguchi, T., Akazawa, K., Inoue, T., Noguchi, S.: Sentinel lymph node biopsy using periareolar injection of radiocolloid for patients with neoadjuvant chemotherapy-treated breast carcinoma. *Cancer.* 2004 Jun 15;100(12):2555-61.
- Schrenk, P., Hochreiner, G., Fridrik, M., Wayand, W.: Sentinel node biopsy performed before preoperative chemotherapy for axillary lymph node staging in breast cancer. *Breast J.* 2003 Jul-Aug;9(4):282-7.
- Schwartz, G.F., Meltzer, A.J.: Accuracy of axillary sentinel lymph node biopsy following neoadjuvant (induction) chemotherapy for carcinoma of the breast. *Breast J.* 2003 Sep-Oct;9(5):374-9.
- Stearns, V., Ewing, C.A., Slack, R., Penannen, M.F., Hayes, D.F., Tsangaris, T.N.: Sentinel lymphadenectomy after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer may reliably represent the axilla except for inflammatory breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2002 Apr;9(3):235-42.
- Tafra, L., Verbanac, K.M., Lannin, D.R.: Preoperative chemotherapy and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Am J Surg.* 2001 Oct;182(4):312-5.

STANOVENÍ AKTIVITY TELOMERÁZY U MNOHOČETNÉHO MYELOMU

TELOMERASE ACTIVITY IN MULTIPLE MYELOMA

HÁJEK R.^{1,2}, KUNICKÁ Z.³, SKLENIČKOVÁ M.⁴, DVOŘÁČKOVÁ M.^{3,4}, FAJKUS J.^{3,4}, SMEJKALOVÁ J.², KREJČÍ M.¹, POUR L.¹, OČADLÍKOVÁ D.², WEISSOVÁ D.⁵, VIGÁŠOVÁ J.², KOVÁŘOVÁ L.², DUDOVÁ S.², HEINIGOVÁ J.², VIDLÁKOVÁ P.², ADAM Z.¹, PENKA M.²

¹ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, FN BRNO

² LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ HEMATOLOGIE A BUNĚČNÉ IMUNOTERAPIE, ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

³ LABORATOŘ FUNKČNÍ GENOMIKY A PROTEOMIKY, MU BRNO

⁴ BIOFYZIKÁLNÍ ÚSTAV AV ČR

⁵ CENTRUM BIostatistiky A ANALÝZ, LF MU BRNO

Souhrn: *Východisko:* Zvýšení aktivity telomerázy je pozorováno u řady zhoubných nádorů. Cílem práce bylo vyhodnotit aktivitu u nemocných s mnohočetným myelomem včetně zhodnocení prognostického významu stanovení telomerázové aktivity. *Typ studie a soubor:* Zkoumali jsme prognostický význam telomerázové aktivity u mnohočetného myelomu. *Metody a výsledky:* Pro analýzu byly připraveny CD138+ myelomové buňky izolované celkem od 130 nemocných s mnohočetným myelomem. Deset vzorků kostní dřevě od nemocných s monoklonální gamapatií nejasného významu tvořily kontrolní soubor reprezentující málo aktivní onemocnění. Aktivita telomerázy byla analyzována u souboru 34 nemocných s mnohočetným myelomem s vysokou čistotou CD 138+ populace buněk (medián 95,5 %; rozptyl 50,0-100,0 %). Pozorovali jsme výraznou heterogenitu v telomerázové aktivitě. Index pro aktivitu telomerázy v souboru pacientů s mnohočetným myelomem byl 0,80; pro pozitivní frakci 0,92 a negativní frakci 0,68. U pacientů s novou diagnózou byl index telomerázy v pozitivní frakci 1,18 a v negativní frakci 0,81. V kontrolním souboru pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu byla minimální telomerázová aktivita pozorována jen v 20,0% (2 z 10) případů. Index aktivity telomerázy (0,20) byl výrazně nižší než u nemocných s mnohočetným myelomem s hraniční statistickou významností i u tak malého souboru nemocných ($p=0,054$). Nepozorovali jsme korelaci mezi aktivitou telomerázy a standardními prognostickými parametry u mnohočetného myelomu. Podobně tomu bylo u korelace s parametry dlouhodobého přežití. *Závěr:* Výsledky ukázaly, že aktivita telomerázy v kostní dřevě pacientů s mnohočetným myelomem není specifická pro frakci CD138+. Tato skutečnost snižuje možnost využití tohoto parametru pro prognostické účely.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, prognóza, telomera, telomerázová aktivita

Summary: *Background:* Telomerase activity is associated with most malignant tumors. The aim of this trial was to evaluate telomerase activity in multiple myeloma including prognostic potential of this marker. *Design and subject:* We have investigated the prognostic significance of telomerase activity in multiple myeloma. CD138+ myeloma cells were isolated from bone marrow of 130 patients with active multiple myeloma. Ten patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance represent control group with low activity of disease. The analyses of telomerase activity were undertaken only on 34 samples with high purity of CD 138+ myeloma cells with median 95,5% (range 50,0-100,0%). There was heterogeneity in telomerase activity. Index for telomerase activity in multiple myeloma patients was 0.92 for CD138+ MM cells and 0.68 for CD138- cells ($p=0,238$). The corresponding indexes for newly diagnosed multiple myeloma and relapse only were 1.18 (CD138+) and 0.81 (CD138-). In control group of monoclonal gammopathy of undetermined significance, the telomerase activity index (0.20) was markedly lower in comparison with the multiple myeloma patients ($p=0,054$), with very low activity of telomerase activity detectable in 2 of 10 patients only. No significant correlations with standard prognostic factors were observed. Similar was true for parameters of survival. *Conclusion:* The results have shown that telomerase activity has a trend to correlate with activity of multiple myeloma. Unfortunately telomerase activity in marrow of multiple myeloma patients is not specific for CD138+ myeloma cells. This fact limits usefulness of telomerase activity for prognostic purpose in this diagnosis.

Key words: multiple myeloma, prognosis, telomerase, telomerase activity

Úvod

Mnohočetný myelom (MM) je onemocnění charakterizované neoplastickou klonální proliferací plazmatických buněk a jejich akumulací v kostní dřevě (1). Přestože jsou nemocní léčeni zpravidla podle univerzálních standardních protokolů, je MM heterogenním onemocněním, které se vyznačuje individuálními rozdíly z hlediska klinických projevů, léčebné odezvy a prognózy (2). Je zjevné, že u části nemocných se objevuje nová aktivita onemocnění časně a byli by proto vhodnými kandidáty pro časně použití agresivnější léčebné metody zahrnující dvojistou autologní transplantaci (3,4) či následnou konsolidační léčbu využívající cytostatika, nověji inhibitory angiogeneze nebo jinou experimentální léčbu po provedení standardní transplantace (6). Nejrozšířenějším prognostickým kritériem je v současnosti klinické stádium choroby podle Durie-Salmona z roku 1975, založené na kombinaci klinických parametrů, které korelují s velikostí nádorové masy. Význam některých z nich je však sporný. Obecně se hledají silné, na ostatních faktorech nezávislé pro-

gnostické faktory (PF), jejichž kombinace by postihovala velikost nádorové masy, stupeň agresivity nemoci a vnitřní biologické vlastnosti myelomových buněk. Mezi všeobecně uznávaná standardní prognostická kritéria patří: beta2mikroglobulin, C reaktivní protein, laktát dehydrogenáza, počet trombocytů, albumin, labeling index, stádium I-III dle Salmon-Durie (1,2) a nejnověji International Staging System (ISS), který jsme poprvé aplikovali u našich nemocných v roce 2004 (7). V poslední době je u nemocných s MM, zvláště jsou-li léčeni vysokodávkovou chemoterapií, často považován za rozhodující prognostický faktor jejich úvodní cytogenetický nálezní (8). Zcela nejnověji bylo americkými týmy navrženo vstupní rozdělení onemocnění na 4 různé typy lišící se zásadně prognózou. Jde dělení dle přítomnosti chromozomálních aberací a přítomnosti cyklinů (9) a jiné dělení na základě microarray profilu prezentované týmem z Little Rocku (10). Je zkoumána řada dalších potenciálních prognostických faktorů. Mezi ně patří i stanovení aktivity telomerázy (11).

Telomeráza je ribonukleoproteinový komplex, který zajišťuje doplňování 3'-konců chromozomální DNA, které při replikaci DNA zůstávají nezkopirovány. Při nečinnosti telomerázy je každý cyklus replikace DNA spojen se zkrácením chromozómů, které může nakonec vést až ke ztrátě schopnosti telomer maskovat konce chromozómů a odlišit je od neopravených zlomů. To má za následek aktivaci odpovědi na poškození DNA, která způsobí zastavení buněčného cyklu (12). Aktivita telomerázy je reprimována v naprosté většině normálních diferencovaných lidských buněk, a v důsledku toho je replikační kapacita těchto buněk omezena. Naproti tomu zárodečné tkáň, nediferencované buňky (např. hematopoietické buňky kostní dřevě) a nádorové buňky jsou pozitivní na aktivitu telomerázy, čímž se tyto buňky stávají nesmrtelnými. Velmi silná korelace mezi přítomností aktivity telomerázy a malignitou činí tento enzym jedním z nejobecnějších tumorových markerů (13). Podle sumarizovaných údajů byla aktivita telomerázy delegována přibližně v 90,0% všech typů lidských rakovinových onemocnění. U MM bylo publikováno jen několik sdělení věnujících se stanovení a prognostickému významu telomerázy, respektive její aktivity a délky telomer (11,14,15,16), přičemž jen jediná práce ze čtyř citovaných poskytuje jistou informaci ve vztahu k prognóze (11).

Cílem této práce je shrnutí našich poznatků o telomerázové aktivitě, jejím stanovení u nemocných s MM a potenciálním přínosu pro stanovení prognózy.

Soubor nemocných

Indikací k provedení vyšetření bylo zařazení nemocného s MM do transplantčního programu, respektive do studie 4W nebo studie navazující. Jako kontrolní soubor byl použitý soubor sledovaných jedinců s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Odběry pro laboratorní vyšetření a pro stanovení aktivity telomerázy byly provedeny v jeden den. Soubor 44 nemocných byl tvořen 19 muži a 25 ženami s diagnózou MM (34x) a MGUS (10x). Průměrný věk byl 56 let. Celkem bylo hodnoceno 48 vzorků: 28 od nově diagnostikovaných MM, 5 od nemocných v relapsu onemocnění (1 x stejný nemocný jako při vstupu), 5 pacientů vykazovalo maximální léčebnou odpověď (2x u nemocného se vstupním vzorkem, 1x opakovaně). U 10 pacientů byla diagnostikována (MGUS). Klinická stádia byla stanovena podle Durie and Salmon (D-S) a dle International Staging System (ISS). Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 1.

Materiál a metody

Imunomagnetická separace buněk se získáním CD138+ frakce: 40 – 80 ml kostní dřevě s IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma), Heparinem a DNase from bovine pancreat (Roche) je po 30 minutách jemného třepání centrifugována na Histopaque (Sigma). Separované mononukleární buňky jsou promyty v PBS + 0,1M EDTA, pH 7,2 a značeny podle povrchového antigenu monoklonální protilátkou B – B4 (CD 138 MicroBeads, 20 µl /10⁷ buněk, inkubace 15 min., 6–12 °C). Značená buněčná suspenze je aplikována do kolony umístěné v magnetickém poli separátoru, pozitivní buňky jsou

zachyceny v koloně. Frakce buněk CD138+ je získána po odstranění kolony z magnetického pole. Při kontrole čistoty frakcí (procento myelomových buněk) se zjišťuje procento plazmatických buněk určeného z cytospinového preparátu (17). Příprava vzorku pro stanovení aktivity telomerázy: odebrané množství 0.01x10⁶ – 0.1x10⁶ buněk pozitivní frakce, 0.1x10⁶ buněk negativní frakce a 0.1x10⁶ – 1x10⁶ buněk vstupního vzorku se centrifuguje 1600 ot. 10 min., supernatant se slijí. Sediment se zamrazí šokem v tekutém dusíku v Dewarově nádobě. Stanovení aktivity telomerázy se provádí pomocí metody TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol), která byla vyvinuta pro stanovení aktivity telomerázy v lidských buňkách (18). Metoda TRAP zahrnuje dva kroky: první fáze - extenze, probíhá 30 minut při 26 °C. Reakční mix obsahuje 18,5 µl TRAP pufru, 5 pmol substrátového oligonukleotidu, 5 pmol reverzního oligonukleotidu, 2 oligonukleotidy vytvářející vnitřní kontrolu reakce (všechny složky jsou součástí kitu TRAPeze Telomerase Detection kit, Chemicon), 1 jednotku termostabilní DNA polymerázy [např. Dynazyme II DNA polymerase (Finnzymes)] a buněčný extrakt. Po skončení fáze extenze jsou amplifikovány produkty reakce v 35 cyklech: 94 °C/30s, 56 °C/30s, 72 °C/30s. Separace produktů probíhá pomocí polyakrylamidové gelové elektroforózy na 12,5% polyakrylamidovém gelu. Produkty jsou obarveny pomocí SybrGreen (Molecular Probes) a následně skenovány přístrojem STORM PhosphoFluorImager (Amersham Biosciences).

Statistické zpracování: Výsledky byly zpracovány programem Statistika 7.0. Aktivita telomerázy má tři kategorie (pozitivní, opačná, stejná). Pro zjištění zda existuje závislost mezi aktivitou telomerázy a ostatními parametry byl pro spojitě parametry (věk, laboratoř, délka přežití, follow-up) použit Kruskal-Wallis ANOVA test popř. Mann-Whitney test, pro kategoriální parametry (pohlaví, řetězec, ...) byl použit Fischer test a test maximální věrohodnosti. Spojité parametry jsou popsány průměrem, směrodatnou odchylkou, mediánem, min, max a percentily. Pro kategoriální veličiny jsou vytvořeny frekvenční tabulky. Protože data nemají normální rozložení, byly pro testování použity metody neparametrické statistiky.

Výsledky

Hodnocení bylo provedeno semikvantitativně s označením aktivity 1,0-33,0% hodnocením 1, aktivity 33,0%-66,0% hodnocením 2 a aktivity vyšší než 66,0% hodnocením 3. Index pro aktivitu telomerázy v souboru pacientů s MM (28x nová dg.; 5x relaps, 5x max. léčebná odpověď) byl 0,80; pro pozitivní frakci 0,92 a negativní frakci 0,68. U pacientů s novou diagnózou a relapsem byl index telomerázy 1,00; v pozitivní frakci 1,18 a v negativní frakci 0,81. V kontrastu s tím níže uvádíme výsledky získané u 10 nemocných s MGUS, respektive index pro aktivitu telomerázy 0,20. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Výsledky ukázaly, že aktivita telomerázy v kostní dřevě pacientů s mnohočetným myelomem není specifická pro frakci CD138+. Ze 38 vzorků od nemocných s MM (28x nová dg.; 5x relaps, 5x max. léčebná odpověď) byla u 25 vzorků (66,0%) aktivita telomerázy pozitivní ve kterékoliv frakci (CD138+ i CD138-). Ve 12 případech byla zvýšená aktivita telomerázy v CD138+ frakci (32,0%), 19 vzorků dřevě mělo podobnou aktivitu v obou frakcích (50,0%) a u zbývajících 7 vzorků byla aktivita v CD138- frakci vyšší než ve frakci CD138+ (18,0%). Při odclonění výsledků u pacientů po dosažení maximální odpovědi (5x) byla relevantní čísla pro jednotlivé frakce následující: 12x zvýšená aktivita telomerázy v CD138+ frakci (12/33 – 36,0%); 16 x podobná aktivita (16/33- 48,0%); 5 x aktivita v CD138- frakci vyšší než ve frakci CD138+ (5/33 – 15,0%) (graf č. 1 a 2).

Po dosažení maximální léčebné odpovědi byla telomerázová aktivita pozitivní ve kterékoli frakci u 2 z 5 vzorků (40,0%), přičemž CD138+ frakce vykazovaly aktivitu vždy nižší než odpovídající CD138- frakce (s hodnocením 1 vs 2, resp. 1 vs 3). To je výrazný rozdíl oproti dokladované pozitivitě aktivity

Tabulka č. 1. Charakteristika celého souboru. IgA, IgG, IgM, IgD, nespecifický Ig – typy monoklonálního paraproteinu, stádium D-S – stádium dle Durie-Salmon, stádium ISS – stádium dle International Staging System.

Počet pacientů	44
Ženy	25
Muži	19
IgA	17
IgG	22
IgM	1
IgD	1
nespecifický Ig nezařazeno	2
Stádium D-S	
I	2
II	5
III	27
MGUS	10
Stádium ISS	
I	12
II	12
III	7
MGUS	10
nezařazeno	3
Věk průměr 56,6 rozptyl 9,8	

Tabulka č. 2. Přehled výsledků telomerázové aktivity u 48 hodnocených nemocných s mnohočetným myelomem a monoklonální gamapatií nejasného původu.

čís.	čistota T-	čistota T+	dg.	A (TV)	A (T+)	A (T-)	hodnocení
1	0%	80.8%	nová dg		1	0	p
2	3%	81%	nová dg		0	0	s
3	3%	96%	nová dg		1	0	p
4	29%	94%	nová dg		3	3	s
5	39%	99%	nová dg		1	1	s
6	11%	100%	nová dg		1	1	s
7	0.4%	96.4%	nová dg		0	2	o
8	11%	100%	nová dg		2	2	s
9	22%	92%	relaps		0	2	o
10	0%	100%	nová dg		3	1	p
11	3%	100%	nová dg		3	1	p
12	0%	100%	max. o		0	0	s
13	0%	100%	nová dg		0	0	s
14	27%	100%	nová dg		0	0	s
15	21%	100%	nová dg		0	0	s
16	7%	91%	max. o		0	0	s
17	5%	92%	nová dg		2	0	p
18	2%	100%	nová dg		0	1	o
19	2%	100%	nová dg		0	0	s
20	0%	58%	nová dg		2	0	p
21	0%	70%	relaps		2	0	p
22	2%	9%	max. o		0	0	s
23	45%	81%	relaps		1	1	s
24	10%	89%	nová dg		1	1	s
25	nezhod	18%	max. o		1	3	o
26	60%	90%	relaps		3	2	p
27	3%	79%	max. o		1	2	o
28	0%	50%	relaps		0	1	o
29	16%	100%	nová dg		1	0	p
30	8%	63%	nová dg		0	0	s
31	nezhod	99%	nová dg		1	0	p
32	37%	72%	nová dg		0	0	s
33	4,00%	97%	nová dg	1	0	2	o
34	9,00%	100%	nová dg	3	3	0	p
35	5,00%	100%	nová dg	0	2	0	p
36	0,00%	62%	nová dg	0	0	0	s
37	3,00%	100%	nová dg	0	0	0	s
38	0%,40bb	100%	nová dg	3	0	0	s
39	x	x	MGUS	0	x	x	
40	x	x	MGUS	0	x	x	
41	x	x	MGUS	0	x	x	
42	x	x	MGUS	0	x	x	
43	x	x	MGUS	0	x	x	
44	x	x	MGUS	0	x	x	
45	x	x	MGUS	1	x	x	
46	x	x	MGUS	1	x	x	
47	x	x	MGUS	0	x	x	
48	5%	40%	MGUS	0	0	0	s

čistotaT+ - procento myelomových buněk v pozitivní frakci
 čistotaT- - procento myelomových buněk v negativní frakci
 A (TV) - aktivita telomerázy ve vstupním vzorku
 A (T+) - aktivita telomerázy v pozitivní frakci buněk
 A (T-) - aktivita telomerázy v negativní frakci buněk
 hodnocení - hodnocení aktivity telomerázy
 p - pozitivní výsledek, aktivita v A(T+) je větší než v A(T-)
 o - opačný výsledek, aktivita v A(T+) je menší než v A(T-)
 s - stejný výsledek, aktivita v A(T+) je stejná než v A(T-)
 nová dg - nová diagnóza
 MGUS - monoklonální gamapatie nejasného původu
 max. o. - maximální léčebná odpověď
 čís. - pořadové číslo pacienta

telomerázy u 23 z 33 vzorků (70,0%) u nemocných v aktivní fázi onemocnění (před léčbou nově dg. nebo při relapsu onemocnění). Jen ve dvou případech šlo posoudit vývoj onemocnění u jednotlivých pacientů porovnáním aktivity vzorků vstupních a vzorků po dosažení maximální léčebné odpovědi; vzorky č. 1. (vstupní) a 27. (maximální léč. odpověď); vzorky č. 5. a 22. V prvním případě došlo k úplnému vymizení telomerázové aktivity (hodnocení 0 v obou frakcích při původní aktivitě 1). Ve druhém případě (č. vzorku 1) bylo při vstupním stanovení v CD138+ frakci hodnocení 1 a v CD138- frakci hodnocení 0. Po dosažení maximální léč. odpovědi zůstala v CD138+ frakci aktivita stupně 1, zatímco v CD138- frakci dosáhla hodnocení 2.

Podobně jako u maximální léčebné odpovědi byly nulové hodnoty naměřeny u většiny nemocných s MGUS (celkem 10 vyšetřených vzorků). Vzhledem k očekávané negativitě nebyly již měřeny frakce, ale byla vyšetřena plná dřev. Osm z 10 vzorků bylo negativních, ve dvou případech byla zaznamenána slabá aktivita s hodnocením 1.

Výsledky nekorelovaly s žádnými standardně měřenými prognostickými parametry kromě hladiny LDH v souboru pacientů s MGUS (p=0,042).

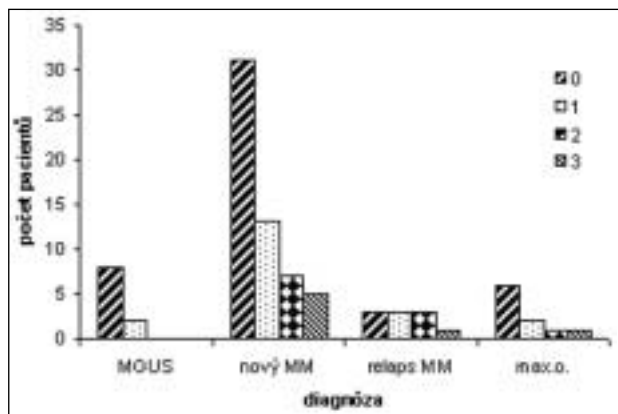
Diskuse

Pozorované výsledky naznačují, že by mohla existovat předpokládaná korelace aktivity telomerázy se stupněm proliferace buněk a tedy i aktivitou onemocnění podobně jako u změn aktivity telomerázy, k nimž dochází u jiných nádorových onemocnění. Dokladem toho je 80,0% negativních vyšetření u prekancerózy MGUS a orientačně nízká nebo nulová aktivita telomerázy u nemocných s MM po dosažení maximální léčebné odpovědi (60,0% negativních). Tato data jsou ve shodě s pilotní prací z roku 2001 (16). Limitací je malý počet nemocných vyšetřených po dosažení remise onemocnění. Technické potíže (nízký vstupní počet buněk, ztráty buněk při selekci a nemožnost kvalitně separovat buňky) a další objektivní příčiny (závažné komplikace s přerušením léčby a případně časným relapsem či úmrtím bez možnosti odběru vzorku pozorované až ve 30,0% případech v průběhu klinických studií) vedly k vyšetření malého počtu pacientů ve stadiu maximální léčebné odpovědi. Tato data budou doplněna s postupem času nad rámec grantu na nejméně 10 srovnání, neboť jde o jedinečné údaje, které se obtížně získávají a doposud ve světě takové porovnání nebylo publikováno.

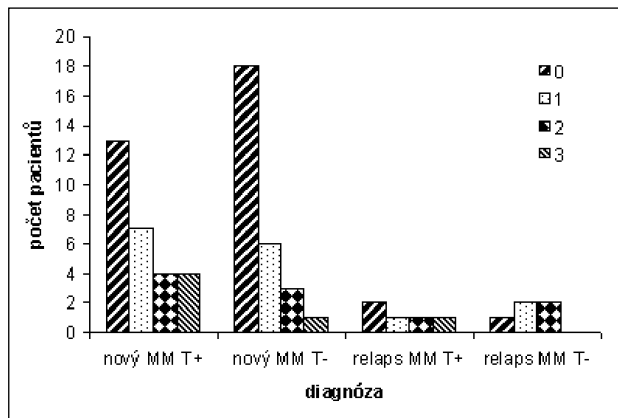
Ve stadiu relapsu a při stanovení diagnózy bylo rozmezí zjištěných aktivit velmi široké (hodnota 0-3), což může souviset s poměrně častou aktivací alternativního (na telomeráze nezávislého) prodlužování telomer (*alternative telomere lengthening; ALT*) v této fázi onemocnění. Tomu nasvědčují i pozorování heterogenity a ztráty telomer pomocí in situ technik v buňkách kostní dřeně MM pacientů.

Podobně jako v jediné dosud publikované velké práci na světě s reprezentativním počtem vyhodnocených nemocných s MM (11) a totožnou metodikou přípravy buněk pro vyšetření (selektce CD138+ buněk) jsme zjistili pozitivitu telomerázové aktivity i v CD138- frakci buněk. Účinnost frakcionace buněk pro toto vyšetření nedosahovala při použití manuální metody MACS hodnot dosažených kolektivem Wu et al (11) při použití automatického přístroje AutoMACS (>95,0% plazmocytů v CD138+ frakci hodnoceno cytospinem). Omezení souboru na vstupní vzorky o vhodné čistotě (viz výše) však vedlo k dosažení hodnoty 89,7% (50,0-100,0% plazmocytů v CD138+ frakci hodnoceno cytospi-

Graf č.1: Hodnocení aktivity telomerázy v celém souboru. 0,1,2,3 – stupeň aktivity telomerázy.



Graf č. 2: Hodnocení aktivity telomerázy u pacientů s novou diagnózou a relapsem. 0,1,2,3 – stupeň aktivity telomerázy.



nem) ve vzorcích u nově diagnostikovaných nebo relabovaných nemocných. U těchto vzorků byly získány obdobné výsledky s častou pozitivitou telomerázové aktivity i v CD138-frakci (14 z 33 nemocných; 42,0%). Toto zjištění částečně komplikuje hodnocení a nabízí se řada úvah o přítomnosti prekursorů myelomových buněk ve formě jistého stádia B lymfocytů bez přítomnosti znaku CD138+ nebo i příspěvek CD138+ buněk uniklých do negativní frakce (čistota frakce od 0,0 do 60,0%, ale vždy nejméně o polovinu nižší zastoupení CD138+ buněk oproti CD138+ frakci). Druhé vysvětlení je možné, ale

nepravděpodobné, neboť výběr nemocných s jednoznačně zvýšeným podílem CD138+ buněk v pozitivní frakci oproti negativní frakci tuto úvahu nepodporuje. Pravděpodobnějším vysvětlením tohoto jevu může být nízká aktivita telomerázy v myelomových buňkách na pozadí telomerázové aktivity krevtvořných buněk, přítomnost jiného aktivního klonu v negativní frakci, či dokonce aktivace telomerázy v buňkách tvořících mikroprostředí kostní dřevě, o němž je známo, že v patofyziologii progresu MM hraje pravděpodobně významnou roli (5, 11).

V původní práci z roku 2002 byl na souboru 25 nemocných s MM dokladován význam stanovení telomerázové aktivity pro prognózu. Pacienti s vysokou aktivitou měli signifikantně ($p=0,035$) kratší přežití (15). Wu a spol. v jediné práci s reprezentativním souborem nemocných prokázali jistý význam stanovení telomerázové aktivity pro prognózu onemocnění. Vysoká telomerázová aktivita korelovala s celkově horší prognózou u 183 nemocných (52,0% versus 81,0%; $p<0,001$). Nicméně při analýze souboru byly tyto výsledky potvrzeny pro nemocné v relapsu onemocnění, ale ne pro nemocné nově diagnostikované, kde byl pozorován jen trend ke zhoršení prognózy ($p=0,080$) (11). Naše vlastní výsledky sledování aktivity telomerázy neprokázaly významné korelace se standardními prognostickými faktory na limitovaném souboru nemocných. Rovněž při sledování nemocných s dobou sledování s mediánem 28 měsíců a mediánem přežití 25 měsíců (14 - 94 měsíce) nebyl pozorován prognostický význam stanovení telomerázové aktivity u nově diagnostikovaných jedinců.

Závěr

Výsledky, získané u pacientů s MM, zvláště pak v porovnání s výsledky získanými u nemocných MGUS, potvrzují, že aktivita telomerázy může korelovat s dynamikou onemocnění. Její rutinní použití v diagnostice (vzhledem k tomu, že aktivita není specifická pro CD138+ frakci, resp. není v mnoha případech v této frakci výrazně vyšší než ve zbytku kostní dřevě) je však problematickejší než u jiných typů nádorů, například kolorektálního karcinomu (19). Naše výsledky potvrzují výsledky jediné práce na toto téma (publikované na konci roku 2003), ve které byly zjištěny heterogenní hodnoty aktivity telomerázy (od 0,0 do 427,0% aktivity kontrolní neuroblastomové linie) [11]. Na limitovaném počtu nemocných nebyly nalezeny žádné prognostické korelace související s telomerázovou aktivitou. Obtížnost stanovení i pozadí telomerázové aktivity v kostní dřevě je výraznou limitací pro využití tohoto parametru pro jiné než výzkumné účely.

Poděkování

Práce je podporována grantem IGA MZ ČR NC 7043 – 3/02.

Literatura

- Adam Z., Hájek R., Ščudla V. et al.: Multiple myeloma and other monoclonal gammopathies Press: Opuscula Haematologica, Masaryk University Brno, 1999; 1-260
- Ščudla V., Ordeltová M., Špidlová A. et al.: Importance of determining the propidium-iodide index of plasmacytes in multiple myeloma. I. Relation to selected laboratory indicators of the disease. Vnitř Lek. 1999 Jun;45(6):331-5
- Barlogie B., Jagannath S., Vesole D. et al: Autologous and allogeneic transplants for multiple myeloma. Semin. Hematol., 1995; 32:31-44
- Hájek R., Adam Z., Vášová I. et al: Evolution of myeloma treatment from melphalan monotherapy to bone marrow transplantation. Acta Medica Austriaca, 1996;23(3): 85-91
- Anderson KC: Multiple Myeloma Research Foundation. Novel immunomodulatory therapies in the treatment of multiple myeloma. Oncology (Huntingt). 2004 Jul;18(8):988-90
- Krivanova A, Hájek R, Krejci M, et al , Czech Myeloma Group: Second autologous transplantation for multiple myeloma patients relapsing after the first autograft - a pilot study for the evaluation of experimental maintenance therapies. Report of the prospective non-randomized pilot study of the Czech Myeloma Group. Onkologie. 2004 Jun;27(3):275-9.
- Krejci M, Buchler T, Hájek R., et al.: Prognostic factors for survival after autologous transplantation: a single centre experience in 133 multiple myeloma patients. Bone Marrow Transplant. 2004.
- Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, et al.: Groupe Francais de Cytogenetique Hematologique (2001) Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. Blood 1998(7):2229-38.

- Fonseca R, Blood E, Rue M, et al.: Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood 2003, 1;101(11): 4569-75
- Shaughnessy in : Harousseau JL, Shaughnessy Jr J, Richardson P: Multiple myeloma.Hematology (Am Soc Hematol Educ Program).2004 237-256.
- Wu, K.-D., Orme, L.M., Shaughnessy Jr J., et al.,: Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival. Blood 2003; 101, 4982-4989.
- Fajkus, J., Borský, M., Kunická, Z., et al.: Changes in Telomerase Activity, Expression and Splicing in Response to Differentiation of Normal and Carcinoma Colon Cells. Anticancer Res. 2003, 23, 1605-1612.
- Shay JW, Bacchetti S: A survey of telomerase activity in human cancer. Eur J Cancer. 1997 Apr;33(5):787-91.
- Kosugi H, Saito H.: Analysis for telomerase activity in various hematologic disorders. Nippon Rinsho. 1998 May;56(5):1316-21.
- Shiratsuchi M, Muta K, Abe Y, et al.: Clinical significance of telomerase activity in multiple myeloma. Cancer. 2002 Apr 15;94(8):2232-8.
- Xu D, Zheng C, Bergenbrant S, et al.: Telomerase activity in plasma cell dyscrasias. Br J Cancer. 2001 Mar 2;84(5):621-5.
- Fiserova A, Hájek R, Holubova V, et al.: Detection of 13q abnormalities in multiple myeloma using immunomagnetically selected plasma cells. Neoplasma 2002;49(5):300-306
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al.: Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science 1994 Dec 23;266(5193):2011-5.
- Maláska J, Kunická Z., Borský M., et al.: Telomerase as a diagnostic and predictive marker in colorectal carcinoma Neoplasma 2004; 51: 90-96 (2004).

NOVÉ POZNATKY Z MOLEKULÁRNEJ BIOLÓGIE GERMINATÍVNYCH TUMOROV

UPDATES IN MOLECULAR BIOLOGY OF GERM CELL TUMORS

MEGO M.

NÁRODNÝ ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, KLENOVA 1, 833 10 BRATISLAVA, SLOVENSKO

Abstract: Germinatívne tumory (GT) sú nádory senzitívne na systémovú chemoterapiu, s možnosťou vyliečenia až 80% pacientov v metastatickom štádiu. Poznanie príčiny senzitivity GT na molekulárnej úrovni, môže byť prínosné aj v liečbe iných metastatických nádorov. Autori sa v práci sústreďujú na najnovšie pokroky v oblasti molekulárnej biológie germinatívnych nádorov. Hoci presný mechanizmus nádorovej transformácie nie je známy, množstvo dôležitých génov bolo identifikovaných ako p53, c-KIT, cyklín D2, EGFR, GRB7, VEGF. Napriek vysokej úspešnosti liečby čast pacientov ochoreniu nakoniec podľahne. Identifikácia mechanizmov rezistencie u GT na molekulárnej úrovni a ich ovplyvnenie modernou liečbou na báze monoklonálnych protilátok a targetovej liečby malými molekulami môže ďalej zlepšiť prežívanie postihnutých pacientov.

Kľúčové slová: germinatívny tumor, chemosenzitivita, angiogenéza, EGFR, cyklín, c-KIT

Summary: Germ cell tumors (GCTs) are malignancies sensitive to systemic chemotherapy. About 80% patients with metastatic disease are cured. The understanding of GCT's sensitivity to chemotherapy on molecular level could be of value in the development of new treatment strategies for other metastatic tumors as well. In this work, the authors are focusing on novel knowledge in the field of GCT's molecular biology. Although the exact mechanism of all processes involved in the tumor transformation are not fully understood, many genes were identified that are involved in this process, e.g. p53, c-KIT, cyclin D2, EGFR, GRB7, VEGF. Despite the existence of highly successful treatment of GCT, there are patients who ultimately succumb to their disease. Identification of exact molecular mechanisms is important in the development of new targeted therapies seeking to increase the patient's survival.

Key words: germ-cell tumor, chemosensitivity, angiogenesis, EGFR, cyclin, c-KIT

Germinatívne tumory (GT) sú najčastejšou malignitou mužov medzi 20 až 30 rokom života. Ich incidencia má stúpajúcu tendenciu. Predstavujú malignitu dobre reagujúcu na chemoterapiu, s možnosťou vyliečenia až 80% pacientov v metastatickom štádiu. Napriek tomu, že sa väčšina pacientov s metastatickým germinatívnym nádorom vylieči, u malého percenta sa choroba stáva chemorezistentná a pacienti jej podľahnú. Sú to hlavne pacienti s postihnutím viscerálnych orgánov iných ako pľúca, pacienti s extragonadálnym postihnutím a pacienti s výrazne zvýšenými nádorovými markermi (AFP - alfafetoproteín, b-HCG – humánný choriogonadotropín) (1). Charakterizácia nádoru na molekulárnej úrovni predstavuje významný pokrok v onkológií, ktorý umožňuje individualizáciu liečby. Aj v oblasti germinatívnych nádorov dochádza v súčasnosti k pribúdaniu poznatkov na genetickej úrovni.

Histologicky sa germinatívne tumory sa rozdeľujú do dvoch základných skupín; seminómov a neseminómov. Oba podtypy pochádzajú zo spoločnej totipotentnej zárodočnej bunky. Seminómy si zachovávajú morfológiu spermatogónií, kým neseminómy majú znaky embryonálnej (embryonálny karcinóm, teratóm), a extraembryonálnej diferenciácie (nádor žltokového vaku, choriokarcinóm) (2).

Vzniku GT predchádza väčšinou karcinóm in situ (CIS). Takmer 100% CIS lézií progreduje do invazívnych lézií. Pre spoločný pôvod seminómov a neseminómov svedčí cytologicky identická lézie karcinóm in situ (2).

V súčasnosti existujú dva modely, ktoré popisujú vznik GT. Podľa Skakkebaeka a kol. je spúšťačom parakrinná stimulácia fetálnych gonocytov. Táto stimulácia sa uskutočňuje prostredníctvom faktora stimulujúceho kmeňové bunky - SCF (stem cell factor), ktorý sa viaže na receptor kódovaný protoonkogénom c-KIT (viď nižšie). Takto stimulované gonocyty unikajú normálnemu vývoju smerom k spermatogóniám a dávajú

vznik CIS. Druhý model vychádza zo zvýšeného počtu kópií 12p chromozómu v germinatívnych nádoroch, zvýšenej expresie cyklínu D2 v CIS a nadmernej expresií divokého typu p53 (wild type p53). Podľa tohto modelu dochádza k chybné výmene chromatíd počas meiotického cross-overu na úrovni spermatocyty. Toto vedie k zdvojeniam 12p chromozómu, s následnou zvýšenou expresiou cyklínu D2, ktorého gén je lokalizovaný práve na 12p chromozóme. Takto zmenená bunka unikne apoptóze vďaka onkogénemu efektu cyklínu D2. Dochádza k chybné reinciácii bunkového cyklu a ku genómovej instabilite (3, 4, 5).

Existuje genetická predispozícia k vzniku germinatívnych nádorov. Epidemiologické štúdie ukázali, že súrodenci majú 8-10 krát vyššie riziko vzniku GT v porovnaní s bežnou populáciou. Deti postihnutých majú asi 4 – krát vyššie riziko. Zatiaľ bol identifikovaný jeden gén, zvyšujúci riziko k vzniku GT. Nachádza sa na chromozóme Xq27 – TGCT1 (testicular germ cell susceptibility gene 1). Tento gén je zodpovedný za predispozíciu ku kryptorchizmu. Pravdepodobne však existujú aj ďalšie gény susceptibility, ktoré však doteraz neboli identifikované (6,7).

Chemosenzitivita GT a mechanizmy rezistencie

Základom liečby testikulárnych nádorov je kombinovaná chemoterapia na báze cisplatiny a etoposidu, teda látok, pôsobiacich mechanizmom poškodenia DNA. Bunky derivované z testikulárnych nádorov sú dobre citlivé na podanie DNA poškodzujúcich cytostatík. Je však známe, že aj iné nádory ako napríklad urotelové sú spočiatku citlivé na chemoterapiu na báze platiny, ale časom dochádza u nich k selekcií rezistentných klonov. V laboratórnych podmienkach sú bunky z germinatívnych nádorov 2 – 4 x citlivejšie v porovnaní s bunkami iných tumorov na rôzne cytostatiká a žiarenie. Vystáva otázka, či takýto relatívne malý rozdiel in vitro sa môže pre-

mietnuť do výrazne odlišného klinického efektu? Ako príklad môže posloužiť rozdiel medzi bunkami nádoru močového mechúra a bunkami GT. Dávka cisplatiny schopná zničiť nádor obsahujúci 1012 germinatívnych buniek, čo predstavuje asi 1kg tumor, by bola schopná zničiť len približne 103 až 104 buniek nádoru močového mechúra. (8, 9, 10, 11).

Čo je príčinou takejto senzitivita GT? Skúmali sa rozdiely vo frekvenciách mutácií medzi testikulárnymi a chemorezistentnejšími nádormi, rozdiely medzi transportnými systémami, v detoxifikačných systémoch bunky avšak výraznejšie odlišnosti sa nepodarilo zistiť (12, 13). V posledných rokoch pribudli ďalšie poznatky na molekulárnej úrovni.

DNA opravné mechanizmy

Keďže cisplatina je DNA poškodzujúce cytostatikum, schopnosť bunky prežiť závisí od jej schopnosti opraviť DNA. Významnú úlohu v reparačných mechanizmoch predstavuje nukleotidový excízny reparačný systém (**NER – nucleotid excision repair system**). V experimente sa zistilo, že kým bunky napríklad urotelového nádoru sú schopné opravy väčšiny poškodenej DNA, u testikulárných nádorov zostáva DNA po podaní platiny poškodená (Bedford, 1988, Hill, 1994). Príčinou je výrazne znížená aktivita NER systému. In vitro štúdie poukazujú, že GT majú zníženú aktivitu až 3 proteínov zúčastnených na oprave DNA a to **XPA, ERC1-XPF a DNA ligáza III**. Práve táto skutočnosť je pravdepodobne jednou z príčin zvýšenej senzitivity GT na pôsobenie cytostatík (14, 15).

Mikrosatelitová instabilita predstavuje rozdiely v dĺžke krátkych repetitívnych sekvencií v genóme, a venuje sa jej pozornosť predovšetkým v súvislosti s kolorektálnym a ovariálnym karcinómom. Jej príčinou je mutácia v niektorom gène zúčastnenom na oprave DNA ako napríklad **MLH1, MSH2, MSH6**. Mayer so spolupracovníkmi zistili, že u 11 chemorezistentných nádorov bol mutovaný jeden (46% vs. 6%) alebo viac (36% vs. 0%) týchto génov v porovnaní s chemosenzitivnými nádormi. Mutácie v reparačných génoch vedú k nahromadeniu mutácií v celom genóme, čo v konečnom dôsledku vedie k vzniku rezistentnému fenotypu (16). Mayer a kol. skúmali tiež úlohu systémov zabraňujúcich kumulácií cytostatík v bunke ako **P-glykoproteínu, MRP** (multiple resistance protein), **LRP** (lung resistance protein) avšak nezistili rozdiel medzi chemorezistentnými a chemorefraktérnymi GT. Výnimkou bola vyššia pozitivita MRP, LRP u zreľých teratómov, ktorú potvrdil aj vo svojej práci aj Mandoki (17,18). Zároveň expresia LRP bola spojená s rezistenciou na liečbu a horším prežívaním pacientov (18).

EGFR/ HER-2/neu

Expresia epidermálneho rastového faktora a jeho receptora (EGFR) je v mnohých nádoroch spojená s horšou prognózou, čo do určitej miery súvisí s redukovanou pohotovosťou buniek k apoptóze. Táto expresia sa v posledných rokoch skúmala aj u testikulárných nádorov. Približne 20 - 25% neseminómov má zvýšenú expresiu EGFR resp. HER-2-neu imunohistochemickým vyšetrením (19-23). Len v jednej z týchto štúdií sa overoval výsledok imunohistochemie aj fluorescentnou in situ hybridizáciou (FISH) (23), ktorá však tento výsledok nepotvrdila. Zvýšená expresia HER-2 a EGRF je prítomná oveľa častejšie u pokročilých metastatických nádorov. Madani zistil, že z 23 chemorefraktérnych pacientov expimovalo EGRF až 65% (19). Kollmannsberger analyzoval biopsie od 32 pacientov z toho 22 chemorezistentných avšak expresiu EGFR len 20% pacientov, bez vzťahu k odpovedi na liečbu (24). Vo väčšine prác bola expresia EGFR spojená s produkciou b-HCG, a bola častejšia u choriokarcinómu, resp. buniek syncytiotrofoblastu. Títo pacienti majú aj zvyčajne horšiu prognózu (20,21,25). Seminómy nevykazovali expresiu EGFR /HER-2, čo opäť koreluje s ich lepšou odpoveďou na liečbu a celkovo lepšou prognózou. Použitie inhibítorov EGFR, by mohla byť jedna z možností ako ovplyvniť prognózu časti pacientov. V literatúre je

popísaná kazuistika objektívnej odpovede na trastuzumab u chemorefraktérneho germinatívneho tumoru (26).

GRB7 je adaptorová molekula, ktorá okrem iného cez Src-2 doménu interaguje s cytoplazmatickou doménou receptora pre rastový faktor EGFR2. Podieľa sa na prenose signálu do bunky. Jej zvýšená expresia môže mať pre bunku podobné následky ako nadmerná expresia samotného EGFR. Zvýšený prepis GRB7 sa zaznamenal u karcinómu prsníka, ezofágu a žalúdka. Skotheim a kol. zistili jej zvýšenú expresiu pomocou cDNA microarray techniky u 15 germinatívnych tumorov (27). Podobne ako v prípade EGFR, aj expresia GRB7 bola zvýšená hlavne u neseminómov (27, 28).

c-KIT je protoonkogén kódujúci transmembránový tyrozínkinázový receptor, ktorý zohráva úlohu aj v normálnej spermatogenéze. Exprimuje sa do 12 týždňa na fetálnych germinatívnych buniek. Membránovo sa vyskytuje u CIS a väčšiny seminómov, ale absentuje u neseminómov, kde je však zvýšene exprimovaný jeho ligand SCF (29). Mutácie c-KIT sú okrem gastrointestinálnych stromálnych tumorov, chronickej myeloidnej leukémie a mastocytózy prítomné tiež u 12 - 25% seminómov vychádzajúcich zo spermiokov a u 50% primárnych mediastinálnych seminómov (30-32). Mutácie citlivé na podanie STI-571 (Gleevec) však tvoria len menšiu časť z nich. Spektrum mutácií mediastinálnych a testikulárných seminómov sa ukazuje ako odlišné. Treba však rešpektovať nedostatočnú veľkosť doteraz analyzovaných súborov. Loojenga a kol. zistili prítomnosť somatickej mutácie c-KIT v 17 exone, kódovanej 816 u 93% pacientov s bilaterálnym tumorom testis, v porovnaní s 1% u unilaterálnych tumorov (33). Podobne Rapley a kol. zistili štatisticky významný rozdiel medzi somatickou mutáciou c-KIT u unilaterálnych a bilaterálnych tumorov. Analýza 240 rodokmeňov s dvoma a viac prípadmi GT ukázala neprítomnosť zárodočnej mutácie. Uvedené výsledky ukazujú, že somatické mutácie c-KIT sú zahrnuté v určitej percente prípadov sporadických, ale aj familiárných GT. Podporuje to tiež hypotézu, že ku c-KIT mutáciám dochádza primárne počas embryogenézy, keďže primordiálne germinatívne bunky s c-KIT mutáciou sú prítomné v oboch semeníkoch. Tento výsledok môže mať aj priamy klinický význam, pretože pacienti s touto mutáciou sú kandidátmi na profylaktickú liečbu s cieľom predísť bilaterálnemu nádoru (28).

Cyklín D2 je proteín úzko zapojený do regulácie bunkového cyklu. Viazu sa na cyklín-dependentné kinázy (cdk). Touto väzbou vytvára aktívny komplex regulujúci tumor supresorový gén pRB (retinoblastóm) a kontroluje tak G1-S bod bunkového cyklu. Jeho prítomnosť je potrebná pre normálnu spermatogenézu, avšak významnú úlohu zohráva aj patogeneze GT. Gén kódujúci cyklín D2 je lokalizovaný na krátkom ramene chromozómu 12. Takmer 100% GT má zvýšený počet kópií 12p, či už cestou izochromozómu 12, v ktorom sú fúzované 2 krátke ramená chromozómu 12 alebo formou tandemovej duplikácie 12p. Tento chromozómový marker je už prítomný v CIS. Svedčí to o tom, že táto aberácia je skorým javom v testikulárnej onkogenéze. Schmidt zistil zvýšenú expresiu cyklínu D2 u 69% GT, pričom 41% nádorov zároveň vykazovala zvýšenú expresiu cdk4 (34). Analýza inhibítorov cdk nepriniesla jednoznačné výsledky v porovnaní s cyklínom D2 a cdk4 (35,36).

Angiogenéza je dôležitá súčasť rastu a progresie nádorov. U germinatívnych nádorov boli analyzované viaceré angiogénne faktory ako napríklad vaskulárny endotelialný rastový faktor, (**VEGF**), angiogenetický protoonkogén **est-1**, ďalej gény **flt, flk**, thymidine phosphorylase platelet-derived endothelial cell growth factor (**TP – PD-ECGF**) a **mikrovaskulárna denzita**. V publikovaných prácach bola korelácia medzi metastatickým nádorom, expresiou VEGF, protokogénom ets-1 a mikrovaskulárnou denzitou. Uvedené proteíny boli významne častejšie exprimované u nádorov s teratómovou komponentou a neseminómov v porovnaní so seminómami (37-39). Vzhľadom na dostupnosť inhibítorov angiogenézy

(bevacizumab) a toxicitu neprekryvajúcu sa s konvenčnou chemoterapiou stojí za zváženie ich použitie u pacientov s expresiou týchto faktorov.

Apoptóza. Väčšina cystostatík zabíja bunky aktiváciou apoptózy. To, či k nej naozaj dôjde závisí aj od samotnej bunky. Len samotné spustenie apoptózy vedie k eradikácii malígneho bunkového klonu. Niekoľko génov zohráva kľúčovú úlohu v procese apoptózy, predovšetkým p53, BCL-2, BAX, BCL-X(L). Tieto gény boli predmetom intenzívneho výskumu aj u GT.

Úloha **p53** u GT sa extenzívne študovala. TP53 je tumor supresorový gén, ktorého normálna funkcia je kľúčová z hľadiska udržania integrity genómu a je dôležitý z hľadiska indukcie apoptózy po poškodení DNA chemoterapiou. Je mutovaný vo viac ako 50% ľudských malígnií. Na druhej strane v prevažnej väčšine GT je p53 nemutovaný s vysokou hladinou, v porovnaní s inými tkanivami, relatívne nižšou u zreých teratómov (40). Predpokladalo sa že práve funkčný p53 u GT môže byť zodpovedný za výbornú odpoveď na chemoterapiu. Mutácia p53 môže viesť k neschopnosti spustiť apoptotickú odpoveď a následnú rezistenciu na cytostatiká. Houldsworth a kol. zistili zvýšenú frekvenciu mutácií p53 v biopsických vzorkách u chemorezistených pacientov (41). Zistila sa korelácia medzi apoptotickým indexom a divokým typom p53 (17). Na druhej strane je popísaných aj mnoho chemorezistených GT bez mutácie p53, preto je pravdepodobné, že existujú aj alternatívne mechanizmy rezistencie (42). Vysoká expresia p53 v GT súvisí skôr s prirodzenou náchylnosťou germinatívnych buniek k apoptóze, ale nevysvetľuje senzitivitu k chemoterapii na báze platiny. Inaktivácia p53 vo forme mutácií, alebo zvýšenej degradácií napr. cestou protoonkogén mdm-2 (viď nižšie), má len parciálny význam pri vzniku rezistencie na chemoterapiu (42).

Ďalší faktor, ktorý ovplyvňuje spustenie apoptózy po celulárnom poškodení sú gény BCL rodiny. Je známe, že zvýšená expresia **BCL-2** chráni bunky pred apoptózou, avšak definitívna odpoveď závisí od pomeru proapoptotických a antiapoptotických molekúl. GT vykazujú nízke hladiny antiapoptotických proteínov BCL-2, BCL-X(L) a relatívne vysoké hladiny proapoptotického **BAX**, čo tiež vysvetľuje chemosenzitivitu GT (43). V experimente umelo zvýšená expresia BCL-2 nevedla k prevencii apoptózy, ale k zníženiu hladiny BCL-X(L) čo paradoxne viedlo k pro-apoptotickému efektu (44).

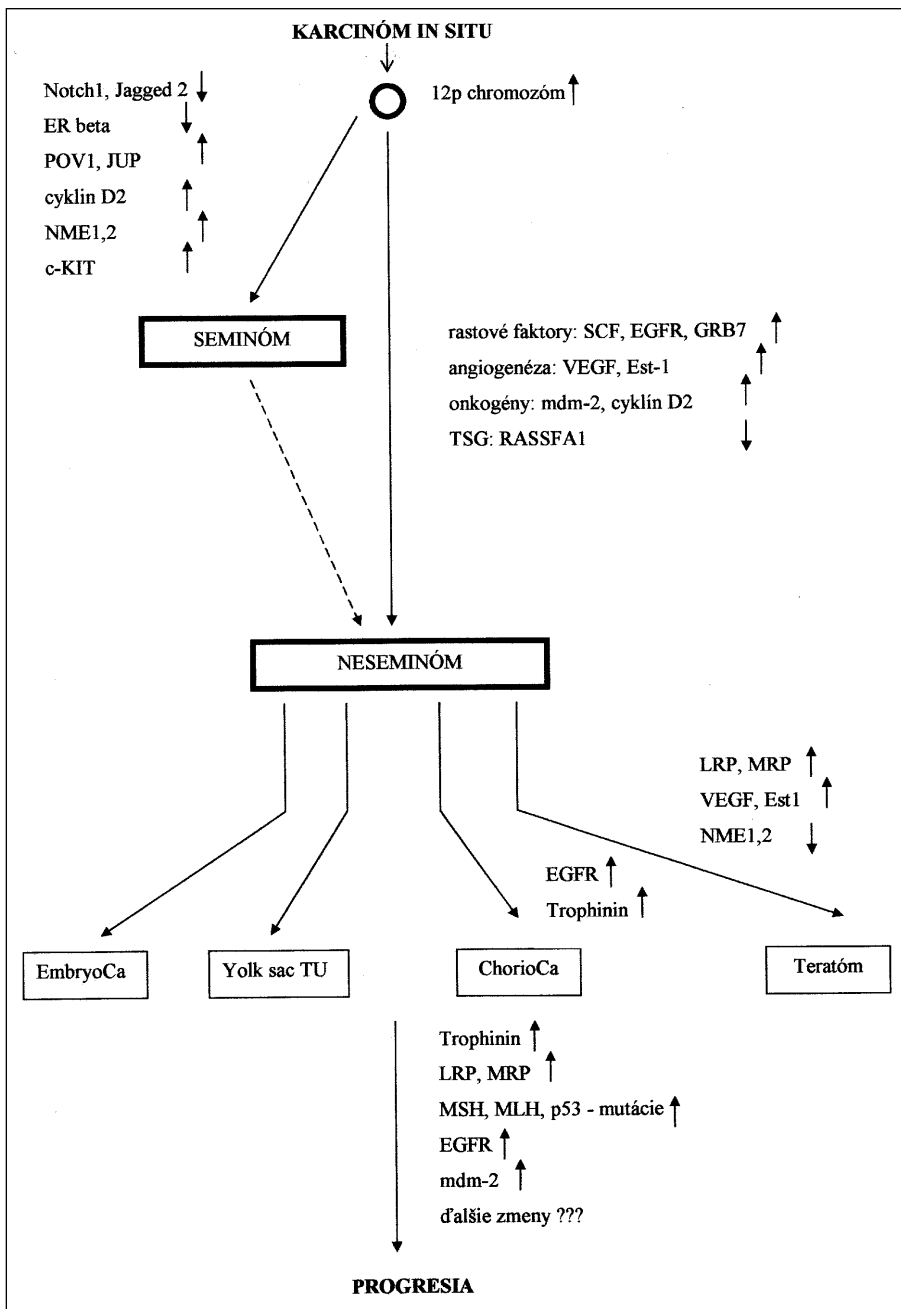
Ďalšie gény

U GT sa tiež zisťovala prítomnosť celého radu ďalších génov (Tabuľka č. 1 a 2). V súčasnosti však väčšina týchto výsledkov ešte nemá

priamy klinický dopad, a interpretácia ich prítomnosti resp. neprítomnosti v nádorovom tkanive nemá odraz v liečebnej stratégii (Obrázok č. 1).

Trophinin je membránový proteín, ktorý sa zúčastňuje na implantácii embrya v maternici. Je zodpovedný za väzbu medzi bunkou trofoblastu a endometriálnou bunkou. Embryo produkuje b-HCG, a indukuje expresiu trophoninu materskými bunkami. Vzhľadom na analógiu medzi implantáciou embrya a metastazovaním GT Hatakeyama a kol. skúmali expresiu trophoninu u germinatívnych nádorov pomocou imunohistochemie. Zistili koreláciu medzi klinickým štádiom a syntézou trophoninu, ktorý bol prítomný u 43% vzoriek od pacientov v štádiu I, 58% v štádiu II a 95% v štádiu III. Všetci pacienti s pľúcnyimi metastázami exprimovali trophonin. Transfekcia bunkovej línie derivovanej z testikulárneho nádoru (JKT-1-mock) vektorom obsahujúcim gén pre trophonin viedla k zvýšeniu invazivity týchto buniek. Inokulácia JKT-1-mock buniek s trophoninom athymickým myšiam spôsobila vznik

Obrázok č. 1: Hypotetický model progresie germinatívnych tumorov. Blížšie vysvetlenie v texte.



Tabuľka č. 1: Expressia génov zúčastnených na vzniku germinatívnych tumorov, podľa histologického nálezu.

gén	status	zdravé tkanivo	seminóm	neseminóm	embryo Ca	yolk sac TU	chorio Ca	teratóm p	b-HCG produkcia	citácia
notch1	expresia	+	-		+		+	+		50
jagged2		+	-		-		-	+		50
Trophinin		-					+		+	45
LRP		-						+		17,18
MRP		-						+		17
ERbeta		+	-		-	+	-	+	-	51
SCF		-	-/+	+						28
EGFR		-	-	20-25%			+		+	20, 21, 22
GRB7		-	-	+						23, 24, 27, 28
POV1		-	+	-						27
cyklín D2		-	++	+						34
VEGF		-		+				+		37,38,39
est-1		-		+				+		37,38,39
BCL-2		-	-	-						43
BAX		+	+	+						43
mdm-2		-	+	++						46
NME1, 2			+++	++				znižená		48
JUP			+							27
c-KIT	expresia	-	84%	-						28
c-KIT	mutácie	-	12-25%	-						30, 31, 32
RASSFA1	inaktivácia	-	40%	83%						49
pRB	inaktivácia	-	+		+					35,36

Tabuľka č. 2: Expressia génov zúčastnených na vzniku germinatívnych tumorov, podľa klinického priebehu.

gén	status	štádium I	štádium II	štádium III	pľúcne mts.	CHT senz.	CHT rez.	citácia
Trophinin	expresia	40%	58%	95%	100%			45
LRP	expresia						+	18
MSH, MLH	inaktivácia					0-6%	36-46%	17
EGFR	expresia			+			20-65%	19, 20, 21, 23, 24
mdm-2	expresia	+	++	+++				46

Vysvetlivky: mts – metastázy, CHT senz. – senzitivne na podanie chemoterapie, CHT rez. - rezistentné na podanie chemoterapie

pľúcnych metastáz, kým inokulácia týchto buniek bez trophoninu nebola spojená so vznikom metastáz (45). Tieto výsledky poukazujú, že trophonin môže byť vhodným terčom pre cielelnú protinádorovú liečbu.

Proteín p53 zvyšuje expresiu **Mdm-2** génu (ubiquitin ligase mouse double minute-2), ktorý následne zvyšuje deštrukciu p53, mechanizmom negatívnej spätnej väzby. Mdm-2 je protoonkogén, ktorý sa viaže na transaktivačnú doménu p53, čím ju jednak priamo inaktívuje, jednak spôsobuje zvýšené odbúravanie p53 v proteazóme po označení ubikvitínom. Aktivácia mdm-2 môže tak predstavovať ďalší spôsob k zníženiu aktivity p53. Mdm-2 onkogén je zvýšene exprimovaný u 56% analyzovaných GT. Jeho hladina bola vyššia z neseminómov a tiež u metastatických nádorov (46). U premaligných lézií bola prítomná len u 7% vzoriek. Tieto fakty svedčia pre význam mdm-2 v progresii na nádorový fenotyp (47).

Gény **NME1** a **NME2** kódujú transkripčné faktory (Nm23) negatívne regulujúce diferenciáciu. Neprekvapuje preto, že sa zistila ich nadmerná expresia u 65% nádorov, hlavne u seminómov, menej u embryonálnych karcinómov, kým u teratómov bola znížená (48).

Analýza ďalších génov zúčastnených regulácie bunkového cyklu ukázala že tumor supresorový gén pre retinoblastóm **pRb** vykazuje slabú expresia v CIS, seminómoch embryonálnych karcinómoch (35,36). Ďalším tumor supresorovým génom, ktorý je inaktívovaný u GT je gén **RASSF1A**. Neaktívny je u 40% seminómov a až u 83% neseminómov. Predpokladá sa, že inaktivácia tohto génu je skorým javom germinatívnej tumorigenézy (49).

Notch signálny systém reguluje procesy delenia a diferenciácie bunky. Expressia receptora **Notch 1** a jeho ligandu **Jagged 2** je prí-

tomná v zdravom tkanive semeníkov a u teratómov. U seminómom je neprítomná, kým embryonálny karcinóm a choriokarcinóm exprimujú Notch 1 receptor (50) avšak jeho ligand nie.

Pohlavné hormóny, predovšetkým expozícia estrogénom je spojená so zvýšeným rizikom vzniku germinatívnych nádorov. Ich efekt sa uskutočňuje prostredníctvom receptorov. Estrogénový receptor alfa nie je prítomný v normálnom tkanive semeníkov ani u GT. **Estrogénový receptor beta** je syntetizovaný v zdravom tkanive, nádoroch žltkového vaku a teratómoch. Naopak jeho syntéza je výrazne znížená u seminómov, embryonálnych karcinómov a zmiešaných germinatívnych nádorov (51). Giwercman a kol. sledovali prítomnosť repetitívnych sekvencií CAG a CGN v géne kódujúcom receptor pre androgény. Dĺžka CAG repetícií bola signifikantne vyššia u metastazujúcich nádorov (52).

Skotheim a kol. zistili zvýšenú expresiu **JUP onkogénu** (junctional plakoglobin) patriaceho do katenínovej rodiny. Gény tejto rodiny hrajú úlohu v medzibunkovej komunikácii, adhéziách cez väzbu na kadheríny, tvoria tiež súčasť cytoskeletu bunky. Onkogénny potenciál JUP génu sa realizuje cez vplyv na Wnt signálnu dráhu, ktorá zohráva významnú úlohu predovšetkým v kolorektálnej karcinogéze. Jej význam v patogeneze GT ostáva nejasný. Expressia JUP je prítomná u seminómov. Taktiež premaligne intratubulárne neoplázie boli JUP pozitívne. Podobne aj ďalší proteín – **POV1 (prostate cancer overexpressed gene)** sa vysoko exprimuje u seminómov, avšak nie u neseminómov ani v normálnom tkanive. Predpokladá sa, že ide o gén, uplatňujúci sa vo včasných štádiách vzniku seminómu. Analogicky prekurzorové lézie karcinómu prostaty majú zvýšenú expresiu POV1. Bližšia funkcia tohto génu ešte nie je dostatočne objasnená (53).

Záverom môžeme konštatovať, že napriek vysokej účinnosti chemoterapie u pacientov s metastatickým germinatívnym nádorom časť pacientov ochoreniu podľahne. Použitie liečby na báze monoklonálnych protilátok, a targetovej liečby malými molekulami u hematologických malignít, karcinómu prs-

níka, kolorektálneho karcinómu pomohlo zlepšiť prognózu pacientov s týmito nádormi. Možno predpokladať, že poznanie a charakterizácia germinatívnych nádorov na génovej a molekulárnej úrovni umožní podobný cieleňý zásah do ich patogenézy s následným klinickým benefitom pre pacienta.

Literatúra

1. Bosl GJ, Geller NL, Cirrincione C, Vogelzang NJ, Kennedy BJ, Whitmore WF Jr, Vugrin D, Scher H, Nisselbaum J, Golbey RB.: Multivariate analysis of prognostic variables in patients with metastatic testicular cancer. *Cancer Res.* 43, 1983, 3403-3407
2. Ulbright T.: Germ cell neoplasms of the testis. *Am J Surg Pathol.* 17, 1993, 1075-1091
3. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Carlsen E, Petersen PM, Giwercman A, Andersen AG, Jensen TK, Andersson AM, Muller J. Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? *APMIS.* 106., 1998, 3-11
4. Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Muller J. Carcinoma in situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursors of all types of germ cell tumors except spermatocytoma. *Int J Androl.* 10, 1987, 19-28
5. Chaganti RSK, Houldsworth J. The cytogenetic theory of the pathogenesis of human adult male germ cell tumors. *APMIS.* 106, 1998, 80-83
6. Kawakami T, Okamoto K, Sugihara H, Hattori T, Reeve AE, Ogawa O, Okada Y.: The roles of supernumerical X chromosomes and Xist expression in testicular germ cell tumors. *J Urol.* 169, 2003, 546-1552
7. Holczak MF, Rapley EA, Hoekstra HJ, Sleifer DT, Nolte IM, Sijmons RH.: Genetic predisposition to testicular germ-cell tumors. *Lancet Oncol.* 5, 2004, 363 – 371
8. Oosterhuis JW, Andrews PW, Knowles BB, Damjanov I.: Effects of cisplatinum on embryonal carcinoma cell lines in vitro. *Int J Cancer.* 34, 1984, 133-139
9. Walker MC, Parris CN, Masters JRW, Differential sensitivities to chemotherapeutic drugs between testicular and bladder cancer cells, *J Natl Cancer Inst.* 79, 1987, 213-216
10. Pera MF, Friedlos F, Mills J, Roberts JJ.: Inherent sensitivity of cultured human embryonal cells to adducts of cis-diaminedichloroplatinum (II) on DNA. *Cancer Res.* 47, 1987, 6810 – 6813
11. Fry AM, Chresta CM, Davies SM, Walker MC, Harris AL, Hartley JA, Masters JR, Hickson ID.: Relationship between topoisomerase II level and chemosensitivity in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51, 1991, 6592-6595
12. Parris CN, Walker MC, Masters JRW, Arlett CF.: Inherent sensitivity and induced resistance to chemotherapeutic drugs and irradiation in human cancer cell lines: relationship to mutation frequencies. *Cancer Res.* 50, 1990, 7513-7518
13. Masters JRW, Koberle B.: Curing metastatic cancer: Lessons from testicular germ-cell tumours. *Nature reviews.* 3, 2003, 517-525
14. Koberle B, Masters JRW, Hartley JA, Wood RD.: Reduced repair of cisplatin-induced DNA damage in testicular germ cell tumours due to specific protein defect. *Curr Biol.* 9, 1999, 273-276
15. Cleaver JE, Karplus K, Kashani-Sabet M, Limoli CL.: Nucleotide excision repair a legacy of creativity. *Mutat Res.* 485, 2001, 23-26
16. Mayer F, Gillis AJ, Dinjens W, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH. Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res.* 62, 2002, 2758-2760
17. Mayer F, Stoop H, Scheffer GL, Scheper R, Oosterhuis JW, Looijenga LH, Bokemeyer C. *Clin Cancer Res.* Molecular determinants of treatment response in human germ cell tumors. 9, 2003, 767-773
18. Mandoky L, Gecezi L, Doleschall Z, Bodrogi I, Csuka O, Kasler M, Bak M. Expression and prognostic value of the lung resistance-related protein (LRP) in germ cell testicular tumors. *Anticancer Res.* 24, 2004, 1097-104.
19. Madani A, Kemmer K, Sweeney C, Corless C, Ulbright T, Heinrich M, Einhorn L. Expression of KIT and epidermal growth factor receptor in chemotherapy refractory non-seminomatous germ-cell tumors. *Ann Oncol.* 14, 2003, 873-880
20. Mandoky L, Gecezi L, Bodrogi I, Toth J, Bak M.: Expression of HER-2/neu in testicular tumors. *Anticancer Res.* 23, 2003, 3447 – 3451
21. Moroni M, Veronese S, Schiavo R, Carminati O, Sorensen BS, Gambacorta M, Siena S.: Epidermal growth factor receptor expression and activation in nonseminomatous germ cell tumors. *Clin Cancer Res.* 7, 2001, 2770 – 2775
22. Shuin T, Misaki H, Kubota Y, Yao M, Hosaka M.: Differential expression of protooncogenes in human germ cell tumors of the testis. *Cancer.* 73, 1994, 1721 – 1727
23. Soule S, Baldridge L, Kirkpatrick K, Cheng L, Gilbert JL, Smith LR, Thurston VC, Vance GH, Einhorn L, Miller K.: HER-2/neu expression in germ cell tumors. *J Clin Pathol.* 55, 2002, 656-658
24. Kollmannsberger C, Mayer F, Pressler H, Koch S, Kanz L, Oosterhuis JW, Looijenga LH, Bokemeyer C.: Absence of c-KIT and members of the epidermal growth factor receptor family in refractory germ cell cancer. *Cancer.* 95, 2002, 301-308
25. Hechelhammer L, Storkel S, Odermatt B, Heitz PU, Jochum W.: Epidermal growth factor receptor is a marker for syncytiotrophoblastic cells in testicular germ cell tumors. *Virchows Arch.* 443, 2003, 28-31
26. Kollmannsberger C, Pressler H, Mayer F, Kanz L, Bokemeyer C.: Cisplatin-refractory, HER2/neu-expressing germ-cell cancer: induction of remission by the monoclonal antibody Trastuzumab. *Ann Oncol.* 10, 1999, 1393-1394
27. Skotheim RI, Abeler VM, Nesland JM, Fossa SD, Holm R, Wagner U, Florenes VA, Aass N, Kallioniemi OP, Lothe RA. Candidate genes for testicular cancer evaluated by in situ protein expression analyses on tissue microarrays. *Neoplasia.* 5, 2003, 397 – 404
28. Rapley EA, Hockley S, Warren W, Johnson L, Huddart R, Crockford G, Forman D, Leahy MG, Oliver DT, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewett MA, Lohynska R, Daugaard G, Richard S, Heidenreich A, Gecezi L, Bodrogi I, Olah E, Ormiston WJ, Daly PA, Looijenga LH, Guilford P, Aass N, Fossa SD, Heimdal K, Tjulandin SA, Liubchenko L, Stoll H, Weber W, Einhorn L, Weber BL, McMaster M, Greene MH, Bishop DT, Easton D, Stratton MR.: Somatic mutations of KIT in familial testicular germ cell tumours. *Br J Cancer.* 90, 2004, 2397 – 2401
29. Rajpert-de Meyts E, Skakkebaek NE. Expression of the c-kit protein product in carcinoma in situ and invasive testicular germ cell tumors. *Int J Androl.* 17, 1994, 85-92
30. Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, Cummings OW, Wait C, Town A, Heinrich MC. KIT mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol.* 164, 2004, 305-313
31. Przygodski RM, Hubbs AE, Zhao FQ, O'Leary TJ.: Primary mediastinal seminomas: evidence of single and multiple KIT mutations. *Lab Invest.* 82, 2002, 1369-1375
32. Sakuma Y, Sakurai S, Oguni S, Hironaka M, Saito K. Alterations of the c-kit gene in testicular germ cell tumors. *Cancer Sci.* 94, 2003, 486-491
33. Looijenga LH, de Leeuw H, van Oorschot M, van Gurp RJ, Stoop H, Gillis AJ, de Gouveia Brazao CA, Weber RF, Kirkels WJ, van Dijk T, van Lindern M, Valk P, Lajos G, Olah E, Nesland JM, Fossa SD, Oosterhuis JW. Stem cell factor receptor (c-KIT) codon 816 mutations predict development of bilateral testicular germ-cell tumors. *Cancer Res.* 63, 2003, 7674-7678
34. Schmidt BA, Rose A, Steinhoff C, Strohmeyer T, Hartmann M, Ackermann R.: Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/cyclin D2 expression but down regulation of cyclin-dependent kinase 2/cyclin E in testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* 61, 2001, 4214-4221
35. Bartkova J, Thullberg M, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE, Bartek J.: Lack of p19 INK4d in human testicular germ-cell tumours contrasts with high expression during normal spermatogenesis. *Oncogene.* 19, 2000, 4146-4150
36. Jones RH, Vasey PA. New directions in testicular cancer; molecular determinants of oncogenesis and treatment success. *Eur J Cancer.* 39, 2003, 147-156
37. Adam M, Schmidt D, Wardelmann E, Wernert N, Albers P.: Angiogenic protooncogene ets-1 induced neovascularization is involved in the metastatic process of testicular germ cell tumors. *Eur Urol.* 44, 2003, 329 – 336
38. Fukuda S, Shirahama T, Imazono Y, Tsushima T, Ohmori H, Kayajima T, Take S, Nishiyama K, Yonezawa S, Akiba S, Akiyama S, Ohi Y.: Expression of vascular endothelial growth factor in patients with testicular germ cell tumors as an indicator of metastatic disease. *Cancer.* 85, 1999, 1323 – 1330
39. Jones A, Fujiyama C, Turner K, Fuggle S, Cranston D, Turley H, Valtola R, Bicknell R, Harris AL.: Angiogenesis and lymphangiogenesis in stage 1 germ cell tumours of the testis. *BJU Int.* 86, 2000, 80 – 86
40. Lutzker SG, Levine AJ.: A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells os inactivated either by DNA damage or cellular differentiation. *Nat Med.* 2, 1996, 804-810
41. Houldsworth J, Xiao H, Murty VV, Chen W, Ray B, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS.: Human germ cell tumour resistance to TP53 mutation. *Oncogene.* 16, 1998, 2345-2349
42. Kersemaekers AM, Mayer F, Molier M, van Weeren PC, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH.: Role of p53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol.* 20, 2002, 1551-1561
43. Chresta CM, Masters JR, Hickman JA.: Hypersensitivity of human testicular tumours to etoposide induced apoptosis is associated with functional p53 and a high Bax:Bcl-2 ratio. *Cancer Res.* 56, 1996, 1834-1841
44. Arriola EL, Rodriguez-Lopez AM, Hickman JA, Chresta CM. Bcl-2 overexpression results in reciprocal downregulation of Bcl-X(L) and sensitizes human testicular germ cell tumours to chemotherapy-induced apoptosis. *Oncogene.* 18, 1999, 1457-1464
45. Hatakeyama S, Ohyama C, Minagawa S, Inoue T, Kakinuma H, Kyan A, Arai Y, Suga T, Nakayama J, Kato T, Habuchi T, Fukuda MN. Functional correlation of trophinin expression with the malignancy of testicular germ cell tumor. *Cancer Res.* 140, 2004, 4257-62.
46. Bak M, Gecezi L, Instititoris E, Eid H, Bodrogi I.: The clinical value of mdm-2 (proto-oncogene) expression in testicular cancer, Correlation with tumor progression. *Orv Hetil.* 140, 1999, 1837-1840
47. Datta MW, Macri E, Signoretti S, Renshaw AA, Loda M. Transition from in situ to invasive testicular germ cell neoplasia is associated with the loss of p21 and gain of mdm-2 expression. *Mod Pathol.* 14, 2001, 437-442
48. Schmidt B, Ackermann R, Hartmann M, Strohmeyer T.: Alterations of metastasis suppressor gene nm23 and proto-oncogene c-myc in human testicular germ cell tumors. *J Urol.* 158, 1997, 2000-2005
49. Honorio S, Agathangelou A, Wernert N, Rothe M, Maher ER, Latif F. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene in testicular tumours and distinct methylation profiles of seminoma and nonseminoma testicular germ cell tumours. *Oncogene.* 22, 2003, 461-466
50. Hayashi T, Yamada T, Kageyama Y, Kihara K. Expression failure of the notch signaling system is associated with the pathogenesis of testicular germ cell tumor. *Tumour Biol.* 25, 2004, 99-105
51. Pais V, Leav I, Lau KM, Jiang Z, Ho SM. Estrogen receptor-beta expression in human testicular germ cell tumors. *Clin Cancer Res.* 9, 2003, 4475-4482
52. Giwercman A, Lundin KB, Eberhard J, Stahl O, Cwikiel M, Cavallin-Stahl E, Giwercman YL. Linkage between androgen receptor gene CAG trinucleotide repeat length and testicular germ cell cancer histological type and clinical stage. *Eur J Cancer.* 40, 2004, 2152-2158
53. Skotheim RI, Monni O, Mousseis S, Fossa SD, Kallioniemi OP, Lothe RA, Kallioniemi A.: New insights into testicular germ cell tumorigenesis from gene expression profiling. *Cancer Res.* 62, 2002, 2359-2364

DOCETAXEL – NOVÁ MOŽNOST TERAPIE HORMONÁLNĚ REZISTENTNÍHO KARCINOMU PROSTATY

DOCETAXEL - NEW THERAPEUTIC POSSIBILITY IN PROSTATE CARCINOMA RESISTANT TO HORMONAL THERAPY

KATOLICKÁ J.¹, ROVNÝ A.², FILIPENSKÝ P.²

¹ AMBULANCE UROLOGICKÉ ONKOLOGIE, FN U SVATÉ ANNY, BRNO

² UROLOGICKÉ ODDĚLENÍ, FN U SVATÉ ANNY, BRNO

Souhrn: Chemoterapie je nejvíce prostudovanou možností terapie hormonálně refrakterního karcinomu prostaty (HRCP). Docetaxel je jedním z efektivních cytostatik v terapii HRCP. Ve studiích fáze II, v monoterapii, se pokles hladin PSA pohyboval v rozmezí 41 % - 64 %, a to u 42 % léčených nemocných. Týdenní režim je lépe tolerovatelný než třítýdenní, zejména z hlediska neutropenií. **Pacienti, metody a výsledky:** 32 nemocných bylo léčených docetaxelem v dávce 40 mg/m²/týden i. v. v podání 6 týdnů aplikace + 2 týdny pauza. 17 z 32 nemocných mělo pokles PSA ≥ 50 %, u 8 z 32 léčených byl zaznamenán ≥ 25 % pokles PSA. Medián doby do progresu PSA byl 22 týdnů a medián přežití 20 pacientů byl 16,8 měsíce. Toxicita byla nízká, G 3/4 pouze nehematologická, a to změny na nehtech a alopecie.

Klíčová slova: hormonálně refrakterní karcinom prostaty (HRCP), PSA, týdenní docetaxel

Summary: Chemotherapy has been studied extensively in advanced prostate cancer, especially in the hormone-refractory prostate cancer (HRCP) setting. Docetaxel is currently among the most active agents for managing HRCP. In phase II trials, single-agent docetaxel induced PSA response (≥ 50 % decline of PSA, range 41%-64%) in 42% of treated men. In these trials, weekly administration of docetaxel appeared to be better tolerated than the 3-week dosing regimen, producing less neutropenia. **Patients, methods and results:** Thirty-two patients were treated with docetaxel 40 mg/m², repeated weekly for 6 weeks of an 8-week cycle. Seventeen of 32 patients achieved ≥ 50 % decline of PSA, eight of 32 patients achieved ≥ 25 % decline of PSA. Time to progression of PSA levels was 22 weeks and median survival of 20 patients was 16.8 months. Toxicity was moderate, with following grade 3/4 toxicities: nail toxicity, alopecia.

Key words: hormone-refractory prostate cancer (HRCP), PSA, weekly docetaxel

Karcinom prostaty je jedním z nejčastěji diagnostikovaných nádorových onemocnění.

Je to především nemoc starších mužů, ale raritně může být diagnostikován i u mladších 40 let. Téměř v 80-100 % je mikroskopicky verifikován u mužů starších 80 let.

Významnou roli v detekci karcinomu prostaty má stanovení hladiny PSA – prostatického antigenu. Před jeho obecným zavedením do praxe byl relaps onemocnění diagnostikován pouze na základě klinických příznaků – nejčastěji bolestí při metastatickém postižení skeletu, dále potížemi s močením při lokální progresi nebo při postižení viscerálních orgánů, a to symptomy vyplývajícími z jejich funkčních poruch. Také samotná diagnosa byla stanovena ve vyšších stádiích nemoci. Hladiny PSA se dnes stanovují jak v stadiu tak v dispenzarizaci a umožňují časný záchyt nemoci nebo relapsu (1). Zvýšená hodnota PSA předchází u relapsu onemocnění radiologickou a klinickou progresi i o několik měsíců.

Také pokles PSA po terapii, a to zejména o 50 % a více, koreluje s prodloužením přežití (2).

V čase diagnosy je karcinom prostaty androgen sensitivním onemocněním. Androgenní deprivace je prvním krokem v terapii pacientů s metastatickým onemocněním (3). Tato deprivace ve většině případů znamená regresi tumoru a rozsahu postižení, ale v průběhu 12-18 měsíců postupně dochází k tomu, že tumor se stává androgenně independentním.

Hormonálně refrakterní karcinom prostaty

je definován alespoň dvěma po sobě jdoucími vzestupy hladin PSA (vyšetřených ve dvoutýdenním intervalu) u pacientů s kastačními sérovými hladinami testosteronu (< 20 ng/ml) (4)

Potenciálními terapeutickými možnostmi u těchto nemocných jsou

- sekundární hormonální manipulace
- imunoterapie
- chemoterapie
- inhibice a/nebo blokace receptorů růstových faktorů
- inhibice neo-a ngiogenese

Pacienti, u kterých dojde k progresi onemocnění po androgenní ablacii, mohou ještě odpovědět na terapii ketokonazolem (5), kortikoidy, aminoglutetimidem, estramustin fosfátem (6) nebo prostestiny (7).

Chemoterapie androgenně independentního karcinomu prostaty

Proběhla řada randomizovaných studií s chemoterapií u hormonálně refrakterního karcinomu prostaty. Základní přehled uvádí tab. I

Jako standardní chemoterapeutický režim je používán **mitoxantron s prednisonem** (8). S využitím cytostatik třetí generace u jiných malignit se jejich aplikace uplatňuje i u andro-

Tabulka 1. Randomizované studie u hormonálně refrakterního karcinomu prostaty.

autor	režim chemoterapie	n	odpověď
Tannock (8)	Prednison 10 mg/den vs mitoxantron + prednison	161	zlepšení symptomů
Kantoff (9)	Hydrocortison 40 mg/den vs mitoxantron + hydrocortison	242	zlepšení symptomů
Hudes (6)	Vinblastin a vs vinblastin + estramustin fosfát	201	odpověď PSA 3,2 % vs 25,2 %

n: počet nemocných

Tabulka 2. Docetaxel monoterapie v léčbě androgen independentního karcinomu prostaty – publikované studie fáze II.

Autor	Dávka	n	Předléčeno CHT	Pokles PSA více 50 %	OR	Přežití median měsíce
Picus et al) (1999) (12)	D:75 mg/m ² den1, 21 dní	35	ne	46 %	28 %	27
Berry W et al (2001) (13)	D: 36 mg/m ² /týden 6týdnů/8	60	27 %	41 %	33 %	9,4
Beer T.M. (2001) (14)	D:36 mg/m ² /týden 6 týdnů/8	25	ne	46 %	40 %	9,7
Gratis G.D. (Cancer 2003)	D: 35 mg/m ² /týden 6 týdnů/8	30	50 %	48 %	–	20
Ferrero J.M. (2003)	D: 40 mg/m ² /týden 6 týdnů/8	64	ne	64 %	–	16,2

D: docetaxel, OR: objektivní odpověď, n: počet pacientů, CHT: chemoterapie

gen independentního karcinomu prostaty. Jedním z nich je **docetaxel**.

Docetaxel ve studiích fáze II. prokázal efektivitu jak v monoterapii, tak v kombinačních režimech nejčastěji s estramustin fosfátem (10,11). V terapeutických schématech v monoterapii byl aplikován v dávce 75 mg/m² každé 3 týdny nebo v dávce 36 mg/m² týdně po dobu 6 týdnů z každých 8 týdnů. Pokles hladin PSA se v těchto studiích pohyboval v rozmezí 41 % - 64 %, a to u 42 % léčených nemocných. Odpověď ve formě hodnotitelných lézí byla zaznamenána u 28 % - 40 % pacientů. Doba do progresu byla u týdenních režimů 4,6 - 5,1 měsíce a celkové přežití stejného dávkovacího schématu 9,2 - 20 měsíců. Tyto studie fáze II. hodnotily také významné redukci bolesti. K poklesu bolesti došlo u 37 % nemocných a u 50 % k redukci analgetické medikace. Přehled uvádí tabulka 2.

ASCO 2004 přineslo příznivé výsledky dvou velkých randomizovaných studií fáze III, a to SWOG 9916 a společností Aventis sponzorovaného trialu TAX 327.

Studie SWOG 9916,

má dvě ramena: mitoxantron 12 mg/m² každé 3 týdny plus prednison 10 mg denně versus docetaxel 60-70 mg/m² každé 3 týdny s estramustinem 280 mg po dobu 5 dní každé 3 týdny. Dle publikovaných údajů kombinace docetaxel+estramustin v porovnání s mitoxantron +prednison v léčbě androgen independentního karcinomu prostaty prodlužuje celkové přežití, což vedlo k 20 % snížení rizika úmrtí. 27 % rozdíl v prodloužení přežití bez známek progresu byl zaznamenán ve prospěch ramene s docetaxelem + estramustinem. (15)

Ve studii TAX 327

bylo primárním cílem srovnání přežití u nemocných s androgen independentním karcinomem prostaty, jako sekundární cíle byly sledovány hodnocení poklesu hladin PSA, redukce bolesti, léčebné odpovědi měřitelných lézí a kvalita života.

Pacienti byli léčeni ve třech ramenech

- standardním ramenem s mitoxantronem 12 mg/m² každé 3 týdny plus prednison 5 mg denně
- versus dvě ramena s docetaxelem
 - v dávce 75 mg/m² à 3 týdny s prednisonem 5 mg denně
 - v dávce 30 mg/m² týdně po dobu 5 týdnů každých 6 týdnů s prednisonem 5 mg denně.

Doba přežití nemocných léčených docetaxelem + prednisonem v 3týdenním podání ve srovnání s terapií mitoxantron + prednison byla významně delší (18,9 měsíce vs 16,5 měsíce) s 24 % snížením rizika úmrtí (95 % CI 0,62-0,94, P=0,009). Terapie 3týdenním docetaxelem je také spojená s vyšším poklesem hladin PSA (45 % vs 32 %) a obě větve s docetaxelem výrazně snížily bolest. Studie prokázala, že docetaxel v týdenním i 3týdenním režimu je dobře tolerovatelný a zlepšuje kvalitu života u nemocných s hormonálně refrakterním karcinomem prostaty. (16)

Naše zkušenosti s monoterapií docetaxelem u androgen independentního karcinomu prostaty

Charakteristika pacientů

V našem souboru je zařazeno 32 nemocných léčených v době od 11/2002 do 11/2004. Medián věku byl 67,4 let (55-79), ECOG Performans Status všech léčených 0-1. Všichni nemocní s hormonálně refrakterním adenokarcinomem prostaty – kombinace pulpectomie a antiandrogen byla užita u 26 (81 %) nemocných, aplikace LHRH analoga + antiandrogen u 6 (18 %) nemocných.

8 (25 %) nemocných bylo před aplikací docetaxelu předléčeno estramustinem. U 4 pacientů (12,5 %) byl docetaxel aplikován v II. linii – v I. linii byli tito nemocní předléčení kombinací mitoxantron + prednison

v běžném dávkování. Tabulka 3 + 4 uvádí charakteristiku souboru.

V době zahájení terapie mělo 26 (81 %) nemocných měřitelnou lézi – postižení skeletu bylo scintigraficky prokázáno u 26 (81 %) nemocných, dále 8 (25 %) mělo jak metastatické postižení skeletu, tak pomocí CT scanu prokázanou diseminaci v lymfatických uzlinách v oblasti retroperitonea a pánve. Další 8 (25 %) pacientů bylo léčeno pouze na základě elevace PSA bez prokazatelně měřitelné léze – tabulka 5

Tabulka 3: Charakteristika pacientů I.

Pacientů celkem	32
Performans status 0-1	32
Median Gleason score	8 (5-10)
Median PSA (ng/ml)	58 (26-286)
Median věku - let	67,4 (55-79)

Tabulka 4: Charakteristika pacientů II.

Předchozí terapie	Počet pacientů
Pulpectomie +antiandrogen	26
LHRH +antiandrogen	6
Estramustin	8
Mitoxantron + prednison	4

Tabulka 5: Rozsah postižení.

Rozsah postižení	Počet pacientů
Meta skeletu	26
Meta skeletu + uzlin	8
Pouze elevace PSA	8

Terapie

Chemoterapeutický režim – docetaxel 40 mg/m²/týden i.v. v podání 6 týdnů aplikace + 2 týdny pauza. V premedikaci byl dexamethason v dávce 16 mg i.v./aplikaci. Podání probíhalo dle daného schématu do vzestupu hodnot PSA nebo případné intolerance. Hodnocení hladin PSA probíhalo každých 8 týdnů. Celkem bylo provedeno 322 aplikací, tj. 10,5 podání na jednoho pacienta.

Toxicita

Hematologická toxicita

Leukopenie G I u 4 nemocných (12,5 %), leukopenie G II u 2 (4 %). Trombopenie G I u 2 (4 %) pacientů. Anemie G I u 17 léčených (54 %). Hematologická toxicita G III-IV, febrilní neutropenie nebo neutropenická seps nebyla zaznamenána u žádného pacienta viz tab. 6.

Tabulka 6: Hematologická toxicita.

Hematologická toxicita	G I n	G II n	G III-IV n
Anemie	17	-	-
Leukopenie	4	2	-
Trombocytopenie	2	-	-

n: počet nemocných

Nehematologická toxicita:

Nejčastěji byla zaznamenána změna nehtů, a to v 54 % tj. u 17 nemocných, a to u 8 (25 %) ve stupni G III, dále úplná alopecie u 28 pacientů (89 %), částečná u 2 (4 %) nemocných. Na myalgie si stěžovali 4 (12,5 %) nemocní, slizniční toxicita jako průjem a konjunktivitida se objevily v 26 %, dále mírná epistaxe zejména při ranní toaletě dutiny nosní u 12 (37,5 %) léčených. Nechutenství udávalo 8 (25 %) nemocných. Zvracení a nevolnost G III-IV zaznamenáno nebylo viz tabulka 7.

Tabulka 7: Nehematologická toxicita.

Nehematologická toxicita	G I n	G II n	G III-IV n
Alopecie	-	2	28
Nausea	2	-	-
Zvracení	-	-	-
Změny nehtů	2	7	8
Epistaxe	12	-	-
Průjem	4	1	-
Konjunktivitida	4	-	-
Myalgie	4	-	-

n: počet nemocných

Pokles hladin PSA:

Hodnocení odpovědi PSA na danou terapii probíhalo každých 8 týdnů. Pokles více jak 80 % byl zaznamenán u 4 (12,5 %) léčených. Snížení hladiny PSA nad 50 % bylo po prvních 8 týdnech prokázáno u 12 (37,5 %) nemocných. Nejvyšší pokles byl 96 % oproti vstupní hodnotě PSA.

Při dalším hodnocení odpovědi na chemoterapii v hladinách PSA bylo parciální remise tj. poklesu nad 50 %, v následujících 8 až 24 týdnech dosaženo u 12 (37,5 %) léčených nemocných.

U 4 (12,5 %) pacientů byla již po prvních 8 týdnech zaznamenána zvýšená hladina PSA oproti výchozí hodnotě. Ve všech případech byli tyto nemocní léčeni v I. linii mitoxantronem s prednisonem.

Literatura

- Jhaveri F, Kleine E, Kupelian P et al: Declini ng rates of extra capsular extension after radical prostatectomy: evidence of continued stage migration. J Clin Oncol 1999; 17: 3167-3172
- Leo ME, Bilhartz DL, bergstrahl EJ et al.: Prostate specific antigen in hormonally treated stage D2 prostate cancer: is it always an accurate indicator of disease status ? J Urol 1991; 145: 802-806
- Schalcken J,Visakorpi T, Thalmann G et al.: Molecular biology for urologists.Eur Urol 2001; 39: (curric urol 7.2) 1-11
- Iversen P: Current topics in the treatment of hormone refractory prostate cancer, Eur Urol Suppl, 1, 2003 č 3, s 3-8
- Trachtenberg J, Pont A: Ketocenazole therapy for advanced prostate cancer. Lancet 1984; 2: 433-435
- Hudes G.Estramustine-based chemotherapy. Semin Urol Oncol 1997; 15: 13-19
- Sasagawa I, Satoni S: Effects of high dose medroxyprogesterone acetate on plasma hormone levels and pain relief in patient with advanced prostatic cancer Br J Urol 1990; 65: 278-281
- Tannock IF, Osoba D, Stockler MR et al.: Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for smptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. J Clin Oncol 1996; 14:1756-1764
- Kantoff PW, Halabi S, Conway M et al: Hydrocortisone with or without

U 8 nemocných (25 %) předléčených estramustinem byli poklesy hladin PSA po 8 týdnech aplikace kolem 30 %-40 % oproti výchozí hodnotě. Viz tabulka 8.

Parciální remisí v snížení hladin PSA nejlépe odpovídali nemocní předléčení pouze hormonální blokádou. Celková doba trvání poklesu PSA se pohybovala v rozmezí 10-26 týdnů s mediánem 22 týdnů.

Tabulka 8: Hodnocení poklesu hladin PSA po 8-24 týdnech podání.

Týdny/pokles PSA %	80 %	50 %	méně	progrese
8 týdnů	12,5 %	37,5 %	25 %	12,5 %
16 týdnů	9 %	18,5 %	13 %	15 %
24 týdnů	3 %	8 %	8 %	NR

Benefit pro pacienta.

Benefit pro pacienty je především v redukci analgetické terapie. U 26 (81 %) nemocných došlo k změně medikace - 12 (37,5 %) z nich vysadilo silné opioidy a přešlo na slabší opioidy typu tramadolu nebo dihydrokodeinu. 6 (18 %) pacientů postupně užívalo pouze nesteroidní antiflogistika. Úplně léky proti bolesti vysadilo 8 (25 %) léčených. Celkově k omezení spotřeby analgetik o 50 % došlo u 12 (37,5 %) nemocných. Viz tabulka 9.

Tabulka 9: Benefit pro pacienta.

Změna analgetické medikace	Počet pacientů
Omezení analgetik celkem	26
Vysazení silných opioidů	12
Přechod na NSA	6
Úplně vysazení analgetik	8

Z hlediska doby přežití jsme zatím hodnotili 20 nemocných, medián je 16,8 měsíce.

Závěr

Chemoterapie docetaxelem u androgen independentního karcinomu prostaty přináší benefit pro nemocné z několika hledisek:

- ústup algického syndromu při metastatickém postižení skeletu
 - prodloužení doby do progresu nemoci
 - celkové prodloužení přežití
- Docetaxel v dávce 40 mg/m² i.v.v týdenním podání v monoterapii je dle našich zkušeností dobře tolerovatelný režim, s minimální toxicitou i pro vyšší věkovou kategorii pacientů. Redukce spotřeby analgetik a ústup algického syndromu zlepšují kvalitu života nemocných.

- mitoxantrone in men hormone.refractory prostate cancer: Results of the Cancer and Leukemia Group B 9182 study. J Clin Oncol 1999; 17:2505-2513
- Savarese D, Halabi S, Hars V et al: A phase II study of docetaxel, estramustine, and low-dose hydrocortisone in men with hormone-refractory prostate cancer: a final report CALGB 9780. J Clin Oncol 2001; 19:2509-2515
 - Beer TM, Pierce WC, Lowe BA, Henner WD: Phase II study of weekly docetaxel (Taxotere) in hormone refractory metastatic prostate cancer (HRPC). Proc Am Soc Clin Oncol 2000; 19: 348a (Abstr 1368)
 - Picus J, Schultz M: Docetaxel (Taxotere) as monotherapy in the treatment of hormone-refractory prostate cancer:Preliminary results.Semin Oncol 26:14-18, 1999
 - Berry W, Dakhil S, Gregurich MA, et al: Phase II trial of si ngle-agent weekly docetaxel in hormone-refractory, symptomatic, metastatic carcinoma of the prostate. Semin Oncol 28:8-15, 2001
 - Beer TM, Pierce WC, Lowe BA, et al: Phase II study of weekly docetaxel in symptomatic androgen-independent prostate cancer. Ann Oncol 12:1273-1279, 2001
 - Petrylak DP, Tannen CM et al: Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer N E ng J Med 2004; 351:1513 -1520
 - Tannock IF, de Witt R et al:Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N E ng J Med 2004; 351:1502 -1512

CHEMORADIOTERAPIE – MECHANISMUS ZVÝŠENÉ AKTIVACE CYTOSTATIK BĚHEM PORADIAČNÍ REAKCE

CHEMORADIOTHERAPY - MECHANISM OF INCREASED CYTOSTATICS ACTIVATION DURING THE POST-RADIATION REACTION

VÍTEK P., ROSINA J. *, TALTYNOV O. **, HOZÁK P. **

ÚSTAV RADIČNÍ ONKOLOGIE I. LF UK FN NA BULOVCE

* ÚSTAV BIOFYZIKY 3. LF UK PRAHA

** ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY AV ČR PRAHA

Souhrn: Chemoradioterapie s použitím nukleosidových analogů, zejména fluorovaných pyrimidinů se stala standardním postupem u řady zhoubných nádorů. Mechanismus efektu není přesně popsán. Po zavedení capecitabinu byl detailně zkoumán původní koncept zvýšené aktivace pyrimidinů do aktivních forem při indukci pyrimidiny metabolizujících enzymů v rámci poradiační reakce. Vlivem ozáření se indukuje široké spektrum enzymů a cytokinů zahrnující metabolické enzymy thymidinofosforylázu (TP), thymidinkinázu (TK), dihydropyrimidin dehydrogenázu (DPD), thymidylsyntetázu (TS), deoxycytidinkinázu (dCK), deoxycytidinmonofosfát kinázu (dCMPK) a deoxycytidindeaminázu (dCyD), které metabolizují pyrimidinová nukleosidová analoga – 5-fluorouracil, capecitabin, ara-C a gemcitabin. U téměř všech bylo v ozářené tkáni prokázáno buď zvýšení transkripce příslušné mRNA nebo zvýšení obsahu příslušného proteinu nebo obojí. Poměr nárůstu anabolizujících a katabolizujících enzymů (TP/DPD) je ve prospěch zvýšení anabolismu nukleosidových analogů do účinných forem. Poradiační reakce ve spektru proteinů je dlouhodobá. Zvýšení obsahu proteinu probíhá v úseku 24 hod. – 5 dní po ozáření dávkami 2-10 Gy. Zvýšení transkripce začíná v rozmezí do 24 hod. včetně časných reakcí od 1. hodiny po ozáření. Průběh poradiační reakce je variabilní v závislosti na typu ozářené tkáně. V nádorových tkáních je indukce metabolických enzymů intenzivnější než ve tkáni nenádorové, což je podkladem pro určitou selektivitu cytostatického efektu. Dosavadní nálezy pocházejí převážně z tkáňových kultur nebo experimentálních nádorů na zvířatech. Informace o mechanismech potenciace cytostatika během poradiační reakce mají zatím jen minimální praktické výstupy. Dosavadní poznatky podporují zavedená schemata kontinuálního podání cytostatik 5-FU a capecitabinu. Individuální hodnocení poradiační reakce s využitím v predikci efektu chemoradiace je zatím mimo běžné možnosti.

Klíčová slova: Chemoradioterapie, XIP, thymidinkináza, thymidylsyntetáza, dihydropyrimidindehydrogenáza, thymidinkináza, deoxycytidinkináza, 5-fluorouracil, capecitabin, gemcitabin, poradiační reakce

Abstract: Chemoradiotherapy employing nucleoside analogues, esp. fluorinated pyrimidines became a standard treatment approach in a variety of malignant tumours. Its mechanism of effect has not been discovered in detail. The introduction of capecitabine initiated a detailed investigation of the original concept of enhanced pyrimidine activation to active forms caused by an induction of pyrimidine metabolizing enzymes in a scope of a post-radiation reaction. A wide spectrum of cytokines and enzymes is induced by an irradiation including metabolic enzymes – thymidine phosphorylase (TP), thymidine kinase (TK), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidylate synthetase (TS), deoxycytidine kinase (dCK), deoxycytidine monophosphate kinase (dCMPK) and deoxycytidine deaminase (dCyD). These enzymes metabolize pyrimidine nucleoside analogues – 5-fluorouracil, capecitabine, ara-C and gemcitabine. Either an enhanced transcription of the relevant mRNA or an increased protein content or both had been found in irradiated cells. A ratio between the enhancement of anabolising and catabolising enzymes (TP/DPD) favours the increased anabolism of nucleoside analogues to active forms. The post-radiation reaction in a spectrum of proteins is long lasting. The increased protein content is apparent in a period between 24 hours and 5 days after the irradiation by a dose of 2 – 10 Gy. The increased transcription initiates within 24 hours, including early reactions within the first hour after the irradiation. Quantitatively there is a variability of post-radiation reactions related to the kind of the irradiated tissue. There is a more intensive induction of metabolic enzymes in tumour tissue than in a normal (non-tumour) tissue indicating a potential of cytostatic effect selectivity. The available references originate predominantly from tissue cultures or experimental animal tumour xenografts. So far only minimal practical measures can be derived from the information on mechanism of cytostatic effect potentiation. The current information supports the established regimens of a continuous administration of 5-FU and capecitabine. An individual assessment of a post-radiation reaction applicable for a prediction of a chemoradiation effect is not within the compass of our care.

Key words: Chemoradiotherapy, XIP, thymidine dinase, thymidylate synthetase, thymidine dinase, deoxycytidine kinase, 5-fluorouracil, capecitabine, gemcitabine, post-radiation reaction

Úvod

Chemoradioterapie různých solidních nádorů je v posledních 10 letech standartním postupem u řady solidních nádorů zvláště u nádorů s vysokou incidencí (nádory plic, čípku děložního, rekta, ORL oblasti). Ve většině léčebných schémat se využívá radiopotenciálních efektů platinových derivátů a fluorovaných pyrimidinů – 5-fluorouracilu (5-FU) nebo capecitabinu.

Synergie ionizujícího záření a chemoterapie je prokázána empiricky, ve studiích fáze III, což umožňuje použití chemoradioterapie jako standardu. Přesto mechanismus synergie není

dosud jednoznačně popsán, zvláště u fluorovaných pyrimidinů. Literatura uvádí jako pravděpodobný mechanismus inhibici reparačních mechanismů (reparace subletálních a potenciálně letálních poškození DNA), změny v distribuci v buněčném cyklu (efekt synchronizace) a inhibici repopulace. Všechny tyto teoretické mechanismy vycházejí z toho, že efekty záření jsou prvotní. K nim přiřazují pravděpodobný mechanismus účinku chemoterapie, kterým lze dosáhnout celkového účinku supraaditivního. Originální koncept mechanismu účinku prezentuje Blackstock et al. již v roce 1994. V experimentu prokázal prodlouženou retenci zvýšení tkáňo-

vé koncentrace metabolitů 5-FU (FdUMP) po ozáření dávkami 2Gy resp. 5Gy (1). Podklad nachází ve zvýšení koncentrace thymidinkinázy, enzymu metabolizujícího 5-FU do aktivní formy (FdUMP), která byla prokázána v předchozích experimentech. Blackstockův koncept chemoradiace pak spočívá v potenciaci efektů chemoterapie zářením.

Další zájem o poznání mechanismu vzájemné potenciace fluorovaných pyrimidinů a záření přichází s širším použitím capecitabinu a to zejména u nádorů zaživacího traktu. Capecitabin jako „pro-drug“ je do účinné formy aktivován enzymem thymidin-fosforylázou (TP). Několik experimentů prokazuje indukci TP po dávkách záření 2-5 Gy a zvýšenou konverzi capecitabinu na 5-deoxy-5-fluorouridin. Efekty jsou dokonce do jisté míry selektivní pro nádorovou tkáň. Problematika chemoradioterapie s fluorovanými pyrimidiny pochopitelně nelze omezit pouze na indukci jejich metabolismu do účinných forem. Zrychlený metabolismus může představovat jeden z mechanismů majoritních, zvláště u capecitabinu. Dalšími potenciálními mechanismy jsou indukce cílových enzymů (substrátů), konkrétně thymidylsyntetázy (TS) u fluorovaných pyrimidinů. Vlivem záření se potenciálně indukují i enzymy katabolizující a otázka potenciace pak závisí na metabolické rovnováze. Je evidentní, že v konceptu alterovaného metabolismu cytostatika v ozařované tkáni je nezbytné popsat kompletní anabolickou a katabolickou kaskádu účinné látky včetně substrátu a znát komplexní poradiační reakci na molekulární úrovni.

Poradiační reakce

Buněčná odpověď na ionizující záření není přesně popsána. Podle dosavadních poznatků zahrnuje indukci více procesů z následujících kategorií: Indukce enzymů řídících signální transdukcii, stimulace reparace dvojitého zlomu DNA („double strand break“ – DSB), přednostně mechanismem nehomologního spojování („non-homologous end joining“ – NHEJ), indukce „metabolických“ proteinů, které se účastní v reparačním procesu, blokáda „checkpointů“ ve fázích G1, S a G2 buněčného cyklu, indukce zymogenů účastnících se v procesu apoptózy, indukce dalších proteinů, které se účastní dalších procesů v důsledku zátěže zářením – angiogenezy, imunitní odpovědi apod.

Již koncem 80. let předchozího století byl vyvinut první systém klasifikace transkriptů resp. proteinů indukovaných ionizujícím zářením tzv. XIP („X-ray inducible polypeptide“, „X-ray inducible protein“ nebo v přeneseném smyslu „X-ray inducible transcript“) (2). Transkripty a příslušné proteiny byly identifikovány, ale jejich funkce nebyla známa. Proto vznikla původně číselná nomenklatura, identifikující XIP podle molekulové váhy (XIP 126 – XIP 275). Následně byla identifikována řada molekul XIP ze skupiny metabolických enzymů, regulačních faktorů a cytokinů a nomenklatura XIP ustupuje do pozadí. U některých molekul je ale XIP nomenklatura stále užívána, a proto je uvedena v tabulce č. 1.

Z prvních experimentů byly patrné některé obecné závěry (4):

- Většina proteinů ze skupiny XIP je indukována specificky ionizujícím zářením a ne jinými podněty (kupř. hypertermií – „heat shock“).
- XIP jsou indukovány pouze nízkými dávkami záření (200 – 600 cGy).
- Po vyšších dávkách záření, přes 10 Gy, jsou některé XIP suprimovány.
- Transkripce všech XIP neprobíhá synchronně.

Spektrum současně známých záření indukovaných proteinů je rozsáhlé a zahrnuje i řadu cytokinů (kupř. tumor necrosis factor alfa (TNF-α)). Pak zákonitě vzniká otázka, do jaké míry je indukce dalších cytokinů přímá, v rámci poradiační reakce, nebo nepřímá vlivem indukovaného cytokinu. Pro výzkum interakce ionizujícího záření a chemoterapie mají

přirozeně zásadní význam XIP ze skupiny metabolických enzymů, jejichž indukce potenciálně alteruje metabolismus příslušné účinné látky. Proto byly a jsou předmětem výzkumu zejm. enzymy metabolizující DNA a RNA prekursorů. Problematika byla řešena zejména v souvislosti se zavedením „pro-drug“ capecitabinu, který se metabolickými enzymy aktivuje do účinné formy.

Tabulka č. 1.

Nomenklatura „XIP“	Identifikovaná molekula	Funkce	Pozn.
XIP-6	„Tissue plasminogen activator“, t-PA	Aktivace plasminogenu	
XIP-8	Clusterin, KUB-1	Reparace DSB cestou NHEJ (3)	Isoforma proapoptotická n-CLU cytoprotektivní s-CLU
XIP-11	Thymidinkináza, TK	Metabolismus DNA	
XIP-3	DT diaforáza (NAD(P)H menadion oxidoreduktáza	Metabolický enzym	

Tabulka č. 2.

Cytostatikum, účinná látka	Indukovaný metabolizující enzym (potenciální XIP)	Potenciální důsledek aktivace	Důsledek pro účinnost + zvýšení – snížení
5-fluorouracil	TP, TK	Zvýšený anabolismus do účinné formy, 5-FdUMP	+
	DPD	Zvýšený katabolismus do inaktivní formy dihydro 5-FU	–
	TS	Zvýšení koncentrace cílové struktury	+
Capecitabin	TP	Zvýšený anabolismus na 5-FdUMP a 5-FU	+
Raltitrexed	TS	Zvýšení koncentrace cílové struktury	+
Gemcitabin	dCK, dCMPK, dCDPK	Zvýšený anabolismus do účinné formy	+
Cytosin arabinosid	dCyD	Katabolismus do neúčinné formy d-UMP	–

Zkratky: TP – thymidinofosforyláza, TK – thymidinkináza, DPD – dihydrofymidindehydrogenáza, TS – thymidylsyntetáza, dCK – doxycytidinkináza, dCMPK – deoxycytidinmonofosfátkináza, dCDPK – deoxycytidindifosfátkináza, dCyD – deoxycytidindeamináza, 5-FdUMP – 5-fluorodeoxyuridinmonofosfát, 5-FU – 5-fluorouracil, d-UMP – deoxyuridin onofosfát

Metabolismus cytostatik – interakce s poradiačními změnami

Skupina antimetabolitů ze skupiny fluorovaných pyrimidinů zahrnuje v současnosti běžně užívané látky 5-fluorouracil, capecitabin, gemcitabin a cytosin arabinosid. Schéma metabolismu 5-fluorouracilu, capecitabinu a gemcitabinu je na obr. 1, 2, 3. Do skupiny metabolických enzymů (a pravděpodobně XIP) spadá i thymidylsyntetáza (TS). Problematika interakce se zářením proto zahrnuje i další anti-metabolitu – raltitrexed, pro nějž představuje TS cílovou strukturu.

Problematika XIP resp. enzymatické indukce ionizujícím zářením zahrnuje:

- Indukci enzymů metabolizujících látky do aktivní formy - thymidin fosforyláza (TP), thymidinkináza (TK), deoxycytidin kináza (dCK), deoxycytidinmonofosfát kináza (dCMPK)
- Indukci cílové struktury, cílového enzymu – thymidylsyntetázy (TS).
- Indukci enzymu katabolizujícího látky do forem inaktivních – dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD), deoxycytidin deamináza (dCMP deamináza).

V metabolismu cytostatik se pak řeší v rámci poradiační reakce následující otázky:

- Rovnováha anabolismu a katabolismu příslušných látek (otázka aktuální zejm. u capecitabinu).
- Zvýšení koncentrace cílové struktury (TS u 5-FU, capecitabinu a raltitrexedu)
- Variabilita poradiační reakce v různých tkáních, selektivita potenciace efektu účinných látek pro nádorovou tkáň.
- Vývoj XIP v čase, potenciální podklady pro časování, „timing“ chemoradiooterapie.

Přehled teoretických interakcí pro různá cytostatika udává tabulka č. 2.

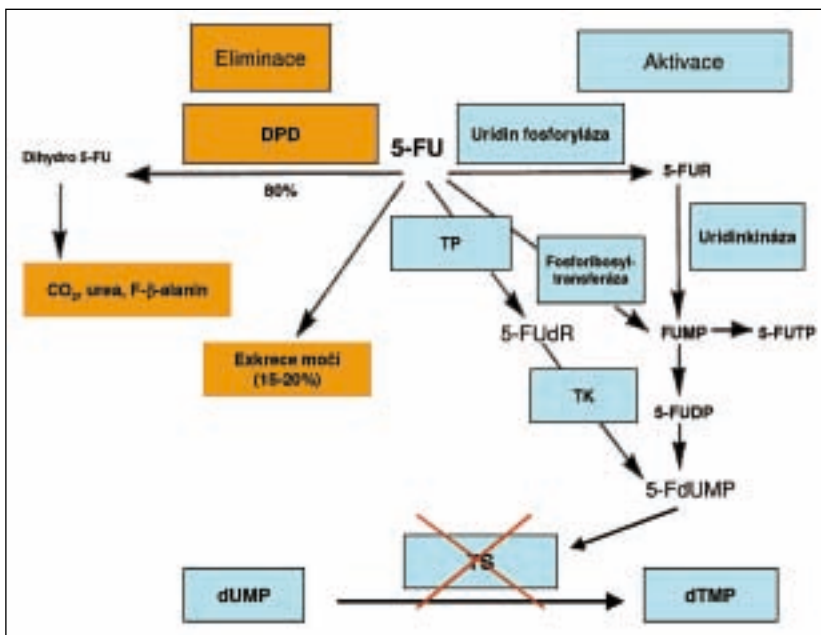
Thymidinfosforyláza (TP)

Indukce TP byla prokázána Sawadou et al. (5) u experimentálních nádorů (ca coli, ca colli uteri, ca ventriculi, ca mamme) ve zvířecím modelu. Při dávkách 2,5 – 5 Gy se intracelulární koncentrace TP v 5 typech modelových lidských nádorů zvyšuje na 10 – 20 násobek bazální hladiny. Maximum zvýšení nastává kolem 9. dne po radiaci a zvyšování přetrvává do 18. dne. Sawada současně prokazuje určitou selektivitu zvýšení při srovnání experimentálních nádorů a zdravé jaterní tkáně. Nicméně rozdíl v koncentraci TP jsou patrné i za normálních podmínek. Schueller (6) prokazuje in vivo u nemocných ca coli určitý gradient mezi koncentrací v tumorozní tkáni ca coli a koncentrací v přilehlé zdravé sliznici a gradient mezi koncentrací v tumorozní tkáni a plasmě.

Indukci TP po ozáření experimentálních nádorů (gliomů) na zvířatech analyzoval Blanquicett (7) a to na úrovni transkriptů. V korelaci s předchozími nálezy Sawady je patrné zvýšení koncentrace TP mRNA po dávce 8,5 Gy. Zvýšení dosahuje průměrně 10 násobku (maximálně až 70 násobku bazální hladiny, počíná 24 hod. po ozáření a přetrvává relativně dlouhou dobu – průměrně 20 dní. V uvedených experimentech vzniká několik kontroverzí:

- Vlivem ozáření narůstá koncentrace i dalších proteinů ze skupiny cytokinů. Na úrovni proteinů byl prokázán nárůst TNF- α se stejným časovým průběhem jako TP. Na úrovni transkriptů je po ozáření prokázán nárůst mRNA pro dalších 11 cytokinů včetně IFN- γ a IL-1 α . (Překvapivě při analýze mRNA tento experiment neprokazuje vzestup TNF- α mRNA.)
- U kontrolní skupiny ozářených zvířat, ale s odstíněním nádoru, je od 10. – 15. dne též patrný až 60 násobný nárůst TP mRNA.
- Přetrvávání zvýšené hladiny TPmRNA v ozářených nádorech je nápadně dlouhé.

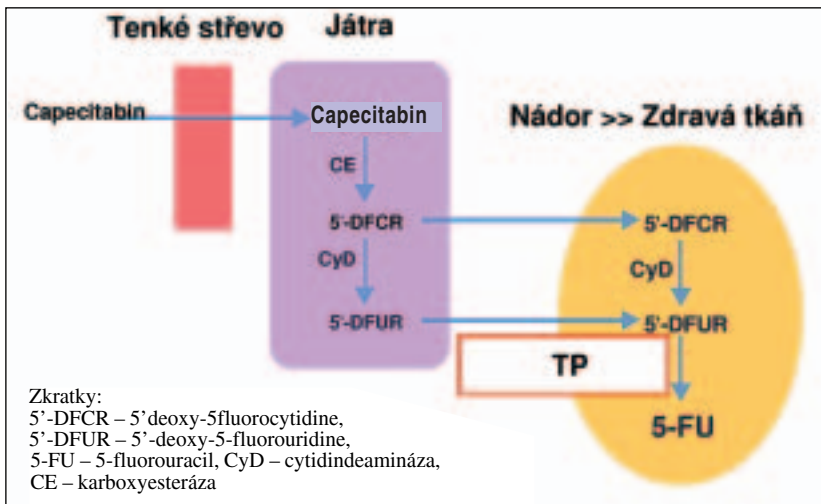
Obr. 1. Metabolismus 5-FU.



Zkratky v obr. 1:

DPD – dihydropyrimidindehydrogenáza, 5-FU – 5-fluorouracil, TP – thymidinfosforyláza, 5-FUR – 5-fluorouridin, 5-FUdR – 5-fluorodeoxyuridin, FUMP – fluorouridinmonofosfát, 5-FUTP – 5-fluorouridintrifosfát, TK – thymidinkináza, 5-FUDP – 5-fluorouridinmonofosfát, 5-FdUMP – 5-fluorodeoxyuridinmonofosfát, dUMP – deoxyuridinmonofosfát, TS – thymidylsyntetáza, dTMP – deoxythymidinmonofosfát

Obr. 2. Metabolismus capecitabinu.



Zkratky:

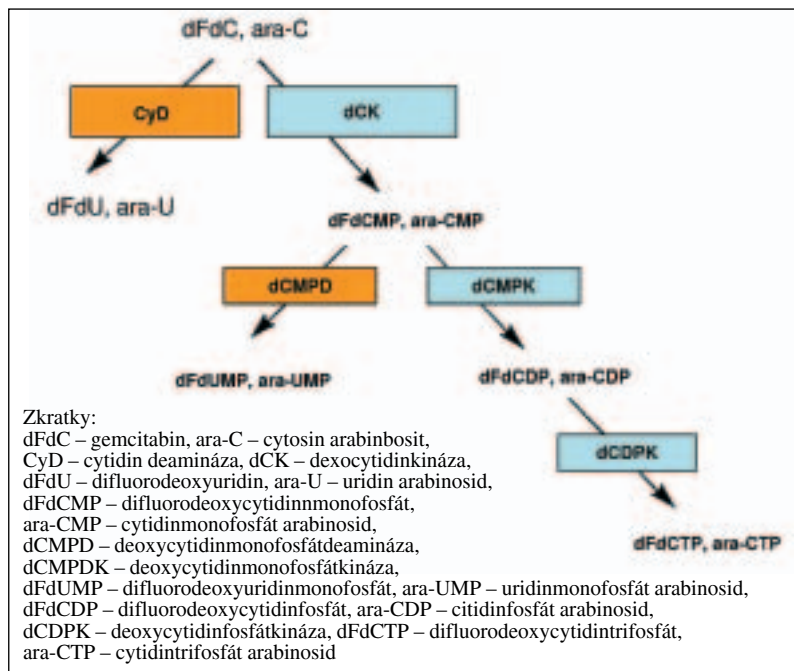
5'-DFCR – 5'-deoxy-5-fluorocytidine,
5'-DFUR – 5'-deoxy-5-fluorouridine,
5-FU – 5-fluorouracil, CyD – cytidindeamináza,
CE – karboxyesteráza

S ohledem na známou indukci TNF- α a IFN- γ lze připustit nepřímou indukci TP ionizujícím zářením prostřednictvím cytokinů. Bez ohledu na mechanismus indukce TP je pravděpodobná zvýšená aktivace capecitabinu a fluorouracilu do účinných forem v ozářené tkáni, pravděpodobně s určitou selektivitou ve tkáni nádorové.

Dihydropyrimidindehydrogenáza (DPD)

Reference o vývoji DPD v ozářované tkáni jsou raritní. Blanquicett et al. (7) stanovil hladiny DPD mRNA u experimentálních nádorů (gliomů) na zvířatech. Nezjišťuje žádnou změnu vlivem radiace. Na kulturách buněk He-La jsme od 7. hodiny po radiaci identifikovali nárůst DPD mRNA do dvojnásobku bazálních hodnot (8) Pro predikci účinnosti 5-FU a capecitabinu je reprezentativním faktorem poměr TP/DPD. Ten byl stanoven v různých nádorových tkáních bez před-

Obr. 3. Metabolismus gemcitabinu a ara-C.



chozí expozice jakékoliv chemoterapii nebo ozařování metodou určení proteinů (9). U nádorů mammy, kolorekta, ledvin a esofagu je evidentně poměr TP/DPD vyšší než 1, minimálně 1,5. (poměr enzymatických aktivit v $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteinu). V ojedinělém, uvedeném experimentu poměr TP/DPD narůstá po ozáření na 60-70 násobné hodnoty (7). Tento nárůst predikuje zvýšení efektu capecitabinu a 5-FU., resp. synergii s ionizujícím zářením (10). Variabilita poměru TP/DPD při stanovení v klinice mezi jednotlivými nemocnými je významná, což je dáno zejm. variabilitou v koncentraci DPD. Variabilita mezi nemocnými dokonce mnohokrát převyšuje variabilitu mezi jednotlivými nádorovými typy. To snižuje význam určení TP/DPD poměru pro potenciální predikci podle nádorových typů. Minimum referencí o vývoji DPD a TP/DPD poměru po radiaci zatím neumožňuje odhadnout vývoj katabolismu 5-FU a capecitabinu při evidentně zvýšeném anabolismu.

Thymidylsyntetáza (TS)

TS je předmětem výzkumu již téměř 2 desetiletí. Jako cílová struktura více účinných látek byla sledována exprese TS genu a hladiny enzymu v různých tkáních včetně nádorových. Expres TS a její význam byla zkoumána zejména jako prognostikátor u nádorů kolorekta a prediktor senzitivity na léčbu fluorovanými pyrimidiny a raltitrexedem. Dosud publikované nálezy jsou kontroverzní (zvýšená exprese = negativní prognostikátor a pozitivní prediktor pro 5-FU), nevedou k jednoznačným závěrům a širě problematiky prognózy a predikce TS přesahuje rámec tohoto přehledu. V návaznosti na ionizující záření je z více referencí patrná následující závislost:

- Opakovaně byla prokázána indukce TS zářením a to již od dávek 2 Gy, všechny dosavadní publikované experimenty byly vedeny in vitro nebo na experimentálních nádorech u zvířat.
- Expres TS prokázala negativní prediktivní hodnotu pro efekty záření i kombinované chemoradioterapie (zvýšená exprese koreluje s nižší radiosenzitivitou) (11).
- Jakkoliv alterovaná hladina TS (včetně změn po ozáření) nerezultuje pouze do změn v metabolismu DNA. TS má zřejmě několik dalších efektorových mechanismů, kupř. regulaci systému p53 (12).

– V rámci poradační reparační reakce navažují zvýšené hladiny na urychlení folátového metabolismu, který je vlivem záření alterován (resp. molekuly folátů jsou degradovány kyslíkovými radikály na pterin a paraaminobenzoylglutamovou kyselinu). Alterace folátového metabolismu může být nepřímým spouštěcím mechanismem indukce TS (13).

Všechny reference zahrnující alteraci TS vlivem ionizujícího záření popisují zvýšení. Dynamika zvýšení je podobná jako u předchozích metabolických enzymů. Koncentrace TS stoupá od 24 hod. po ozáření a zvýšení přetrvává až do 120 hod. Kvantifikace je obtížná vlivem obtížné srovnatelných metodik stanovení enzymů, zvýšení dosahuje cca 200% (14). Vlastní výsledky u He-La buněk prokazují zvýšení TS-mRNA od 8. hodiny po ozáření dávkou 2 Gy (8).

Z hlediska chemoradioterapie je vývoj hladin TS poměrně kontroverzním jevem. Jakkoliv prokázané zvýšení koncentrace cílové molekuly TS, pravděpodobně přináší zvýšení efektu účinné látky (fluorovaného pyrimidinu nebo raltitrexedu). Naproti tomu z hlediska účinnosti ionizujícího záření se zvýšená exprese TS prokázala jako negativní prediktivní faktor a blokáda TS specifickým inhibitorem (Thymitaq) (15) zvyšuje účinnost záření. Navíc je pravděpodobné, že zvýšení efektu blokátoru TS (pyrimidinu nebo raltitrexedu) se nebude manifestovat pouze formou blokády DNA metabolismu, ale pravděpodobně i jinými cestami, kupř. modulací systému p53.

Thymidinkináza (TK)

Indukce TK byla verifikována Boothmanem et al. před více jak 10 lety (4). V rámci nomenklatury XIP byla označena jako „XIP-11“. Indukce TK-mRNA dosahovala 6 násobku bazálních hladin s relativně rychlým nástupem – maximum po 3 hod. od ozáření. Indukce TK mRNA byla intenzivnější v nádorových buňkách (melanom –,U1-Mel“) než v buňkách nenádorových. Maximum indukce bylo dosaženo po jednotlivé dávce 5 Gy. Při dávkách nad 6 Gy je patrný útlum TK, resp. úbytek TK mRNA.

Tatáž pracovní skupina verifikovala i nárůst proteinu TK (16). I u proteinu je patrný rozdíl mezi nádorovou a nenádorovou buňkou, kde jsou hladiny proteinu nižší. Při stanovení aktivity TK po radiaci je v pokusu na nádorových a nenádorových tkáních myši (ascitický nádorový exudát, slezina, thymus,) patrné zvýšení po malých dávkách záření, při dávkách nad 1 Gy se aktivity snižuje v intervalu 12 hodin (17, 18). Jde zřejmě o posttranslační inhibici fosforylací při zvýšení intracelulárního poolu deoxythymidintrifosfátu (dTTP). U He-La buněk ozařovaných dávkou 2 Gy jsme verifikovali časné zvýšení TKmRNA, během první hodiny po radiaci. Nárůst je dvouvrcholový, další zvýšení nastává od 6. hodiny po ozáření (8). Podobná kinetika byla popsána i u t-PA (tissue plasminogen activator – XIP 6), kde odráží stabilizaci mRNA v prvním vrcholu a indukovanou transkripci ve 2. vrcholu (4). I když indukce TK může mít význam pro kinetiku fluorovaných pyrimidinů, tzn. význam pro účinnost chemoradiace, další reference nejsou dostupné, zřejmě proto, že významnější postavení v metabolismu pyrimidinů mají TP, DPD a TS.

Deoxycytidinkináza (dCK)

dCK, je známá jako enzym aktivující pyrimidinová nukleosidová analoga gemcitabinu a cytosin arabinosid a též purinová analoga jako chlordeoxyadenosin. V různých referencích byla popsána jeho aktivace při narušení syntézy DNA z různých

příčin (aphidicolin, cytostatika – kupř. etoposid) (19,20). Navíc aktivita dCK je nezávislá na fázi buněčného cyklu, resp. kromě S fáze si zachovává i ve fázích ostatních včetně G0. Na aktivitě dCK přirozeně závisí i rychlost aktivace Ara-C a gemcitabinu do účinných forem, dCK se uplatňuje jako prediktivní faktor efektu těchto látek (21). Vzestup aktivity dCK resp. nárůst koncentrace proteinu na 5 násobek původní hodnoty byl prokázán na kulturách experimentálních nádorů colon po jednotlivých dávkách záření do 7,5 Gy současně s nárůstem aktivity TK (22). Recentní práce Csapa et al. prokazuje vzestup aktivity dCK na kulturách lymfocytů. Vzestup enzymatické aktivity dCK na 3-4 násobné hodnoty je patrný po krátkém časovém intervalu – 15-30 min. po ozáření dávkami 0,5 – 4 Gy. Při stanovení koncentrace proteinu dCK není patrný žádný vzestup (23). Krátký časový interval od ozáření a absence nárůstu proteinu nasvědčuje posttranslační aktivaci, nikoliv de novo syntéze. Ta zřejmě nastává v delším časovém intervalu, který v uvedené referenci nebyl zkoumán, pravděpodobně po 6 hod. a déle. V rámci časně aktivace se dCK se zřejmě aktivuje proteinkinázou Cα (24) a časná aktivace je pravděpodobně součástí procesu spouštěného po poškození DNA stresovými kinázami (γ-PAK a ATM kináza) (25). Pro přesnější určení syntézy dCK (nikoliv aktivace) bude nezbytné i stanovení transkriptu – dCK mRNA. Reference popisující transkript v závislosti na ozáření nejsou k dispozici.

Deoxycytidindifosfátkináza, deoxycytidinmonofosfátkináza (dCMPK, dCDPK)

Těmito enzymy jsou pyrimidinová analoga Ara-C a dFdC dále aktivována do účinné formy.

Reference popisující tyto enzymy jsou raritní. Současně řešená problematika spočívá v identifikaci mechanismů fosforylace deoxycytidinmonofosfátu (dCMP). Mechanismus fosforylace cestou dCMPK a dCDPK zřejmě není jediný (26). Otázky postavení dCMPK a dCDPK v reakci na záření nebyly řešeny.

Deoxycytidin monofosfát deamináza (dCMPD)

Deaminace monofosfátového metabolitu gemcitabinu (dFdC), tzn. gemcitabin-monofosfátu (dFdCMP) prostřednictvím dCMPD může být majoritní cestou eliminace. Trifosfátový metabolit, dFdCTP, působí jako blokátor dCMPD. Tímto mechanismem autopotenciace se prodlužuje poločas účinných forem resp. metabolitů gemcitabinu. Vývoj dCMPD v kontextu poradiační reakce není známý, k dispozici je minimum referencí. Byla popsána transienční indukce dCMPD v buněčných liniích CHO-K1 po UV ozáření s relevantním nárůstem metabolitu dUMP (27). Hladiny dCMPD mRNA po ozáření nebyly zkoumány.

Z hlediska potenciální kombinace nukleosidových analog Ara-C a gemcitabinu se zářením má význam určení poradiačního vývoje dCMPD v kontextu stanovení poměru anabolismu a katabolismu. Přínosné by bylo stanovení poměru dCK/dCMPD a poměru dCMPK/dCMPD.

Možnosti využití poradiačních změn

Z uvedeného přehledu je patrné, že v rámci poradiační reakce po dávkách v řádu jednotlivých Gy se aktivuje metabolismus DNA a indukují resp. aktivují nukleosidy metabolizující enzymy. Tím se potvrzuje původní Blackstockův koncept chemoradiace s „potenciací chemoterapie zářením“. Zájem o problematiku stoupá s nástupem prekursoru 5-FU – capecitabinu, kde je otázka rychlosti a intenzity aktivace zásadní. U většiny metabolických enzymů byla otázka indukce v ozařované tkáni alespoň iniciálně zkoumána. Přestože je zatím obtížné dát z dostupných referencí jakékoli pevné závěry, jsou patrné některé obecné charakteristiky.

– U enzymů, kde byla zkoumána hladina proteinu, dlouhý časový interval od ozáření – cca 12–24 hod. a zvýšené intracelulární hladiny přetrvávají několik dní.

- Pouze u některých enzymů byla prokázána zvýšená hladina transkriptu, která přirozeně předchází vzestupu proteinu a určuje dobu nástupu poradiační reakce. Doba do nárůstu transkripce je od jednotlivých hodin do 24 hod.
- Možné jsou mechanismy nepřímé indukce metabolických enzymů. Skupina radiací indukovaných proteinů pod původním názvem XIP zahrnuje rozsáhlé spektrum látek včetně cytokinů, které potenciálně indukují metabolické enzymy.
- U některých metabolických enzymů může transkripci a syntézu předcházet posttranslační aktivace, která simuluje urychlení poradiační reakce v řádu hodin.
- Jsou patrné významné rozdíly v indukci a aktivitě metabolických enzymů mezi jednotlivými tkáněmi, indukce je vyšší ve tkáních nádorových, což je základem určité selektivity cytostatického efektu. Dosavadní nálezy jsou převážně z experimentálních nádorů na zvířatech nebo z tkáňových kultur. Práce stanovující indukci metabolických enzymů in vivo u nemocných s nádorovým onemocněním jsou ojedinělé.

Charakteristika a popis metodik, kterými byly stanoveny proteiny a transkripty v různých experimentech přesahují rámec přehledového sdělení. Je evidentní, že použití různých metodik stanovení proteinů (enzymová imunoassay, HPLC, Western blotting, analýza aktivity enzymů aj.) neumožňuje kvantitativní srovnání mezi jednotlivými experimenty. V analýze mRNA jsou pravidelně aplikovány metodiky RT-PCR. Výsledky různých experimentů také nejsou srovnatelné. Na otázku srovnatelnosti výsledků narážíme i ve vlastních výsledcích. Při hodnocení poradiační reakce je problematická volba referenčního „housekeeping“ genu. Řada z běžně používaných referenčních genů se přepisuje v rámci poradiační reakce současně s geny zkoumanými, kupř. běžně užívaný gen GAPDH (glyceraldehydfosfátdehydrogenáza) (28). Metodiky výběru referenčních „housekeeping“ genů jsou pospány (29).

Praktický výstup?

Indukce metabolických enzymů v rámci poradiační reakce je zkoumána v době, kdy je široce používána chemoradioterapie na základě empirie resp. dosažených příznivých výsledků.

Obecné závěry z výzkumu metabolických enzymů v poradiační reakci mohou ovlivnit časování („timing“) chemoradiačních schemat. Teoreticky je možné časovat aplikaci chemoterapie do doby maximálně intenzivního metabolismu resp. aktivace. Nicméně vzhledem k výše uvedeným dlouhodobým reakcím (několikadenní zvýšení hladin anabolických enzymů) a charakteristice metabolismu užívaných látek, zejm. capecitabinu, jsou zřejmě ideální v současné době již zavedená schemata aplikace fluorouracilu v kontinuální infuzi nebo capecitabinu v kontinuální redukované dávce po celou dobu ozařování. U dalších nukleosidových analog, kupř. gemcitabinu nebo ara-C a inhibitorů TS, raltitrexedu, dosud chemoradiační schemata vyvinuta nebyla.

Další přínos potenciálně představuje stanovení poměru indukce anabolických a katabolických enzymů, TP/DPD nebo dCK/dCMPD. V obecné rovině stanovení poměru může informovat o možnosti vzájemné potenciace nebo naopak o subaditivním efektu. Dosavadní reference potvrzují u poměru TP/DPD možnost potenciace. Popsaná velká variabilita DPD mezi jednotlivci ale připoštlí teoretickou možnost obrácení poměru. Identifikace těchto případů by vyžadovala individuální zhodnocení poradiační reakce metabolických enzymů jako prediktivní test. Individuální hodnocení je jednoznačně mimo současné možnosti.

Samostatnou oblast v rámci TP/DPF poměru představuje identifikace jedinců s genetickou deficiencí DPD. V těchto případech se poměr posouvá do hodnot predikujících těžké, případně letální nežádoucí efekty. Běžná dávka 5-FU nebo capecitabinu udržuje v těchto případech hladiny adekvátní předávkování. Individuální identifikace DPD deficiencie je realizovatelná popsávanými metodikami (30, 31).

Závěr

Mechanismus poradiační reakce zahrnuje indukci a aktivaci řady enzymů a cytokinů včetně enzymů metabolizujících nukleosidy. Na jeho základě lze popsat mechanismus vzájemné potenciace chemoterapie a záření a potvrdit koncept zvýšené dostupnosti resp. zvýšeného anabolismu některých cytotatik ze skupiny nukleosidových analog, zejm. fluorovaných pyrimidinů v ozářené tkáni. Anabolismus nukleosidových analog zřejmě převažuje nad katabolismem. Intenzivnější indukce

enzymů v nádorové tkáni může být podkladem pro určitou selektivitu cytostatického efektu. Indukce enzymů je dlouhodobá, přetrvává dny a podporuje současně užívaná schemata kontinuálního podání analog. Přínosem by mohlo být individuální zhodnocení mechanismu poradiační reakce a využití jako prediktoru efektu cytostatika.

Práce je součástí grantového úkolu IGA MZČR č. NC 7372 – 2/2003.

Literatura

1. Blackstock A.W., Kwok L., Gill M. et al. Tumor retention of 5-fluorouracil following irradiation observed using fluorine-19 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Int. J. Radiat. Oncol., Biol. Phys.* 1993, 30: 164
2. Boothman D.A., Bouvard I., Hughes E.N. Identification and characterization of X-ray induced proteins in Human Cells. *Cancer Res.* 1989, 49: 2871-8
3. Leskov K.S., Criswell T., Sheri A., Li J. et al. When X-ray-inducible proteins meet DNA double strand break repair. *Sem. Radiat. Oncol.* 2001, 11: 352-372
4. Boothman D.A., Meyers M., Fukunaga N., Lee S.W. Isolation of x-ray inducible transcripts from radioresistant human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90: 7200-7204
5. Sawada N., Ishikawa T., Sekiguchi F., Tahala Y. et al. X-ray irradiation induces thymidine phosphorylase and enhances the efficacy of capecitabine (Xeloda) in human cancer xenografts. *Clin. Cancer Res.* 1999, 5: 2948-2953
6. Schueller J., Cassidy J., Dumont E., Ross B. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2000, 45: 291-297
7. Blanquicett C., Gillespie Y., Nabors L.B., Miller C.R. et al. Induction of thymidine phosphorylase in both irradiated and shielded, contralateral human U87MG glioma xenografts: Implications for a dual modality treatment using capecitabine and irradiation. *Molecular Cancer Therapeutics* 2002, 1: 1139-1145
8. Vitek P., Taltyov O., Hozák P., Frencl L. et al. Radiation induced transcripts – TS, TK, TP and DPD mRNA 0-8 hrs. after common doses of radiation, a potential basis for an appropriate timing of chemoradiotherapy. *Radiotherapy & Oncology* 2004, 73 (Suppl. 1); S 368
9. Mori K., Hasegawa M., Nishida M., Toma H. et al. Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tumor tissues. *Int. J. of Oncology* 2000, 17: 33-38
10. Hoque M.O., Kawamata H., Nakashiro K.I., Omotehara F. et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA level correlates with the response to 5-fluorouracil-based chemo-immuno-radiation therapy in human oral squamous cell cancer. *Int. J. Oncol.* 2001, 19: 953-8
11. Okonkwo A., Musumuri S., Talamonti M., Benson A. et al. Molecular markers and prediction of response to chemoradiation in rectal cancer. *Oncol. Rep.* 2001, 8: 497-500
12. Ju J., Pedersen-Lane J., Maley F., Chu E. Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, 96: 3769-3774
13. Pogozelski W.K., Xapsos M.A., Blakely W.F. Quantitative assessment of the contribution of clustered damage to DNA double strand breaks induced by 60 Co gamma rays and fission neutrons. *Radiat. Res.* 1999, 151: 442-448
14. Batra V., Kesavan V., Mistra K.P. Modulation of enzymes involved in folate dependent one-carbon metabolism by γ -radiation stress in mice. *J. Radiat. Res.* 2004, 45: 527-533
15. Kim S.H., Brown S.L., Kim J.H. The potentiation of radiation response in human colon carcinoma cells in vitro and murine lymphoma in vivo by AG 337 (Thymitaq), a novel thymidylate synthase inhibitor. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1998, 42: 789-93
16. Boothman D.A., Davis T.W., Sahijdak W.M. Enhanced expression of thymidine kinase in human cells following ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1994, 30: 391-8
17. He Q., Skog S., Welander I., Tribukait B. X-irradiation effects on thymidine kinase (TK): II. The significance of deoxythymidine triphosphate for inhibition of TK1 activity. *Cell Prolif.* 2002, 35: 83-92
18. He Q., Skog S., Welander I., Tribukait B. X-irradiation effects on thymidine kinase (TK): I. TK1 and 2 in normal and malignant cells. *Cell Prolif.* 2002, 35: 69-81
19. Csapo Z., Sasvari-Szekely M., Spasokoukotskaja T., Talinadis I. et al. Activation of deoxycytidine kinase by inhibition of DNA synthesis in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61: 191-7
20. Ooi K., Okhubo T., Higashigawa M., Kawasaki H. et al. Increased deoxycytidine kinase activity by etoposide in L1210 murine leukemic cells. *Biol. Pharm. Bull.* 1996, 19: 1382-3
21. Gregore V., Rosier J.F., De Bast M., Bruniaux M. et al. Role of deoxycytidine kinase (dCK) activity in gemcitabine's radioenhancement in mice and human cells in vitro. *Radiother. Oncol.* 2002, 63: 329-338
22. Wei S., Geron-Blanc A., Petridis A., Beaumatin J. et al. Radiation induced changes in nucleotide metabolism of two colon cancer cell lines with different radiosensitivities. *Int. J. Radiat. Biol.* 1999, 75: 1005-13
23. Csapo Z., Keszler G., Safrany G., Spasokoukotskaja T. et al. Activation of deoxycytidine kinase by gamma-irradiation and inactivation by hyperosmotic shock in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65: 2031-2039
24. Xu Y.Z., Juany P., Plunkett W. Functional compartmentation of DTP pools. Preferential utilization of salvaged deoxycytidine for DNA repair in human lymphoblasts. *J. Biol. Chem.* 1995, 270: 631-7
25. Sasvari-Szekely M., Szabo Jr G., Strub M., Spasokoukotskaja T. et al. Discrepancies between flow cytometric analysis and [3 H]thymidine incorporation in stimulated lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1983, 762: 452-7
26. Hsu C.H., Liou J.Y., Dutschman G.E., Cheng Y.C. Phosphorylation of cytidine-, deoxycytidine-, and their analog- monophosphates by human UMP/CMP kinase is differentially regulated by ATP and magnesium. *Mol. Pharmacol.* 2004, 18:
27. Newman C.N., Miller J.H. Mechanism of UV-induced deoxynucleoside triphosphate pool imbalance in CHO-K1 cells. *Mutat. Res.* 1985, 145, 95-101
28. Weill D., Gay F., Tovey M.G., Chouaib S. Induction of tumor necrosis factor α expression in human T lymphocytes following ionizing gamma irradiation. *Journal of Interferone and Cytokine Research* 1996, 16: 395-402
29. Blanquicett C., Johnson M.R., Heslin M., Diasio R.B. Housekeeping gene variability in normal and carcinomatous colorectal and liver tissues: Applications in pharmacogenomic gene expression studies. *Analytical Biochemistry* 2002, 303: 209-214
30. Sumi S., Kidouchi K., Kondou M., Hayashi K. et al. Possible prediction of averse reactions to fluorouracil by measurement of urinary dihydrothymine and thymine. *Int. J. Mol. Med.* 1998, 2: 477-482
31. Mattison L.K., Carpenter M., Wang Y.H., Johnson M.R. et al. Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency by a novel uracil breath test (UBT). *Proc. ASCO* 2003, 22: Abst. 494

VÝSKYT A VÝZNAM MUTACE *CHEK2**1100DEL C U PACIENTEK S KARCINOMEM PRSU A V KONTROLNÍ SKUPINĚ ZDRAVÝCH ŽEN V ČESKÉ REPUBLICE

THE INCIDENCE AND RELEVANCE OF THE *CHEK2**1100DEL C MUTATION IN BREAST CANCER PATIENTS AND IN HEALTHY WOMEN IN THE CZECH REPUBLIC

KLEIBL Z.¹, NOVOTNÝ J.², MALÍK R.², BEZDÍČKOVÁ D.³, KLEIBLOVÁ P.⁴, FORETOVÁ L.⁵, KRUTÍLKOVÁ V.⁶, ČÍNEK M.⁷, ILENČÍKOVÁ D.⁸, PETRUŽELKA L.², MATOŮŠ B.¹, POHLREICH P.¹

¹ ÚSTAV BIOCHEMIE A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE 1. LF UK

² ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A 1. LF UK

³ ÚSTAV KLINICKÉ BIOCHEMIE A LABORATORNÍ DIAGNOSTIKY VFN A 1. LF UK

⁴ GYNEKOLOGICKO-PORODNICKÁ KLINIKA VFN A 1. LF UK

⁵ ODDĚLENÍ EPIDEMIOLOGIE A GENETIKY NÁDORŮ, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

⁶ ÚSTAV BIOLOGIE A LÉKAŘSKÉ GENETIKY, 2. LF UK V PRAZE

⁷ ÚSTŘEDNÍ VOJENSKÁ NEMOCNICE V PRAZE

⁸ NÁRODNÍ ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRATISLAVA 8

Souhrn: Východisko: Karcinom prsu je dlouhodobě nejčastějším maligním nádorovým onemocněním v populaci žen v ČR. Přibližně 5 – 10% nádorů vzniká na podkladě zárodečných mutací v predispozičních genech. Kromě majoritních predispozičních genů je v poslední době studována i úloha tzv. genů s nízkou penetrancí, mezi které patří i gen *CHEK2* (checkpoint kináse 2). V nedávné době byl popsán podíl mutací v genu *CHEK2* na vzniku hereditárních nádorových onemocnění, včetně karcinomu prsu. **Metody:** Provedli jsme detekci patogenní mutace c. *CHEK2* 1100delC u 1 776 osob zahrnujících 688 pacientek s karcinodem prsu, 358 osob vyšetřovaných v rámci screeningu mutací v genech *BRCA1/BRCA2* a 730 osob bez nádorového onemocnění v kontrolním souboru. Identifikace mutací byla prováděna s využitím DHPLC analýzy PCR amplifikátu zahrnujícího exon 10 genu *CHEK2*. Nalezené mutace byly ověřeny sekvenováním. **Výsledky:** V souboru jsme identifikovali celkem 6 nosičů mutací: 3 v souboru pacientek s karcinodem prsu, jednoho muže s karcinodem prsu ze souboru osob vyšetřovaných na přítomnost mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* a 2 osoby v kontrolním souboru. **Závěry:** Četnost nosičství mutace c.1100delC v České populaci je nízká. Klinická využitelnost takového vyšetření je tedy u pacientek s karcinodem prsu sporná.

Klíčová slova: karcinom prsu, *CHEK2*, dědičná dispozice, zárodečná mutace

Summary: Backgrounds: Breast cancer belongs to the most serious malignant diseases in the female population in the Czech Republic. It is assumed that inherited mutations contribute to the development of 5-10% of cancers. In recent years, the role of mutations of the low penetrance genes is studied intensively. One of them is checkpoint kinase 2 (*CHEK2*). Mutations in this gene were shown to predispose to the development of several inherited cancer syndromes, including breast cancer. **Study design:** We have performed mutation analysis of pathogenic *CHEK2* allele c1100delC in 1776 subjects including 688 breast cancer patients, 358 patients screened for mutations in major predisposing genes and 730 non cancer controls. Mutation analysis was based on DHPLC prescreening, mutations were confirmed by sequencing. **Results:** We have found 6 mutation carriers: 3 in sporadic breast cancer patients' cohort, one male breast cancer patient in hereditary breast cancer patients' cohort and 2 among 730 controls. **Conclusion:** Based on our data, we can speculate that Czech Republic belongs to the countries with low occurrence of *CHEK2* c1100delC allele, which limits clinical utilization of *CHEK2* genetic analysis.

Key words: breast cancer, *CHEK2*, hereditary disposition, germline mutation

Úvod

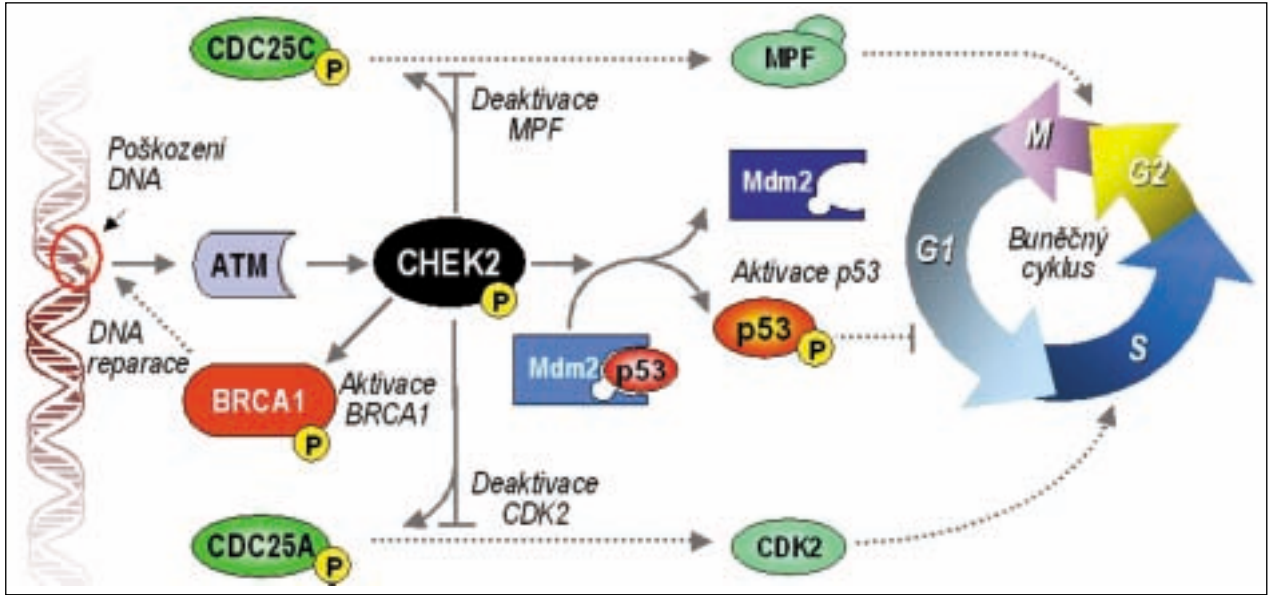
Karcinom prsu je v naší republice závažným onemocněním. Díky vysokému celoživotnímu riziku onemocní karcinodem prsu téměř každá dvanáctá žena. Z těchto důvodů je nezbytné, aby bylo vynaloženo adekvátní úsilí nejen pro hledání nových metod časné diagnostiky, ale také postupů, které by umožňovaly selekci osob se zvýšeným rizikem vzniku nádorového onemocnění. Následně tak mohou být predisponovaní jedinci zařazeni do racionálních screeningových či intervenčních preventivních programů.

Nádorová onemocnění jsou způsobena poruchami DNA postihujícími geny ovládající homeostázu buněčných populací.

Ačkoliv se ve valné většině případů jedná o polygenní onemocnění s kumulací genomových defektů v průběhu života nemocného, může být jejich vznik významně urychlen genetickými aberacemi tumor supresorových genů. Doposud byly popsány vrozené mutace několika tumor supresorových genů - *BRCA1* (OMIM 113705), *BRCA2* (OMIM 600185), *p53* (OMIM 191170), *ATM* (OMIM 191170), *PTEN* (OMIM 601728) – které způsobují dědičné nádorové syndromy v postižených rodinách s častým výskytem karcinomu prsu. Nosičství mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2* tvoří kolem 90% všech případů z doposud definovaných hereditárních predispozic ke vzniku karcinomu prsu a je zodpovědná za 5 - 10% případů

Obr. 1.: Schéma aktivace CHEK2 v důsledku genotoxického poškození a proteiny regulované aktivovanou molekulou CHEK2.

Po genotoxickém poškození je protein kináza CHEK2 aktivována fosforylací zprostředkovanou proteinem ATM. Aktivovaná molekula CHEK2 přímo fosforyluje protein p53 na místě serinu 20. Tato modifikace má za následek přerušení zpětnově vazebné autoregulační smyčky degradace p53 indukované ubiquitin-ligázovou aktivitou mdm2. Aktivace a následná kumulace p53 indukuje syntézu řady proteinů s negativní regulační funkcí na buněčný cyklus (inhibitory komplexů cyklínů a CDKs) a indukcii apoptózy. Fosforylace fosfatázy CDC25c na serinu v pozici 216 vede k její inaktivaci, která znemožňuje plnou aktivaci komplexu MPF (mitosis promoting factor) a tím přechod buňky z S2 fáze do vlastní mitózy. Další fosfatázou, která je cílem CHEK2 je CDC25A. Inaktivací tohoto enzymu fosforylací serinu 123 se CHEK2 podílí na zástavě buněčného cyklu v S-fázi cestou inaktivace cdk2. Po poškození genomové DNA fosforyluje CHEK2 protein BRCA1 na místě serinu 988. V nedávné době byl rovněž popsán kooperativní podíl aktivace CHEK2 a BRCA1 a následně zástavy buněčného cyklu bez účasti proteinu p53.



vzniku karcinomu prsu v celé populaci¹⁾. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu u nosiček mutací v těchto – tzv. hlavních predispozičních genech – vzrůstá na 60 – 90%. Odhaduje se, že na vzniku dalších 10-15% mamárních karcinomů se podílejí dědičné mutace v dalších, doposud nejednoznačně definovaných genech. Mezi ně patří i tzv. geny s nízkou penetrancí. Mutace v genech s nízkou penetrancí zvyšují celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu u nosičů výrazně méně, než je tomu u hlavních predispozičních genů (obvykle do dvojnásobku RR)²⁾. Ke vzniku maligního nádoru u jejich nosičů je nezbytná inaktivace dalších, opět nejednoznačně definovaných, genů.

Jedním z intenzivně studovaných genů s nízkou penetrancí je CHEK2 (checkpoint kinase 2, OMIM 604373) - protein kináza aktivovaná v odpovědi na poškození genomové DNA. Svou aktivitou se podílí na zástavě buněčného cyklu v kontrolních bodech (především na zástavě přechodu z G2 do M fáze) a indukcii apoptózy³⁾. Při vzniku dvouřetězcových zlomů genomové DNA (například ionizujícím záření) je molekula CHEK2 fosforylována proteinem ATM. Aktivovaný protein CHEK2 následně fosforyluje několik substrátů, mezi které patří i protein p53 (obr. 1.). V genu CHEK2 bylo doposud popsáno několik inaktivujících mutací v souvislosti se vznikem jak sporadických maligních nádorů (karcinom prsu, kolorekta, prostaty, štítné žlázy, osteosarkom), tak i hereditárních nádorových syndromů (Li-Fraumeni syndrom). Delece cytosinu v pozici 1100 od začátku iniciačního kodonu mRNA genu CHEK2 (alela CHEK2*1100delC), která způsobuje inaktivaci proteinu CHEK2 díky zkrácení proteinového produktu v místě kinázové domény, je nejstudovanější mutací s jasně prokázaným vztahem k řadě karcinomů⁴⁾. Na základě rozsáhlých populačních studií v různých zemích je tato mutace uváděna v souvislosti se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu (RR = 2) a výskyt HBCS syndromu - rodinného výskytu karcinomu prsu a kolorekta^{5,6)}. V nedávné době byla popsána i další mutace I157T zasahující FHA (fork head associated) doménu proteinu, která se rovněž vyskytuje signifikantně častěji u pacientek s karcinomem prsu⁷⁾.

Cíl studie

Rozhodli jsme se provést testování četnosti alely CHEK2*1100delC u neselektované populace pacientek s karcinomem prsu, v populaci pacientů splňujících kritéria k testování na přítomnost mutací v hlavních predispozičních genech pro vznik karcinomu prsu^{8,9)}, a v kontrolní populaci bez přítomnosti nádorového onemocnění.

Metody

Pacientkám zařazeným do studie bylo, po podpisu informovaného souhlasu schváleného etickou komisí, odebráno 5 ml nesrážlivé žilní krve. Genomová DNA byla izolována pomocí JetStar 96 blood kitu (Genomed, Löhne, BRD) dle protokolu výrobce. Sekvence vysoce homologní CHEK2 genu (především exonům 10-14) se nacházejí v různých oblastech genomu (chromosomy 5, 7, 10, 15, 16, 22 a X). Proto byla oblast, zahrnující exon 10 genu CHEK2, amplifikována pomocí nested PCR na základě publikovaných postupů^{10,11)}. První amplifikace (1284 bp) byla provedena s použitím 50 – 150 ng genomové DNA, 0,4 U DynaZyme II polymerázy (Finnzymes, Turku, FI), 0,2 µl 50xdNTP's (Invitex, Berlin, BRL) 1,0 µl 10x DynaZyme II PCR buffer (Finnzymes), 0,3 µl 50 mM MgCl₂ a 0,6 pmol primerů (CHEK04: 5'-GGAGGTGATTAGATGAAGTCA-CAAAT-3' a 5'-CHEK07: AGTCTCTTCTTGAGATGACAG-3'; Generi Biotech, Hradec Králové). Z této PCR byl amplifikován amplicon o délce 247bp za použití 0,1 µl prvního PCR produktu, 0,5 U GoldTaq DNA polymerázy (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,5 µl 50xdNTP's (Invitex, Berlin, BRL) 2,5 µl 10x GoldTaq PCR bufferu (Applied Biosystems), 0,75 µl 50 mM MgCl₂ a 3pmol primerů (CHEK05: 5'-TGGCAAGTTCAACATTATTTCCC-3' a 5'-CHEK06: GAATAACTCCTAACTCCAGC-3'; Generi Biotech). Vážený PCR produkt byl analyzován pomocí denaturační vysokotučinné kapalinové chromatografie (DHPLC) v systému WAVE (Transgenomic, Omaha, NE) na DNASep koloně s gradientem acetonitrilu. Vzorky s aberantním elučním profilem na DHPLC byly charakterizovány sekvenováním (BigDye Terminator ver. 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA) na

sekvenátoru ABI310 (Applied Biosystems) z nezávisle amplifikovaného vzorku *de novo* izolované DNA pacienta.

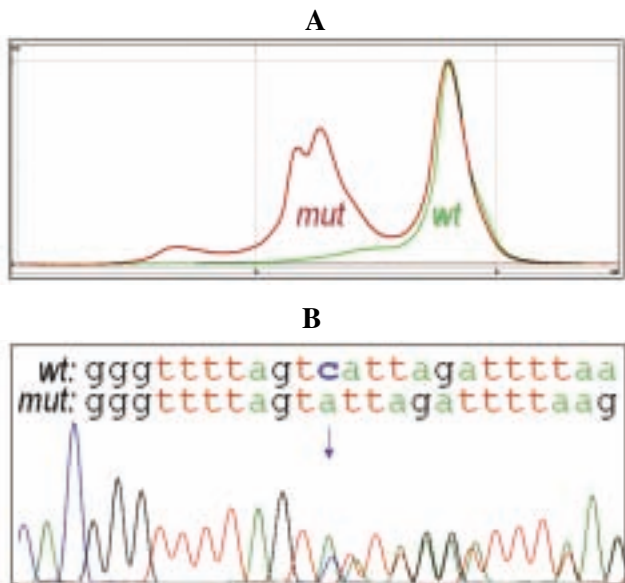
Výsledky

Celkem byl analyzován genetický materiál od 688 patientek s karcinomem prsu, 358 pacientů(ek) testovaných na přítomnost mutace v genech *BRCA1* a *BRCA2* z důvodů hereditárního nebo časného výskytu (<35 let věku) karcinomu prsu či případů karcinomu prsu u muže (6 osob) a 730 kontrol – osob bez známek nádorového onemocnění.

Na základě vyšetření 1046 pacientů s hereditárním i sporadickým karcinomem prsu a 730 osob kontrolního souboru jsme našli 6 nosičů mutací. Ve skupině 688 patientek se sporadickým výskytem karcinomu prsu byly nalezeny 3 ženy s mutací *CHEK2**1100delC (0,44%; obr. 2). Jeden výskyt sledované alely byl nalezen ve vzorcích 358 pacientů(-tek) s karcinomem prsu (0,28%) z rodin splňujících kritéria testování na přítomnost mutací v genech *BRCA1* a *BRCA2*. V tomto případě se jednalo o pacienta s karcinomem prsu u muže. Relevantní klinicko-patologické charakteristiky nemocných nosičů studované mutace jsou uvedeny v tabulce 1. V kontrolním souboru bylo vyšetřeno 730 vzorků a byly zaznamenány dvě analyzované mutace (0,27%). Naše výsledky ukazují, že četnost výskytu mutace *CHEK2**1100delC je v naší republice nízká. Díky tomu je obtížné relevantní statistické zpracování. Četnost výskytu studované alely se ve skupině osob s dědič-

Obr. 2.: Mutační analýza *CHEK2*.

A. Eluční profil zdravé (wt) a mutované (mut) alely 1100delC na DHPLC. B. Výsledek sekvenční reakce alely s deletovaným cytosinem v pozici 1100 (šipka) způsobující posun čtecího rámce.



Tab. 1: Klinické a histopatologické charakteristiky pacientů s karcinomem prsu a mutací *CHEK2**1100delC.

Pacient	Pohl.	Věk při dg.	Charakteristiky nádoru		Sekundární malignita	Maligní onemocnění v rodině (Věk při dg)
			Histologický typ	TNM: Grade		
A59	Ž	40	Invasivní ductální	T ₁ N ₀ M ₀ GIII	0	M: Karcinom děložního čípku (Úmrtí v 48 letech)
A86	Ž	50	Invasivní ductální ER+	T ₂ N ₀ M ₀ GIII	0	O: Karcinom plic (55)
A383	Ž	43	Invasivní ductální ER+; PR+	T ₁ N ₀ M ₀	0	Negativní
322	M	60	Invasivní ductální ER+; PR+	T ₂ N ₁ M ₀ Gx	NHL	M: Karcinom jater (73) B: Karcinom GIT (62)

Zkratky: ER – estrogenní receptor; PR – progesteronový receptor; NHL – Non-Hodgkinský lymfom; O - otec; M – matka; B – bratr

Tab. 2: Četnost mutace *CHEK2**1100delC u pacientů s karcinomem prsu a v kontrolní nenádorové populaci v různých státech.

Populace	Pacienti s karcinomem prsu		Kontroly		Literatura
	Celkem	1100delC (%)	Celkem	1100delC (%)	
Nizozemí*	2851	102 (3.58)	909	9 (0.99)	20)
Finsko*	1489	34 (2.28)	2332	31 (1.33)	20)
Velká Británie*	3450	42 (1.21)	4037	21 (0.52)	20)
Německo	516	8 (1.55)	1315	6 (0.46)	13)
USA	300	3 (1.00)	1665	5 (0.30)	11)
Izrael	219	1 (0.46)	146	0	18)
Česká republika	1046	4 (0.38)	730	2 (0.27)	naše údaje
Polsko	N.S.	-	1921	4 (0.21)	5)
Austrálie	1474	10 (0.68)	736	1 (0.14)	20)
Itálie	939	1 (0.11)	334	0	15)
Španělsko	456	0	400	0	14)

* sdružené údaje

ným charakterem onemocnění nebo jeho časným nástupem liší pouze o 0,1% od četnosti zaznamenané v kontrolním souboru (hodnota $p = 0,9999$; Fisherův exaktní test).

Diskuse

Od roku 2002 bylo provedeno testování několika rozsáhlých souborů pacientů s hereditárními i sporadickými nádory na přítomnost mutace *CHEK2**1100delC (tab. 2.). Z výsledků těchto šetření vyplývá, že gen *CHEK2* patří mezi geny s nízkou penetrancí a specificky delece C v místě 1100 může modifikovat riziko vzniku některých nádorů. Výsledky jsou však celosvětově poměrně heterogenní. Zatímco výsledky populačních studií ze severní Evropy nacházejí poměrně vysoké četnosti výskytu studované alely (Meijers-Heijbroer a kol zaznamenali až 5,1% výskyt alely u osob z rodin testovaných na přítomnost mutací v genech *BRCA1/2*)¹², výrazně nižší jsou zaznamenané nálezy z oblastí středoevropských a USA^{13,11}). V zemích středomořské oblasti Evropy je výskyt *CHEK2**1100delC velmi raritní^{14,15}). Rozporuplné výsledky se týkají i rizika vzniku karcinomu prsu u mužů – nosičů studované alely. První výsledky poukazyvaly na 10-násobné zvýšení rizika vzniku tohoto onemocnění u nosičů mutací¹²). Tento nálezy však nebyl dále potvrzen, a lze tedy předpokládat, že ačkoliv je riziko vzniku karcinomu prsu u mužů – nosičů zvýšené, nedosahuje původně uvedených hodnot^{16,17,18}). Znalost mutačního stavu genu *CHEK2* může být přínosná pro plánování léčebného postupu u žen s rakovinou prsu, neboť v nedávno publikované práci bylo popsáno 2,5násobné zvýšení rizika metachronního kontralaterálního karcinomu prsu u žen, které podstoupily v rámci léčby prvního nádoru radioterapii¹⁹). Díky nízké četnosti studované mutace nebyl v našem souboru zaznamenán ani jeden případ výskytu bilaterálního karcinomu.

Závěr

Výskyt mutace *CHEK2**1100delC je v České republice nízký. Ačkoliv četnost nálezu mutace v populaci pacientů s karcinomem prsu je vyšší, je pravděpodobné, že nosiči mutace představují méně než 0,5% všech nemocných s karcinomem prsu. Vzhledem k mírně zvýšenému riziku vzniku onemocnění a nízké penetranci alely nelze doporučit samotné vyšetření mutace *CHEK2**1100delC jako predispozičního znaku pro vznik karcinomu prsu. Vzhledem k rychlosti stanovení a jeho relativní jednoduchosti ve srovnání s analýzami hlavních predispozičních genů, by bylo možné uvažovat o zařazení tohoto vyšetření do bloku analýz genů *BRCA1/2*. Získání dalších výsledků by umožnilo relevantní statistické zpracování četnosti výskytu i stanovení rizika v české populaci. Hodnocení

vztahu studované alely ke vzniku dalších onemocnění, především karcinomu kolorekta je v současnosti předmětem naší další práce.

Podpora

Projekt byl podpořen finančními prostředky z nadace Běhu Terryho Foxe a výzkumným záměrem 1. LF UK # 111100004.

Seznam zkratk

ATM – ataxia telangiectasia mutated; *HBCC* – hereditary breast and colorectal cancer syndrome; *BRCA1* – breast cancer gene 1; *BRCA2* – breast cancer gene 2; *FHA* – fork head associated; *CHEK2* – checkpoint kinase 2; *PCR* – polymerázová řetězová reakce; *DHPLC* – denaturační vysokoučinná kapalinová chromatografie; *PTEN* – phosphatase and tensin homolog

Literatura

1. Thull D.L., Vogel V.G.: Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist* 9, 2004, 13-24
2. Weber B.L., Nathanson K.L.: Low penetrance genes associated with increased risk for breast cancer. *Eur J Cancer* 36, 2000, 1193-1199
3. Bartek J., Lukas J.: Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 2003, 421-429
4. Schutte M., Seal S., Barfoot R. et al.: Variants in *CHEK2* other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *Am J Hum Genet* 72, 2003, 1023-1028
5. Cybulski C., Huzarski T., Gorski B. et al.: A novel founder *CHEK2* mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res* 64, 2004, 2677-2679
6. Meijers-Heijboer H., Wijnen J., Vasen H. et al.: The *CHEK2* 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet* 72, 2003, 1308-1314
7. Kilpivaara O., Vahteristo P., Falck J. et al.: *CHEK2* variant I157T may be associated with increased breast cancer risk. *Int J Cancer* 111, 2004, 543-547
8. Pohlreich P., Stribrna J., Kleibl Z. et al.: Mutations of the *BRCA1* gene in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic. *Med Princ Pract* 12, 2003, 23-29
9. Foretova L., Machackova E., Navratilova M. et al.: *BRCA1* and *BRCA2* mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. *Hum Mutat* 23, 2004, 397-398
10. Sodha N., Houlston R.S., Williams R. et al.: A robust method for detecting *CHK2/RAD53* mutations in genomic DNA. *Hum Mutat* 19, 2002, 173-177
11. Offit K., Pierce H., Kirchoff T. et al.: Frequency of *CHEK2**1100delC in New York breast cancer cases and controls. *BMC Med Genet* 4, 2003, 1-
12. Meijers-Heijboer H., van den Ouweland A., Klijn J. et al.: Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to *CHEK2*(*1100delC) in noncarriers of *BRCA1* or *BRCA2* mutations. *Nat Genet* 31, 2002, 55-59
13. Dufault M.R., Betz B., Wappenschmidt B. et al.: Limited relevance of the *CHEK2* gene in hereditary breast cancer. *Int J Cancer* 110, 2004, 320-325
14. Osorio A., Rodriguez-Lopez R., Diez O. et al.: The breast cancer low-penetrance allele 1100delC in the *CHEK2* gene is not present in Spanish familial breast cancer population. *Int J Cancer* 108, 2004, 54-56
15. Caligo M.A., Agata S., Aceto G. et al.: The *CHEK2* c.1100delC mutation plays an irrelevant role in breast cancer predisposition in Italy. *Hum Mutat* 24, 2004, 100-101
16. Syrjakovski K., Kuukasjarvi T., Auvinen A. et al.: *CHEK2* 100delC is not a risk factor for male breast cancer population. *Int J Cancer* 108, 2004, 475-476
17. Neuhausen S., Dunning A., Steele L. et al.: Role of *CHEK2**1100delC in unselected series of non-*BRCA1/2* male breast cancers. *Int J Cancer* 108, 2004, 477-478
18. Ohayon T., Gal I., Baruch R.G. et al.: *CHEK2**1100delC and male breast cancer risk in Israel. *Int J Cancer* 108, 2004, 479-480
19. Broeks A., de Witte L., Nuijten A. et al.: Excess risk for contralateral breast cancer in *CHEK2**1100delC germline mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 83, 2004, 91-93
20. The *CHEK2* Breast Cancer Case-Control Consortium: *CHEK2**1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. *Am J Hum Genet* 74, 2004, 1175-1182

EXTRASPINÁLNÍ MYXOPAPILÁRNÍ EPENDYOMOM SAKROKOKCYGEÁLNÍ OBLASTI

EXTRASPINAL MYXOPAPILLARY EPENDYOMA OF THE SACROCOCCYGEAL REGION

RYŠKA A.

FINGERLANDŮV ÚSTAV PATOLOGIE, LÉKAŘSKÁ FAKULTA UK A FAKULTNÍ NEMOCNICE, HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn: Je prezentován neobvyklý případ myxopapilárního ependymomu extraspinálně lokalizovaného, vyrůstajícího v podkoží perianální oblasti u 28leté ženy. Nádor budil klinický dojem chronického recidivujícího periproktálního abscesu. Vzhledem k centrální pseudocystické degeneraci byl opakovaně evakuován, odsáté hmoty vzhledu krevních koagul nebyly nikdy histologicky vyšetřeny. Teprve po chirurgické exstirpaci nádoru byla tkáň histologicky vyšetřena a byla stanovena definitivní diagnóza. Pacientka je po 4 letech od odstranění ložiska bez známek recidivy. Jsou diskutovány otázky histogeneze a možná úskalí v diferenciální diagnostice této vzácné afekce.

Klíčová slova: Myxopapilární ependymom - extraspinální - nádory měkkých tkání - neuroektodermální - sakrokokcygeální

Summary: An unusual case of myxopapillary ependymoma of the sacrococcygeal region in a 28-year-old female is presented. The tumor appeared clinically as a chronic, repeatedly recurring periproctal abscess. The central portion of the lesion was repeatedly evacuated; these masses had a gross appearance of blood clots. Finally, the tumor was surgically removed and histologically examined with the final diagnosis of myxopapillary ependymoma. The patient is alive and well, without any recurrence four years after operation. The histogenesis of the lesion as well as its differential diagnosis are discussed.

Key words: Myxopapillary ependymoma - extraspinal - soft tissue tumors - neuroectodermal - sacrococcygeal

Popis případu

Dvacetiosmiletá žena, která v minulosti navštěvovala po dobu 5 let chirurgickou ambulanci, kde jí byla opakovaně (celkem 4x) provedena incize ložiska v perianální oblasti, které imponovalo jako periproktální absces. Ložisko bylo bolestivé, někdy s fluktuací, bez zarudnutí kůže. V celkové anestezii byla provedena evakuace hmot, které měly vzhled starších krevních koagul. Léze však opakovaně recidivovala, při poslední návštěvě mělo ložisko v intergluteální rýze velikost 30x30x20 mm. Toto bylo exstirpováno; makroskopicky mělo vzhled prokrváčeného lipomu. Tkáň byla histologicky vyšetřena a vzhledem k diagnostickým rozpakům na spádovém oddělení patologie byly bločky zaslány na Fingerlandův ústav patologie v Hradci Králové ke konzultačnímu vyšetření s návrhem diagnózy hemangiosarkomu.

Po stanovení definitivní histologické diagnózy byla provedena reoperace v místě původního uložení afekce s reexcizí jizvy a lůžka nádoru s bezpečnostním lemlem. V materiálu z reexcize byly nalezeny reziduální struktury nádoru obdobného vzhledu jako v primární excizi. Hojení rány probíhalo per secundam. Vzhledem k tomu, že v nádoru nebyla přítomna anaplastická komponenta, nebyla provedena žádná doplňková aktino- ani chemoterapie. Pacientka je po 4 letech po odstranění ložiska bez známek recidivy.

Histologický nález

Afekce měla laločnatý charakter (obr. 1) a byla zčásti obdána tenkým vazivovým pouzdrem. V naprosté většině byla tvořena prokrváčeným systémem papilárních útvarů, místy se větvičích. Papily měly většinou chudě buněčné stroma, často hyalinizované, či myxoidně prosáklé (obr. 2), většinou s centrální

tenkostěnnou cévou (kapilárou). Lemovány byly zpravidla oploštělými či níže kubickými buňkami s chudou, nezřetelnou eozinofilní cytoplazmou a lehce anizomorfními jádry. Místy prakticky chyběly. Místy vznikal dojem tvorby nepravidelných anastomozujících vaskulárních lumin. Pouze na několika místech měly lemuující buňky poněkud jiný charakter, byly spíše cylindrické, palisádovitě uspořádané kolmo na bazální membránu.

Imunohistochemicky byly lemuující buňky zcela negativní v průkazu vaskulárních markerů (vonWillebrandův faktor, CD31, CD34) i epiteliálních markerů (epiteliální membránový antigen [EMA], cytokeratiny). Silně byl exprimován vimentin a gliální fibrilární acidický protein (obr. 3).

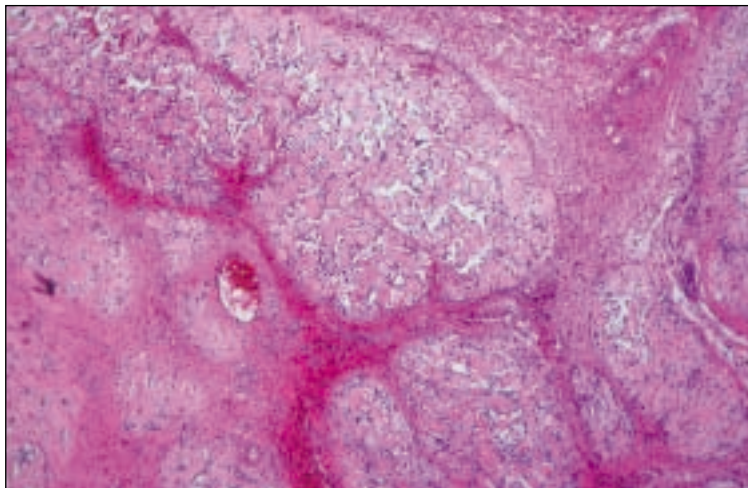
Na základě morfologického obrazu a imunohistochemického profilu nádorových buněk byla stanovena diagnóza myxopapilárního ependymomu podkoží sakrokokcygeální oblasti.

Diskuse

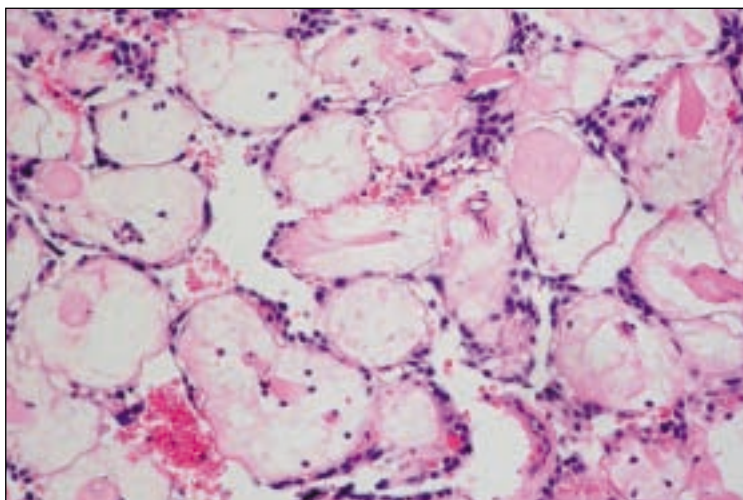
Myxopapilární ependymom je gliální nádor vznikající prakticky výhradně v oblasti míšního konu a filum terminale. Velmi vzácně může vzniknout i extradurálně. V těchto případech může nádor růst buď presakrálně, kdy většinou imponuje jako nádor v retroperitoneu, dutině břišní či v malé pánvi, nebo retrosakrálně, v podkoží či měkkých tkáních oblasti kostrče (1); v některých případech může nádor invadovat i do kosti (2). Doposud bylo popsáno méně než 100 případů extradurálního myxopapilárního ependymomu. Vznik těchto ektopických nádorů je do určité míry zahalen rouškou tajemství. Existují čtyři možnosti, jak vysvětlit jejich vznik v této oblasti:

1. může se jednat o metastázy či nádory prorůstající per continuitatem do těchto míst z durálního vaku míchy (3),

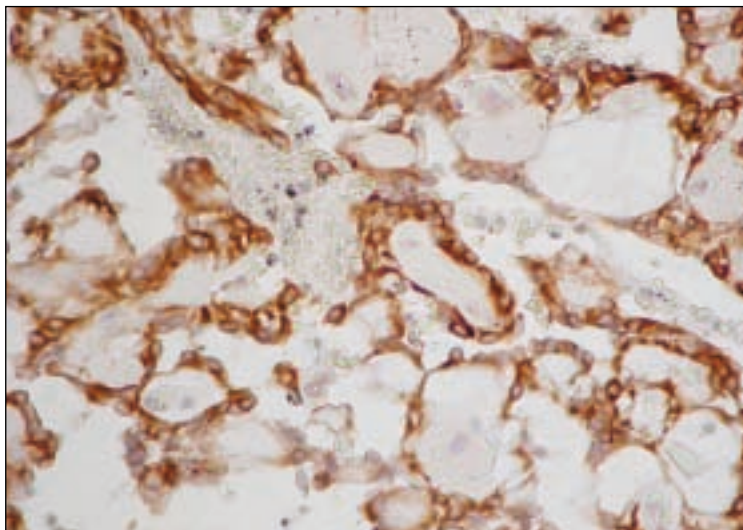
Obr. 1. Histologický vzhled myxopapilárního ependymomu. Nádor je tvořený mnohočetnými papilárními strukturami, vazivová septa jej rozdělují do nepravidelných lalůčků. Místy jsou známky jizvení a čerstvého krvácení do nádorové tkáně (Hematoxylin-eosin, 40x).



Obr. 2. Detail nádorových papil, které jsou výrazně myxoidně prosáklé a kryté oploštěnými buněčnými elementy epiteloidního vzhledu. V interpapilárních prostorech jsou četné erytrocyty (Hematoxylin-eosin, 200x).



Obr. 3. Imunohistochemický průkaz gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP), který je přítomen v cytoplazmě prakticky všech oploštělých elementů na povrchu papil (nepřímá imunohistochemie, dobarveno hematoxylinem, 200x).



2. může jít o měkkotkáňovou recidivu dříve ope- rovaného nádoru míchy (4),
3. nádor může vznikat při defektech vývoje neurál- ní trubice - ať již zjevných, nebo z heterotopic- kých vývojových odštěpků ependymu či filum terminale u retroanálních kožních jamek (5, 6),
4. nádor může vzniknout jako součást sakrokok- cygeálního teratomu (7, 8).

Z výše zmíněných hypotéz se v našem případě nabízí předposlední jmenovaná, ačkoli pacientka nemá vrozenou vývojovou vadu (např. spina bifida, meningomyelocele, apod.) a nebyl jí nyní ani v minulosti v páteřním kanále prokázán patolo- gický útvar (negativní MRI). Ektopické odštěp- ky ependymu se však mohou vzácně vyskytovat v podkoží oblasti kostrče i bez jakýchkoli mak- roskopicky zjevných defektů (5, 6).

Myxopapilární ependymom roste velmi pomalu a může být přítomen po mnoho let (9). V naprosté většině případů se chová pouze lokálně agresiv- ně - může recidivovat (i opakovaně) (4, 10), zvlášt- ě při neúplném odstranění (jako tomu bylo v našem případě). K metastazování dochází v 17% případů (10-12) - v nádoru je zpravidla prokázá- na anaplastická komponenta. Přítomnost této komponenty je proto také indikací k provedení pooperační aktinoterapie lůžka nádoru. V pre- zentovaném případě nebyly známky anaplastické transformace zastíženy. V případě, že nádor pro- růstá do kosti, může resekce kostrče radikálně sní- žit riziko recidivy (ze 71% na 0%) (13).

Klinická diferenciální diagnostika zahrnuje zejmé- na pilonidální sinus či cystu a dále sakrokokcyge- ální teratom (11, 14, 15). Histopatologicky je nut- no diferenciálně diagnosticky vyloučit dvě skupiny lézí (11). Jsou to jednak neuroektoder- mální nádory (astrocytom, paragangliom s pseu- dopapilární myxoidní degenerací, primitivní neu- roektodermální tumor (PNET) s ependymální diferenciací) a dále vaskulární léze (na kterou bylo pomýšleno na prvním pracovišti). Z vaskulárních lézí by mohla připadat v úvahu intravaskulární endoteliální proliferace (Masson), např. v organi- zujícím se starším hematomu a dále endoteliální nádory, zejména dobře diferencovaný hemangio- sarkom. Proti diagnóze hemangiosarkomu však svědčí zejména malá buněčná polymorfie a chy- bění mitóz. Proti Massonově endoteliální proli- feraci svědčí charakter cytoplazmy buněk - ty jsou zde často kubické a místy vysloveně cylindrické, což prakticky vylučuje možnost, že se jedná o endotelie. Jako nejspolehlivější se v tomto pří- padě ukazuje být imunohistochemie - vaskulární markery jsou zcela negativní, zatímco silná a dis- perzní exprese GFAP je prakticky diagnostická pro myxopapilární ependymom (12, 16).

Jsou popsány i případy, kdy byl tento nádor v sak- rokokcygeální oblasti diagnostikován i tenkojeh- lovou aspirační cytologií; vzhledem k vzácnosti těchto případů se však nelze divit, že může být pomýšleno na lézi jinou, jako např. sakrokokcy- geální teratom či PNET.

Prezentovaný případ názorně ilustruje někdy opo- míjené pravidlo, že jakákoliv tkáň či patologická struktura, byť na první pohled působící zcela banálním dojmem (krevní koagula, hnis, vazivo či tuková tkáň) by měla být zaslána k histologic- kému vyšetření. Jen tak lze předejít prodlevám ve stanovení diagnózy u některých klinicky neob- vyklých nádorových i nenádorových afekcí.

Literatura

1. Timmerman W, Bubrick MP. Presacral and postsacral extraspinal ependymoma. Report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 1984; 27(2):114-119.
2. Moelleken SM, Seeger LL, Eckardt JJ, Batzdorf U. Myxopapillary ependymoma with extensive sacral destruction: CT and MR findings. *J Comput Assist Tomogr* 1992; 16(1):164-166.
3. Metcalf JS, Balentine JD, Maize JC. Myxopapillary ependymoma of the cauda equina with extension to the skin of the sacrococcygeal region. *Am J Dermatopathol* 1984; 6(3):249-257.
4. Prins BA, Landsman JN. Sacrococcygeal myxopapillary ependymoma. *Neth J Surg* 1989; 41(2):47-48.
5. Pulitzer DR, Martin PC, Collins PC, Ralph DR. Subcutaneous sacrococcygeal („myxopapillary“) ependymal rests. *Am J Surg Pathol* 1988; 12(9):672-677.
6. Bale PM. Ependymal rests and subcutaneous sacrococcygeal ependymoma. *Pathology* 1980; 12(2):237-243.
7. Bouvier R, Frappaz D. A preterm infant with an extradural myxopapillary ependymoma component of a teratoma and high levels of alpha-fetoprotein. *Pediatr Hematol Oncol* 1999; 16(6):569-572.
8. Hany MA, Bouvier R, Ranchere D *et al.* Case report: a preterm infant with an extradural myxopapillary ependymoma component of a teratoma and high levels of alpha-fetoprotein. *Pediatr Hematol Oncol* 1998; 15(5):437-441.
9. Wahl RW. Fine-needle aspiration of metastatic sacrococcygeal myxopapillary ependymoma. *Diagn Cytopathol* 1986; 2(3):261-263.
10. Kline MJ, Kays DW, Rojiani AM. Extradural myxopapillary ependymoma: report of two cases and review of the literature. *Pediatr Pathol Lab Med* 1996; 16(5):813-822.
11. Helwig EB, Stern JB. Subcutaneous sacrococcygeal myxopapillary ependymoma. A clinicopathologic study of 32 cases. *Am J Clin Pathol* 1984; 81(2):156-161.
12. Kindblom LG, Lodding P, Hagmar B, Stenman G. Metastasizing myxopapillary ependymoma of the sacrococcygeal region. A clinicopathologic, light- and electronmicroscopic, immunohistochemical, tissue culture, and cytogenetic analysis of a case. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 1986; 94(2):79-90.
13. Aktug T, Hakguder G, Sarioglu S, Akgur FM, Olguner M, Pabuccuoglu U. Sacrococcygeal extraspinal ependymomas: the role of coccygectomy. *J Pediatr Surg* 2000; 35(3):515-518.
14. Akpolat N, Bozlak N, Kazez A, Koseogullari AA. Sacrococcygeal extraspinal ependymoma: a case report. *Turk J Pediatr* 2003; 45(3):276-279.
15. Agapitos E, Kavantzias N, Karaitianos J, Davaris P. Subcutaneous sacrococcygeal myxopapillary ependymoma. A case report. *Arch Anat Cytol Pathol* 1995; 43(3):157-159.
16. Matsuo K, Kumagai K, Kawai K, Tsuchiyama H. Subcutaneous sacrococcygeal myxopapillary ependymoma. A case report and review of the literature. *Acta Pathol Jpn* 1985; 35(4):925-931.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MZO 00179906.

informace

Gynekologicko-porodnická klinika I. LF UK a VFN v Praze

pořádá

v sobotu 5. listopadu 2005 od 9.00 hodin

v posluchárně Gynekologicko-porodnické kliniky, Apolinářská 18, Praha 2,

onkologický seminář U Apolináře na téma **KARCINOM DĚLOŽNÍHO TĚLA**

Absolventi kurzu obdrží certifikát podle Stavovského předpisu č. 16 ČLK.

Vaše přihlášky, prosím, zasílejte na adresu: Děkanát I. LF UK – odd. doškolování lékařů, Kateřinská 32, 121 08 Praha 2, e-mail: eva.svobodova@lf1.cuni.cz nebo vzdělavani.lekaru@lf1.cuni.cz, tel. + fax: 224 965 675, mobil: 732 146 799.

MOŽNOSTI A MEZE CHIRURGICKÉ LÉČBY DUKTÁLNÍHO KARCINOMU MLÉČNÉ ŽLÁZY IN SITU (DCIS)

POSSIBILITIES AND LIMITATIONS OF SURGICAL TREATMENT OF DUCTAL CARCINOMA IN SITU OF THE BREAST

JANDÍK P.

CHIRURGICKÁ KLINIKA FN HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn: Autor prezentuje současný chirurgický přístup a následné možné terapeutické modalitty u pacientek s DCIS. Je uvedena klasifikace dle VNPI (Van Nuys Prognostic Index). Je definován základní onkochirurgický požadavek na operační výkon ve smyslu „tumor free margins“. Je diskutována detekce a vyšetření sentinelové uzliny SLB (Sentinel Lymphnode Biopsy) u této léze. Je zmíněna změna epidemiologických údajů DCIS vlivem mammografického screeningu.

Klíčová slova: DCIS – epidemiologie – chirurgie – sentinelová uzlina

Summary: Author presents current surgical management and consequent therapeutic methods in DCIS. A classification according to VNPI (Van Nuys Prognostic Index) is shown. Author defines basic oncological requirement for the surgical procedure – tumor free margins. He discusses detection and examination of SLB (Sentinel Lymphnode Biopsy) in patients with this lesion. He mentions a change in epidemiological data of DCIS due to mammographic screening.

Key words: DCIS – epidemiology – surgery – sentinel lymphnode

Úvod

DCIS je neinvazivním karcinomem prsní žlázy – v Mezinárodní klasifikaci nádorů je uveden pod symbolem D 05 a nikoliv jako C 50. V klinické praxi však k němu přistupujeme jako k reálnému karcinomu. Hlavním důvodem je významná možnost zvratu na invazivní karcinom (C 50). U lobulárního karcinomu in situ – LCIS – je tato možnost velmi malá, přestože obecně je lobulární neoplazie v invazivní formě považována za velmi závažnou. Riziko maligního zvratu u LCIS je cca 1% ročně od data stanovení této diagnózy (San Antonio, 2004). LCIS je pokládán za projev onkologické nestability mléčné žlázy, vyžadující kontrolu, event. chemoprevenci. /17/ Fisherovy a Silversteinovy práce upřesnily názor na rozsah onkologické péče. Konkrétně na rozsah primárního chirurgického výkonu, event. nutnosti následné radioterapie nebo adjuvantní systémové chemoterapie. Další studie jejich závěry potvrdily (EORTC trial 10853, NSABBP – B – 17). Nutno však připomenout, že DCIS je heterogenní nádorová léze. Existuje proto i řada názorových kontroverzí a v současné klinické praxi není k němu jednotný terapeutický přístup. /1,2/

Chirurgická léčba

Je primární, má dominující postavení, své zásady a meze, jak tuto lézi samostatně zvládnout. Respekt této reality je bezpodmínečný, neboť souvisí s dalším průběhem a prognózou vlastního onemocnění.

A. Radikální modifikovaná mastektomie bez disekce axily – dříve převládala a v podstatě byla metodou volby. Lokální recidiva po mastektomii se uvádí v 0-1% případů. Prakticky u 100% DCIS takto léčených docházelo k trvalému vyléčení, ale za cenu mutilujícího výkonu. I v současnosti má mastektomie své indikace:

- multicentricita (1-2% DCIS)
- rozsáhlý unicentrický DCIS

- opakovaně pozitivní okraje po BCS
- rozsáhlé mikrokalifikace kolem nádoru
- recidiva
- předpokládáný špatný kosmetický efekt po BCS

B. BCS (Breast Conserving Surgery), prs šetřící výkony. Tento druh chirurgické léčby je na podkladě výsledků proběhlých studií jednoznačně preferován. Ukazuje se však, že ne všichni pacienti jsou pro BCS vhodnými kandidáty (viz bod A). /1,2,3/

Striktním a bezpodmínečným onkochirurgickým požadavkem jsou „tumor free margins“ /4,5/. Histologická klasifikace okrajů resekátu /6/:

1. okraje čisté a zdravé bez DCIS
a/ zavžené – čistý okraj do 1 mm
b/ negativní – čistý okraj více než 1 mm
2. okraje pozitivní – s DCIS
a/ fokálně pozitivní – kontakt nádoru v okraji resekátu méně, než na třech místech
b/ extenzivně pozitivní – mnohočetné kontakty nádoru v okraji resekátu. Pozitivní okraje vyžadují reexcizi. Frekvence těchto reexcizi je vysoká a osciluje mezi 45-60%. Příčinou je skutečnost, že nádor není hmatný a chirurg má tak ztíženou orientaci. Z toho důvodu se doporučuje peroperační vyšetření okrajů resekátu pomocí RTG a biopsie /7/.

Detekce, odstranění a vyšetření sentinelové uzliny u DCIS je dodnes otevřeným problémem. Metastatické postižení spádových axilárních uzlin u DCIS se uvádí v 1-2% a v literatuře lze najít nejedno tvrzení, že DCIS nemá dostatečný potenciál metastazovat /8/. Přesto např. práce Coxe ukázaly, že mapování lymfatického systému spádové axily je přínosné a to hlavně při stanovení mikrometastáz /9/. Vyšetření sentinelové axilární uzliny je výkon miniinvazivní. V současnosti (San Antonio,

2004) je konsensus jej provádět v případě komedonového DCIS, u high - grade typu a je-li DCIS větší než 3 cm /17/.

Diskuse

EUSOMA (European Society of Mastology) definuje DCIS jako maligní transformaci epiteliální výstelky ductu s neporušenou bazální membránou, bez známek invaze do okolí. Patologové v současnosti prezentují pojem DCIS s mikroinvazí. Ta je chápána jako penetrace nádorových buněk z ductu přes bazální membránu do bezprostředního okolí parenchymu na vzdálenost menší než 0,1 mm /4,5/.

I když se uvádí, že většina DCIS se vyskytuje především v menopauze, výsledky mammografického screeningu však ukazují na významnou incidenci i v nižších věkových kategoriích. Skorovací systémy hodnotí výskyt DCIS u žen pod 35 let věku jako významný nepříznivý prognostický faktor. Pokud není prováděn mammografický screening je detekce DCIS nahodilá. V zemích s fungujícím screeninem představuje DCIS nejméně 20% všech

C 50. Jak vyplývá z četných sdělení auditu jednotlivých pracovišť mammografického screeningu i v ČR detekce DCIS významně povýšila /10,11,12/.

DCIS není homogenní patologicko-anatomickou jednotkou a tak můžeme v praxi registrovat stále hledání optimálních terapeutických postupů. Původní Hollandovo základní dělení DCIS dle gradingu na dobře, středně a níže diferencovaný typ bylo nahrazeno novou patologickou klasifikací Silversteina na typ non high-grade a high-grade, bez nekrozy nebo s nekrozou /13,14/. V klinické praxi se setkáváme s rozparem výsledků předoperační core-cut biopsie s definitivní biopsií pooperační. Tato kontroverze je celkem logická, neboť patolog může z chirurgického preparátu učinit přesnější závěry, než z malého množství tkáně získané punkční metodou. Není ojedinělé, když je přítomen invazivní C 50 a původně zjištěný DCIS je nálezem satelitním, přidruženým. To však má své konsekvence pro další terapeutický postup včetně chirurgické léčby.

Požadavek čistých resekcí okrajů je zásadní a bezpodmínečný. Pozitivní kontakty DCIS v okrajích resekcí jsou indi-

kačí k reoperaci. Reexcizi si vyžádá asi polovina konzervativních, prs šetřících chirurgických výkonů. Pozitivní kontakty DCIS v resekcí okrajích představují významný prediktivní faktor prognózy. Prevence lokální recidivy je nutná, neboť 40-50% recidiv nemá jen charakter DCIS, ale invazivního C 50 s metastatickým potenciálem 10-20% /15/. Jako praktický a přehledný pro onkologickou léčbu se jeví skórovací systém VNPI (Van Nuys Prognostic Index) v kalifornské modifikaci. Respektuje velikost a grading tumoru, stav okrajů resekcí a věk pacienta. Na základě dosaženého skóre je indikován rozsah onkologické péče. (Tab. 1, Tab.2)

Jako vše má i tento systém svoji opozici a kritiky /16/.

Tab. č. 1. USC / VNPI – skórovací systém.

Skóre	Patologická klasifikace	okraje	T	Věk
1	non-high grade bez nekrozy	10 mm	15 mm	61 >
2	non-high grade s nekrozou	1-9 mm	do 40 mm	40 - 60
3	high grade	< 1 mm	> 40 mm	< 40 let

Tab. č. 2. Léčebný postup podle skóre USC/VNPI.

Skóre	Dostačující léčba
4-6	BCS
7-9	BCS + radioterapie
10-12	mastektomie

Závěr

vlivem úspěšně probíhajícího mammografického screeningu bude počet zjištěných DCIS narůstat. Je nezbytně nutná těsná, tvořivá a racionální spolupráce všech členů mammologického týmu. DCIS není problém okrajový, má svá úskalí a specifickou problematiku. Chirurgická péče má sice dominantní postavení, ale je limitována. Je prostor pro další terapeutické možnosti. Chirurg a onkolog tyto skutečnosti musí respektovat.

Literatura

1. Bojler N., Peterse J.L., Duchateau L., et al.: Risk factors for recurrence and metastases after breast conserving therapy for ductal carcinoma in situ: Analysis of European Organisation for Research and Treatment of Cancer Trial 10853. J Clin Oncol, 2001, roč. 19, s. 2263-71
2. Fisher B., Digman J., Wolmark N., et al.: Lumpectomy and radiation therapy for the treatment of intraductal breast cancer: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-17. J Clin Oncol, 1998, roč. 16, č. 2, s. 441-52
3. Bijker N., Peterse J.L., Duchateau L., et al.: Breast conserving treatment for ductal carcinoma in situ, analysis of EORTC trial 10853. Eur J Cancer, 2000, roč. 36, s. 18-22
4. Schwarz G.I., Solin L.J., Olivetto I.A., et al.: Consensus Conference on the Treatment of in Situ Ductal Carcinoma of the Breast. Cancer, 2000, roč. 88, č. 9, s. 946-54
5. Rutgers E.J.Th.: Quality control in the locoregional treatment of breast cancer. EUSOMA Guidelines. Eur J Cancer, 2001, roč. 37, č. 8, s. 447-53
6. Blamey R.: The impact of surgical margins on the outcome of breast conserving therapy. Eur J Cancer, 2000, roč. 36, Suppl. 65
7. Chagpar A., Yen T., Sahin A., Hunt K.K., et al.: Intraoperative margins assessment reduces reexcision Rates in patients with ductal carcinoma in situ treated with breast conserving surgery. Am J Surg, 2003, roč. 186, s. 371-7

8. Zelis J.J., Brenda J., Satanello S., et al.: Do not contemplate invasive surgery for ductal carcinoma in situ. Am J Surg, 2002, 184, s. 348-9
9. Cox C.E., Gray R.J., Nguyen K., et al.: Importance of lymphatic mapping in ductal carcinoma in situ (DCIS): Why map DCIS? Am Surg, 2001, roč. 67, s. 513-21
10. Abrahámová J., a kol.: Atlas nádorů prsu. Praha: Grada-publ., Avicenum, 2000, s. 326
11. Silverstein M. J.: The Van Nuys/USC experience by treatment-ductal carcinoma in situ of the Breast. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2002, pp. 337-42
12. Bartoňková H., Svobodník A., Klimeš I.: Mammografický screening. Vybrané otázky z onkologie VII. Praha: Galén, 2003, s. 152
13. Holland R., Peterse J., Millis R.R., et al.: Ductal carcinoma in situ: A proposal for a new classification. Semin. Diagn Pathol, 1994, č. 11, s. 167-80
14. Silverstein M.J., Lagios M.D., Craig P.H., et al.: The Van Nuys Prognostic Index for ductal carcinoma in situ. Breast J., 1996, 2, s. 38-40
15. Silverstein M.J.: An argument against routine use of radiotherapy for ductal carcinoma in situ. Oncology, 2003, č. 11, s. 1511-33
16. Roland G.P., Chan K.C., Roberts S.A., et al.: Value of the Van Nuys Prognostic Index in prediction of recurrence of ductal carcinoma in situ after breast-conserving surgery. Br J Surg, 2003, č. 4, s. 426-32
17. Lippman M.E., et al.: San Antonio Breast Cancer Symposium. Breast Cancer Res Treat, 2004, 88, Suppl 1

SONDA DO PSYCHOLOGICKÉ SITUACE ONKOCHIRURGICKÉHO PACIENTA

PROBE INTO PSYCHOLOGICAL SITUATION OF AN ONCOLOGICAL PATIENT IN SURGERY

JANDÍK P.

CHIRURGICKÁ KLINIKA FN HRADEC KRÁLOVÉ

Souhrn: Podpůrné psychologické aktivity u onkologicky nemocných představují součást multimodální onkologické péče. V praxi se jeví jako nezbytně nutné, jejich absence je nepřijatelná. Autor vychází z dlouhodobých zkušeností na klinickém pracovišti, kde je tradičně velká frekvence onkochirurgických pacientů se solidními nádory. Metodou dotazníku oslovil 100 pacientů se zhoubnými nádory kolorekta nebo prsní žlázy. Sdělení hodnotí jednotlivé aspekty psychologického supportu v určitých fázích onemocnění. Je prezentován vliv lůžkové stanice, operačního sálu a specializované ambulantní poradny. Výsledky průzkumu ukazují na rezervy v možnosti vytváření protistresových bariér. Jsou uvedeny některé závažné chyby verbálních produkcí zdravotníků při komunikaci s onkologickým pacientem.

Klíčová slova: psychologický support, onkochirurgický pacient, chyby, možnosti ve slovní komunikaci

Summary: Supporting psychological activities in oncological patients represent a part of multimodal oncological treatment. In our experience they appear absolutely necessary, their absence is unacceptable. The author builds on long time experience from a clinical department with high frequency of oncological patients with solid tumors. In form of an inquiry he addressed one hundred patients with colorectal and breast malignancies. This article evaluates various aspects of psychological support in certain stages of the malignant disease. Influence of inpatient department, operating room and specialized clinics are presented. The results of our inquiry show a lack in our efforts to generate anti-stress barriers. Several significant errors in verbal communication with the oncological patient are mentioned.

Key words: psychological support, oncological patient in surgery, errors and possibilities in communication

Úvod do problematiky

Zdraví je pro člověka přirozeným stavem, nemoc představuje opak. Naše populace je nyní celkem dobře informována o základních onkologických faktech. Tato ji významně stigmatizují /1/. Nádorová onemocnění provázejí život od jeho vzniku, takže by teoreticky nemělo jít o něco mimořádného /1,2/. Avšak stoupající incidence nádorových chorob a dlouhodobě nepříznivý trend křivky jejího vývoje způsobují, že stále více lidí má praktickou osobní zkušenost s maligním onemocněním, nebo se s malignitou setká ve svém bezprostředním okolí. Dále je tu skutečnost, že stále u většiny maligních chorob neznáme příčinu jejich vzniku. Jejich léčba je velmi náročná a komplikovaná, často s nejistými, či špatnými výsledky /6,7/.

Výskyt zhoubných nádorů v naší populaci představuje velmi důležitý ukazatel jejího zdravotního stavu /2/. Vývoj je nepříznivý především u solidních nádorů-kolorekta a prsní žlázy. V podvědomí většiny lidí je zakotveno magické a nesmírně stresující slovo „RAKOVINA“ jako reálné ohrožení, či dokonce ukončení jejich života /3,4,8/. Obava z reálné možnosti onemocnět zhoubným nádorem je dnes veliká. Stále častěji slyšíme od pacientů otázky, proč zrovna já jsem onemocněl nádorem, kde se stala v životě chyba, o co vlastně jde, jak k tomu došlo a kdo za to může? Stále více lidí si uvědomuje, že *zdraví sice není úplně vším, ale všechno ostatní bez zdraví, že je ničím* /5,7,8/.

Onkologická diagnóza se odrazí zásadním způsobem v psychice pacienta a zpravidla i jeho nejbližších. Je nutné s tímto faktem počítat a přizpůsobit tomu odpovídající kvalitu komunikace. Jde především o kvalitní verbální produkce a správné obratnosti při sdělení diagnózy a v jednotlivých fázích léčby, či v období dispenzarizace nebo terminálního stavu choroby /5/. Případné chyby v psychologickém supportu zhorší celkovou situaci našich pacientů zpravidla významným způsobem.

Vlastní pozorování

Formou anonymního dotazníku jsme oslovili 100 pacientů s maligním nádorem kolorekta nebo prsní žlázy. Dotazy směřovaly na základní aspekty ovlivňující psychologickou situaci našich nemocných. Odpovědi byly hodnoceny se záměrem na potencionální možnosti psychologické podpory.

a/ informovanost pacienta

- 92% dotázaných vyžadovalo úplnou informaci o chorobě – diagnóze a její prognóze, 8% takovou informaci znát nechtělo
- 94% chtělo být seznámeno se způsobem, možnostmi a pravděpodobnými výsledky léčby
- 85% vyžadovalo informaci o vyšetřovacích metodách, riziku jejich provedení a sdělení výsledků vyšetření
- 97% trvalo na základní informaci od ošetřujícího lékaře nebo přednosty kliniky, pouze ve 3% by preferovali informaci od nejbližších příbuzných
- 100% dotazovaných požadovalo sdělení formou ústní
- 73% potřebovalo informaci o diagnóze a léčbě nezbytně pro zajištění osobních záležitostí v rodině, zaměstnání a majetkových věcí (*Graf č. 1.*)

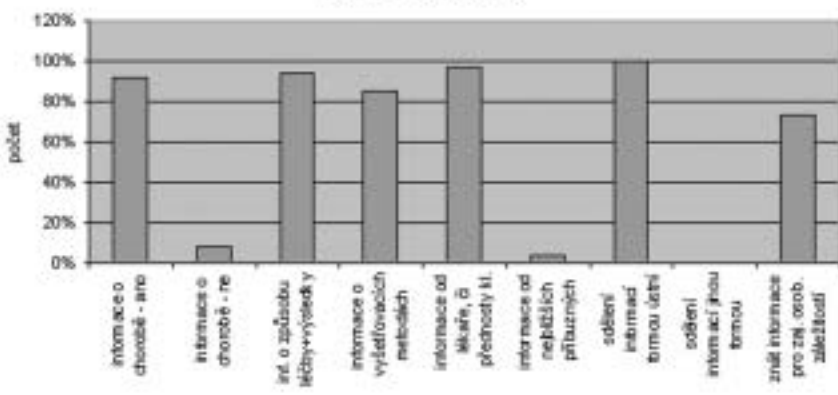
Všichni respondenti považovali základní i průběžnou informovanost za zásadní pro získání a udržení důvěry ve zdravotnické zařízení, zdravotníky a jako nezbytný předpoklad spolupráce v době léčby a dispenzarizace.

b/ soukromí

- 21% pacientů uvedlo, že na lůžkové části kliniky nebo v ambulantní poradně nemělo dostatek osobního soukromí, nebo toto bylo během jejich pobytu narušeno
- 67% vyžadovalo o všem podstatném soukromý rozhovor, 33% by u informace uvítalo přítomnost nejbližších příbuzných

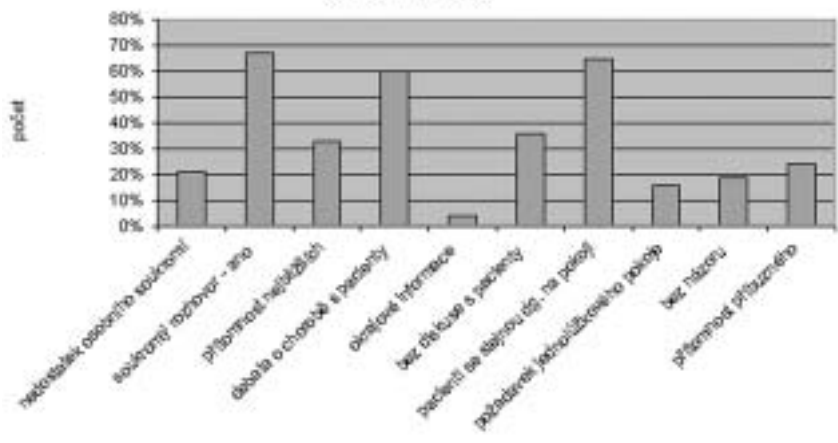
Graf č. 1.

Informovanost pacienta



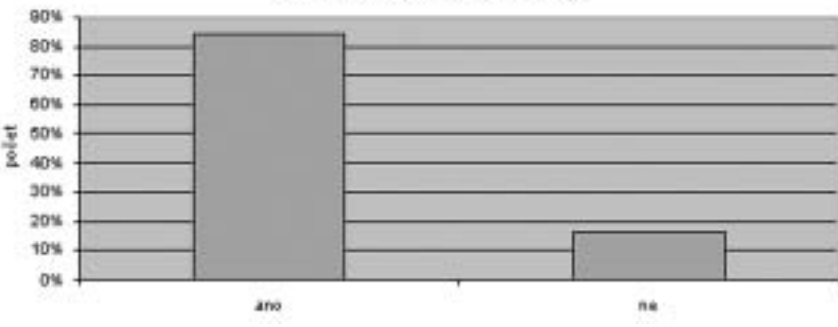
Graf č. 2.

Soukromí pacienta



Graf č. 3.

Volba ošetřujícího lékaře a sestry



- 60% dotázaných se o své chorobě podrobněji bavilo s dalšími pacienty, 4% jen okrajově, 36% takovou debatu odmítlo
- 65% by preferovalo být na pokoji se stejně postiženým pacientem, 16% by naopak volilo pokoj jednolůžkový, 19% nemělo vyhraněný názor
- 24% by využilo možnosti souběžné hospitalizace blízkého příbuzného (Graf č. 2.)
- Lze konstatovat, že pacienti jednoznačně preferují dodržování soukromí. O své chorobě vedou hovory za účelem získání co největšího množství informací. Je patrná i silná vazba na nejbližší příbuzné a požadování jejich přítomnosti.

c/ pacient-sestra-lékař

- jednoznačná preference odbornosti, slušnosti a přirozené komunikace
- požadavek na naslouchajícího, chápaního zdravotníka
- jen 16% pacientů by nevyužilo možnosti volby ošetřujícího lékaře a sestry, absolutní většina volbu „svého lékaře a sestry“ vyžadovala (Graf č. 3.)

d/ operační sál

- 9% dotázaných uvedlo po příchodu na operační sál pocit duševního klidu – dočkali se chirurgického výkonu, operace pro ně znamenala předpoklad uzdravení

- 91% mělo strach a depresi z neznámého prostředí, dominovala obava z vlastního operačního výkonu
- 14% upozornilo na rušivé vlivy, které se na operačním sále a předšlaly za dobu jejich pobytu vyskytly /hluk, smích, křik atp./
- 23% registrovalo „nevhodný obsah“ konverzace zdravotnického personálu /dovolená, program víkendů, televize atp./ - shoda na pocitu odcizení a chybějící empatie zdravotníků vůči své osobě a nemoci
- 84% dotazovaných hodnotilo návštěvu anesteziologa před operací jako akt uklidnění s výrazným potlačením původní obavy z narkózy (Graf č. 4.)

Hodnotili jsme období pobytu pacienta v předšlaly a na operačním sále až do samého úvodu celkové anestezie. Všichni pacienti byli řádně premedikováni, přesto registrovali rušivé elementy a nevhodné verbální projevy.

e/ specializovaná onkochirurgická poradna

- 19% uvedlo malý časový prostor pro sdělení svého stavu a jeho změn
 - 22% avizovalo nedostatek soukromí a výhrady k lokalitě ordinace /průchozí místnost/
 - 37% reklamovalo delší čekací dobu na vlastní vyšetření
 - 52% pacientů registrovalo přítomnost určité sestry a lékaře,
 - 62% preferovalo objednání vyšetření na určitou dobu
- Podobné výhrady pacientů vůči složce ambulantní jako k lůžkové stanici. (Graf č. 5.)

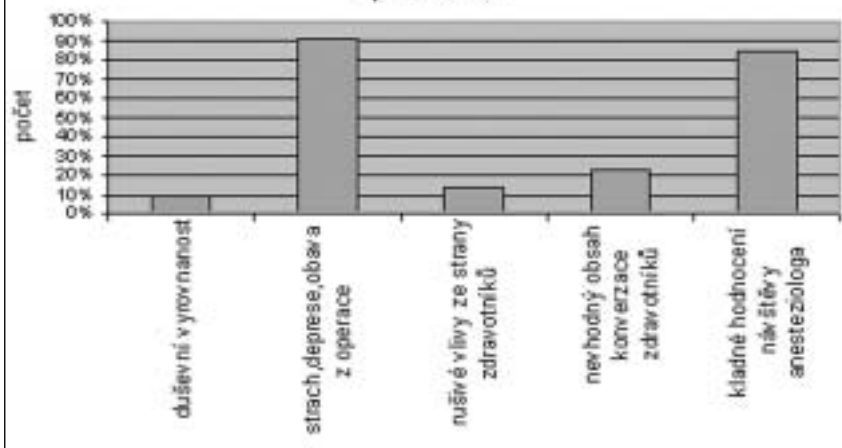
Diskuse

Maligní nádorová onemocnění významně stresují současnou lidskou populaci. Svým zdravotním a sociálně-ekonomickým dopadem se dotýkají nejen jedince samotného a jeho rodiny, nýbrž jsou problémem celé společnosti /2,6/.

Když nemoc přijde a dosud zdravý člověk se stane onkologickým pacientem, leccos se změní. Diagnóza zhoubné nádorové choroby dopadne bezprostředně na psychiku pacienta i jeho blízkého okolí a psychiku podstatným způsobem změní. Navíc jako mýtus převládá názor o nevyčleptelnosti choroby a nutnosti blízké smrti /8/. Velkou roli hraje typ osobnosti pacienta. Stupeň změny psychologického stavu koreluje s celkovým stavem pacienta a ovlivňuje i úspěšnost /neúspěšnost/ onkologické léčby. Proto je psychologická podpora v onkologii nanejvýš potřebná. Je nutné ji provádět na všech liniích onkologické činnosti – prevenci, skríningu, v době stanovení a sdělení diagnózy,

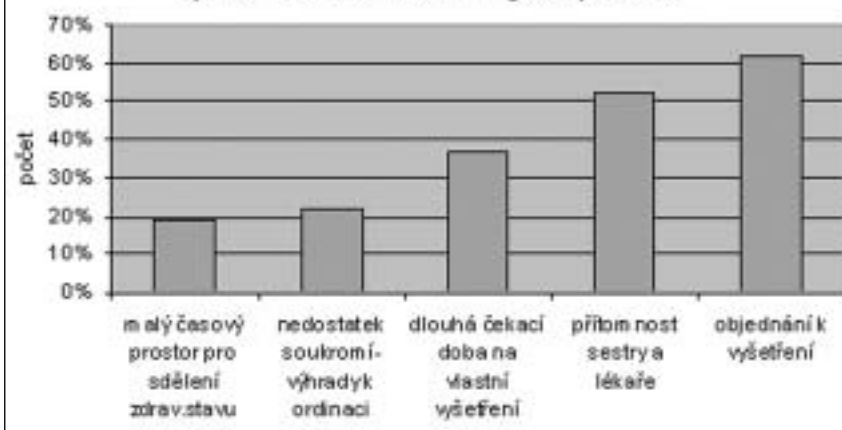
Graf č. 4.

Operační sál



Graf č. 5.

Specializovaná onkochirurgická poradna



v období vlastní terapie i remise choroby, dispenzarizace i v terminální fázi onemocnění /6,7,8/.

Postavení a práva pacienta, zdravotní sestry, či bratra a lékaře jsou vyjádřeny v příslušných kodexech. Je v nich zakotvena i požadovaná úroveň etiky a nutnost jejího dodržování /5/. Onkologická praxe však není jen pouhé dodržování kodexů. Denně prověřujeme nejen naši odbornost, ale i trpělivost a schopnost komunikace. Jsme nuceni často postupovat individuálně. Zpravidla nelze použít univerzální postupy.

Tím je situace pro zdravotníky náročnější. Mnohé může komplikovat komunikačně primárně obtížný typ osobnosti pacienta. Nesnáze bývají s typem hypochondrickým, podezřivým, hysterickým, úzkostlivým, či s jedincem uzavřeným – s primárním sklonem ke smutku /1,3,4/. Velkou úlohu má pacientova inteligence, vzdělání, celková orientace a věk. Pro zdravotníka může být nezdůvodněnější komunikovat s rodinou, než s pacientem samým. Problematika je velmi široká, ale v odborném písemnictví se lze poučit a nalézt pomoc /5,6,7,8,9/.

Zdravotníci se dopouštějí v komunikaci řady chyb. Mezi nejčastější patří bagatelizace symptomů primární choroby, či její recidivy. Jindy jde o vnučování „reálných nadějí“ tam, kde to reálně není. **Samotné naděje na další život je nutné věnovat výraznou pozornost.** Především lékař sám na podkladě znalostí o chorobě up to date by měl vědět, co je naděje reálná,

částečně reálná a co pro danou chorobu a její stadium je již iracionální a nemožné /3,5/.

Zdravotnický pracovník onkologických oborů by měl znát principy diagnostických a léčebných metod a sám musí být přesvědčen o nutnosti a správnosti jejich aplikace. Lékař by si měl udržet dominantní pozici v linii lékař – sestra – pacient. Lékař a sestra by neměli vnášet příliš osobních pocitů, osobních zkušeností a slibů do komunikace s pacientem. Nesprávnými informacemi lze pokazit i do budoucna mnohé již na samém počátku. Stejně tak zásadní chybou je, když se zdravotníci psychologickému problému pacienta vyhnou tím, že se vyhýbají komunikaci, nemají dostatek empatie a někdy i taktu. Situace může být ovlivněna únavou a opotřebováním zdravotnického personálu /3/. Nermalou úlohu hraje dosud stále trvající nedůstojné postavení zdravotníka ve společnosti a pozice zdraví v její kategorii hodnot. Nutno také uvést, že rehabilitace změněné psychiky onkologického pacienta není jen věcí zdravotníků samých. Zúčastnit se jí musí též blízké a širší okolí, včetně specializovaných klubů a společenských institucí /klub stomiků, po operaci prsu atp./ Je zapotřebí, aby pacient našel motivaci k dalšímu čínorodému a -pokud to jde- plnému životu, byť někdy v nových podmínkách /3,4,7/.

Chybnými verbálními produkcemi a neobratností v komunikaci, či embargo na psychologický support onkologického pacienta, můžeme velmi lehce vytvořit prostor pro léčitele, šarlatány a podvodníky. Ti dodnes za své jednání a především „podnikatelské alternativní postupy“ nenesou praždnou odpovědnost a rizika, včetně odpovědnosti právní. Velká zdravotnická centra nabízejí úzce specializovanou a špičkovou onkologickou péči. Pokud se však nevěnují souběžně i ovlivňování změněné psychiky pacienta, může se stát, že iniciativu ze ně převezmou „jiní“ /7,9/.

V uvedeném pozorování našich nemocných jsem názorně uvedl, jak je onkologický pacient nesenzitivní. Špatně přijímá náš nezájem, nedostatek empatie a nedostatečný respekt své situace. Preferuje odborně zdatného, trpělivého zdravotníka se schopností mu naslouchat a s ním komunikovat /3,5,6,7/.

Závěr

Onkologická problematika v současné populaci je velice aktuální. Její řešení vyžaduje vysokou profesionální kvalitu a komplexní přístupy v oblasti diagnostické a léčebné. Jde o problematiku interdisciplinární. Součástí je i nezbytná psychologická rehabilitace pacienta se zhubným nádorem.

Je nezbytné dodržování etiky-mnoho záleží na dávce trpělivosti a schopnosti obou stran individuálně komunikovat. Chyby ovlivňují nepříznivě nejen psychiku pacienta, ale i jeho celkový stav a výsledek léčby.

Literatura

1. Riegel J.: Osobnost a emocionální problémy. Galén. 1978
2. Koutecký J.: Filosofie současné onkologické péče. Klin.onkol. 6,1989:163-168
3. Capponi V., Novák T.: Sám sobě psychologem.Grada. 1992
4. Murény J.: Moc podvědomí. Knižní klub. 1992

5. Haškovcová H.: Lékařská etika. Galén. 1994
6. Vorlíček J. a kol.: Paliativní medicína. Grada. 1998
7. Klener P., Vorlíček J.: Podpůrná léčba v onkologii. Galén. 1998
8. Haškovcová H.: Thanatologie. Galén. 2000
9. James Le Fanu: Vzestup a pád moderní medicíny. Academia. 2001

EXPRESSE ANTIGENU CD56 NA MALIGNÍCH PLAZMOCYTECH A KOSTNÍ POSTIŽENÍ U PACIENTŮ S MNOHOČETNÝM MYELOMEM

THE EXPRESSION OF CD56 ON MALIGNANT PLASMOCYTES AND BONE DISEASE IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

DOLEŽELOVÁ E.^{1*}, BÜCHLER T.^{1,2*}, FABIAN P.^{3,4*}, POUR L.¹, KŘEN L.³, MOULIS M.³, ADAM Z.¹, KREJČÍM I.¹, KRIVANOVÁ A.¹, HÁJEK R.^{1,2}

* první tři autoři přispěli k práci stejným dílem

¹ INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA, LF MU A FN BRNO

² ODDĚLENÍ KLINICKÉ HEMATOLOGIE, FN BRNO

³ PATOLOGICKO-ANATOMICKÝ ÚSTAV, LF MU A FN BRNO

⁴ ODDĚLENÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

S PODPOROU VÝZKUMNÉHO ZÁMĚRU MZČR 6526 9705. PRÁCE BYLA PREZENTOVÁNA NA 48. STUDENTSKÉ VĚDECKÉ KONFERENCI LÉKAŘSKÉ FAKULTY MASARYKOVY UNIVERZITY.

Souhrn: Mezi hlavní příčiny morbidit u mnohočetného myelomu patří osteolytická ložiska a osteoporóza. Antigen CD56 (NCAM – neuronal cell adhesion molecule) se podílí na interakcích mezi buňkami navzájem i mezi buňkami a strukturami extracelulární matrix. Cílem práce bylo zhodnotit význam exprese antigenu CD56 na buňkách mnohočetného myelomu, především jeho korelaci s kostním postižením a biochemickými markery. Sledovaný soubor tvořilo 35 pacientů s nově diagnostikovaným onemocněním a 12 pacientů s relapsem nebo progresí. Expresse CD56 byla stanovena v kostní dřeni získané trepanobiopsií pomocí monoklonální protilátky. Pacienti s expresí antigenu CD56 tvořili 74,5 % našeho souboru. Skupiny CD56+ a CD56- byly ekvivalentní, co se týká hodnot vybraných biochemických markerů (beta 2-mikroglobulin, vápník, albumin), procenta infiltrace kostní dřene, věku, pohlaví, stádia dle Durie-Salmona, stádia dle IPI a typu myelomu. Pozitivita CD56 signifikantně korelovala s nálezem osteolytických ložisek na RTG ($p=0,0006$) a s kostním postižením (definováno jako patologická fraktura nebo kostní ložisko vyžadující paliativní ozáření či chirurgickou intervenci) ($p=0,0339$). CD56 je tedy užitečným markerem úzce korelujícím s přítomností kostního postižení u pacientů s mnohočetným myelomem. Na rozdíl od RTG a jiných zobrazovacích metod, které nám ukazují spíše výsledný obraz kostního postižení, CD56 predikuje určité biologické vlastnosti myelomových buněk, ze kterých můžeme odvozovat jejich chování a tak i průběh onemocnění.

Klíčová slova: mnohočetný myelom, CD56, NCAM, osteolytická ložiska

Summary: Osteolytic lesions and osteoporosis are among the principal causes of morbidity in multiple myeloma (MM). CD56 (NCAM – neuronal cell adhesion molecule) is a molecule that has a role in interactions among cells and between cells and extracellular matrix. The objective of this study was to evaluate the correlations between the expression of CD56, bone disease, and selected biochemical and clinical parameters in MM. The study included 35 patients with newly diagnosed MM and 12 patients with relapse or progression of the disease. The expression of CD56 was detected in bone marrow biopsies using a monoclonal antibody. Malignant plasma cells expressed CD56 in 74.5 % of the patients. No statistically significant differences in selected biochemical markers (beta2-microglobulin, calcium, albumin), bone marrow infiltration, age, gender, myeloma type and stage (Durie-Salmon and IPI) have been found between the CD56+ and CD56- groups. The expression of CD56 correlated significantly with the presence of osteolytic lesions detected by x-rays ($p=0.0006$) and with the occurrence of bone events (pathologic fracture or a bone lesion requiring palliative radiotherapy or surgical intervention) ($p=0.0339$). Thus, CD56 is a useful marker that closely correlates with the presence of bone disease in patients with MM. In contrast to standard imaging, the expression of CD56 is related to certain intrinsic properties of malignant plasmocytes and, therefore, can predict the clinical course of myeloma bone disease.

Key words: multiple myeloma, CD56, NCAM, osteolytic lesions

ÚVOD

Kostní postižení patří k hlavním příčinám morbidit pacientů s mnohočetným myelomem (MM) (1). Incidence MM v ČR je u 3,8/100 000 obyvatel. Je to onemocnění vyššího věku – mezi 20. až 40. rokem je tato nemoc vzácná, ale ve věkové kategorii 75-79 let je její incidence u mužů až 25/100 000 obyvatel (2).

Od normálních plazmatických buněk se maligní plazmocyty liší především nekontrolovanou proliferací a dlouhověkostí plazmocytů, ale mají také odlišný imunofenotyp. Vykazují aberantní expresi nejrůznějších antigenních struktur, z nichž mnoho patří mezi adhezivní molekuly, které slouží k interakcím mezi buňkami navzájem i mezi buňkami a strukturami extracelulární matrix. Ovlivňují tak migraci a homing myelomových buněk, regulují proliferační i apoptotickou aktivitu a sekreci cytokinů. Mezi tyto molekuly patří antigen CD56 (NCAM – neuronal cell adhesion molecule), transmembráno-

vý glykoprotein patřící do imunoglobulinové rodiny (3,4). NCAM má značný vliv na interakci myelomových buněk se stromatem kostní dřene a na jejich specifickém usídlení v kostech a koreluje s výskytem osteolytických ložisek. NCAM není exprimován na normálních plazmatických buňkách. U pacientů s monoklonální gamapatií nejasného významu (MGUS), POEMS syndromem a plazmocelulární leukémií ho najdeme jen výjimečně (5,6). Je exprimován buňkami některých jiných tumorů, jako jsou neuroendokrinní tumory (včetně malobuněčného plicního karcinomu), neuroblastomy a osteosarkomy (3,4). Najdeme ho i na některých normálních buňkách, např. na Schwanových buňkách, gliálních buňkách, neuronech, na některých buňkách imunitního systému (NK buňky, část aktivovaných T-lymfocytů) a také na osteoblastech (3,4,6,7). Cílem naší studie bylo zjistit korelaci CD56 pozitivitu nebo negativitu s výskytem kostních ložisek a její vztah k ostatním markerům nádorové masy a prognózy u MM.

MATERIÁL A METODY

Pacienti

Sledovaný soubor tvořilo 47 pacientů – 35 pacientů s nově diagnostikovaným onemocněním a 12 pacientů s relapsem nebo progresí onemocnění. 32 pacientů s novou diagnózou, u kterých byla dostupná kompletní data, bylo hodnoceno detailně. Muži tvořili v této skupině 41 % a ženy 59%, medián věku v době diagnózy byl 61 let. Pacienti s expresí antigenu CD56 tvořili 74,5 % našeho souboru. Diagnóza a stadium onemocnění bylo stanoveno dle kritérií Durie-Salmona a podle systému IPI (1).

Sledování kostního postižení

Osteolytická ložiska byla zjišťována rentgenovým vyšetřením (RTG) lebky, cervikální, hrudní, lumbální a sakrální páteře, pánve, ramenních a stehenních kostí. Snímky byly popsány nezávisle na zjišťování CD56 pozitivitu. Kostní postižení bylo definováno jako patologická fraktura, nebo kostní ložisko vyžadující paliativní ozaření či chirurgickou intervenci.

Imunohistochemie

Vzorky kostní dřevě získané trepanobiopsií z lopaty kosti kyčelní byly fixovány a dekalifikovány, dále zpracovány rutinní parafinovou metodou, 4 µm silné řezy barveny hematoxylinem a eosinem. Myelomové buňky byly prokázovány pozitivní reakcí s monoklonální myší protilátkou anti-CD138 (DAKO, Glostrup, Denmark), ředění 1:500. Antigen CD56 byl detekován monoklonální myší protilátkou anti-CD56 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), ředění 1:100. K detekci primární protilátky byl použit kit En Vision (DAKO) značený peroxidázou. Za pozitivní příkaz exprese NCAM byl považován stav, kdy nadpoloviční většina myelomových buněk vzorku reagovala zřetelnou membránovou pozitivitou. Jako pozitivní vnitřní kontrola sloužily osteoblasty lemuující povrch trámčů spongiózní kosti, které normálně výrazně exprimují CD56.

Statistická analýza

Data byla hodnocena pomocí standardních neparametrických testů (Mann-Whitney U test, Wilcoxonův test). Korelace mezi expresí CD56, nálezem osteolytických ložisek na RTG a kostním postižením byly hodnoceny pomocí testu chi-square. Výpočty byly prováděny pomocí programu Statistica 6.1.

VÝSLEDKY

Mezi pacienty s novou diagnózou (n=35) byla exprese CD56 nalezena u 24 pacientů (69%), 11 pacientů (31%) bylo CD56-negativních. Mezi pacienty s relapsem nebo progresí (n=12) byla pozitivita CD56 nalezena u 11 pacientů (92%), pouze 1 pacient byl CD56-negativní.

U pacientů s novou diagnózou byla provedena podrobná analýza vybraných klinických a laboratorních markerů. Skupiny CD56+ a CD56- byly ekvivalentní, co se týká hodnot vybraných biochemických markerů (beta 2-mikroglobulin, vápník, albumin), procenta infiltrace kostní dřevě, věku i pohlaví, stádia dle Durieho a Salmona, stádia dle IPI a typu myelomu (Tabulka 1).

Osteolytická ložiska byla nalezena u 19 (59,4%) pacientů s novou diagnózou, u zbývajících 13 (40,6%) bylo RTG negativní. CD56 pozitivita signifikantně korelovala s pozitivním nálezem na RTG (p=0,0006). Expresí antigenu CD56 měla pro výskyt osteolytických ložisek podle RTG pozitivní pre-

Tabulka 1. Srovnání stádia a běžných biochemických a morfologických parametrů mezi pacienty s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem a expresí CD56 na plasmocytech a pacientů bez této exprese.

	CD56+	CD56-	P-value
Počet pacientů	21	11	–
Medián věku v době diagnózy (rozsah), roky	61(26-80)	61(33-68)	NS
Pohlaví Muži Ženy	10 11	3 8	NS
Stádium dle Durieho a Salmona I II III	7 4 10	6 1 4	NS
Subklasifikace dle Durieho a Salmona A B	21 0	10 1	NS
IPI stadium 1 2 3 Nezapočítaní	12 7 1 1	6 5 0 0	NS
Medián beta 2-mikroglobulinu v séru (rozsah), mg/l	2,82(1,51-7,62)	2,64(1,16-5,31)	NS
Medián sérového kalcia (rozsah), mmol/l	2,44(2,19-2,75)	2,39(2,00-2,80)	NS
Medián infiltrace kostní dřevě (rozsah), %	21,8(0,8-60,0)	19,1(10,0-83,0)	NS
Medián sérového albuminu (rozsah), g/l	37,1(22,4-48,0)	38(16,9-43,0)	NS

Tabulka 2. Srovnání výskytu osteolytických ložisek detekovaných rentgenologicky a kostního postižení (definováno jako patologická fraktura, nebo kostní ložisko vyžadující paliativní ozaření či chirurgickou intervenci) u pacientů s nově diagnostikovaným mnohočetným myelomem a expresí CD56 na plasmocytech a pacientů bez této exprese.

	CD56+	CD56-	P-value
Počet pacientů	21	11	
Osteolytická ložiska dle RTG přítomná nepřítomná	17 4	2 9	0,0006
Kostní postižení přítomné nepřítomné	14 7	3 8	0,0339

diktivní hodnotu (PPV) 0,81 a negativní prediktivní hodnotu (NPV) 0,82.

Kostní postižení, jak bylo definováno výše, mělo 17 pacientů (53%). CD56 pozitivita opět signifikantně korelovala s tímto nálezem (p=0,0339). PPV činila 0,67 a NPV 0,73 (Tabulka 2).

DISKUSE

Na rozdíl od jiných onemocnění s plasmocytoidní diferenciací (MGUS, některé non-Hodgkinské lymfomy) u MM dochází ke vzniku osteolytických ložisek (7). Osteolytická ložiska a osteoporóza jsou jedním z klinických příznaků MM a u pacientů s tímto onemocněním patří mezi hlavní příčiny morbidity. Expresí molekuly CD56 je v poslední době zkoumána jako kauzální a prediktivní parametr osteolytického potenciálu MM (7). Některé studie (7) ukazují, že molekula CD56 zprostředkuje interakci mezi myelomovými buňkami a osteoblasty. Osteoblasty samy vykazují stabilně silnou expresi CD56 antigenu a slouží také jako pozitivní vnitřní kontrola kontrola při určování CD56 pozitivních plasmocytů při imunohistochemickém vyšetření kostní dřevě. Molekuly NCAM plasmocytů vytváří s NCAM molekulami osteoblastů homodimery, které mohou způsobovat transdukcí signálů vedoucí ke snížení tvorby kostní matrix (7,8). To je jeden z možných mechanismů, který vede ke snížení počtu i aktivity osteoblastů u MM, jak bylo proká-

záno u pacientů s osteolytickými ložisky (7). Maligní buňky však neerodují kostní tkáň přímo, ale působí parakrinní cestou různými cytokiny (lymfotoxin, interleukin-1, interleukin-6 a makrofágové kolonie stimulující faktor) na osteoklasty, které stimulují k resorpci kosti (9). U těchto pacientů je tedy nejen zvýšený počet i aktivita osteoklastů (k čemuž dochází i u jiných onemocnění kostní dřeně – např. MGUS, B-lymfocytární NHL), ale i snížený počet a aktivita osteoblastů. Křehká rovnováha mezi kostní resorpcí a novotvorbou kosti je tak porušena a může docházet ke vzniku osteolytických ložisek typických pro MM (7).

Ukazuje se, že chybějící exprese CD56 na myelomových buňkách může predisponovat k vývoji extramedulárních ložisek a plazmocelulární leukémií (6,10). V jedné studii se dokonce zjistilo, že pacienti s CD56-negativním myelomem léčení konvenční chemoterapií mají horší prognózu (10).

Existují i studie pojednávající o solubilním antigenu CD56 (3,11), který byl nalezen spolu s dalšími prognostickými mar-

kery (beta 2-mikroglobulin, kalcium, albumin) v séru pacientů s MM. Tyto studie poukazují na to, že difúzní osteoporóza, která postihuje některé pacienty s MM, by mohla být způsobena tímto sérovým glykopeptidem. Naznačují i jeho využitelnost jako markeru difúzní osteoporózy u MM a spolu s dalšími sérovými markery v diagnostice, stagingu a monitorování MM (3,11).

Z naší studie vyplývá, že exprese CD56 by mohla být nezávislým faktorem predikujícím výskyt osteolytických ložisek a kostního postižení u pacientů s mnohočetným myelomem. Na rozdíl od RTG a jiných zobrazovacích metod, které nám ukazují spíše výsledný obraz kostního onemocnění, exprese CD56 určuje jisté biologické vlastnosti myelomových buněk, a můžeme z ní odvozovat jejich chování a tak i průběh onemocnění. Je možné, že v budoucnu bude přítomnost antigenu CD56 na maligních plazmocycitech indikací k zahájení chemoterapie v časných stádiích MM v rámci prevence vzniku patologických fraktur.

Literatura

1. Durie BG, Kyle RA, Belch A, et al. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J* 2003; 4: 379-98.
2. <http://www.uzis.cz>
3. Kaiser U, Oldenburg M, Jaques G, et al. Soluble CD56 (NCAM): a new differential-diagnostic and prognostic marker in multiple myeloma. *Ann Hematol* 1996; 73: 121-6.
4. Ong F, Kaiser U, Seelen PJ, et al. Serum neural cell adhesion molecule differentiates multiple myeloma from paraproteinemias due to other causes. *Blood* 1996; 87: 712-6.
5. Van Camp B, Durie BG, Spier C, et al. Plasma cells in multiple myeloma express a natural killer cell-associated antigen: CD56 (NKH-1; Leu-19). *Blood* 1990; 76: 377-82.
6. Pellat-Deceunynck C, Barille S, Jego G, et al. The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma. *Leukemia* 1998; 12: 1977-82.
7. Ely SA, Knowles DM. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *Am J Pathol* 2002; 160: 1293-9.
8. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, et al. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science* 1987; 236: 799-806.
9. Roodman GD. Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1921-5.
10. Sahara N, Takeshita A, Shigeno K, et al. Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma. *Br J Haematol* 2002; 117: 882-5.
11. Poley S., Stieber P., Nussler V., et al. Evaluation of serum neural cell adhesion molecule as a prognostic marker in multiple myeloma *Anticancer Res* 1997; 17: 3021-4.

KOMENTÁŘ K ČLÁNKU:

COMMENTARY ON THE ARTICLE:

Kovařík J.:

MŮŽE BÝT RADIOCHEMOTERAPIE LOKÁLNĚ POKROČILÝCH NÁDORŮ HLAVY A KRKU POVAŽOVÁNA ZA STANDARDNÍ LÉČBU?

Klinická onkologie 2005, 18, 1, 27-28.

PÁLA M.

ÚSTAV RADIAČNÍ ONKOLOGIE I.LF A FN PRAHA

Konkomitantní chemoradioterapie se stala součástí léčby loko(regionálně) pokročilých nádorů ORL oblasti díky výsledkům, které prokázala ve srovnání s konvenčně frakcionovanou samostatnou radioterapií. Zmiňovaná metaanalýza randomizovaných klinických studií z let 1965-1993 MACH-NC Collaborative Group ozřejmila 8% benefit v 5 letém přežití u pacientů s chemoterapií v konkomitantním podání (nikoli 4% jak uvedeno) (1). Výsledky této metaanalýzy jsou v souladu s výsledky dalších metaanalýz včetně poslední publikované, zahrnující klinické studie z let 1975-2000, která vyhodnotila snížení rizika úmrtí o 11% při použití kombinované léčby (2). V tom, že konkomitantní chemoradioterapie je efektivnější než samostatná radioterapie konvenční frakcionací, tedy panuje shoda.

Otázkou zůstává, zda by stejné či lepší efektivity mohlo být dosaženo užitím alterovaných frakcionačních režimů. Autorem citované výsledky Horiotovy studie EORTC 22791 hodnotící přínos hyperfrakcionace oproti konvenční frakcionaci se opravdu zdají být lepší než výsledky léčby konkomitantní chemoradioterapií z výše zmiňované metaanalýzy. Je třeba si ovšem uvědomit, že do Horiotovy studie byli zařazováni pacienti s nádory orofaryngu rozsahu T2-3N1, zatímco většina studií s konkomitantní chemoradioterapií z předchozí metaanalýzy hodnotí výsledky u lézí pokročilejších. Prognostická závažnost rozsahu nádoru je obecně známá a výsledky studie tedy nenapovídají nic vyšší o efektivitě hyperfrakcionace oproti chemoradioterapii u loko(regionálně) pokročilých nádorů, ale pouze o slibných výsledcích samostatné radioterapie cílené do relativně přesně určené prognosticky příznivější podskupiny pacientů. I když bylo dosaženo signifikantního rozdílu obou frakcionačních režimů v lokální kontrole ve prospěch hyperfrakcionace, výsledky 5 letého přežití již zaznamenaly pouze trend k jeho zlepšení bez patřičné statistické významnosti (3).

Definitivní odpověď na přínos alterovaných frakcionačních režimů měla dát autorem rovněž zmiňovaná studie RTOG 90-03 porovnávající 4 různé frakcionační režimy radioterapie. I přes vysoký počet zařazených pacientů (n=1113) bylo zaznamenáno pouze statisticky marginální zlepšení lokální kontroly v ramelech s hyperfrakcionací a akcelerovanou frakcionací s konkomitantním boostem. Rozdíly v 2letém celkovém přežití pak statistické významnosti vůbec nedosáhly. K dispozici jsou sice pouze 2letá data, ale ta jsou konzistentní s výsledky předchozích randomizovaných studií hodnotících přínos alterované frakcionace – tedy zlepšení lokoregionální kontroly bez výrazné odezvy v celkovém přežití (4).

Autorem referovaná absence dopadu konkomitantní chemoterapie na případnou diseminaci onemocnění není rovněž jed-

noznačná. Není pravdou, že by snížení incidence vzdálených metastáz nebylo nikdy zaznamenáno v žádné studii porovnávající chemoradioterapii s radioterapií, naopak, takových studií je více (5,6,7,8). Zajímavé jsou výsledky klinické studie autorů Jeremic a kol. hodnotící přínos denního podávání nízkých dávek cisplatiny k radioterapii hyperfrakcionací. 5leté přežití bez vývoje metastáz bylo 86 vs. 57% (p=0,0013) ve prospěch kombinované léčby (9).

Nepřesný je rovněž údaj týkající se pozdních následků léčby v klinické studii porovnávající efekt radioterapie s konkomitantním boostem s nebo bez konkomitantní chemoterapie německé skupiny Staar a kol.. Autor udává, že 51% pacientů v experimentálním rameni přežívajících 2 roky bylo závislých na výživě nazogastrickou sondou či gastrostomií.

Ve skutečnosti vyžadovalo nutriční podporu sondou celkem 19 pacientů z obou ramen z celkového počtu 64 dlouhodobě přežívajících (30%), i když výskyt polykacích obtíží se vyskytoval v rameni s kombinovanou léčbou ve dvojnásobné míře (10).

Námítka proti nonekvitoxicitě použitých režimů je zcela namístě, byť možnost exaktního stanovení ekvotoxicity kombinované a samostatné léčby je značně virtuální. Přesto se o to některé studie pokusily (11,12). Randomizovaná studie německých autorů publikovaná v únoru tohoto roku v JCO porovnávala akcelerovanou frakcionací 77,6Gy/6 týdnů s méně intenzivním režimem (70Gy/6týdnů) v kombinaci s konkomitantní chemoterapií. Jak výsledky lokoregionální kontroly (50 vs. 37%), tak výsledky 5letého přežití (29 vs. 24%) favorizovaly užití kombinované léčby, aniž bylo zaznamenáno zhoršení pozdní toxicity. Autoři studie činí závěr, že konkomitantní chemoradioterapie terapeutický poměr zlepšuje.

Oba způsoby intenzifikace léčby - konkomitantní chemoradioterapie a užití alterovaných frakcionačních režimů přináší zlepšení léčebných výsledků u pacientů s loko(regionálně) pokročilými nádory ORL oblasti. Při neexistenci jasných prediktorů pro ten který léčebný postup jsme nuceni se opírat o výsledky proběhlých klinických studií a ty dosud hovoří jasně ve prospěch konkomitantní chemoradioterapie. Otázkou tedy spíše zůstává, jaké cytostatikum a v jakém režimu by mělo být podáváno a jaká frakcionace by měla být v kombinované léčbě uplatněna. V žádném případě nesmí přidání konkomitantní chemoterapie jakkoli nahrazovat nedostatky v samotné radioterapii. Ta zůstává spolu s chirurgií orofaciální oblasti nadále základním pilířem léčby těchto nádorů. I z těch důvodů je věcně přesnější autorem článku užívaný termín „radiochemoterapie“ (oproti častěji užívanému termínu „konkomitantní chemoradioterapie“), protože daleko lépe vystihuje hierarchii ve významu obou léčebných způsobů v této lokalizaci.

Literatura:

1. Pignon J., Bourhis J., Domenge C., et al.: *Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous cell carcinoma: Three meta-analysis of updated individual data*. Lancet, 355, 2000, 949-955.
2. Brownman G. P., Hodson D. I., Mackenzie R. J., et al.: *Choosing a concomitant chemotherapy and radiotherapy regimen for squamous cell head and neck cancer: A systematic review of the published literature with subgroup analysis*. Head and Neck 23, 2001, 7, 579-589.
3. Horiot J. C., Lemur R., Nguyen T., et al.: *Hyperfractionation versus conventional fractionation in oropharyngeal carcinoma: final analysis of randomized trial of the EORTC cooperative group of radiotherapy*. Radiotherapy and Oncology 1992, 25, 231-241.
4. Fu K., Pajak T., Troil A., et al.: *RTOG phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variant of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinoma: First report of RTOG 9003*. Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys. 2000, 48, 1, 7-16.
5. Forastiere A. A., Berkey B., Mao M., et al.: *Phase III trial to preserve the larynx: Induction chemotherapy and radiotherapy versus concomitant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone, Intergroup trial R91-11*. Proc Am Soc Clin Oncol 20, 2001, 2a.
6. Adelstein D. J., Lavertu P., Saxton J. P., et al.: *Mature results of a phase III randomized trial comparing concurrent chemoradiotherapy with radiation therapy alone in patients with stage III and IV squamous cell carcinoma of the head and neck*. Cancer 88, 2000, 876-83).
7. Al-Sarraf M., LeBlanc M., Giri P. G., et al.: *Superiority of five year survival with chemo-radiotherapy (CT-RT) vs radiotherapy in patients (Pts) with locally advanced nasopharyngeal cancer (NPC)*. Intergroup (0099) (SWOG 8892, RTOG 8817, ECOG 2388) phase III study: Final report. Proc Am Soc Clin Oncol 20, 2001, 227a.
8. Chan A. T., Teo P. M., Nga R. K., et al.: *Concurrent chemotherapy-radiotherapy compared with radiotherapy alone in locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: Progression free survival analysis of a phase III randomized trial*. J Clin Oncol 20, 2002, 8, 2038-44.
9. Jeremic B., Shibamoto Y., Milicic B., et al.: *Hyperfractionated radiation therapy with or without concurrent low dose daily cisplatin in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: A prospective randomized trial*. J Clin Oncol 18, 2000, 7, 1458-1464.
10. Staar J., Rudat V., Stuetzer H., et al.: *Intensified hyperfractionated accelerated radiotherapy limits the additional benefit of simultaneous chemotherapy - results of a multicentric randomized German trial in advanced head-and-neck cancer*. Int J Rad Oncol Biol Phys 50, 2001, 5, 1161-71.
11. Brize, D. M., Albers M. E., Fisher S. R., et al.: *Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer*. New Engl J Med 338, 1998, 25, 1798-1804.
12. Budach V., Stuschke M., Budach W., et al.: *Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracil-mitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: final results of the radiotherapy cooperative clinical trials group of the German Cancer Society 95-06 Prospective Randomized Trial*. J Clin Oncol 2005, 20; 23(6), 1125-35.

zpráva

LASERY V MEDICÍNĚ 2005 LASERS IN MEDICINE, 2005

T. HORVÁTH

Na přelomu března a dubna se uskutečnilo v Orlandu, Lake Buena Vista, na Floridě 25. výroční setkání American Society for Laser Medicine and Surgery (ASLMS) za bohaté účasti amerických lékařů, středních a vyšších zdravot. pracovníků z klinických pracovišť, výzkumných laboratorů, fyziků, přírodovědců (ASLMS měla k termínu zahájení sjezdu 3 147 členů) a pečlivě vybraných zahraničních specialistů. Bezchybně organizované mezioborové sdílení sumarizovalo pestrou řadu pozoruhodných zkušeností, evokovalo intelektuální výboje, poohlédlo se za minulostí a uvažovalo o cestách vpřed. Zároveň probíhala výstava farmak, technologií a pomůcek. Rozdělme informace na 1. obecné 2. specifické.

Ad 1.

Laserová medicína je komplexní fakt. Vyžaduje zřetelné více pozornosti. Nejtěžší terapeutické výzvy však dosud nejsou adekvátně adresovány. (R. Fitzpatrick, Encinitas, Kalifornie). Léčba světlem představuje potenciál k redukci výdajů na zdravotnictví. Její důležitost je třeba přednostně zhodnotit a porovnat s konvenčními metodami v termínech užitek pro pacienta (patient benefit) a úspěšnost (effectiveness) analýzou náklady/ užitek (cost/benefit) a náklady/úspěšnost (cost/effectiveness) v koalici institucí národního zdravotního pojištění (NIH), ústavů pro kontrolu léčiv (FDA) a producentů zařízení a léků (industry). Studie musí mít jasná kritéria s přesným důrazem na fakta. Požadují aplikaci kompetentními a motivovanými profesionály. Požadovaným výsledkem takového počínání je doporučení (případně nedoporučení) příslušného postupu (prescription) v daných indikacích (R. Waynant, FDA, Rockville, Maryland). Přirozenou potřebou a zároveň předností takového procesu je široké začlenění a propojení pionýrů jednotlivých modalit, mnohdy věz-ných v složitém místně specifickém objektivním a subjektivním mikrokosmu, vně něj dosud přijímaných pochybovačně anebo lhostejně (J. Basford, Mayo Clinic, Rochester, Minesota). Lékař angažovaný v tomto snažení potřebuje spolupracovníky hluboce vzdělané ve fyzice, matematice a informatice často extrémně specializované. Taková symbióza přináší efektivní výsledky (Lars Swaasand, Trondheim, Norsko). Specifickou úlohou středního personálu v tomto duchu je přenesení vědeckého poznání do služby konkrétního nemocného (J. Chamberlain, Cincinnati, Ohio). Ideje rozkvétají multidisciplinární spoluprací (J. Walsh, Evanston, Illinois). Je tu doba interakce expertů (J. Garden, Chicago, Illinois).

Ad 2.

ASLMS hraje vedoucí roli v přenašení nových poznatků laserové medicíny do široké chirurgické i interní praxe, takže lze očekávat její rozvoj v mnoha specifických oblastech:

1. Diagnostika a léčba premalignit a malignit v plicních, gynekologických, urologických a gastroenterologických indikacích.
 2. Léčba chronických nehojících se ran / diabetická noha.
 3. Terapie závažných a rozsáhlých pohmoždění měkkých tkání, zlepšení hojení ohrožených ran, ale také podvrtnutí kotníku.
 4. Řešení žilní insuficience dolních končetin.
 5. Laserová intervence u úrazů míchy a periferních nervů.
 6. Pozoruhodné jsou dále výsledky léčebného uplatnění laserů v léčbě mozkové mrtvice (transkraniálně) a srdečního infarktu (transtorakálně).
 7. Atraktivním polem uplatnění jsou nemaligní indikace dermatologické - hyperpigmentace, akné, kožní rejuvenace, léčba strie, liposukce.
 8. Jinou možností je využití laseru v stomatologické, stomatochirurgické a otorhinolaryngologické praxi, jak maligních, tak nemaligních indikací leukoplakie, erytroplakie, bazo- i spinocelulární karcinom, eradikace infekce obnova průchodnosti kanálu kořene zubu, tonzilektomie, nedoslýchavost.
 9. Oční laserová medicína dále upřeshňuje a rozšiřuje své indikace - glaukom, makulární degenerace sítnice, fenestrace pochvy nervus opticus.
 10. Předmětem intenzivního studia je skutečnost, že specifické vlnové délky úplně nahrazují růstové faktory v podpoře buněčné proliferace, migrace, diferenciace a přežívání buněk v tkáňových kulturách. To může mít nedozírný význam v onkologii a transplantologii.
 11. Další zprávy informují o úspěšné aplikaci laserů u laterální epikondylitidy, tendovaginitidy a chronického bolestivého více- etážového vertebrogenního syndromu.
 12. Jiné povzbudivé zjištění přichází z oblasti protinádorové léčby. Laserem potencionovaná chemoterapie - fotochemoterapie - je schopna eradikovat chemorezistentní neoplazie.
- Optimální vlnové délky, způsoby a délky aplikace jsou předmětem dalšího rozsáhlého studia. Mechanizmy účinku rovněž.

Reference:

Online www.interscience.wiley.com Lasers in Surgery and Medicine, Wiley-Liss, ISSN 0196-8092, Supplement 17, March 2005.

Masarykova univerzita Brno.

Tel.: 543135811. Fax: 543132455. E- pošta: horvath@mou.cz

POSKYTNUTÍ ZÁŠTITY ČOS NAD ODBORNÝMI AKCEMI

„Na svém zasedání 19.4. 2005 se dohodl výbor ČOS, že podmínkou poskytnutí záštity ČOS nad odbornými akcemi bude i souhlas pořadatele s dodáním textů abstrakt publikovaných ve sborníku pořádané akce a s jejich veřejnou prezentací v „Databázi abstrakt z konferencí pořádaných pod záštitou

ČOS“, která bude přístupná na internetových stránkách ČOS (www.linkos.cz) od května 2005.

Současně si dovoluujeme pořadatele požádat i o zpětné poskytnutí sborníků z akcí pořádaných od ledna 2004.

Online formulář žádosti o poskytnutí záštity ČOS ČLS JEP nad odbornou akcí naleznete i na http://www.linkos.cz/kongresy/cos_zadost.php.“

OTEVŘENÍ CENTRA DĚTSKÉ HEMATOLOGIE A TRANSPLANTOLOGIE RAISY GORBAČOVOVÉ V ST. PETERSBURGU

MÁŠKOVÁ M., LAŽA A.

„V situaci, kdy se nedá nic dělat, ale je silná touha něco udělat, by se mělo úsilí z různých směrů soustředit na jeden cíl; pak dochází k fenoménu podobnému jadernému výbuchu, fenoménu amplifikace. Úspěch přichází.“

Akademik Andrej Sacharov

Úsilí mnoha odborníků i laiků o rozvoj hematoonkologie v Rusku bude v červnu tohoto roku korunováno úspěchem - otevřením moderního Centra dětské hematologie a transplantologie Raisy Gorbačovové na Klinice transplantací kostní dřeně a genové terapie při Státní lékařské universitě I. P. Pavlova v St. Petersburgu.

Ještě v roce 1991 bylo v Rusku vyléčeno pouze 7 % dětí s leukémiemi a další druhy nádorů jako např. nádory mozku nebo jiná závažná onemocnění nebyly léčitelné vůbec. Rozdíl mezi Ruskem a ostatními západními zeměmi s lepšími finančními podmínkami byl desetinásobný: 70 % k 7 %. V tehdejší ekonomické situaci Ruska se zdálo téměř nemožné, že by se tento neutěšený stav mohl jakkoliv změnit. Díky společnému úsilí mnoha odborníků, mezinárodní spolupráci a díky podpoře četných dobrodinců a řady humanitárních či neziskových organizací bylo však už v roce 1996 v Ruské Federaci dosaženo výsledků srovnatelných se západními zeměmi. Jenom na Klinice hematologie, krevní transfúze a transplantologie při Státní lékařské univerzitě I. P. Pavlova v St. Petersburgu (Saint Petersburg State Medical University - SPSMU) bylo od roku 1990 provedeno více než 300 transplantací kostní dřeně, třetina z toho u dětí. Nové Centrum dětské hematologie a transplantologie otevírané v St. Petersburgu letos v červnu

ponese jméno Raisy Gorbačovové jako projev vděčnosti za její bezpříkladné úsilí o zpřístupnění účinné moderní léčby dětským pacientům. Byla to zejména Nadace manželů Gorbačovových, díky jejíž mnohaleté podpoře bylo vybudování dětských onkologických center v Moskvě a St. Petersburgu možné. Nešťastnou ironií osudu právě Raisa Gorbačová, která věnovala tolik energie a pomoci dětem trpícím leukémií, sama této nemoci před několika lety podlehla.

Přestože je otevření nového centra velkým úspěchem, řadu problémů je třeba stále ještě řešit. Provádění transplantací kostní dřeně od nepříbuzenských dárců je nemožné bez založení Registru dárců kostní dřeně v Rusku. Národní registry dárců již existují v mnoha zemích a jsou spojovány do mezinárodních registrů soustřeďujících informace o 6 milionech potenciálních dárců. Odborníci ze SPSMU I. P. Pavlova nyní usilují o založení původního registru dárců kostní dřeně. Děje se tak ve spolupráci s jedním z velkých německých registrů - Registru Stefana Morsche a Nadace Stefana Morsche. SPSMU rozšiřuje svou mezinárodní spolupráci také v oblasti molekulární medicíny, hematologie a transplantologie (prof. M. Borset - Norsko, prof. A. von Deimling - Německo, prof. G. Wagemaker - Nizozemí a další). V září 2003 uspořádaly SPMSU a Lékařská Fakulta Ueval Univerzity v Oslu společnou rusko-norskou konferenci o aktuálních problémech hematologie a transplantace kmenových buněk.

Zástupci kliniky v čele s prof. Afanasjevem a prof. Fregatovou vyjádřili přání rozšířit také spolupráci s odborníky z České republiky, k čemuž jak doufáme, přispěje i tento článek. Pokud máte zájem o jakoukoliv formu spolupráce s petrohradskou klinikou nebo chcete poblahopřát svým kolegům, můžete kontaktovat prof. Fregatovou: tel.: +7(812)-234-46-25; fax: +7(812)-234-06-16; mobil: 7-921-305-46-99; e-mail: bmt-apheresis@spmu.rssi.ru

ZÁPIS Z JEDNÁNÍ VÝBORU ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI KONANÉHO DNE 19. 4. 2005 V MOSTĚ

Přítomni: Vorlíček, Cwiertka, Abrahámová Eckschlager, Jelínková, Konopásek, Příbylová, Petruželka, Rob, Stáhalová, Stankušová, Vyzula, Žaloudík

Omluveni: Fínek, Aschermannová, Petera

1. V úvodu představil mosteckou nemocnici její ředitel ing. Vopelka. Pan ředitel při této příležitosti předal předsedovi ČOS prof. Vorlíčkovi příslib podpory mostecké nemocnice Národním onkologickému programu stvrzený svým popisem. Prim. Jelínková poté referovala o problematice vývoje nádorové incidence v okrese Most a stručně informovala o organizaci onkologické péče v celém Severočeském kraji.

2. Doc. Abrahámová referovala o novinkách z jednání o NOR s ÚZIS a KRZIS. Vyšla nová publikace statistiky ZN za rok 2002.

Hlavním tématem NOR je nyní postupný přechod na elektronickou hlášenku ZN. Bude zaveden pilotní projekt zkusmého provozu elektronické formy hlášení ZN. Byla diskutována strategie dvoudobého systému - hlášení části epidemiologické a verifikační (histologické potvrzení, stadium) do 30 dnů po stanovení diagnózy a stadia, hlášení druhé klinické části charakterizující léčbu bude odesláno po skončení primární léčby, nejdéle však do 6 měsíců po odeslání epidemiologického hlášení. Cílem je naplnit znění vyhlášky 187/2004 z 5. 11. 2005, v níž povinnost hlásit ZN přechází na pracoviště, která převzala odpovědnost za péči o onkologicky nemocného. Dosavadní stav, kdy jednu diagnózu hlásí stovky i tisíce subjektů je neúnosný a jakékoli podrobnější hodnocení údajů ZN je dosavadním stavem omezeno a znehodnocováno.

Členové výboru byly vyzváni, aby ve svých nemocnicích a ústavech projednali s ředitelem zájem o účast v pilotním projektu elektronické hlášenky a oznámili to předsedovi ČOS do týdne, tedy do 26. 4. 2005. Pilotní projekt je otevřen i zájemcům z dalších nemocnic, které projeví vůli a schopnost přejít na elektronickou formu hlášení ZN.

SZP musí být projednán signální kód existence hlášenky, protože případy nehlášené by neměly být propláceny. Doc. Vyzula upozornil na potřebu propracovat zejména hlášenky a spojení s ÚZIS/KRZIS přes internet. Zároveň bylo hovořeno o potřebě revidovat při obsahu, parametru klinické části hlášenky tak, aby odpovídaly době i reálným potřebám.

3. Dále v souvislosti s NOR informoval prof. Žaloudík o stavu SVOD v návaznosti na úkoly dohodnuté na výše uvedeném jednání na ÚZIS.

a) Byl diskutován návrh zpřístupnit epidemiologickou část HZN a strukturu diagnosticko-léčebné péče bez označení pracovišť a výsledků na webu pod www.linkos.cz. Návrh členové výboru ČOS jednomyslně odsouhlasili.

b) Dále byl diskutován návrh zpřístupnit údaje o počtu léčených s danou diagnózou a analýzy přežití pro dané pracoviště, příslušný kraj a celou republiku hlásícímu zdra-

vatnickému zařízení pouze na vyžádání statutárním zástupcem u ÚZIS. Součástí tohoto kompletního SVOD na CD bude také přehled počtu léčených s danou diagnózou na všech pracovištích, která jsou ovšem kryta kódovým označením. Odkódováno může být pouze pracoviště žadatele. Srovnání údajů z pracovišť bude tedy možné pouze po vzájemné interní dohodě zástupců pracovišť z jejich vlastního rozhodnutí. Také tento návrh výbor ČOS jednomyslně schválil.

Tyto závěry jednání výboru ČOS budou oznámeny ÚZIS a odboru zdravotní péče MZD, kde lze předpokládat podporu těmto zásadním inovačním krokům ve využívání všech dat NOR, a to především v grafické podobě podle aktuálních potřeb uživatelů.

Členové výboru projeví zájem o praktické školení v práci se sv SVOD.

4. Problematika diagnosticko-léčebných standardů. Je třeba odlišit doporučený medicínský standard, který se postupně aktualizuje, od daného stavu možností proplácet výkony a léky tou či onou pojišťovnou. Doporučené standardy nejsou odrazem možností plateb pojišťovnou. Zpravidla se pojišťovny k tomuto optimu i v rozvinutých ekonomikách podle svých možností pouze dotahují. Standard doporučený ČOS může být tedy odlišný a jít nad rámec od standardu placeného zdravotním pojištěním. Bylo dohodnuto, že není účelná forma periodických publikací odborných standardů. Tyto jsou v aktualizované podobě přístupny na internetu. Kromě amerických a britských zdrojů může sloužit jako základ v českém jazyce přehled diagnosticko-léčebných standardů OÚ na www.mou.cz, který je přístupný připomínkám i průběžně inovaci. Takovýto systém je dostatečně flexibilní a nevylučuje ani pořízení písemné formy ad hoc, pokud to zájemce potřebuje. Zásady cytostatické léčby vydané ČOS spolu s VZP a MZD vyjdou letos již potřetí k 1. 7. 2005.

5. Problematika struktury onkologické sítě v ČR. Dosaženo konsensu o struktuře sítě pracovišť onkologické péče v ČR na základě již přijatých a opakovaně diskutovaných kritérií, kterou garantuje Česká onkologická společnost. V tomto směru proběhnou další jednání s VZP a MZD ČR pro dosažení věstníkové podoby dohodnutého.

6. Výbor ČOS schválil přijetí nových členů ČOS: Dr. Lehanka (Havlíčkův Brod), Dr. Csóka (Dunajská Streda, SR), Dr. Štuková (Lomnice n/P.)

7. Předseda ČOS referoval o stavu kategorizace léků, resp. problémech s ní v současném období spojených.

8. Prof. Žaloudík vyzval jménem Sekce onkochirurgie a jménem presidenta kongresu prof. MUDr. M. Rysky, CSc. členy ČOS k aktivní účasti na XV. Světovém kongresu Mezinárodní asociace chirurgů a gastroenterologů (IASG), který se koná 7.–10. 9. 2005 v Praze a jehož tématy bude také onkologická problematika. Bližší informace lze získat na iasg2005@uvn.cz