

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

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:

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

#### REDAKČNÍ RADA:

ADAM ZDENĚK, Brno  
BABUŠÍKOVÁ OLGA, Bratislava  
BEDNAŘÍK OTAKAR, Brno  
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  
KLAŠTERSKÝ 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

<b>Přehled</b>	
Obořilová A., Šálek D., Mayer J. Fludarabin v léčbě folikulárních lymfomů .....	203
Sedláček J., Vyzula R. Molekulární detekce volných nádorových buněk a mikrometastáz u karcinomu prsu a kolorekta pomocí RT-PCR specifické pro cytokeratiny 19 a 20	211
Klocová K., Svoboda M., Vyzula R. Dihydropyrimidin dehydrogenáza a její role v prediktivní onkologii .....	219
<b>Původní práce</b>	
Peychl J., Hatina J., Reischig J., Červinka M. Vztah motility a invazivity transformovaných buněk-model H2-K/V-JUN fibrosarkomových buněčných linií .....	223
Pleško I., Obšitníková A., Cuninková M. Epidemiologické aspekty in situ karcinómov prsníka u žen na Slovensku .....	227
<b>Kazuistika</b>	
Horváth T. A. Systémové řešení .....	231
<b>Sdělení</b>	
Haber J. a odborné společnosti, Čermák J., Indrák K., Klener P., Marešová V., Starý J., Ryska M., Švihovec J., Vorlíček J. Stanovisko odborných společností k indikaci a použití antimykotik se systémovým účinkem .....	233
<b>Zprávy</b>	
Šmardová J. Vůdčí gen P53-zpráva z konference .....	238
<b>Informace</b>	
Geryk E., Holub J., Žáček V. Stručná charakteristika novotvarů z dat Národního onkologického registru ČR .....	226
– knihy .....	210 237
<b>Onkologické společnosti</b> .....	240

---

**CONTENTS**

<b>Reviews</b>	
Obořilová A., Šálek D., Mayer J. Fludarabin in treatment of follicular lymphoma .....	203
Sedláček J., Vyzula R. Molecular detection of isolated tumor cells and micrometastasis in breast and colorectal carcinoma by cytokeratins 19 and 20 specific RT-PCR	211
Klocová K., Svoboda M., Vyzula R. Dihydropyrimidine dehydrogenase and its role in predictive oncology .....	219
<b>Original publications</b>	
Peychl J., Hatina J., Reischig J., Červinka M. Relationship between motility and invasiveness of transformed cells - a model of H2-K/V-JUN fibrosarcoma – derived cell lines .....	223
Pleško I., Obšitníková A., Cuninková M. Epidemiological aspects of in situ female breast cancer in Slovakia .....	227
<b>Case Report</b>	
Horváth T. A. Systemic solution .....	231
<b>Communication</b>	
Haber J. a odborné společnosti, Čermák J., Indrák K., Klener P., Marešová V., Starý J., Ryska M., Švihovec J., Vorlíček J. The viewpoint of professional societies to the indication and use of antimycotics with systemic effect .....	233
<b>Report</b>	
Šmardová J. The leading gene P53: report on the conference .....	238
<b>Notification</b>	
Geryk E., Holub J., Žáček V. Up-date summary from Czech Cancer Registry .....	226
– book .....	210 237
<b>Oncological association</b> .....	240

## FLUDARABIN V LÉČBĚ FOLIKULÁRNÍCH LYMFOMŮ

### FLUDARABINE IN TREATMENT OF FOLLICULAR LYMPHOMA

OBOŘILOVÁ A., ŠÁLEK D., MAYER J.

INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÁ KLINIKA FN BRNO-BOHUNICE

**Souhrn:** Folikulární lymfom je znám jako nozologická jednotka více než šest desetiletí, ale navzdory velkým pokrokům v protinádorové léčbě se dosud nepodařilo zásadně ovlivnit prognózu pacientů s rozvinutým onemocněním. Choroba je dobře senzitivní na terapii, ale téměř vždy dochází k relapsům. Naděje jsou proto vkládány do nových léků. Jedním z nich je fludarabin monofosfát, který má vyšší selektivní afinitu pro lymfoidní buňky a kromě inhibice proliferace indukuje apoptózu. Fludarabin vykazuje synergismus s řadou látek, proto jej lze s výhodou kombinovat s jinými cytostatiky i s monoklonální protilátkou rituximabem. Fludarabin v monoterapii dosahuje v indikaci folikulárních lymfomů celkové odpovědi u 31-84% nemocných s 9-60% kompletních remisí (CR). Kombinované režimy s fludarabinem a antracyklinem (typ FM, FND) vykazují průměrnou celkovou účinnost 86% s dosažením průměrně 45% kompletních remisí. Režimy fludarabinu s cyklofosfamidem (typ FluCy, FluCyD) dosahují celkové odpovědi průměrně u 91% nemocných s dosažením kolem 58% CR. Režimy s fludarabinem a rituximabem vykazují celkovou účinnost mezi 70-95% léčebných odpovědí. Účinnost fludarabinových režimů se jeví velmi slibně, ale vliv na prodloužení celkového přežití pacientů s folikulárním lymfomem zatím nelze definovat. Fludarabin má také nezanedbatelné toxické účinky. Dominující je myelotoxicita (vyskytuje se v 5-33%), toxicita v kompartmentu progenitorových buněk a výrazná a dlouhodobá imunotoxicita, která bývá vyjádřena nejvíce v subpopulaci CD4+ buněk a která je sledována výskytem oportunních infekcí.

**Klíčová slova:** folikulární lymfom, fludarabin

**Summary:** Follicular lymphoma belongs to the group of low grade B non-Hodgkin's lymphomas. Since more six decades it has been known as a nosologic unit, but in spite of huge advance in anticancer therapy the prognosis of patients with developed disease can not be influenced so far. The disease is well therapy-sensitive, but perhaps regularly relapses. Therefore hopes lay on new drugs. One of them is fludarabine monophosphate. It has a higher selective affinity to lymphoid cells and except the inhibition of proliferation induces the apoptosis. Fludarabine shows synergism with several other drugs and for all that there is suitable for combining with other cytostatics and with monoclonal antibody rituximab as well. The efficacy of fludarabine is documented by several studies mostly of phase II. In monotherapy it achieves the overall response in 31-84% patients with 9-60% complete remissions (CR) in the indication of follicular lymphoma. Fludarabine-anthracycline combined regimens (type FM, FND) show average overall efficacy about 86% with achievement about 45% complete remissions. Regimens based on fludarabine and cyclophosphamide (type FluCy, FluCyD) reach the overall average response in 91% patients with achievement about 58% CR. Regimens containing fludarabine and rituximab show total efficacy in range 70-95%. Results of fludarabine containing regimens are very encouraging, however is impossible to say, if they project into the extension of overall survival in follicular lymphoma patients. On the other hand fludarabine shows considerable toxic effects. The myelotoxicity is dominating (in 5-33% cases), but the toxicity of the compartment of progenitor cells occurs often. Severe and long-term immunotoxicity is expressed most strongly at the subpopulation of CD4+ cells and followed by the occurrence of opportunistic infections.

**Keywords:** follicular lymphoma, fludarabine

## ÚVOD

Folikulární lymfom vzniká maligní transformací buněk folikulárního centra a řadí se mezi B ne-Hodgkinovy lymfomy (NHL). Lymfomy této skupiny se vyznačují relativně dlouhým mediánem přežití (mezi 5-10 lety) a indolentním průběhem s pomalou progresí. Výjimečně se mohou vyskytnout i spontánní remise (1). Jejich charakteristickým znakem je, že odpovídají obvykle velmi dobře na iniciační léčbu. Pravidelně však relabují a jsou tudíž jen zřídka vyléčitelné (2, 3). S délkou léčby vzrůstá i pravděpodobnost histologické transformace do agresivních typů lymfomů (1, 3, 4).

Za uplynulá tři desetiletí, zejména díky uplatnění chemoterapie a radioterapie, se podařilo zvýšit 5-leté přežívání pacientů s NHL z 31% na 52% (5). Některé typy lymfomů jsou dokonce potenciálně vyléčitelné. Nicméně toto tvrzení neplatí pro folikulární lymfom, kde zůstává účinnost léčby stále velmi málo uspokojivá. V léčbě se zkoušejí nejrůznější přístupy od strategie „watch and wait“ až po alogenní transplantace kost-

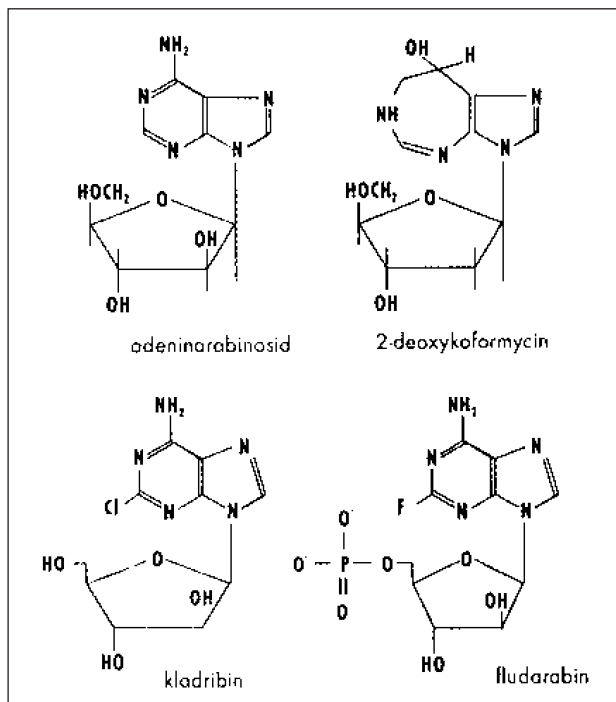
ní dřeně. Přes veškeré úsilí se nepodařilo zatím dosáhnout podstatného zlepšení prognózy nemocných. Naopak použití agresivní léčby vede často ke komplikacím a tím k výraznému zhoršení kvality života (3).

Neúspěchy v dosavadní léčbě pacientů s folikulárním lymfomem vyvolávají potřebu zavádění nových léčebných prostředků. Jedním z nadějných léků, který se v protinádorové léčbě začal uplatňovat od počátku 90. let 20. století, je fludarabin monofosfát (2F-Ara-AMP). Tento nový purinový analog se úspěšně prosazuje zejména v léčbě níže maligních lymfoproliferací zejména díky své selektivní afinitě k lymfoidním buňkám a schopnosti indukovat apoptózu. Tato práce podává přehled základních farmakologických vlastností fludarabinu, včetně synergismu a popsání typických i vzácnějších toxických účinků. Účinnost fludarabinu v indikaci folikulárního lymfomu je dokumentována přehledy nejvýznamnějších studií fludarabinu v monoterapii i v kombinované léčbě.

## FLUDARABIN

**STRUKTURA, VLASTNOSTI A FARMAKOKINETIKA**  
Fludarabin (9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenin-5'-monofosfát, 2F-Ara-AMP, synonymum fludarabin-5'-dihydrogenfosfát) je fluorovaný purinový analog, ve vodě dobře rozpustný, o molekulové váze 365,2. Poprvé byl syntetizován Montgomery a Hewsonem v roce 1969 (6). Substituce fluorem na pozici 2 molekuly adeninu zajišťuje stabilitu tohoto nukleotidu vůči adenosindeaminázám (viz obrázek). Fludarabin monofosfát (2F-Ara-AMP) je v organismu rychle defosforylován na fludarabin (2F-Ara-A) (7, 8). Plazmatické koncentrace po podání krátkodobé či dlouhodobé infúze vykazují dvoufázový, po bolusové injekci až třífázový průběh. První fáze s krátkým průběhem kolem 5 minut (je patrná jen po bolusu), druhá fáze s poločasem 1-2 hodiny a třetí s poločasem trvání kolem 10-30 hodin (9). Plazmatické hladiny jsou lineárně závislé na dávce fludarabinu, ale poločas, plazmatická clearance a distribuční objemy jsou spíše individuální, na dávce nezávislé (7, 10). Fludarabin je vylučován hlavně ledvinami, přičemž kolem 60% bolusové podané dávky je takto eliminováno již během 24 hodin (9). Defosforylovaný fludarabin (2F-Ara-A) je z plazmy aktivně nasáván zejména do leukemických a lymfoidních buněk. Intracelulárně je potom znovu refosforylován na vlastní účinný trifosfát (2F-Ara-ATP), který je zodpovědný za cytotoxické účinky (11, 12).

Obr. A: Přehled struktury purinových analogů. Původní molekula adeninarabinosidu od které byly odvozeny fludarabin a jeho nejbližší analoga kladribin a 2-deoxykoformycin.



## FARMAKODYNAMIKA

Vlastní účinný metabolit 2F-Ara-ATP blokuje syntézu DNA a také aktivuje apoptózu (13, 14). Blokáda syntézy DNA se děje pravděpodobně inhibicí hned několika enzymů. Blokádu ribonukleotidreduktázy dochází k inhibici syntézy deoxyribonukleotidů, následkem čehož vzniká nedostatek metabolitů pro replikaci a reparaci DNA (15). 2F-Ara-ATP soutěží navíc s redukováným množstvím přirozených substrátů o vazbu na DNA-polymerázu. Nejvýznamnějším farmakodynamickým účinkem fludarabinu je zřejmě inhibice DNA-syntézy. Molekuly 2F-Ara-ATP inkorporované do řetězce DNA představují místo inhibice DNA-polymerázy (15). Vestavba

fludarabinových nukleotidů do DNA rovněž brání zahájení „primingu“ syntézy DNA, elongaci řetězce DNA, spojování fragmentů DNA a opravného čtení DNA (16). Vestavba 2F-Ara-ATP do RNA-primerů blokuje DNA-primázu a tím i spojování tzv. Okazakiho fragmentů (17). Správné dokončení replikace a reparace vyžaduje spojení dvou vláken DNA do dvojšroubovice, což zajišťuje DNA-ligáza (18). Pokud ale fragment DNA končí fludarabinovým nukleotidem, je v tomto místě aktivita DNA-ligázy inhibována a tím i reparace a replikace DNA (19).

Blokádou DNA lze dobře vysvětlit cytotoxicitu fludarabinu u aktivně se dělících buněk. Avšak jeho nesporná účinnost u lymfocytů v klidové fázi (jako jsou například buňky níže maligních lymfomů a chronické lymfatické leukemie) má pravděpodobně odlišný mechanismus. Fludarabin (jako jediný z purinových analogů) má schopnost vestavět se i do mRNA, což vede k předčasnému ukončení syntézy RNA-transkriptu, který slouží jako matrice proteosyntézy (20).

Dalším diskutovaným mechanismem cytotoxicity fludarabinu je aktivace programované buněčné smrti (14, 21). Tato hypotéza je podporována pozorováním DNA-fragmentace, jako zjevného průkazu apoptózy, u buněk inkubovaných s fludarabinem (22). Přesný způsob aktivace apoptózy je předmětem intenzivního výzkumu. Jsou doklady o přímém ovlivnění kaspázového systému a jeho inhibitorů (22, 23).

## SPECIFITA

Fludarabin je vychytáván zejména v lymfocytech a lymfoidních blastických buňkách. Mechanismus tohoto jevu není přesně objasněn, ale předpokládá se zvýšený selektivní transport fludarabinu do lymfocytů, nebo jeho zvýšená intracelulární fosforylace na cytotoxické metabolity (24, 25). Naopak poměrně pomalý intracelulární transport fludarabinu mají buňky sliznice gastrointestinálního traktu. Takto je možné vysvětlit dobrou toleranci fludarabinu s minimem zvracení a mukozitid.

## SYNERGIZMUS

Studie in vitro testovaly synergizmus fludarabinu s řadou cytostatik (cytarabinem, cisplatinou, mitoxantronem, nitrátem galia apod.). Významný synergistický efekt byl potvrzen in vitro u leukemických buněk inkubovaných s fludarabinem před podáním cytarabinu. U takto inkubovaných buněk byla pozorována zvýšená absorpce a akumulace aktivního trifosfátového metabolitu ARA-CTP (26).

Výrazný synergizmus byl popsán po fludarabinu a monoklonální protilátce rituximabu. Proti nádorový účinek rituximabu se děje dominantně jako CDC (complement-dependent cytotoxicity) a ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity). CDC je úzce závislá na současné ligaci receptorů CD55 a CD95, které působí jako inhibitory komplementu (27, 28, 29). In vitro, na primárně rituximab-rezistentních kmenech folikulárního lymfomu, se podařilo rezistenci buněk překonat současným podáním fludarabinu s rituximabem. Zdá se, že synergizmus spočívá ve schopnosti fludarabinu (ale nikoli jiných testovaných cytostatik) snížit expresi CD55 a CD95 receptorů a umožnit tak uplatnění CDC (30).

## TOXICITA FLUDARABINU

### MYELOTOXICITA

Myelosuprese je nejzávažnějším nežádoucím účinkem fludarabinu. Velká nekomparativní studie pacientů s chronickou lymfatickou leukémií (CLL) uvádí hematologickou toxicitu stupně IV (zejména anémii a trombocytopenii) u 43% pacientů léčených fludarabinem v monoterapii (31). V jiné studii byla v průběhu 479 cyklů u 96 pacientů s CLL pozorována granulocytopenie v 19%, trombocytopenie ve 14% a anémie v 7% (32). Pokud se týká myelotoxicity u folikulárních lymfomů údaje pochází z několika menších studií a jsou v podstatě srovnatelné s údaji popsány u CLL. Hematologická toxicita stupně III-IV zde kolísala od 5% do 33% (33, 34, 35).

Dlouhodobá myelotoxicita se projevuje v kompartmentu progenitorových buněk, která je pravděpodobně příčinou neúspěšných pokusů o sběr periferních kmenových buněk u pacientů léčených fludarabinem (36, 37, 38). Pravděpodobnost neúspěšné mobilizace vzrůstá s počtem podaných cyklů fludarabinu a je nepřímě úměrná době uplynulé od ukončení terapie. Zvláště vysoké riziko vzniká po podání více než 6 cyklů a v době kratší než 2 měsíce od ukončení posledního cyklu léčby (37).

#### IMUNOTOXICITA

Fludarabin vyvolává významnou a dlouhodobou lymfopenii, která se dostavuje velmi brzy. Obvykle je již patrná po prvním cyklu a nejvíce postihuje T-lymfocyty, které klesají až na 1/10 původních hodnot, zatímco B-lymfocyty jen asi na 1/2 (39). Nejvýznaměji se lymfotokcita projevuje v subpopulaci CD4+ a CD8+ buněk (40, 41). Tento pokles je dobře patrný ještě za 11-13 měsíců po ukončení chemoterapie fludarabinem (41). I když většina uvedených dat pochází ze studií pacientů s chronickou lymfatickou leukémií, podobné výsledky byly pozorovány i u pacientů s folikulárními lymfomy (42).

#### INFEKČNÍ KOMPLIKACE

Dlouhodobá lymfopenie bude zřejmě hlavní příčinou častých infekčních komplikací pozorovaných po fludarabinu (40, 41, 43). Při standardním dávkování fludarabinu (25mg/m<sup>2</sup>/den, po dobu 5 dní) byl popsán výskyt těžkých oportunních infekcí u 7/17 nemocných (41), jiní autoři uvádějí až 22/70 těžkých infekčních komplikací s 14/70 úmrtí v důsledku sepse. Příčinou fatálních sepsí byla 4x *Pneumocystis carinii*, 3x *Aspergillus fumigatus*, *Cytomegalovirus*, *Herpes simplex virus*, *Varicella zoster virus* (40). Ve studii s 402 pacienty s CLL byl pozorován zvýšený výskyt zejména těžkých oportunních infekcí jako listeriózy, pneumocystózy, mykobakteriálních, plísňových a virových infekcí (44). V randomizovaných studiích nebyly však pozorovány žádné signifikantní rozdíly ve výskytu infekčních komplikací mezi pacienty léčenými fludarabinem ve srovnání s chlorambucilem, nebo s režimem CAP a CHOP (33, 45, 46).

Pokud jde o kombinované režimy s fludarabinem (FluCy, FND, FluCyD atd.) prevalence infekčních komplikací je velmi různá. V některých studiích se pohybuje kolem 10-15% (47, 48, 49), jiní autoři uvádějí přes 23% infekčních komplikací (50). Riziko infekčních komplikací bývá vyšší u starších a předléčených nemocných (43, 44, 50).

Ve snaze omezit infekční komplikace používají mnozí autoři s úspěchem po celou dobu léčby fludarabinem profylaxe oportunních infekcí. Nejčastěji se jedná o pneumocystovou profylaxi cotrimoxazolem (2x960mg/den), plísňovou profylaxi flucanazolem (200-400mg/den) nebo itraconazolem (200mg/den) a antivirovou profylaxi acyklovirem (3x400mg/den) (47, 49, 51). Z důvodu zkrácení doby kritické neutropenie bývají součástí některých režimů i růstové faktory (52, 53).

#### AUTOIMUNITNÍ REAKCE

Mezi nejvýznamnější autoimunitní projevy uváděné v souvislosti s fludarabinem patří autoimunitní hemolytická anémie (AIHA). Zhoršení hemolýzy, nebo její vznik byl pozorován opakovaně u pacientů s CLL léčených fludarabinem (54, 55). I když fenomén autoimunitní hemolýzy může být zapříčiněn také vlastní lymfoproliferací, je nutné o tomto potenciálu fludarabinu uvažovat. Případy AIHA byly popsány výhradně u pacientů s CLL. Pokud jde o pacienty s folikulárními lymfomy, máme k dispozici pouze vlastní zkušenosti, přičemž jsme opakovaně zastihli projevy AIHA po podání režimu s fludarabinem - FND (dosud nepublikováno).

Vzácně jsou popisovány po fludarabinu i případy idiopatické trombocytopenické purpury (56).

#### JINÁ TOXICITA

Neurotoxická byla popsána zejména po vysokých dávkách fludarabinu (90-120mg/m<sup>2</sup>) s klinickými projevy ztráty zraku,

komatu a encefalopatie (57, 58). Nicméně neurotoxická se s incidencí kolem 0,5% vyskytuje i po podání takzvaných standardních dávek (18-25mg/m<sup>2</sup>). Nejčastěji jde progresivní multifokální leukoencefalitidu, ale může být nalezena i difúzní demyelinizace, infekce JC-virem apod. (59).

Přímá pneumotoxická může mít různou klinickou symptomatologii, většinou charakteru intersticiální pneumonitidy (60, 61). V léčbě se osvědčily kortikoidy, ale často odezní i spontánně po ukončení léčby fludarabinem (61, 62). Incidence pneumotoxicity se pohybuje mezi 8-9% a zdá se být častější u CLL, než u jiných diagnóz (61).

Jsou data o zvýšeném výskytu sekundárních malignit, či časné transformaci po léčbě fludarabinovými režimy (63, 64).

#### ÚČINNOST FLUDARABINU V LÉČBĚ FOLIKULÁRNÍHO LYMFOMU

Fludarabin se v léčbě nízce maligních lymfomů začal uplatňovat přibližně od roku 1990. Účinnost monoterapie fludarabinem u folikulárních lymfomů kolísá v různých studiích od 31% do 84% celkových odpovědí (OR) s dosažením 9% až 60% kompletních remisí (CR). Odpověď se zdá být lepší u nepředléčených pacientů (OR v průměru 70%, CR 48%) oproti předléčeným nemocným (OR průměrně 58%, CR 23%). Výsledky je třeba hodnotit velmi opatrně, neboť ve většině případů se jedná o nekomparativní studie fáze II s relativně malým počtem pacientů a krátkým sledováním. Publikovány byly pouze 2 větší randomizované prospektivní studie srovnávající fludarabin v monoterapii (25mg/m<sup>2</sup> 5 dní á 28 dní) s jiným režimem. Jednou z nich je studie GELA u pacientů s folikulárním lymfomem věku 59-76 let, srovnávající účinnost fludarabinu v monoterapii (25mg/m<sup>2</sup> 5 dní á 28 dní; 6 cyklů) versus CHVP+IFN $\alpha$  (cyklofosamid 600mg/m<sup>2</sup> den 1, doxorubicin 25mg/m<sup>2</sup> den 1, teniposid 60mg/m<sup>2</sup> den 1 a prednisolon 40mg/m<sup>2</sup> den 1-5, á 28 dní; 12 cyklů, IFN $\alpha$  18 měsíců). Celkem bylo zařazeno 131 pacientů; 70 dostalo CHVP+IFN $\alpha$  a 61 bylo léčeno fludarabinem. Léčebná odpověď byla lepší po CHVP+IFN $\alpha$  (71% vs 59%) a rovněž i progresí bylo méně po režimu CHVP (49% vs 56%). TTF (doba do progresu) byla delší po CHVP (ve 2 letech 63% vs 49%). Vliv na celkové přežití v této studii hodnocen nebyl. Těžké neutropenie byly pozorovány častěji po CHVP, avšak bez zvýšení počtu infekcí či febrilních stavů (33).

Druhá publikovaná randomizovaná studie srovnávala fludarabin (25mg/m<sup>2</sup> 5 dní á 28 dní; 6 cyklů) s režimem CVP (cyklofosamid 750mg/m<sup>2</sup> den 1, vinkristin 1,2mg/m<sup>2</sup> den 1, prednisolon 40mg/m<sup>2</sup> den 1-5; á 21 dní 8 cyklů). 91 pacientů s nízce maligním NHL bylo léčeno fludarabinem a 44 CVP. V léčebné odpovědi nebyl signifikantní rozdíl mezi fludarabinem a CVP (64% versus 52%). Doba do progresu choroby byla zde sice delší po fludarabinu, ale bez efektu na celkové přežití. Tři pacienti zemřeli po léčbě fludarabinem na infekční komplikace, ale po CVP žádný (65). Přehled studií s fludarabinem v monoterapii je uveden v tabulce 1.

Vzhledem k experimentálně prokázanému synergizmu fludarabinu s řadou jiných cytostatik bylo nasnadě využít těchto vlastností v klinické praxi. Variant kombinací režimů fludarabinu s jinými cytostatiky bylo publikováno velké množství. Nejčastěji se objevují kombinace s antracykliny, cyklofosamidem, kortikoidy a interferonem alfa.

Účinnost režimů obsahujících fludarabin, antracykliny a případně dexamethazon se pohybuje všeobecně mezi 69-97% (průměrně 86%) s dosažením kompletní remise (CR) mezi 20-76% (průměrně 45%). U nepředléčených pacientů jsou výsledky příznivější s celkovou odpovědí průměrně 90% a s 54% dosažených CR. K dispozici je pouze jediná srovnávací studie testující polychemoterapii FND (fludarabin 25mg/m<sup>2</sup> den 1-3, mitoxantron 10mg/m<sup>2</sup> den 1, dexamethazon 20mg 5 dní, 8 cyklů) s ATT (alternující triple terapie: CHOP+Bleo, ESHAP, NOPP). Zhodnoceno bylo celkem 112 nemocných, 54 bylo léčeno FND a 58 nemocných dostalo ATT. Celková

odpověď byla po obou režimech shodně 97%, CR bylo pozorováno více po FND (49% vs 41%). 5-leté přežití pacientů s folikulárními lymfomy po FND bylo 83% a po ATT 82%. Nebyl prokázán žádný rozdíl mezi oběma režimy v celkovém přežití. Faktory, které korelovaly s kratším celkovým přežitím a kratším trváním léčebné odpovědi byly: věk nad 60 let, IPI skóre nad 2 a absence bcl-2 přestavby (66). Pokud jde o postavení dexamethazonu v těchto režimech zdá se, že jeho podání nemá překvapivě zvláštní význam. Po režimech pouze s fludarabinem a s antracyklinem se celková odpověď pohybovala kolem 88% (84-94%), zatímco u režimů typu FND kolem 84% (69-97%). Podobně tomu bylo v dosažení celkových remisí kolem 50% (40-76%) bez dexamethazonu a zhruba 39% (20-67%) po FND. Podrobnější přehled studií s režimy kombinující fludarabin, antracyclin a případně dexamethazon uvádí tabulka 2.

Fludarabin s cyklofosfamidem a eventuelně s dexamethazonem je rovněž velmi rozšířená kombinace. Celková účinnost se ve větších studiích pohybovala průměrně kolem 91% (72-100%) s dosažením kompletní remise kolem 58% (32-89%). Ani zde se nezdá mít dexamethazon zásadní přínos ve zvýšení účinnosti léčby. Kombinace fludarabin, cyklofosfamid, mitoxantron dokonce přinesla horší výsledky než pouze fludarabin s cyklofosfamidem. Rozdíl v účinnosti mezi předléčenými a nepředléčenými pacienty není ze studií patrný. Dosud nebyla publikována žádná randomizovaná studie. Přehled nejvýznamnějších studií uvádí tabulka 3.

Mezi méně používané kombinace patří fludarabin s IFN $\alpha$ . Publikované práce uvádějí celkovou účinnost 48% až 76%, což se blíží účinnosti fludarabinu v monoterapii, jak bylo uvedeno výše (OR 31% až 84%).

Vzhledem k dlouhodobé myelotoxicitě fludarabinu a obtížném sběru periferních kmenových buněk se objevují tendence využít snížený počet fludarabinových cyklů v kombinaci s jinou méně myelotoxickou chemoterapií. V současné době byly publikovány dvě práce využívající látek s nezkříženou rezistencí v sekvenční léčbě s fludarabinovým režimem. Celková účinnost

**Tabulka č. 1: Přehled studií s fludarabinem v monoterapii.**

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předléčenost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF OS	Medián sledování
Whelan <sup>80</sup> (1991)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní (med 3 cykly; 1-10)	fáze II	ano	23	22/48%	?	?
Redman <sup>81</sup> (1992)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní	fáze II	ano	67 (28 FL)	?/80%	?	?
Hiddeemann <sup>34</sup> (1993)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní (6 cyklů) 20 pts (FL), 23 pts (imunocytom), 1 pt T-lymfom, 1 pt lymfocyt.lymfom	fáze II	ano	38	13/31%	?	12 měs
Klasa <sup>65</sup> (2002)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní 6 cyklů vs CVP	random	ano	91 vs 44 (47 FL)	9/64%	11 měs	42 měs
Tondini <sup>82</sup> (2000)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní vs Cd 0,14mg/kg 5 dní	random	ano	58 (26 Cd)	48/68%	?	?
Belanger <sup>83</sup> , Solal-Céligny <sup>35</sup> (1996, 1997)	Flu25mg/m <sup>2</sup> 5 dní (až 9 cyklů)	fáze II	ne	49	37/65%	PFS 13,6	50 měs
Hagenbeek <sup>84</sup> (1998)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní (6 cyklů)	nekomp	ne	194	39/69%	PFS 16,5 měs	??
Coiffier <sup>33</sup> (1999)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní 6x vs CHVP 12 cyklů + IFN $\alpha$ Věk 59-76 let	random	ne	131 (61)	20/59%	49% ve 2 letech	22 měs
Zinzani <sup>51</sup> (2000)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní vs Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní +Ida 12mg/m <sup>2</sup> 3 dny (6 cyklů)	random	ne	60 vs 43	60/87% vs 40/84%	?	19 měs

Legenda k tabulce č. 1: Flu-fludarabin, Cd-cladribin, CVP (cyklofosfamid, vinkristin, prednison), CHVP (cyklofosfamid, doxorubicin, teniposid, prednison), Ida- idarubicin, PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, pt –pacient, Random- randomizovaná studie

**Tabulka č. 2: Přehled studií s kombinovanými režimy fludarabin, antracyklin +/- dexamethazon.**

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předléčenost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF OS	Medián sledování
McLaughlin <sup>49</sup> (1996)	FND: Flu 25mg/m <sup>2</sup> /den 1-3 +Mitox 10mg/m <sup>2</sup> /den 1 +Dex 20mg/den 1-5 (8 cyklů)	nekomp	ano	51 (33 FL)	44/91%	PFS (CR) 21 měs	25 měs
Zinzani <sup>50</sup> (1997)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> /den 1-3 +Mitox 10mg/m <sup>2</sup> /den 1 +Pred 40mg/den 1-5 (6 cyklů)	nekomp	ano	48 (22 FL)	27/81%	OS 67% v 33 měs PFS 32%	33 měs
Crawley <sup>85</sup> (2000)	FND:Flu+Mitox+Dex (8 cyklů)	fáze II	ano	54	20/69%	??	??
Velasquez <sup>88</sup> (1999)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> /den 1-3 +Mitox 10mg/m <sup>2</sup> /den 1 (8 cyklů)	fáze II	ne	67	43/91%	OS 93% Ve 2 letech	??
Dimopoulos <sup>22</sup> (2002)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> /den 1-3 +Mitox 10mg/m <sup>2</sup> /den 1 (6 cyklů)	fáze II	mix	25 (10 FL)	44 / 84%	OS 75% po 3 letech	33 měs
Zinzani <sup>67</sup> (2000)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní vs Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní +Ida 12mg/m <sup>2</sup> 3 dny (6 cyklů)	random	ne	60 vs 43	60/87% vs 40/84%	??	19 měs
Zinzani <sup>51</sup> (2000)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> /den 1-3 +Mitox 10mg/m <sup>2</sup> /den 1	nekomp	ne	27 (17 FL)	76 / 94% (FL)	OS 92% ve2 letech	??
Tsimberidou <sup>66</sup> (2002)	8 cyklů FND vs ATT	random	ne	54 vs 58	67/97% vs 59/97%	OS v 5 letech 83 vs 82%	5,9 roku

Legenda k tabulce č. 2: Flu-fludarabin, Mitox-mitoxantron, Dex-dexamethazon, Ida-idarubicin, FND (fludarabin, mitoxantron, dexamethazon), ATT – alternující triple terapie (CHOPBleo, ESHAP, NOPP), PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, FL-folikulární lymfom, pts- pacient, nekomp-nekomp- randomizovaná studie.

se pohybuje mezi 95-97%, což odpovídá účinnosti i jiných kombinovaných fludarabinových režimů. Předpokladané snížení dlouhodobé myelotoxicity nebylo v těchto studiích uvedeno. Přehled studií s různými kombinovanými režimy s fludarabinem je uveden v tabulce 4.

**Tabulka č. 3: Přehled studií s kombinovanými režimy s fludarabinem a cyklofosfamidem.**

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předléčinnost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF OS	Medián sledování
Lazzarino <sup>48</sup> (1999)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> /den, CFA 50mg/m <sup>2</sup> /den, Dex 20mg/den, 3 dny, 6 cyklů	nekomp	ano	25 (14 FL)	32/72% v 18 měs	PFS 53%	21 měs
Santini <sup>88</sup> (2001)	Flu + CFA vs Flu +CFA+ Mitox	random	ano	13 vs 21	69/100% vs 57/86%	??	??
Hochster <sup>47</sup> (2000)	Flu 20mg/m <sup>2</sup> 5 dní + CFA 0,6-1,0g/m <sup>2</sup> den 1	fáze I	ne	23	89/100%	PFS 53% v 5 letech	61 měs
Flinn <sup>52</sup> (2000)	Flu 20mg/m <sup>2</sup> /den 1-5 + CFA 600mg/m <sup>2</sup> /den 1 +G-CSF 5μg/kg/d	nekomp	ne	60 (20 FL)	60/92%	??	??
Eucker <sup>24</sup> (2002)	Flu 30mg/m <sup>2</sup> /den + CFA 250mg/m <sup>2</sup> /den, den 1-3, 6 cyklů	nekomp	mix	27	41/ 89%	??	??

Legenda k tabulce č. 3: Flu-fludarabin, Mitox-mitoxantron, Dex-dexamethazon, Ida-idarubicin, CFA- cyklofosfamid, G-CSF- granulocytární růstové faktory, PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, FL-folikulární lymfom, pts- pacienti, nekomp - nekomparativní studie, random - randomizovaná studie

**Tabulka č. 4: Přehled ostatních kombinací fludarabinových režimů.**

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předléčinnost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF OS	Medián sledování
Lynch <sup>90</sup> (2002)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní + IFNα 10 <sup>6</sup> U/m <sup>2</sup> den 22-26, 8 cyklů + IFN 6 měs udrž	Fáze II	ano	21	25 / 76%	PFS 12 měs	55 měs
Zinzani <sup>91</sup> (1997)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní 6 cyklů + IFNα 3x10U/l týden	Nekomp.	ano	60 LG-NHL	?/48%	PFS 30% ve 2 letech	22 měs
Rohatgi <sup>92</sup> (2002)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> /d 5 dní 3 cykly + CNOP 6-8 cyklů	Fáze II	ne	27	67/97%	PFS 34 měs	50 měs
Wilder <sup>93</sup> (2002)	FND altern CHOP	Nekomp	mix	87	?/95%	PFS 29 měs	41 měs

Legenda k tabulce č. 4: Flu-fludarabin, Dex-dexamethazon, CHOP- cyklofosfamid, adriamycin, vinkristin, prednison, CNOP-cyklofosfamid, mitoxantron, vinkristin, prednison, PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, pts- pacient, nekomp- nekomparativní studie

**Tabulka č. 5: Přehled studií s fludarabinem a rituximabem.**

Autor	Terapie/schéma	Typ studie	Předléčinnost	Počet pacientů	CR/CR+PR (%)	PFS/TTF OS	Medián sledování
Czuczman <sup>42</sup> (2002)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> 5 dní (3 dny), R 7x375mg/m <sup>2</sup>	fáze II	ano	30 LG-NHL	80/93%	med PFS 14 měs	26 měs
McLaughlin <sup>94</sup> (2000)	Flu 25mg/m <sup>2</sup> /den 1-3 +Mitox 10mg/m <sup>2</sup> /den 1 +Dex 20mg/den 1-5, 8 cyklů + R 8x375mg/m <sup>2</sup> +IFNα 12 měs	random	ano	78 LG-NHL	??/??	??	??
Hiddemann <sup>95</sup> (2002)	(FCM) Flu 25mg/m <sup>2</sup> den 1-3 + Mitox 8mg/m <sup>2</sup> den 1 +CFA 200mg/m <sup>2</sup> den 1-3, 4 cykly vs 4 xFCM +R 4x375mg/m <sup>2</sup>	random	ano	147 93 (FL)	13/58% vs 35/83%	??	??
Zinzani <sup>67</sup> (2002)	FM+R vs CHOP+R Flu 25mg/m <sup>2</sup> /den 1-3 +Mitox 10mg/m <sup>2</sup> /den 1	random	ne	69	31/95% vs 28/70%	??	??

Legenda k tabulce č. 5: Flu-fludarabin, Dex-dexamethazon, Mitox-mitoxantron, R-rituximab, CFA-cyklofosfamid CHOP-cyklofosfamid, adriamycin, vinkristin, prednison, PFS- doba do progresu, OS- celkové přežití, TTF- doba do relapsu, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, LG-NHL – níže maligní neHodgkinovy lymfomy, FL-folikulární lymfom, random- randomizovaná studie

Na základě experimentálních důkazů o in vitro synergizmu fludarabinu s monoklonální protilátkou anti-CD20 (rituximab) se zkouší nejrůznější schémata s rituximabem a fludarabinem (30).

Czuczman a kol. prezentovali výsledky léčby pacientů s níže maligním lymfomem léčených fludarabinem s rituximabem. Fludarabin zde byl podáván v 6 cyklech v dávce 25mg/m<sup>2</sup>/den po dobu 5 dní v 28-denním intervalu a rituximab také v 6 cyklech v jednotlivé dávce 375mg/m<sup>2</sup>. Celková odpověď byla 90% s dosažením 83% kompletních remisí (42). Tyto výsledky jsou plně srovnatelné s výsledky režimu CHOP/rituximab po stránce účinnosti i po stránce toxicity. Jinou imunochemoterapii srovnával s CHOP režimem Zinzani. Do studie byly zařazeni pacienti s folikulárním lymfomem a pozitivní přestavbou bcl-2/IgH. Tito nemocní dostávali randomizovaně buď fludarabin s mitoxantronem (FM) nebo CHOP. Pacienti s přetrvávající PCR pozitivitou a alespoň parciální klinickou odpovědí byli dále léčeni 4 dávkami rituximabu. FM režim byl účinnější s dosažením 95% vs 70% celkových odpovědí a s 64% vs 42% CR. Po FM/rituximab bylo pozorováno také vyšší procento molekulárních odpovědí 34% vs 10% ve srovnání s CHOP/rituximab (67). Hiddemann a spolupracovníci prospektivně randomizovali pacienty s relabovanými indolentními lymfomy, kterým podali režim FCM (fludarabin, cyklofosfamid, mitoxantron) nebo FCM s rituximabem. Předběžně bylo zhodnoceno 80 z 147 randomizovaných. Lepší účinnost vykazoval režim FCM+rituximab s 89% vs 53% celkových odpovědí, přičemž 36% vs 15% bylo kompletních remisí (68). Recentní studie pod vedením McLaughlina testuje v kombinaci s rituximabem velmi účinný režim FND (fludarabin, mitoxantron, dexamethazon). První předběžné výsledky hodnotí pouze toleranci a toxicitu léčby, které jsou srovnatelné s pouhým FND (49).

Uvedené studie se tedy vyznačují celkovou účinností mezi 70% a 95% při nezvýšené toxicitě léčby (49). Přehled kombinovaných režimů s fludarabinem a rituximabem přináší tabulka 5.

U folikulárního lymfomu se popisuje charakteristická přestavba t(14;18), která je identifikovatelná molekulárně biologickými metodami v 45 až 85 % případech onemocnění. Přesný biologický význam t(14;18) je zatím nejasný (69). Tato přestavba není výlučně specifická

**Tabulka č. 6: Molekulární odpověď po fludarabinových režimech.**

Autor	Schéma	Počet pts	CR/CR +PR	Molekulární odpověď
Czuczman <sup>42</sup> (2002)	8x R-CHOP vs 6x R-FND	30 (R-FND)	80 / 93%	PB 9/9 (100%) BM 6/7 (86%)
Tsimberidou <sup>66</sup> (2002)	ATT vs 8x FND + udr. IFN $\alpha$	142 73 (FND)	79 / 97%	PB 26/32 (81%)
Crawley <sup>85</sup> (2000)	8x FND	54	20 / 69%	RQ-PCR OR 17/25 (68%) CR 8/25 (32%)

Legenda k tabulce č. 6: R-rituximab, R-CHOP- rituximab, cyklofosfamid, adriamycin, vinkristin, prednison, R-FND-rituximab, fludarabin, mitoxantron, dexamethazon, ATT-alternující triple terapie, CR – kompletní remise, PR- parciální remise, RQ-PCR-real time PCR, PB-periferní krev, BM- kostní dřev, pts- pacienti

pro folikulární lymfom. Byla popsána i u jiných typů lymfomů a rovněž i u podstatného procenta „zdravých“ lidí a pacientů s nemaligními onemocněními uzlin (70, 71, 72). Translokace t(14;18) (q32q21) zahrnuje jednak část pro těžký řetězec imunoglobulinu (IgH), který je za normálních okolností umístěn na lokusu 14q32 a jednak gen pro bcl-2 protein (B-cell leukemia/lymphoma-2 protein) na lokusu 18q21. Při translokaci dochází k přesunu genu pro bcl-2 z chromozomu 18 do oblasti promotoru pro těžký řetězec imunoglobulinu na chromozomu 14 (73). Vzniklý chimerický gen bcl-2/IgH má za následek trvalou expresi bcl-2 a tím syntézu proteinu bcl-2, který je znám jako silný inhibitor apoptózy. U buněk s overexpresí bcl-2 proteinu dochází k blokádě programované buněčné smrti a také k usnadnění další nádorové transformace (74, 75, 76).

Existují data, která uvádějí pozitivní korelaci mezi navozením „molekulární remise“ a příznivou prognózou choroby (72, 77). Na druhé straně někteří autoři tuto korelaci popírají (78, 79). I když jednoznačný význam molekulární odpovědi není dosud potvrzen, zdá se, že pacienti v dlouhodobé molekulární remisi mají mnohem příznivější prognózu než-li pacienti s trvalou

nebo kolísavou pozitivitou. Kritériem účinné léčby folikulárního lymfomu je tedy dnes dosažení nejen klinické ale i molekulární remise. Fludarabinové režimy se zdají být účinné i v eliminaci detekovatelné přestavy t(14;18) z kostní dřevě a periferní krve. Tabulka 6 uvádí studie s fludarabinovými režimy a hodnocením molekulárních odpovědí.

## SHRNUTÍ

Více než desetileté klinické zkušenosti s fludarabinem v léčbě folikulárních lymfomů jsou velmi povzbudivé. V tuto chvíli se ale nelze vyjádřit k efektu fludarabinu na celkové přežívání nemocných. Závěry nám brání učinit relativně krátká doba sledování léčených pacientů vzhledem k přirozenému mediánu tohoto indolentního lymfomu.

Pokud jde o prokázanou účinnost, lze říci, že fludarabin v monoterapii má srovnatelnou účinnost jako standardní režimy typu COP nebo CHOP. Efektivita kombinovaných fludarabinových režimů (FM, FND, FluCy) je znatelně lepší než monoterapie. Překvapivě efekt kortikoidů v kombinovaných režimech se nezdá být zvláště významný. Kombinace fludarabinových režimů s rituximabem dosahují rovněž výborné výsledky a jeví se jako velmi perspektivní. V těchto režimech je využit příznivý synergismus fludarabinu s rituximabem při nezvýšené toxicitě léčby.

Fludarabin má ale také svůj toxický potenciál. Mezi dominující projevy patří dlouhodobá suprese T-buněčné imunity. Myelotoxicita v kompartmentu progenitorových buněk zase vede často k neúspěšné stimulaci a sběru periferních kmenových buněk. Tento fakt je obávaný a limituje do jisté míry podání fludarabinových režimů v primární léčbě. Výrazně horší výsledky po podání fludarabinových režimů jsou pravidelně pozorovány u nemocných nad 60 let a velmi předléčených pacientů. Příčina tkví především ve vyšším výskytu závažných infekčních komplikací.

V současné době se objevují léčebná schémata sekvenčního podání fludarabinových cyklů s jinou chemoterapií. Cílem je využití plně cytostatický potenciál fludarabinu za současného snížení toxických projevů.

## Literatura

1. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initial untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984; 311: 1471-5.
2. Skarin AT, Dorfman DM. Non-Hodgkin's lymphomas: current classification and management. *CA Cancer J Clin*. 1997; 47: 351-72.
3. Horning SJ. Natural history of and therapy for the indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol*. 1993; 20(suppl 5): 75-88.
4. Acker B, Hoppe RT, Colby TV et al. Histologic conversion in the non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol*. 1983; 1: 11-16.
5. Landis SH, Murray T, Bolden S, & Wingo PA. Cancer statistics. *CA: A cancer Journal for Clinicians*. 1999; 49: 8-31.
6. Montgomery JA and Hewson K. Nucleosides of 2-fluoroadenine. *J Med Chem* 1969; 12: 498-504.
7. Danhauser L, Plunkett W, Keating M, Cabanillas F. 9- $\beta$ -arabinofuranosyl-2-fluoroadenin 5'-monophosphate pharmacokinetics in plasma and tumor cells of patients with relapsed leukemia and lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 1986; 18: 1840-1847.
8. Danhauser L, Plunkett W, Liljemark J et al. Comparison between the plasma and intracellular pharmacology of 1- $\beta$ -D-arabinosylcytosine and 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate in patients with relapsed leukemia. *Leukemia* 1987; 1: 638-643.
9. Malspeis L, Grever MR, Staubus AE, Young D. Pharmacokinetics of 2-F-Ara-A (9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate) in cancer patients during the phase I clinical investigation of fludarabine phosphate. *Semin Oncol* 1990; 17 (suppl 8): 18-32.
10. Hersh MR, Kuhn JG, Phillips JL et al. Pharmacokinetic study of fludarabine phosphate (NSC 312 887). *Cancer Chemother Pharmacol* 1986; 17: 277-280.
11. Brockman RW, Cheng YC, Schabel FM Jr, Montgomery JA. Metabolism and chemotherapeutic activity of 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine against murine leukemia L1210 and evidence for its phosphorylation by deoxycytidine kinase. *Cancer Res* 1980; 40: 3610-3615.
12. Plunkett W, Chubb S, Alexander L et al. Comparison of the toxicity and metabolism of 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9- $\beta$ -D-arabino-furanosyladenine in human lymphoblastoid cells. *Cancer Res* 1980; 40: 2349-2355.
13. Plunkett W, Huang P, Gandhi V et al. Metabolism and action of fludarabine phosphate. *Semin Oncol* 1990; 17 (suppl 7): 24-27.
14. Robertson LE, Chubb S, Meyn RE et al. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9- $\beta$ -D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood* 1993; 81: 143-150.
15. White EL, Shaddix SC, Brockman RW et al. Comparison of the actions of 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-adenine on target enzymes from mouse tumor cells. *Cancer Res* 1982; 42: 2260-2264.
16. Huang P, Chubb S, Plunkett W et al. Termination of DNA synthesis by 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine: a mechanism of cytotoxicity. *J Biol Chem* 1990; 265: 16617-16625.
17. Catapano CV, Perrino FW, Fernandes DJ. Primer RNA chain termination induced by 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine 5'-triphosphate. A mechanism of DNA synthesis inhibition. *J Biol Chem* 1993; 268: 7179-7185.
18. Lindahl T and Barnes DE. Mammalian DNA ligases. *Ann Rev Biochem* 1992; 61: 251-281.
19. Rabkin CS, Ward MH, Manns A et al. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphomas. In: Magrath I. *The Non-Hodgkin's Lymphomas*. Arnold London; 1997: 171-186.
20. Spriggs D, Robbins G, Mitchell T, Kufe D. Incorporation of 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine into HL-60 cellular RNA and DNA. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 247-252.
21. Consoli U, El-Tounsi I, Sandoval A et al. Differential induction of apoptosis by fludarabine monophosphate in leukemic B and normal T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1998; 91: 1742-8.
22. Stoetzer OJ, Pogrebniak A, Scholz M et al. Drug-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 1873-1880.
23. Sampath D, Plunkett W. The role of c-Jun kinase in the apoptotic response to nucleoside analogue-induced DNA damage. *Cancer Res* 2000; 60: 6408-15.
24. Barrueco JR, Jacobsen DM, Chang CH et al. Proposed mechanism of therapeutic selectivity for 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoro-adenine against murine leukemia based upon lower capacities for transport and phosphorylation in proliferative intestinal epithelium compared to tumor cells. *Cancer Res* 1987; 47: 700-706.



25. Sirotiak FM, Chello PL, Dorick DM et al. Specificity of systems mediating transport of adenosine, 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoro-adenine, and other purine nucleoside analogues in L1210 cells. *Cancer Res* 1983; 43: 104-109.
26. Gandhi V, Nowak B, Keating M et al. Modulation of arabinosylcytosine metabolism by arabinosyl-2-fluoradenine in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for combination therapy. *Blood* 1989; 74: 2070-5.
27. Bellosillo B, Villamor N, López-Guillermo A. et al. Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species. *Blood* 2001; 98: 2771-2777.
28. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T et al. Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD 20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD95 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* 2000; 95: 3900-3908.
29. Golay J, Lazzari M, Facchinetti V et al. CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell CLL: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 2001; 98: 3383-3389.
30. DiGaetano N, Xiao Y, Erba E et al. Synergism between fludarabine and rituximab revealed in a follicular lymphoma cell line resistant to the cytotoxic activity of either drug alone. *British J Haematol* 2001; 114: 800-809.
31. Sorensen JM, Vena DA, Fallavollita A et al. Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the Group protocol mechanism of the National Cancer Institute: five-year follow-up report. *J Clin Oncol* 1997; 15: 458-65.
32. Johnson S, Smith AG, Loffler H et al. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1996; 347: 1432-8.
33. Coiffier B, Neidhardt-Bérard E M, Tilly H et al. Fludarabine alone compared to CHVP plus interferon in elderly patients with follicular lymphoma and adverse prognostic parameters: A GELA study. *Ann of Oncol* 1999; 10: 1191-1197.
34. Hiddemann W, Unterhalt M, Pott Ch et al. Fludarabine single-agent therapy for relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphomas: A phase II study of the german low-grade non-Hodgkin's lymphoma study group. *Semin in Oncol* 1993; 20: 28-31.
35. Solal-Céligny P, Brice P, Brousse N et al. Phase II trial of fludarabine monophosphate as first line treatment in patients with advanced follicular lymphoma: a multicenter study by the Groupe d'Étude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 1996; 14: 514-519.
36. Laszlo D, Galieni P, Raspadori D et al. Fludarabine containing-regimens may adversely affect peripheral blood stem cell collection in low-grade Non-Hodgkin lymphoma patients. *Leukemia and Lymphoma* 2000; 37: 157-161.
37. Michallet M, Thiébaud A, Dreger P et al. Peripheral blood stem cell (PBSC) mobilization and transplantation after fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a report of the European Blood and Marrow Transplantation (EBMT) CLL subcommittee on behalf of the EBMT Chronic Leukaemias Working Party (CLWP). *Br J Haematol* 2000; 108: 595-601.
38. O'Donnell P, Loper K, Flinn G et al. Effect of fludarabine chemotherapy on peripheral blood stem cell transplantation (PBSC). *Blood* 1998; 92 (suppl 1): 120a (abstr 487).
39. Boldt DH, Von Hoff DD, Kuhn JG et al. Effects on human peripheral lymphocytes of in vivo administration of 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl-2-fluoro-adenine-5'-monophosphate (NSC 312887) a new purine antimetabolite. *Cancer Res* 1984; 44: 4661-4666.
40. Fenchel K, Bergmann L, Wijermans P et al. Clinical experience with fludarabine and its immunosuppressive effects in pretreated chronic lymphocytic leukemias and low-grade lymphomas. *Leukemia and Lymphoma* 1995; 18: 485-492.
41. Wijermans PW, Gerrits WBJ, Haak HL. Severe immunodeficiency in patients treated with fludarabine monophosphate. *Eur J Haematol* 1993; 50: 292-296.
42. Czuczman MS, Fallon A, Mohr A et al. Rituximab in combination with CHOP or fludarabine in low-grade lymphoma. *Semin Oncol* 2002; 29 (suppl 1): 36-40.
43. Cheson BD. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. *J Clin Oncol* 1995; 13: 2431-2448.
44. Annaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S et al. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann Int Med* 1998; 129: 559-566.
45. Leporrier M, Chevret S, Cazin B et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and CHOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2001; 98: 2319-25.
46. Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR et al. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1750-1757.
47. Hochster H S, Oken M M, Winter J A et al. Phase I study of fludarabine plus cyclophosphamide in patients with previously untreated low-grade lymphoma: results and long-term follow up - a report from the Eastern Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2000; 18: 987-994.
48. Lazzarino M, Orlandi E, Montillo M et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and dexamethasone (FluCyD) combination is effective in pretreated low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann of Oncol* 1999; 10: 59-64.
49. McLaughlin P, Hagemeister FB, Romaguera JE et al. Fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone: an effective new regimen for indolent lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1262-1268.
50. Zinzani PL, Bendandi M, Magagnoli M et al. Fludarabine-mitoxantrone combination-containing regimen in recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Ann of Oncol* 1997; 8: 379-383.
51. Zinzani PL, Magagnoli M, Moretti L et al. Randomized trial of fludarabine versus fludarabine and idarubicin as frontline treatment in patients with indolent or mantle-cell lymphoma. *J of Clin Oncol* 2000; 18: 773-779.
52. Flinn I W, Byrd J C, Morrison C et al. Fludarabine and cyclophosphamide with filgrastim support in patients with previously untreated indolent lymphoid malignancy. *Blood* 2000; 96: 71-75.
53. Lossos IS, Paltiel O, Polliak A. Salvage chemotherapy using a combination of fludarabine and cyclophosphamide for refractory or relapsing indolent and aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia and Lymphoma* 1999; 33: 155-160.
54. Mauro FR, Foa R, Cerretti R et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood* 2000; 96: 2786-2792.
55. Gonzales H, Leblond V, Azar N et al. Severe autoimmune hemolytic anemia in eight patients treated with fludarabine. *Hematol Cell Ther* 1998; 40: 113-8.
56. Bay JO, Fouassier M, Beal D et al. Autoimmune thrombocytopenia after six cycles of fludarabine phosphate in patient with chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* 1997; 39: 209-12.
57. Cheson BD, Vena DA, Foss FM, Sorensen JM. Neurotoxicity of purine analogs: a review. *J Clin Oncol* 1994; 12: 2216-28.
58. Grever M, Leiby J, Kraut E et al. A comprehensive phase I and II clinical investigation of fludarabine phosphate. *Semin Oncol* 1990; 17: 39-48.
59. Gonzales H, Bolger F, Leblond V. Progressive multifocal leukoencephalitis (PML) in three patients treated with standard-dose fludarabine (FAMP). *Hematology and Cell Therapy* 1999; 41: 183-6.
60. Garg S, Garg MS, Basraji N. Multiple pulmonary nodules: an unusual presentation of fludarabine pulmonary toxicity: case report and review of literature. *Am J Hematol* 2002; 70: 241-5.
61. Helman DL Jr, Byrd JC, Ales NC et al. Fludarabine-related pulmonary toxicity: a distinct clinical entity in chronic lymphoproliferative syndromes. *Chest* 2002; 122: 785-90.
62. Stoica GS, Greenberg HE, Rossoff LJ. Corticosteroid responsive fludarabine pulmonary toxicity. *Am J Clin Oncol* 2002; 4: 340-1.
63. Cheson BD, Vena DA, Barrett J, Freidlin B. Second malignancies as a consequence of nucleoside analog therapy for chronic lymphoid leukemias. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2454-2460.
64. Cohen Y, Da'as N, Libster D et al. Large-cell transformation of chronic lymphocytic leukemia and follicular lymphoma during or soon after treatment with fludarabine-rituximab-containing regimens: natural history- or therapy-related complication? *Eur J Haematol* 2002; 68: 80-3.
65. Klasa R, Meyer RM, Shustik C et al. Randomized phase III study of fludarabine phosphate versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone in patients with recurrent low grade non-Hodgkin's lymphomas previously treated with an alkylating agent or alkylator-containing regimen. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4649-54.
66. Tsimberidou AM, McLaughlin P, Younes A et al. Fludarabine, mitoxantrone, dexamethasone (FND) compared with an alternating triple therapy (ATT) regimen in patients with stage IV indolent lymphoma. *Blood* 2002; 100: 4351-4357.
67. Zinzani PL, et al. A randomized trial of fludarabine and mitoxantrone plus rituximab vs CHOP plus rituximab as first-line treatment in patients with follicular lymphoma. *Oncology* 2002; 16 (suppl 2): 12 (abstr 3500).
68. Forstpointner R, Hanel A, Repp R et al. Increased response rate with rituximab in relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas - results of a prospective randomized study of the German low-grade lymphoma study group. *Dtsch Med Wochenschr* 2002; 127: 2253-8.
69. Viardot A, Möller P, Högel et al. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4523-4530.
70. Aster JC, Kobayashi Y, Shiota M et al. Detection of the t(14;18) at similar frequencies in hyperplastic lymphoid tissues from american and japanese patients. *Am J of Pathol.* 1992; 141: 291-299.
71. Dölke G, Illerhaus G, Hirt C et al. Bcl-2/J<sub>H</sub> rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J of Clin Oncol.* 1996; 14: 1333-1344.
72. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993; 81: 3449-3457.
73. Meijerink JPP. T (14;18), a journey to eternity. *Leukemia* 1997; 11: 2175-2187.
74. Liu YJ, Mason DY, Johnson GD et al. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol.* 1991; 21: 1905-1910.
75. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988; 335: 440-2.
76. Zhang L, Insel PA. Bcl-2 protects lymphoma cells from apoptosis but not growth arrest promoted by cAMP and dexamethasone. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001; 281: C1642-C1647.
77. McLaughlin P, Hagemeister FB, Swan F et al. Intensive conventional-dose chemotherapy for stage IV low-grade lymphoma: high remission rates and reversion to negative of peripheral blood bcl-2 rearrangement. *Ann Oncol* 1994; 5 (suppl 2): 73-74.
78. López-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F et al. Applicability of the international index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J Clin Oncol.* 1994; 12: 1343-8.

79. Mandingers CMPW, Meijerink JPP, Mensink EJB et al. Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. *Blood* 2001; 98: 940-944.
80. Whelan JS, Davis CL, Rule S et al. Fludarabine phosphate for the treatment of low grade lymphoid malignancy. *Br J of Cancer* 1991; 64: 120-3.
81. Redman JR, Cabanillas F, Velasquez WS et al. Phase II trial of fludarabine phosphate in lymphoma: an effective new agent in low-grade lymphoma. *J of Clin Oncol* 1992; 10: 790-4.
82. Tondini C, Balzarotti M, Rampinelli I et al. Fludarabine and cladribine in relapsed/refractory low-grade non-Hodgkin's lymphoma: a phase II randomized study. *Ann of Oncol* 2000; 11: 231-233.
83. Belanger C, Solal-Céligny P, Neidhardt E M et al. Fludarabine monophosphate as first-line therapy for patients with advanced follicular lymphoma: updated analysis of and salvage treatment results from the Groupe d'Étude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trial. *Blood* 1997; 90: S1 abstr 1534.
84. Hagenbeek A et al. Fludarabine versus conventional CVP chemotherapy in newly diagnosed patients with stages III and IV low grade malignant non-Hodgkin's lymphoma. Preliminary results from a prospective, randomized, phase III clinical trial in 381 patients. *Blood* 1998; 92 suppl 1: 315a abstr 1294.
85. Crawley CR, Foran JM, Gupta RK et al. A phase II study to evaluate the combination of fludarabine, mitoxantrone and dexamethasone (FMD) in patients with follicular lymphoma (FL). *Ann Oncol* 2000; 11: 861-865.
86. Velasquez W et al. SWOG 95-01: A phase II trial of a combination of fludarabine and mitoxantrone (FN) in untreated advanced low grade lymphoma. An effective, well tolerated therapy. *Proc ASCO* 1999; 18: 9a abstr 27.
87. Dimopoulos MA, Fountzilas G, Papageorgiou E et al. Primary treatment of low-grade non-Hodgkin's lymphoma with the combination of fludarabine and mitoxantrone: a phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 111-4.
88. Santini G, Nati S, Spriano M et al. Fludarabine in combination with cyclophosphamide or with cyclophosphamide with mitoxantrone for relapsed or refractory low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2001; 86: 282-286.
89. Eucker J, Schille C, Schmid P et al. The combination of fludarabine and cyclophosphamide results in a high remission rate with moderate toxicity in low grade non-Hodgkin's lymphomas. *Anticancer Drugs* 2002; 13: 907-13.
90. Lynch JW, Hei DL, Braylan RC et al. Phase II study of fludarabine combined with interferon-alpha-2a followed by maintenance therapy with interferon-alpha-2a in patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Clin Oncol* 2002; 25: 391-7.
91. Zinzani PL, Bendandi M, Magagnoli M et al. Results of fludarabine induction and alpha-interferon maintenance protocol in pretreated patients with chronic lymphocytic leukemia and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 1997; 59: 82-8.
92. Rohatgi A, LaRocca RV, Bard V et al. Phase II trial of sequential therapy with fludarabine followed by cyclophosphamide, mitoxantrone, vincristine, and prednisone for low-grade follicular lymphomas. *Am J Haematol* 2002; 70: 181-185.
93. Wilder DD, Ogden JL, Jain VK. Efficacy of fludarabine/mitoxantrone/dexamethasone alternating with CHOP in bulky follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma* 2002; 2: 229-37.
94. McLaughlin P, Hagemester FB, Rodriguez MA et al. Safety of fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone combined with rituximab in the treatment of stage IV indolent lymphoma. *Sem Oncol* 2000; 27: 37-41.
95. Hiddemann W, Forstpointer R, Fiedler F et al. Combined immunotherapy (R-FCM) is superior to a fludarabine-containing chemotherapy (FCM) alone in recurrent follicular and mantle cell lymphoma – results of a prospective randomized comparison of the German low grade lymphoma study group. *Ann Oncol* 2002; suppl 2: abstr 186.

## knihy

### CLINICAL ONCOLOGY - BASIC PRINCIPLES AND PREVENTION, THIRD EDITION

NEAL, A. J., HOSKIN, P. J.

Arnold, A member of the Hodder Headline Group, London 2003  
294 str., 149 obr., 28 tab., ISBN 0-340-76409-0, cena 19,99 GBP.

Tato úspěšná kniha představující výtečně napsaný úvod do klinické onkologie sestává z 23 kapitol s touto tematikou: patogenéze zhoubných nádorů, principy diagnostiky a stážování zhoubných nádorů, rozhodování a komunikace, základy chirurgické onkologie, principy radioterapie, principy systematické léčby, rakovina plic a mesotheliom, nádory prsu, nádory GI traktu, urologické nádory, gynekologické nádory, nádory CNS, hlavy a krku, endokrinní nádory, sarkomy, lymfomy, hematologické malignity, maligní tumory u dětí, kožní tumory, tumory související s AIDS, karcinomy s neznámým primárním místem, náhlé onkologické příhody, paliativní péče.

V první kapitole jsou vysvětlovány genetické, chemické, fyzikální, virové, imunologické a endokrinní faktory, jež mohou hrát roli při vzniku zhoubných nádorů. Ve druhé kapitole se pojednává o stanovení diagnózy jednoduchou biopsií i více invazivními metodami (např. laparotomií nebo kraniotomií) a dále o stanovení velikosti a rozsahu nádoru za pomoci vyšetřovacích metod – snímkováním, sonografií, scintigrafií, CT, MRI, pozitronovou tomografií aj. Obsahem třetí kapitoly je komentář ke graficky prezentovanému rozhodovacímu schématu, jež sestává ze tří úrovní; na první úrovni rozhodnutí zahájí léčbu či nekoliv, na druhé rozhodnutí o radikální nebo paliativní léčbě, na třetí rozhodnutí o primární nebo adjuvantní léčbě. Čtvrtá kapitola o chirurgické onkologii je velmi stručná s důrazem na zásahy v případě primárních nádorů, kombinaci chirurgie s radioterapií, chirurgii regionálních lymfatických uzlin a paliativní chirurgii. Obsahem páté kapitoly je stručný výklad radioterapeutických přístupů s doplňky o biologických účincích ionizujícího záření a vedlejších účincích radioterapie. V šesté kapitole je probrána chemoterapie, její účinnost a toxicita, rezistence k chemoterapii, hormonální, biologická a experimentální chemoterapie. Uspořádání následujících kapitol o různých druzích nádorů je obdobné, text je členěn do odstavců o epidemiologii, etiologii, patologii, přirozené historii, příznacích, vyšetřeních, stážování, léčbě, komplikacích vztahujících se k nádorům, komplikacích spojených s léčbou, screeningu a prevenci.

Kniha je výtečně graficky upravena, uspořádání textu je mimořádně přehledné, důležité části a tabulky jsou odděleny od ostatních částí textu modrým podkladem, v některých kapitolách jsou kasuistiky, množství snímků je kvalitně reprodukováno, je připojen velmi podrobný rejstřík. V knize není citována žádná odborná literatura. Z učebnice původně napsané pro lékařské fakulty se v důsledku neustálého zlepšování a aktualizace v průběhu přípravy dvou dalších vydání (první vydání je z r. 1997) stala výtečná pomůcka nejen pro studenty, ale také pro mladé lékaře, středně zdravotnický personál i jiné pracovníky ve zdravotnictví, kteří chtějí získat přehled o tom, co je v oblasti současné

klinické onkologie nejdůležitější. Adresa nakladatelství: Arnold, a member of the Hodder Headline Group, 338 Euston Road, London NW1 3BH UK ([www.arnoldpublishers.com](http://www.arnoldpublishers.com)). V. H.

### MEDICAL THERAPY OF BREAST CANCER

RAYTER Z., MANSI J. (EDS.)

CAMBRIDGE, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS 2003  
394 s., cena 70,- GBP. ISBN 0-521-49632-2.

V posledních letech došlo k významnému pokroku v diagnostice a léčbě karcinomu prsu. Cílem recenzované knihy, kterou vytvořil kolektiv 21 autorů převážně z Velké Británie, je nabídnout čtenáři nejnovější poznatky v této oblasti v souhrnné formě. Samozřejmě se tak děje v kontextu se skutečnostmi známými již delší dobu a i když je hlavní těžiště informací zaměřeno na medikamentózní léčbu karcinomu prsu, nalezneme zde i informace o léčbě chirurgické a také o prevenci, screeningu a genetických aspektech tohoto závažného onemocnění.

Obsah díla je rozdělen do 14 kapitol. V prvním oddíle je zmíněna historie léčby karcinomu prsu, od prvních dochovaných informací ze starověkého Egypta až po současnost. Opakovaně se tu přesvědčujeme, že chirurgické postupy hrály v historii vždy rozhodující úlohu, zatímco teprve v posledním období jsou zaznamenávány významnější úspěchy medikamentózní léčby. Druhá kapitola popisuje význam preventivní chemoterapie u pacientek s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu. Jde zejména o ženy, které jsou nositelkami mutací genů BRCA1 a BRCA2. Kritickému rozboru jsou zde podrobeny publikované výsledky studií s tamoxifenem a raloxifenem. Následuje 9 stran věnovaných familiárnímu výskytu karcinomu prsu a 20 stran o hormonální terapii. Autoři zde rozebírají zatím neúplné a místy i kontroverzní poznatky o úloze endogenních a exogenních estrogenů, jejich účinků a úlohy v období menopauzy. Další kapitola popisuje roli screeningu, výhody a omezení jednotlivých zobrazovacích metod v něm i věkové hranice, od kterých by měl být screening prováděn. V šesté kapitole nalezneme postupy používané v léčbě in situ karcinomu prsu, včetně chirurgických záchranných operací. Dalších 8 oddílů, reprezentujících převážnou část knihy, je věnováno nechirurgické léčbě. Nalezneme zde informace o všech významných v současnosti používaných možnostech – adjuvantní systémové terapii, adjuvantní radioterapii, primární chemoterapii včetně vysokodávkové, nových imunologických přístupech, úloze bifosfonátů a paliativní terapii. Rozsáhlý oddíl je věnován možnostem predikce úspěšné terapeutické odpovědi či rezistence na jednotlivé druhy léčby. Každá kapitola končí četnými literárními odkazy.

Ve všech oddílech knihy je patrný kritický přístup k dosud publikovaným informacím a snaha o zařazení nejnovějších poznatků do kontextu již známých a prověřených faktů. Nejde tedy o klasickou učebnici, ale dílo přinášející v souhrnné formě aktuální informace v oblasti léčby karcinomu prsu. M. H.

# MOLEKULÁRNÍ DETEKCE VOLNÝCH NÁDOROVÝCH BUNĚK A MIKROMETASTÁZ U KARCINOMU PRSU A KOLOREKTA POMOCÍ RT-PCR SPECIFICKÉ PRO CYTOKERATINY 19 A 20

## MOLECULAR DETECTION OF ISOLATED TUMOR CELLS AND MICROMETASTASIS IN BREAST AND COLORECTAL CARCINOMA BY CYTOKERATINS 19 AND 20 SPECIFIC RT-PCR

SEDLÁČEK J., VYZULA R.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

**Souhrn:** Výskyt metastáz u pacientů se solidními nádory velmi negativně ovlivňuje prognózu. Současné zobrazovací techniky však nemají dostatečnou rozlišovací schopnost pro zachycení časných stádií metastatického procesu. V posledních letech se proto s rozvojem nových molekulárně-biologických metod soustřeďuje pozornost na včasné rozpoznání diseminace nádorových buněk. Tyto techniky umožňují rozpoznání jednotlivých nádorových buněk mezi řádově  $10^4$  až  $10^6$  zdravých buněk a tím mohou přispět k dřívějšímu zachytu metastáz. Zvláštní pozornost je věnována detekci mikrometastáz stanovením mRNA cytokeratinů 19 a 20 u nádoru prsu a kolorektálního karcinomu pomocí zpětné polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). Touto metodou je možné zjistit přítomnost nádorových buněk v periferní krvi, lymfatických uzlinách nebo biopsii u vysokého procenta pacientů s tímto maligním nádorovým onemocněním. Dodnes však není zcela vyjasněn skutečný přínos stanovení volných nádorových buněk a mikrometastáz pro klinickou praxi. Bude proto zapotřebí dalších studií, které by pomohly definovat použitelnost těchto metod pro určení dalšího léčebného postupu.

**Klíčová slova:** cytokeratin, volné nádorové buňky, mikrometastázy, kolorektální karcinom, karcinom prsu, RT-PCR

**Abstract:** The metastasis occurrence very negatively affects prognosis of solid tumor patients. However, current imaging techniques do not have sufficient resolution for detection of early stages of metastatic process. Along with recent development of new molecular-biological methods, the attention has been focused on early diagnosis of tumor cells dissemination. These techniques make possible to distinguish single tumor cell among on order of  $10^4$ - $10^6$  healthy cells and thereby they can contribute to earlier catchment of metastase formation. Special attention is dedicated to micrometastasis determination by detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in breast and colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). This method is able to find out the presence of tumor cells in peripheral blood, lymphatic nodes or biopsies in high percentage of patients with malignant tumor. However, real contribution of assessment of isolated tumor cells and micrometastases for clinical practice has not been clarified up to the present day. There will be needed next studies to define applicability of these methods for determination of further patient treatment.

**Keywords:** cytokeratin, isolated tumor cells, micrometastases, colorectal carcinoma, breast carcinoma, RT-PCR

Klasická TNM klasifikace rozděluje pacienty do několika skupin na základě statutu primárního nádoru, lymfatických uzlin a vzdálených metastáz. V rámci těchto skupin lze pro každého jednotlivého pacienta stanovit míru rizika vzniku metastatického ložiska, případně relapsu nemoci po odstranění primárního nádoru. Nicméně, jedná se pouze o statistické vyjádření pravděpodobnosti založené na výsledcích rozsáhlých studií. Adjuvantní terapii proto mohou obdržet i pacienti, u kterých nemá žádný dodatečný léčebný účinek. Na druhou stranu, u pacientů, kteří adjuvantní terapii z důvodu zařazení do nižšího stadia TNM klasifikace neobdrží, může dojít k relapsu nádorového onemocnění. Pro lepší rozlišení těchto dvou skupin je proto důležité individualizovat možná rizika a na základě těchto faktorů rozhodnout o vhodnosti další léčby.

Jedním z možných přístupů je co nejčasnější zachycení diseminace nádorových buněk. První zmínka o volných nádorových buňkách (VNB) pochází z roku 1869. Asworth (1) popsal případ rakoviny, kdy ještě po smrti pacienta byly v jeho krvi objeveny buňky připomínající nádorové. Tyto buňky se po uvolnění z nádoru šíří jak krevní, tak i lymfatickou cestou a po jejich extravazaci do cílového orgánu může dojít ke vzniku mikrometastáz (MMTS) a následně tvorbě makroskopických metastáz. Jak VNB, tak také MMTS (z důvodu malé velikos-

ti a nepřítomnosti vaskularizace) představují velice vhodný cíl pro protinádorovou terapii. Dostatečně citlivé metody pro detekci těchto buněk však byly vyvinuty až v posledních přibližně 20 letech (imunohistochemie, flowcytometrie, PCR). V této době bylo otestováno mnoho markerů pro rozlišení buněk nádorového původu (VNB a MMTS) od buněk okolní tkáně (viz. kapitola 2). Tento článek podává stručný přehled o metodách, které mohou sloužit k detekci VNB a MMTS, hlavně se však zaměřuje na využití polymerázové řetězové reakce a konkrétně na použití cytokeratinových markerů u nádoru prsu a kolorektálního karcinomu.

### 1. Metody umožňující detekci volných nádorových buněk a mikrometastáz

**1.1. Histologie a imunohistochemie.** Velkou pozornost vyvolala v polovině 50. let možnost detekce VNB pomocí histologických metod (2). Mezi lety 1955-65 bylo vyšetřeno na přítomnost VNB asi 5.000 pacientů s rakovinou (3). VNB byly detekovány téměř ve 100% případech. Velmi brzy se však ukázalo, že často docházelo k záměně hematopoetických buněk (zvláště megakaryocytů) s nádorovými buňkami (3). Znovuoživení v oblasti mikroskopických technik detekce VNB a MMTS přinesl až v 80. letech objev imunohistochemie (IHC). Použití této metody umožňuje detekci 1 nádorové buňky mezi

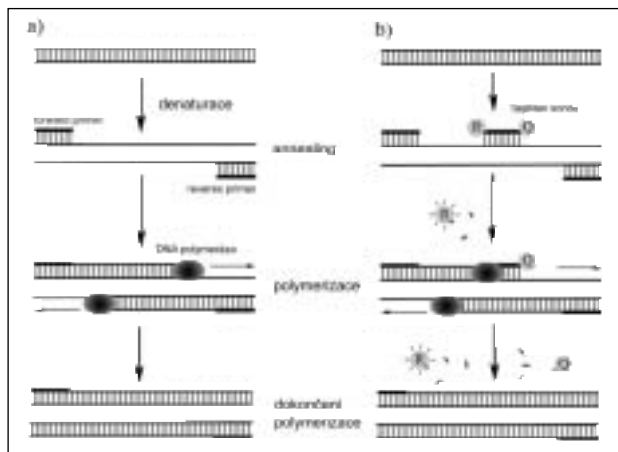
10 000 – 100 000 mononukleáry za pomoci obarvení preparátu monoklonálními protilátkami proti antigenům specifickým pro nádorové buňky. Nevýhodou je však omezený počet hodnocených buněk. Navíc i přes využití automatizovaného zpracování obrazu metoda zdaleka nedosahuje citlivosti polymerázové řetězové reakce. Nevýhodou je také možnost křížové reakce protilátky s epitopy příbuzných proteinů.

**1.2. Průtoková cytometrie** je založena na vytvoření proudu suspenzních buněk, které jsou obklopeny izotonickým roztokem vytvářejícím laminární proudění a které prochází individuálně průtokovou komorou. V průtokové komoře jsou buňky ozařovány monochromatickým světlem, většinou emitovaným laserem. Světlo vyzařované buňkami je následně vedeno přes sérii filtrů a dichroických zrcadel, které izolují jednotlivá spektra. Fotony jednotlivých vlnových délek jsou poté detekovány fotonásobiči a naměřené hodnoty jsou počítačově zpracovány (4). Často se využívá měření obsahu jaderné DNA za použití fluorescenčních barviv interkalujících do struktury DNA helixu, jako je například propidium jodid. Aneuploidie nádorů je obecně spojena s malignitou a horší prognózou (5), avšak může se vyskytovat i u benigních onemocnění (6). Jako marker určující stupeň proliferace se často užívá procentuální poměr buněk v S-fázi (7). Průtoková cytometrie umožňuje také stanovovat množství jak povrchových, tak i vnitrobuněčných proteinů s využitím širokého spektra monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorescenčním barvivem. Tento způsob je použitelný pro stanovování VNB a MMTS. Hlavní výhodou oproti IHC spočívá ve schopnosti vyhodnotit velké množství buněk a také v objektivitě hodnocení. Velkého uplatnění se průtoková cytometrie dočkala hlav-

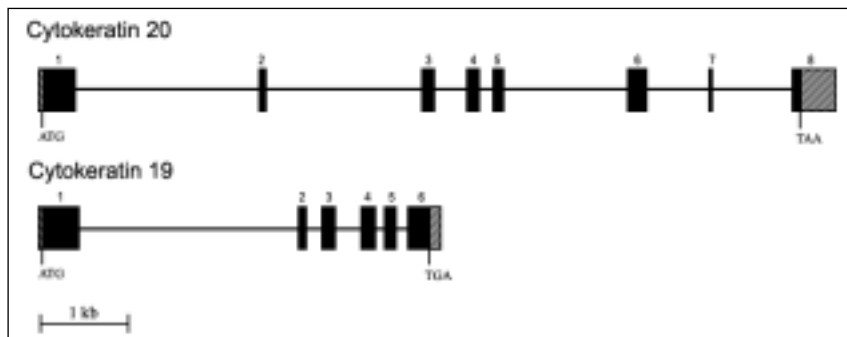
ně v hematologii a hematonekologii (shrnuto v ref. 4). V biologii solidních nádorů jsou však výsledky mnohem více protichůdné. Existuje množství studií potvrzujících možnost použití průtokové cytometrie v praxi (7-10), avšak také práce, kde nebyla nalezena žádná asociace mezi zkoumanými parametry a klinickým výstupem (11-14).

**1.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)** byla poprvé popsána roku 1985 Karry B. Mullisem (15), který za ni roku 1993 obdržel Nobelovu cenu. Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu umožňující detekci vybrané sekvence DNA její mnohonásobnou amplifikací za použití sekvence specifických oligonukleotidů (primerů) a DNA polymerázy. Typický průběh PCR zahrnuje 35 – 40 cyklů, přičemž každý cyklus sestává z následujících kroků (obr. 1a): (a) dvouřetězová DNA je separována tepelnou denaturací; (b) následně po ochlazení dochází k nasednutí primerů (annealing); (c) po ohřátí na teplotu optimální pro funkci DNA polymerázy je syntetizován komplementární řetězec. Vzniklé fragmenty DNA jsou poté detekovány elektroforeticky. Citlivost PCR je podstatně vyšší než citlivost tradičních histologických a imunohistochemických metod. Zpětná polymerázová řetězová reakce (RT-PCR), poprvé použitá v roce 1987 (16), je modifikací dovolující detekci úseku mRNA, která je nejprve enzymem reverzní transkriptázou přepsána do komplementární DNA (cDNA). Použitím více sad primerů (nested PCR) je možné stanovit dokonce pouze 1 nádorovou buňku v 1 ml periferní krve (17). Jedním z faktorů komplikujících klasickou PCR je možnost amplifikace nespecifických sekvencí - při málo stringentních (málo přísných) podmínkách mohou primery nasedat na místa pouze částečně homologní s cílovou sekvencí a tak může dojít i k amplifikaci jiných částí genomu. Tomuto problému se dá zčásti vyhnout výběrem vhodných primerů a používáním vysoce stringentních podmínek. Hlavní nevýhodou klasické PCR je však nemožnost přesně kvantifikovat množství templátové DNA ve vzorku. Je to způsobeno povahou této metody – v závěrečné fázi reakce není už pro množství vznikajícího produktu limitující počet templátových molekul DNA, ale kompetice o DNA polymerázu, primery a nukleotidy.

Obr. 1: Princip (a) klasické PCR, (b) kvantitativní PCR v reálném čase. Q – zhášedlo (quencher), R – fluorescenční barvivo (reporter)



Obr. 1b: Intron-exonová organizace genů pro lidský cytokeratin 19 a 20. Obdélníky představují exony, introny jsou reprezentovány horizontálními liniemi. Vyznačeny jsou pozice iniciačních a terminačních kodonů. Gen pro cytokeratin 20 se skládá z 8 exonů o délce 38 – 518 bp, zaujímá 9,29 kb na chromozomu 17q21.2. Gen pro cytokeratin 19 se skládá z 6 exonů o délce 83 – 473 bp a zaujímá 4,69 kb na chromozomu 17q21.2.



**1.4. Základy kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)** byly položeny již na počátku 90. let (18, 19). Jednou z možností je využití fluorescenčního barviva interkalujícího mezi báze DNA (ethidium bromid, SYBR Green) a detekce takto vzniklé fluorescence (19). Tento přístup bohužel neodstraňuje problémy spojené s nespecifickou amplifikací, protože detekována je každá dvouřetězová DNA. V současné době je asi nejvíce rozšířena tzv. 5'-nukleázová reakce využívající TaqMan sond. První využití 5'-exonukleázové aktivity DNA polymerázy pro účely přesné kvantifikace DNA se sice datuje do roku 1991, kdy Holland a kol. popsali kvantifikaci DNA za použití terminálně radioaktivně značené sondy (18), ale první prakticky použitelné systémy (založené na fluorescenčně značených sondách) se objevily až v druhé polovině 90. let (20-22). Hlavní změnou proti klasické PCR je použití oligonukleotidu (TaqMan sonda), který se specificky váže na sekvenci mezi oba primery (obr. 1b). Na 5'-konci je sonda naznačena kovalentně navázaným fluorescenčním barvivem (reporter, „R“), jehož emisní spektrum je zhášeno druhým fluorescenčním barvivem navázaným na 3'-konci sondy (zhášedlo, quencher, „Q“). Dále je sonda na 3'-konci modifikována fosfátem, který zabraňuje extenzi sondy během amplifikace. Při polymerizaci z primeru dojde působením 5'-exonukleázové aktivity DNA polymere-

rázy k odstěpení reportérového barviva a tím k jeho uvolnění z blízkosti zášedla, což vede ke vzrůstu fluorescence. Cyklus, ve kterém dojde k nárůstu fluorescence na detekovatelnou úroveň, je nazýván Ct (threshold cycle) a je nepřímo úměrný koncentraci cílové DNA. Čím větší je množství templátové DNA, tím menší množství cyklů je zapotřebí k dosažení Ct (pro přehled (23, 24).

## 2. Možné způsoby detekce volných nádorových buněk a mikrometastáz pomocí PCR

### 2.1. Detekce chromozomálních aberací a mutací specifických pro daný nádor.

Přes rozsáhlý výzkum nebyla dodnes nalezena žádná mutace nebo chromozomální aberace specifická pro nádorové buňky většiny solidních nádorů. Naproti tomu chromozomální aberace asociované s určitým typem vykazují leukémie (např. reciproká translokace t(15;17) způsobující tvorbu fúzního genu PLM/RAR $\alpha$  je specifická pro akutní promyelocytární leukémii). Tento rozdíl je způsoben na jedné straně difúzní povahou hematologických malignit a na straně druhé vysokou heterogenitou solidních nádorů. Pokud se jedná o mutace, je situace velice podobná. Pravděpodobně nejčastěji mutovaným genem v nádorech je gen pro nádorový supresor p53, který se účastní mnoha buněčných procesů, včetně transkripce, opravy DNA, udržování stability genomu, stárnutí buňky, kontroly buněčného cyklu a apoptózy (25). Jeho mutace proto mohou mít dalekosáhlé důsledky v regulaci buněčných pochodů. Využití stanovení p53 v primárním nádoru pro prognostické účely se potenciálně jeví jako velice zajímavé (25, 26). I když je p53 asi nejvíce mutovaným genem v lidských nádorech, jeho mutace se vyskytují jen v necelé polovině všech nádorů (27). Dalším problémem je široké spektrum mutací (25), které znemožňuje vytvoření univerzálních pramerů schopných detekovat tento mutovaný gen. Mutace genu p53 navíc pravděpodobně nejsou potřebné pro časnou diseminaci nádorových buněk (27). Tím se použití p53 pro detekci VNB stává velice diskutabilní (28). Podobné výhrady platí i pro další markery této skupiny, např. Ras (25).

### 2.2. Detekce tkáňově specifických markerů.

Jedná se o markery (mRNA, proteiny), které musí splňovat několik základních kritérií. Za prvé musí být exprimovány v tkáni, odkud nádor pochází. Jejich výskyt by se v průběhu karcinogeneze neměl pokud možno výrazněji měnit. Za druhé nesmí být exprimovány (nebo alespoň ve významném množství) v místě detekce, tj. periferní krvi, kostní dřeni nebo lymfatických uzlinách. Tento jednoduchý požadavek je často komplikován nelegitimní transkripcí v místě detekce (viz. dále). V současné době je asi nejintenzivněji studována skupina cytoskeletárních proteinů – cytokeratinů, na které je tento článek zaměřen.

### 2.3. Jiné možné markery.

Dalším často studovaným markerem je karcinoembryonální antigen (CEA). Za normálních podmínek není exprimován v buňkách tkání dospělého člověka, při vývoji nádoru se však jeho hladina zvyšuje s pokračující dediferenciací buněk. Ve většině studií však vykazuje horší výsledky než cytokeratiny. Tvorba nádoru je doprovázena zvýšenou genomovou nestabilitou a nádorové buňky vykazují rozsáhlé chromozomové přestavby včetně amplifikací, duplikací, delecí a translokací. Některé z těchto změn mohou být detekovány pomocí alel-specifických markerů, jako např. mikrosatelitů. Mikrosatelity jsou malé repetitivní sekvence rozptýlené v genomu, které vykazují vysoký polymorfismus v populaci. Takto lze detekovat například ztrátu heterozygoty (loss of heterozygosity, LOH), která může způsobit vyrazení funkčních alely genu. Tato metoda se však v praxi potýká s mnoha problémy: výběr mikrosatelitních markerů; nutnost mikrodisekce nádorové tkáně, neboť přítomnost nepoškozené DNA z okolní tkáně může způsobit ztrátu signálu; nutnost standardizace množství vstupní DNA nebo např. chyby polymerázy způsobující 3' netemplátovou extenzi (28). Potenciál vyu-

žití analýzy mikrosatelitů by však mohl spočívat v ověření nádorového původu buněk detekovaných za pomoci histologie nebo imunohistochemicky (28).

## 3. Lesk a bída PCR

Citlivost PCR reakce je o několik řádů vyšší než citlivost mikroskopických technik. Dokáže spolehlivě zachytit nepatrné množství buněk, které je hluboko pod detekčním limitem histologických metod. Další výhodou je fakt, že vyhodnocování výsledků PCR, a obzvláště kvantitativní PCR v reálném čase, není tak výrazně zatíženo rozdílnou zkušeností pracovníků jako v případě histologie nebo imunohistochemie. Nicméně také PCR má mnoho úskalí, kterým je nutné se vyhnout a na něž považujeme za nezbytné upozornit. Některé z těchto příčin jsou uvedeny v tab. 1 a podrobněji popsány v dalším textu.

Tab. 1: Možné příčiny falešné pozitivita a negativita.

Falešná pozitivita	Falešná negativita
<i>Kontaminace epiteliálními buňkami</i>	<i>Špatná kvalita RNA/DNA</i>
<i>Kontaminace genomovou DNA</i>	<i>Inhibice reakce</i>
<i>Křížová kontaminace</i>	<i>Jiné faktory</i>
<i>Přítomnost pseudogenů</i>	
<i>Nelegitimní transkripce</i>	

### 3.1. Možné příčiny falešně pozitivních výsledků

#### 3.1.1. Kontaminace epiteliálními buňkami.

Pokud se při detekci VNB u pacientů se solidními nádory využívá markerů specifických pro epiteliální buňky, je nezbytné nutné věnovat maximální pozornost eliminaci příčin možné kontaminace vzorku těmito buňkami. Jedním ze zdrojů jsou buňky kůže (např. Merkelovy buňky exprimující cytokeratin 20 (29), které se mohou dostat do vzorku periferní krve při odběru. Proto je zapotřebí pro účely stanovení VNB odebírat několik frakcí krve a vyhnout se analýze první frakce následující bezprostředně po vpichu. Při operaci dochází k uvolnění jak nádorových, tak i normálních epiteliálních buněk zdravé tkáně (30, 31), které mohou způsobit falešnou pozitivitu, pokud je vzorek odebrán při operačním zákroku nebo bezprostředně po něm. Periferní krev pro analýzu by proto měla být odebírána vždy až několik dnů po operaci. Dalším možným způsobem, jak se mohou do vzorku dostat epiteliální buňky, je z rukou laboratorních pracovníků. Proto je důležité dodržovat maximální opatrnost a pracovat zásadně v rukavicích.

#### 3.1.2. Kontaminace genomovou DNA.

Detekce VNB je ve většině případů závislá na stanovení tkáňově specifické mRNA metodou RT-PCR. Je proto důležité, aby vzorek nebyl kontaminován genomovou DNA, což by vedlo k falešně pozitivním výsledkům. Protože však není možné vyizolovat zcela čistou RNA, bylo vyvinuto několik postupů, které řeší tuto situaci. Jednou z možností je použití enzymu DNázy I, který nespecificky štěpí DNA. Dále lze při návrhování pramerů využít faktu, že mnoho genů je složeno z exonů a intronů, a navrhnout primery nacházející se na různých exonech. Amplikony získané PCR z cDNA jsou v důsledku nepřítomnosti intronů v mRNA elektroforeticky rozlišitelné na základě velikosti od amplikonů obdržených z genomové DNA, které introny zahrnují. Lze také navrhnout primer (TaqMan sondu) tak, aby zahrnoval sekvenci ze dvou vedle sebe se nacházejících exonů. PCR potom proběhne pouze tehdy, je-li mezilehlý intron vyštěpen a dojde tak ke spojení obou exonů. Tento způsob bohužel nelze uplatnit, vyskytuje-li se u daného genu alternativní sestřih.

#### 3.1.3. Křížová kontaminace.

Další častou komplikací je kontaminace PCR produkty z předchozích amplifikací prováděných ve stejné laboratoři. Řešením je fyzické oddělení prostor

sloužících k přípravě a analýze vzorků, což není bohužel vždy proveditelné. Další možností je použití dUTP (deoxyuridinu) místo dTTP (deoxytymidinu) v PCR reakci. Možné kontaminující produkty dřívějších reakcí jsou na začátku nové PCR reakce rozloženy enzymem deoxyuracil-N-glykosylázou (UNG). Templátová DNA však zůstane intaktní, neboť přírodní DNA uracil neobsahuje.

**3.1.4. Nelegitimní transkripce.** Obecně je přijímán ne zcela správný názor, že buňka exprimuje dvě skupiny genů – tzv. provozní („housekeeping“) geny kódující proteiny základního buněčného metabolismu, které jsou nutné pro fungování buněk všech typů, a tkáňově specifické geny, jejichž exprese je omezena pouze na úzce vymezenou skupinu buněk. V roce 1988 však Chelly a kolektiv zjistili expresi genu pro lidský dystrofin také v několika jiných tkáních (32). Tento jev byl potvrzen také u jiných tkáňově specifických genů – genu pro MIH (hormon polačující vývoj Müllеровých vývodů),  $\beta$ -globin, aldolázu A a faktor VIIIc v buňkách lidských tkání, pro které není exprese těchto genů specifická (33). Fenomén ekto-pické exprese mRNA byl nazván nelegitimní transkripce. Frekvence transkriptů byla vypočítána jako 1 molekula mRNA na 100 až 1000 buněk, což znamená mnohem méně než jednu kopii na buňku (34). Naproti tomu však byla detekována exprese 26 různých mRNA, považovaných za tkáňově specifické, v jednom lymfocytu, spermii nebo nádorové buňce (35). Tato hladina transkriptů je sice naprosto nedostatečná pro tvorbu funkčně relevantního množství proteinu, nicméně může znamenat velmi vážnou komplikaci pro detekci MMTS v klinických vzorcích, kde jsou normální buňky ve velkém nadbytku nad buňkami nádorovými. V případě klasické RT-PCR může být nelegitimní transkripce téměř neproblematickým problémem, neboť ekto-pická exprese mRNA v nenádorových tkáních může být zdrojem falešně pozitivních výsledků. S nástupem kvantitativních technik (komparativní nebo kompetitivní end-point PCR, ale hlavně kvantitativní PCR v reálném čase) se začíná stále více využívat možnosti stanovit na základě znalosti přesného množství transkriptu hranici rozdělující normální a patologickou (způsobenou přítomností VNB a MMTS) hladinu mRNA.

**3.1.5. Přítomnost pseudogenů.** Dalším zdrojem falešně pozitivních výsledků při detekci markerové mRNA může být přítomnost pseudogenů a genových fragmentů v genomu. Jedná se o sekvence blízké příbuzné funkčním genům a až na výjimky transkripčně inaktivní z důvodu nepřítomnosti promotorové oblasti. Mechanismus jejich vzniku je dvojitý: (a) genová duplikace a (b) reverzní transkripce mRNA a následně začlenění zpět do genomu. Genová duplikace je mechanismus podílející se mimo jiné na vzniku nových genů zdvojením původního genu. Duplikovaná sekvence si zachovává svou exon-intronovou strukturu, avšak u pseudogenů duplikace nezahrnuje regulační oblasti a proto nejsou schopny přepisu do funkční mRNA. Upravené pseudogeny (processed pseudogenes) vzniklé přepisem z mRNA kromě regulačních oblastí navíc ve srovnání s pseudogeny vzniklými duplikací postrádají introny. V důsledku sníženého selekčního tlaku na oblasti DNA neobsahující geny potřebné pro funkci buňky, dochází v pseudogenech k podstatně rychlejšímu mutačním změnám než v původním genu (shrnuto v ref. 36). Při navrhování primerů je proto nutné využívat rozdílů v sekvencích funkčního genu a pseudogenu.

## 3.2. Možné příčiny falešně negativních výsledků

**3.2.1. Špatná kvalita RNA/cDNA.** RNA je velice citlivá molekula. RNázy jsou hojně přítomné v okolním prostředí a vysoce stabilní. Velmi proto záleží na zvoleném způsobu manipulace se vzorkem (vzorek je nutné dostatečně rychle zpracovat, nebo zamrazit na teplotu minimálně  $-70^{\circ}\text{C}$ ) a na použité metodě izolace RNA. Chadderton a kol. například porovnávali tři

reagencie používané k izolaci RNA a shledali Trizol-LS vhodnější pro izolaci dostatečného množství čisté RNA než RNA-STAT-50 a Ultraspec-3 (37).

**3.2.2. Inhibice reakce.** Původ klinických vzorků zpracovávaných metodou PCR může být velmi různý – nejčastěji se jedná o vzorky periferní krve, punkce kostní dřeně, biopsie nádorů nebo lymfatické uzliny. Rozdílné jsou i postupy používané při uchování a zpracování vzorků – některé z těchto technik mohou využívat chemikálie inhibující průběh PCR nebo reverzní transkripce (RT). Heparin, hojně využívaný jako anti-koagulant pro uchování vzorků krve, inhibuje DNA polymerázu (38). Řešením je ošetření vzorku heparinázou (39), nebo použití jiného antikoagulantu, jako například EDTA nebo citrátu (40). Průběh reakce může být ovlivněn i dalšími látkami používanými k purifikaci DNA (SDS, fenol, etanol, izopropanol, acetat sodný, NaCl) nebo k jejímu uchování (EDTA v TE pufru) (41, 42). Jiné inhibitory mohou být obsaženy přímo ve vzorku – například hemová složka hemoglobinu (41). Proto je velice důležité věnovat pozornost látkám s možným inhibičním efektem používaným při zpracování vzorku nebo v něm přímo obsažených.

**3.2.3. Jiné faktory.** Další možné vlivy mohou zahrnovat kontaminaci velkým množstvím DNA, která může kompetovat s cDNA o primery a snižovat tak citlivost RT-PCR. Výběr špatných housekeepingových genů pro normalizaci může také způsobit falešnou negativitu. Pokud je referenční gen exprimován v buňkách ve velkém množství, může být detekován i při špatné kvalitě cDNA, kdy již není zachycena mRNA markeru s expresí o několik řádů nižší (43). Samozřejmě nemohou být vyloučeny ani lidské chyby.

## 3.3. Další stinné stránky PCR

PCR je sice metoda podstatně citlivější než histopatologie, imunohistochemie nebo průtoková cytometrie, jde však o techniku do značné míry destruktivní. Po provedení analýzy již není možné zpětně ověřit morfologické povahy buněk, ani jejich množství. V posledním bodě může být velice užitečná kvantitativní PCR, nicméně vzhledem k možnosti změny exprese genů v nádorové tkáni nemůže v tomto bodě nahradit tradiční metody. V případě RT-PCR je nevýhodou oproti histologii a IHC podstatně snížená možnost provádění retrospektivních studií. Materiál bývá většinou konzervován formaldehydem a parafínem a vzhledem k velice nízké kvalitě RNA se nehodí pro zpracování touto metodou.

## 4. Cytokeratiny

### 4.1. Cytoskelet

Cytoplazma není jen beztvárovou polotekutou hmotou, ale vysoce organizovanou strukturou. Její kostru tvoří cytoskelet – jedná se o komplexní síť vláken, jejichž úkolem je udržovat dynamickou morfolologii buňky v neustále se měnícím prostředí. Hlavními funkcemi je poskytovat buňce oporu a udržovat její integritu, zakotvení vnitřních organel k cytoplazmatické membráně, cytoskelet se dále podílí na mitóze, přenosu signálů apod. Cytoskelet vyšších eukaryot se skládá ze tří hlavních komponent: (a) mikrotubulů, které jsou tvořeny  $\alpha$  a  $\beta$  tubulinem uspořádaným do dutých vláken o průměru 25 až 28 nm; (b) mikrofilament o průměru 6-8 nm a (c) středních (intermediárních) filament o průměru 8-11 nm. Tyto tři hlavní složky cytoskeletu je nutné posuzovat v celku – teprve ve vzájemné interakci a v kombinaci s dalšími proteiny jsou schopny zajišťovat tvorbu vysoce dynamické cytoarchitektury specifické pro jednotlivé buněčné typy (44). Mikrotubuly se podílí na tvorbě mitotického vřeténka při rozdělování chromozomů do jednotlivých dceřinných jader při buněčném dělení, hrají důležitou roli při udržování tvaru buňky, podílí se také na pohybu organel i celých buněk apod. Mikrofilamenta jsou tvořena aktinovými proteiny a v buňce zajišťují hlavně pohybové funkce –

udržování a změnu tvaru buňky, proudění cytoplazmy, jsou součástí dělicího vřeténka atd.

#### 4.2. Intermediární filamenta

Intermediární filamenta (IF) ve spojení s mikrotubuly a mikrofilamenty stabilizují strukturu buňky a její tvar (svou vysokou stabilitou a elasticitou) a představují tak velice důležitou součást nitrobuňkové kostry. Zatímco aktiny a tubuliny jsou vysoce konzervativní globulární proteiny schopné vázat a hydrolyzovat nukleotidtrifosfáty, IF jsou tvořena vláknitými proteiny bez známé enzymatické aktivity. Jsou charakterizovány výskytem  $\alpha$ -helikální tyčinkovité („rod“) domény tvořené svnutým helixem, která má sice velmi konzervovanou strukturu, nicméně se může podstatně lišit v primární sekvenci. IF lze rozdělit na základě biochemických a imunologických kritérií do minimálně pěti tříd (45): (a) keratinová filamenta nacházející se v epitelálních buňkách a buňkách epitelálního původu; (b) desminová filamenta převážně buněk hladkého, kosterního a srdečního svalstva; (c) vimentinová filamenta vyskytující se v buňkách mezenchymálních a mezenchymálního původu; (d) neurofilamenta nacházející se v neuronech; (e) gliová filamenta typická pro všechny typy gliových buněk. Další možné rozdělení vychází ze sekvenční homologie proteinů IF a dělí je do pěti genových rodin (44). Ty zahrnují keratiny, které reprezentují skupiny homologie I a II kódované více než 20 geny a dalších 15 genů pro trichocytární keratiny („hair“ keratiny); proteiny typu III – desmin, vimentin, GFAP a peripherin; skupinu IV zahrnující  $\alpha$ -internexin, syncoilin, nestin, synemin a neurofibrilární proteiny NF-L, -M a -H. Nukleární laminy A/C, B1 a B2 tvoří typ V; proteiny oční čočky phakinin a filensin jsou začleněny do zvláštní skupiny.

#### 4.3. Cytokeratiny

V nedávné době byla publikována studie, ve které se Hesse a kol. (46) pokusili určit počet genů pro IF s využitím databází NCBI a Celera Genomics. Došli k číslu 65, což řadí IF mezi 100 největších genových rodin v genomu člověka. 49 genů z tohoto množství tvoří geny pro keratiny. Ty se dělí do dvou podskupin, na trichocytární („hair“) keratiny tvořící hlavní část vlasů a jiných kožních derivátů, a na tzv. cytokeratiny, které jsou hlavními strukturálními proteiny epitelálních buněk. Protože pro další výklad je relevantní pouze poslední jmenovaná skupina, bude v dalším textu uvažována již jen tato. Některé z uvedených principů jsou však platné i pro rodinu „hair“ keratinů.

Cytokeratiny (CK) lze rozdělit na základě jejich molekulové hmotnosti a izoelektrického bodu, které se pohybují v rozsahu 40-68 kDa, resp. pH 5-8, do dvou skupin: na menší kyselé polypeptidy typu I (CK9 – CK23) a větší bazické nebo neutrální proteiny typu II (CK1 – CK8) (47, 48). Do dnešního dne bylo zatím identifikováno 16 genů pro keratiny typu I a 18 genů typu II (46). Zajímavým rysem této skupiny proteinů IF je také fakt, že všechny geny typu I (s výjimkou CK18 nacházejícího se na chromozomu 12 (49) jsou lokalizovány na chromozomu 17q21 a geny typu II na chromozomu 12q13 (50). Příčinou tohoto stavu je pravděpodobně vznik nových genů genovou duplikací. V lidském genomu bylo také nalezeno 106 pseudogenů a 47 genových fragmentů pro cytokeratiny (46), což může značně komplikovat nalezení vhodných primerů pro PCR.

Biologická aktivita cytokeratinů může být regulována buď interakcí se sebou samými (48) nebo různými postranlačními modifikacemi – fosforylací, glykosylací, transglutaminací, ubikvitina-

ci, proteolytickým štěpením, asociací s jinými cytoplazmatickými nebo cytoskeletárními proteiny (51, 52). Jedním z nejdůležitějších principů při tvorbě cytokeratinových filament je však heteropolymerizace (44, 48). Na rozdíl od zbylých tříd proteinů IF vyžadují cytokeratiny partnera z odpovídající skupiny. Tento obligatorní heteropolymerizační proces se odehrává na úrovni dimerů a vždy vyžaduje účast cytokeratinů z obou skupin I a II (např. CK8 a CK18). Cytokeratiny však nepolymerizují s ostatními skupinami IF (44). Místa zprostředkovávající heterodimerizaci cytokeratinů tvorbu svnutých helixů se nachází v centrální („rod“) doméně (48). Dvojice cytokeratinů, které společně tvoří filamenta, jsou poměrně rigidní, nicméně v organismu existuje určitá funkční redundance – např. CK19 je schopen zastoupit CK18 (53). Zajímavou a pro oblast detekce MMTS v onkologii velice důležitou vlastností cytokeratinů je jejich výskyt v epitelálních tkáních. Cytokeratiny se vyskytují většinou ve víceméně omezené skupině epitelálních tkání. Velmi významný je fakt, že při vzniku nádoru z těchto tkání nedochází ke změně spektra exprimovaných cytokeratinů, i když může dojít ke změně množství exprimované mRNA (54). Byl dokonce sestaven určitý „katalog lidských cytokeratinů“ (47).

**4.3.1. Cytokeratin 19** je cytoskeletární protein o velikosti 40 kDa. Jeho gen je lokalizován na chromozomu 17q21.2 (obr.2). Exprese byla prokázána v širokém spektru normálních i nádorových tkání včetně tkáně prsu, tlustého střeva a odpovídajících nádorů (47). Přítomnost CK19 byla prokázána v primárních nádorech prsu u 10/10 případů (100%), 44/46 (96%) a 44/45 (98%) u stádií I, resp. II a III (55) a u 40/40 (100%) pacientů s invazivní rakovinou prsu (56). Možné využití CK19

**Tab. 2: Přehled studií detekujících VNB a MMTS u nádorů prsu za pomoci CK19.** Pacienti, kontrolní vzorky: počet pozitivních vzorků/celkový počet; původ vzorku: BM, kostní dřev; PB, periferní krev; LN, lymfatické uzliny; LP, leukoferéza; prognostický význam: a, ano; n, ne; n.u. neurčeno.

Pacienti	Kontrolní vzorky	Reference	Původ vzorku	Prognostický význam
<i>Imunohistochemie</i>				
199/552 (36%)	2/191 (1%)	Braun (60)	BM	a
3/117 (2,6%)		Ikeda (61)	BM	a
10/23 (43%)		Slade (62)	BM	a
10/59 (17%)			PB	a
222/751 (29,6%)	2/191 (1%)			
<i>RT-PCR</i>				
4/27 (14,8%)	1/39 (2,56%)	Datta (63)	PB	a
6/8 (75%)			BM	a
67/145 (46%)	14/51 (27,5%)	Grunewald (56)	PB	n
7/72 (9,72%)	3/30 (10%)	Hu (64)	PB	a
40/117 (34,2%)	0/12 (0%)	Ikeda (61)	BM	a
23/33 (70%)		López-Guerrero (65)	LP	a
29/141 (20,6%)		Shammas (66)	BM	n.u.
22/45 (49%)	5/25 (20%)	Silva (67)	plazma	a
23/60 (38%)	0/45 (0%)	Slade (62)	PB	a
14/23 (61%)	0/30 (0%)		BM	a
19/51 (27,5%)	0/26 (0%)	Stathopoulou (68)	PB	a
44/148 (29,7%)	6/82 (7,3%)	Stathopoulou (69)	PB	a
51/73 (70%)			BM	a
16/33 (48%)		Vanucchi (70)	BM	a
14/33 (42,4%)	5/26 (19%)	Wong (71)	PB	a
24/33 (72%)	5/26 (19%)	Wong (72)	PB	a
70/115 (40,87%)	0/8 (0%)	Zhong (73)	BM	a
	0/96 (0%)		PB	a
7/29 (24,13%)			LP	a
18/26 (69,2%)	0/8 (0%)	Zhong (74)	BM	a
	0/117 (0%)		PB	a
498/1212 (41,1%)	39/621 (6,3%)			

**Tab. 3: Přehled studií detekujících VNB a MMTS u kolorektálních nádorů za pomoci CK20.** Pacienti, kontrolní vzorky: počet pozitivních vzorků/celkový počet; původ vzorku: BM, kostní dřev; PB, periferní krev; LN, lymfatické uzliny; prognostický význam: a, ano; n, ne; n.u. neurčeno.

Pacienti	Kontrolní vzorky	Reference	Původ vzorku	Prognostický význam
<i>Imunohistochemie</i>				
25/100 (25%)		Clarke (83)	LN	a
14/33 (42,4%)		Greenson (84)	LN	a
4/11 (45%)		Litle (85)	BM	a
35/64 (54,7%)		Noura (86)	LN	n
47/147 (32%)		Oberg (87)	LN	n
4/41 (10%)		Werther (88)	BM	n
0/38 (0%)			PB	n
32/42 (76,2%)		Yasuda (89)	LN	a
46/53 (86,8%)		Yokoyama (90)	játra	a
207/529 (39,1%)				
<i>RT-PCR</i>				
27/27 (100%)	21/21 (100%)	Bustin (91)	PB	n
1/30 (3,3%)	19/64 (29,6%)	Dimmler (92)	BM	n.u.
6/8 (75%)		Funaki (17)	PB	a
18/28 (64%)	0/11 (0%)	Funaki (93)	PB	a
13/18 (72%)	21/29 (72%)	Champelovier (94)	PB	n
	8/8 (100%)		BM	n
15/35 (42,8%)	0/22 (0%)	Chausovsky (95)	PB	a
	16/53 (30,2%)	Jung (81)	PB	n.u.
	5/14 (35%)		BM	n.u.
31/51 (60,8%)		Rosenberg (96)	LN	a
44/85 (52%)		Rosenberg (97)	LN	a
20/57 (35%)	1/16 (6,3%)	Soeth (98)	BM	a
9/52 (17%)		Soeth (99)	PB	a
20/65 (31%)			BM	a
9/30 (30%)	10/47 (21,3%)	Vlems (79)	PB	a
9/19 (47,3%)	4/15 (26,6%)		BM	a
26/41 (63,4%)		Weitz (100)	PB	a
8/30 (26,7%)			BM	a
63/100 (63%)	1/70 (1,4%)	Wharton (101)	PB	a
12/25 (48%)	1/12 (8,3%)	Wylid (102)	PB	n
331/701 (47,2%)	107/382 (28%)			

jako markeru pro detekci VNB a MMTS však komplikuje jak nelegitimní transkripce v krevních buňkách (57), tak také existence několika pseudogenů a genových fragmentů v lidském genomu (46, 58, 59; Hesse, osobní komunikace). Přesto je cytokeratin 19 velice často využíván k detekci cirkulujících nádorových buněk u nádorů prsu (tab. 2) v lymfatických uzlinách, kostní dřevě a krvi. Poměrně často však také dochází k nálezům mRNA i u kontrolních skupin.

**4.3.2. Cytokeratin 20** byl identifikován v roce 1990 jako protein IT, hlavní cytoskeletární polypeptid epitelu lidského střeva (29). Jedná se o protein o velikosti přibližně 46 kDa, jehož gen se nachází na chromozomu 17q21.2 (obr. 2). Imunocytochemicky byl detekován jako významná složka střevního a žaludečního foveolárního epitelu, uroteliálních superficiálních buněk a Merkelových buněk epidermis. Vzácně byly CK20 pozitivní buňky nalezeny v brzlíku, průduškách, žluč-

níku a prostatě. Expres je obecně udržována v primárních i metastatických kolorektálních karcinomech i odvozených buněčných kulturách (29). Expres CK20 v kolorektálním karcinomu byla potřena i v dalších studiích. Moll a kol. detekovali expresi v 89/93 (75) a 50/52 případů (76), Chu a kol. u 20/20 pacientů (77). Chu a kol. uvádí v přehledu literatury pozitivitu CK20 pro různé karcinomy – pro kolorektální adenokarcinom je to 401 pozitivních případů z celkového počtu 426, tj. 94% (77). Tot v podobném přehledu uvádí pozitivitu 177/194 (91%) pro primární a 217/233 (93%) pro metastatické adenokarcinomy tlustého střeva (78). Pravděpodobně však dochází ke snížení exprese cytokeratinů v neoplastické tkáni (54, 79). Z důvodu exprese omezené na gastrointestinální, v menší míře i urogenitální soustavu, a hlavně nepřítomnosti v krevních buňkách, kostní dřevě, lymfatických uzlinách a neexistenci pseudogenů se CK20 jeví jako naprosto ideální marker pro detekci VNB a MMTS v těchto tkáních. Později však byla detekována exprese CK20 v granulocytech (80, 81). Tato ektopická transkripce by mohla vysvětlovat poměrně velké množství falešně pozitivních výsledků. Bylo provedeno množství studií, které se pokoušely detekovat VNB a MMTS v různých tkáních. Výsledky některých z nich jsou uvedeny v tab. 3. V poslední době byl však nalezen CK20 i v jiných než kolorektálních primárních nádorech a příslušných lymfatických uzlinách. Exprimované množství bylo však vždy několikanásobně nižší než u kolorektálního karcinomu (82).

## 5. Závěr

Přestože CK19 i CK20 mají z hlediska jejich využití jako markerů pro detekci volných nádorových buněk a mikrometastáz řadu nevýhod, v současné době, kdy nejsou známy žádné dostatečně nádorově specifické markery, se stále jeví jako jedny z nejslibnějších. Vzhledem k poměrně vysokému procentu pozitivity i v kontrolních skupinách však bude nutné používat při stanovení cytokeratinů kvantitativní metody, nejlépe kvantitativní RT-PCR. S tím souvisí také výběr „housekeeping“ genů používaných k normalizaci výsledků. Pravděpodobně bude nutné zavedení nových standardů, protože geny využívané v současné době (především GAPDH) vykazují značnou variabilitu (103). Další otázkou je vlastní prognostický význam detekce nádorových buněk v krvi, resp. kostní dřevě a lymfatických uzlinách. Metastázování je velice neúčinný proces (104) a přítomnost cirkulujících nádorových buněk v krvi nemusí nutně indikovat budoucí vývoj vzdálených metastáz. Proto je nutné význam detekce volných nádorových buněk a mikrometastáz nepřeceňovat, ale zároveň mít na paměti možné dalekosáhlé využití pro individualizaci léčby onkologicky nemocných pacientů a tím zlepšení klinických výsledků.

**Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MZČR. č. 00020980501**

## Literatura

- Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australian Med J* 1869; 14:146.
- Engell H.C. Cancer cells in the circulating blood. *Acta Chir Scand* 1955; (Suppl.):201.
- Christopherson W. Cancer cells in the peripheral blood: a second look. *Acta Cytol* 1965; 9:169-74.
- Brown M., Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 2000; 46(8 Pt 2):1221-9.

- Friedlander M.L., Hedley D.W., Taylor I.W. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. *J Clin Pathol* 1984; 37(9):961-74.
- Joensuu H., Klemi P.J. DNA aneuploidy in adenomas of endocrine organs. *Am J Pathol* 1988; 132(1):145-51.
- Martinez-Arribas F., Nunez M.J., Piqueras V., Lucas A.R., Sanchez J., Tejerina A., et al. Flow cytometry vs. Ki67 labelling index in breast cancer: a prospective evaluation of 181 cases. *Anticancer Res* 2002; 22(1A):295-8.



8. Baeten C.I., Wagstaff J., Verhoeven I.C., Hillen H.F., Griffioen A.W. Flow cytometric quantification of tumour endothelial cells; an objective alternative for microvessel density assessment. *Br J Cancer* 2002; 87(3):344-7.
9. Leers M.P., Schoffelen R.H., Hoop J.G., Theunissen P.H., Oosterhuis J.W., vd Bijl H., et al. Multiparameter flow cytometry as a tool for the detection of micrometastatic tumour cells in the sentinel lymph node procedure of patients with breast cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(5):359-66.
10. Rupa J.D., De Bruine A.P., Gerbers A.J., Leers M.P., Nap M., Kessels A.G., et al. Simultaneous detection of apoptosis and proliferation in colorectal carcinoma by multiparameter flow cytometry allows separation of high and low-turnover tumors with distinct clinical outcome. *Cancer* 2003; 97(10):2404-11.
11. Reed D.N., Jr., Johnson J., Richard P., McCormick S., Shannon N., Mikhail R.A., et al. DNA flow cytometry does not predict 5- or 10-year recurrence rates for T1-2 node-negative breast cancer. *Arch Surg* 2000; 135(12):1422-6.
12. Tsavellas G., Huang A., McCullough T., Patel H., Araia R., Allen-Mersh T.G. Flow cytometry correlates with RT-PCR for detection of spiked but not circulating colorectal cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19(6):495-502.
13. Post C., Christensen I.J., Flyger H., Christiansen J., Larsen J.K. Flow cytometric bivariate analysis of DNA and cytokeratin in colorectal cancer. *Anal Cell Pathol* 2002; 24(4-5):113-24.
14. Wimberger P., Hillemann P., Kapsner T., Hepp H., Kimmig R. Evaluation of prognostic factors following flow-cytometric DNA analysis after cytokeratin labelling: II. Cervical and endometrial cancer. *Anal Cell Pathol* 2002; 24(4-5):147-58.
15. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-4.
16. Veres G., Gibbs R.A., Scherer S.E., Caskey C.T. The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 1987; 237(4813):415-7.
17. Funaki N.O., Tanaka J., Itami A., Kasamatsu T., Ohshio G., Onodera H., et al. Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA. *Life Sci* 1997; 60(9):643-52.
18. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(16):7276-80.
19. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10(4):413-7.
20. Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6(10):995-1001.
21. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10):986-94.
22. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetj K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4(6):357-62.
23. Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2):169-93.
24. Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29(1):23-39.
25. Harris C.C. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(20):1442-55.
26. McLeod H.L., Murray G.I. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(2):191-203.
27. Offner S., Schmaus W., Witter K., Baretton G.B., Schlimok G., Passlick B., et al. p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(12):6942-6.
28. van Houten V.M., Tabor M.P., van den Brekel M.W., Denkers F., Wisaupt R.G., Kummer J.A., et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res* 2000; 6(10):3803-16.
29. Moll R., Schiller D.L., Franke W.W. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol* 1990; 111(2):567-80.
30. Mori M., Mimori K., Ueo H., Karimine N., Barnard G.F., Sugimachi K., et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996; 68(6):739-43.
31. Weitz J., Kienle P., Lacroix J., Willeke F., Benner A., Lehnert T., et al. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(2):343-8.
32. Chelly J., Kaplan J.C., Maire P., Gautron S., Kahn A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 1988; 333(6176):858-60.
33. Chelly J., Concorde J.P., Kaplan J.C., Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(8):2617-21.
34. Kaplan J.C., Kahn A., Chelly J. Illegitimate transcription: its use in the study of inherited disease. *Hum Mutat* 1992; 1(5):357-60.
35. Kimoto Y. A single human cell expresses all messenger ribonucleic acids: the arrow of time in a cell. *Mol Gen Genet* 1998; 258(3):233-9.
36. Mighell A.J., Smith N.R., Robinson P.A., Markham A.F. Vertebrate pseudogenes. *FEBS Lett* 2000; 468(2-3):109-14.
37. Chadderton T., Wilson C., Bewick M., Gluck S. Evaluation of three rapid RNA extraction reagents: relevance for use in RT-PCR's and measurement of low level gene expression in clinical samples. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1997; 43(8):1227-34.
38. Beutler E., Gelbart T., Kuhl W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1990; 9(2):166.
39. Bai X., Fischer S., Keshavjee S., Liu M. Heparin interference with reverse transcriptase polymerase chain reaction of RNA extracted from lungs after ischemia-reperfusion. *Transpl Int* 2000; 13(2):146-50.
40. Holodniy M., Kim S., Katzenstein D., Konrad M., Groves E., Merigan T.C. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 1991; 29(4):676-9.
41. Effect of template quality on PCR performance. 1999, 29-31. Available from: URL: <http://www.qiagen.com/literature/brochures/pcr/pdf/pcrcha08.pdf>.
42. Peist R., Honsel D., Twieling G., Loffert D. PCR inhibitors in plant DNA Preparations. *QIAGEN News* 2001; 3:7-9. Available from: URL: [http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/0301/1017317\\_QN301\\_I\\_TJPDIS-7-9.pdf](http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/0301/1017317_QN301_I_TJPDIS-7-9.pdf)
43. Hu X.C., Chow L.W. Detection of circulating breast cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Eur J Surg Oncol* 2000; 26(6):530-5.
44. Herrmann H., Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cyto-dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(1):79-90.
45. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 1980; 283(5744):249-56.
46. Hesse M., Magin T.M., Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 14):2569-75.
47. Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31(1):11-24.
48. Coulombe P.A., Omary M.B. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(1):110-22.
49. Waseem A., Gough A.C., Spurr N.K., Lane E.B. Localization of the gene for human simple epithelial keratin 18 to chromosome 12 using polymerase chain reaction. *Genomics* 1990; 7(2):188-94.
50. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):860-921.
51. Coulombe P.A., Bousquet O., Ma L., Yamada S., Wirtz D. The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell Biol* 2000; 10(10):420-8.
52. Omary M.B., Ku N.O., Liao J., Price D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* 1998; 31:105-40.
53. Hesse M., Franz T., Tamai Y., Taketo M.M., Magin T.M. Targeted deletion of keratins 18 and 19 leads to trophoblast fragility and early embryonic lethality. *Embo J* 2000; 19(19):5060-70.
54. Wildi S., Kleeff J., Maruyama H., Maurer C.A., Friess H., Buchler M.W., et al. Characterization of cytokeratin 20 expression in pancreatic and colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5(10):2840-7.
55. Malzahn K., Mitze M., Thoenes M., Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 1998; 433(2):119-29.
56. Grunewald K., Haun M., Urbanek M., Fiegl M., Muller-Holzner E., Gunsilius E., et al. Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Lab Invest* 2000; 80(7):1071-7.
57. Lopez-Guerrero J.A., Bolufer-Gilbert P., Sanz-Alonso M., Barragan-Gonzalez E., Palau-Perez J., De la Rubia-Comos J., et al. Minimal illegitimate levels of cytokeratin K19 expression in mononucleated blood cells detected by a reverse transcription PCR method (RT-PCR). *Clin Chim Acta* 1997; 263(1):105-16.
58. Ruud P., Fodstad O., Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* 1999; 80(1):119-25.
59. Savtchenko E.S., Schiff T.A., Jiang C.K., Freedberg I.M., Blumenberg M. Embryonic expression of the human 40-kD keratin: evidence from a processed pseudogene sequence. *Am J Hum Genet* 1988; 43(5):630-7.
60. Braun S., Pantel K., Muller P., Janni W., Hepp F., Kenterich C.R., et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(8):525-33.
61. Ikeda N., Miyoshi Y., Motomura K., Inaji H., Koyama H., Noguchi S. Prognostic significance of occult bone marrow micrometastases of breast cancer detected by quantitative polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91(9):918-24.
62. Slade M.J., Smith B.M., Sinnen H.D., Cross N.C., Coombes R.C. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(3):870-9.
63. Datta Y.H., Adams P.T., Drobyski W.R., Ethier S.P., Terry V.H., Roth M.S. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12(3):475-82.
64. Hu X.C., Chow L.W. Detection of circulating breast cancer cells with multiple-marker RT-PCR assay. *Anticancer Res* 2001; 21(1A):421-4.

65. Lopez-Guerrero J.A., Gilabert P.B., Gonzalez E.B., Sanz Alonso M.A., Perez J.P., Talens A.S., et al. Use of reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for carcinoembryonic antigen, cytokeratin 19, and maspin in the detection of tumor cells in leukapheresis products from patients with breast cancer: comparison with immunocytochemistry. *J Hematother* 1999; 8(1):53-61.
66. Shammam F.V., Deak E., Nysted A., van Eekelen J.A., Osland A., Heikkilä R. Serial quantitative PCR analysis of bone marrow samples from breast cancer patients to monitor systemic micrometastases. *Anticancer Res* 2001; 21(3C):2099-106.
67. Silva J.M., Dominguez G., Silva J., Garcia J.M., Sanchez A., Rodriguez O., et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 2001; 7(9):2821-5.
68. Stathopoulou A., Angelopoulou K., Perraki M., Georgoulis V., Malamos N., Lianidou E. Quantitative RT-PCR luminometric hybridization assay with an RNA internal standard for cytokeratin-19 mRNA in peripheral blood of patients with breast cancer. *Clin Biochem* 2001; 34(8):651-9.
69. Stathopoulou A., Vlachonikolis I., Mavroudis D., Perraki M., Kouroussis C., Apostolaki S., et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002; 20(16):3404-12.
70. Vannucchi A.M., Bosi A., Glinz S., Pacini P., Linari S., Saccardi R., et al. Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA. *Br J Haematol* 1998; 103(3):610-7.
71. Wong I.H., Yeo W., Chan A.T., Johnson P.J. Quantitative relationship of the circulating tumor burden assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients with Dukes' stage, serum carcinoembryonic antigen level and tumor progression. *Cancer Lett* 2001; 162(1):65-73.
72. Wong I.H., Yeo W., Chan A.T., Johnson P.J. Quantitative correlation of cytokeratin 19 mRNA level in peripheral blood with disease stage and metastasis in breast cancer patients: potential prognostic implications. *Int J Oncol* 2001; 18(3):633-8.
73. Zhong X.Y., Kaul S., Diel I., Eichler A., Bastert G. Analysis of sensitivity and specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase/polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(5):286-91.
74. Zhong X.Y., Kaul S., Lin Y.S., Eichler A., Bastert G. Sensitive detection of micrometastases in bone marrow from patients with breast cancer using immunomagnetic isolation of tumor cells in combination with reverse transcriptase/polymerase chain reaction for cytokeratin-19. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126(4):212-8.
75. Moll R., Lowe A., Laufer J., Franke W.W. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992; 140(2):427-47.
76. Moll R., Zimbelmann R., Goldschmidt M.D., Keith M., Laufer J., Kasper M., et al. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 1993; 53(2):75-93.
77. Chu P., Wu E., Weiss L.M. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol* 2000; 13(9):962-72.
78. Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2002; 38(6):758-63.
79. Vlems F.A., Diepstra J.H., Cornelissen I.M., Ruers T.J., Ligtenberg M.J., Punt C.J., et al. Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. *Mol Pathol* 2002; 55(3):156-63.
80. Vlems F., Soong R., Diepstra H., Punt C., Wobbes T., Tabiti K., et al. Effect of blood sample handling and reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay sensitivity on detection of CK20 expression in healthy donor blood. *Diagn Mol Pathol* 2002; 11(2):90-7.
81. Jung R., Petersen K., Kruger W., Wolf M., Wagener C., Zander A., et al. Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *Br J Cancer* 1999; 81(5):870-3.
82. Soong R., Beyser K., Basten O., Kalbe A., Rueschoff J., Tabiti K. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detection of cytokeratin 20 in noncolorectal lymph nodes. *Clin Cancer Res* 2001; 7(11):3423-9.
83. Clarke G., Ryan E., O'Keane J.C., Crowe J., MacMathuna P. The detection of cytokeratins in lymph nodes of Duke's B colorectal cancer subjects predicts a poor outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(5):549-52.
84. Greenson J.K., Isenhardt C.E., Rice R., Mojzsis C., Houchens D., Martin E.W., Jr. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 1994; 73(3):563-9.
85. Litle V.R., Warren R.S., Moore D., 2nd, Pallavicini M.G. Molecular cytogenetic analysis of cytokeratin 20-labeled cells in primary tumors and bone marrow aspirates from colorectal carcinoma patients. *Cancer* 1997; 79(9):1664-70.
86. Noura S., Yamamoto H., Ohnishi T., Masuda N., Matsumoto T., Takayama O., et al. Comparative detection in Dukes Stages A and B colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2002; 20(20):4232-41.
87. Oberg A., Stenling R., Tavelin B., Lindmark G. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1998; 41(10):1244-9.
88. Werther K., Normark M., Brunner N., Nielsen H.J. Cytokeratin-positive cells in preoperative peripheral blood and bone marrow aspirates of patients with colorectal cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62(1):49-57.
89. Yasuda K., Adachi Y., Shiraishi N., Yamaguchi K., Hirabayashi Y., Kitano S. Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(4):300-4.
90. Yokoyama N., Shirai Y., Ajioka Y., Nagakura S., Suda T., Hatakeyama K. Immunohistochemically detected hepatic micrometastases predict a high risk of intrahepatic recurrence after resection of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer* 2002; 94(6):1642-7.
91. Bustin S.A., Gyselman V.G., Williams N.S., Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 79(11-12):1813-20.
92. Dimmler A., Gerhards R., Betz C., Gunther K., Reingruber B., Horbach T., et al. Transcription of cytokeratins 8, 18, and 19 in bone marrow and limited expression of cytokeratins 7 and 20 by carcinoma cells: inherent limitations for RT-PCR in the detection of isolated tumor cells. *Lab Invest* 2001; 81(10):1351-61.
93. Funaki N.O., Tanaka J., Ohshio G., Onodera H., Maetani S., Imamura M. Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 1998; 77(8):1327-32.
94. Champelovier P., Mongelard F., Seigneurin D. CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells. *Anticancer Res* 1999; 19(3A):2073-8.
95. Chausovsky G., Luchansky M., Figer A., Shapira J., Gottfried M., Novis B., et al. Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung. *Cancer* 1999; 86(11):2398-405.
96. Rosenberg R., Hoos A., Mueller J., Nekarda H. Impact of cytokeratin-20 and carcinoembryonic antigen mRNA detection by RT-PCR in regional lymph nodes of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83(10):1323-9.
97. Rosenberg R., Hoos A., Mueller J., Baier P., Stricker D., Werner M., et al. Prognostic significance of cytokeratin-20 reverse transcriptase polymerase chain reaction in lymph nodes of node-negative colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2002; 20(4):1049-55.
98. Soeth E., Roder C., Juhl H., Kruger U., Kremer B., Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996; 69(4):278-82.
99. Soeth E., Vogel I., Roder C., Juhl H., Marxsen J., Kruger U., et al. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 1997; 57(15):3106-10.
100. Weitz J., Koch M., Kienle P., Schroedel A., Willeke F., Benner A., et al. Detection of hematogenous tumor cell dissemination in patients undergoing resection of liver metastases of colorectal cancer. *Ann Surg* 2000; 232(1):66-72.
101. Wharton R.Q., Jonas S.K., Glover C., Khan Z.A., Klokouzas A., Quinn H., et al. Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res* 1999; 5(12):4158-63.
102. Wylid D.K., Selby P., Perren T.J., Jonas S.K., Allen-Mersh T.G., Wheeldon J., et al. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 1998; 79(3):288-93.
103. Steele B.K., Meyers C., Ozbun M.A. Variable expression of some „housekeeping“ genes during human keratinocyte differentiation. *Anal Biochem* 2002; 307(2):341-7.
104. Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):563-72.

# DIHYDROPYRIMIDIN DEHYDROGENÁZA A JEJÍ ROLE V PREDIKTIVNÍ ONKOLOGII

## DIHYDROPYRIMIDINE DEHYDROGENASE AND ITS ROLE IN PREDICTIVE ONCOLOGY

KLOCOVÁ K., SVOBODA M., VYZULA R.

LABORATOŘ PREDIKTIVNÍ ONKOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

**Souhrn:** Fluoropyrimidinová chemoterapeutika v čele s 5-fluorouracilem se využívají v léčbě nádorových onemocnění už od poloviny minulého století. I když je 5-fluorouracil (5-FU) hlavním lékem využívaným v terapii kolorektálního karcinomu, pacientů rezpozivních na tuto léčbu je jen 15 – 30 % a u některých se může objevit závažná toxicita. Pochopení metabolismu 5-FU vedlo k odhalení enzymů limitujících biochemickou odpověď 5-FU. Tyto prediktory rezistence by mohly být sledovány před nasazením terapie s cílem určit pravděpodobnost pozitivní reakce na léčbu a umožnit použití jiného chemoterapeutika v případě nízké pravděpodobnosti léčebné odpovědi. Jedním z těchto prediktorů je enzym dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD), který se podílí na katabolismu 5-fluorouracilu na neaktivní metabolity. Je přítomen v zdravých i nádorových buňkách, její exprese je však v normálních buňkách vyšší. Vysoká aktivita DPD v nádorových buňkách způsobí inaktivaci 5-FU dříve, než by se mohl projevit cytotoxický efekt chemoterapeutika. Naproti tomu deficience DPD v organismu může vést k vzniku nebezpečné toxicity.

**Klíčová slova:** 5-fluorouracil, dihydropyrimidin dehydrogenáza, chemorezistence k fluoropyrimidinům

**Summary:** Fluoropyrimidine chemotherapeutics headed by 5-fluorouracil are used for the treatment of cancer since half of the last century. Though 5-fluorouracil (5-FU) is mainly used drug in the therapy of colorectal cancer, only 15 – 30 % of patients are responsive to this treatment and some of them could suffer from severe toxicity. The understanding of 5-FU metabolism led to detection of enzymes limiting 5-FU bioefficiency. These resistance predictors could be followed-up before beginning of the cure to determine positive cure reaction probability or to enable to dispose another chemotherapy if the probability of cure response is weak. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) which participates in 5-FU catabolism is one of these predictors. DPD is present in normal and cancer cells, its expression is higher in normal cells. High DPD activity in tumour cells causes 5-FU inactivation before the cytotoxic effect of chemotherapeutics could exert. On the other side, DPD deficiency could result in development of life-threatening toxicity.

**Key words:** 5-fluorouracil, dihydropyrimidine dehydrogenase, chemoresistance to fluoropyrimidines

### Metabolismus a mechanismy působení fluoropyrimidinů

Fluorouracil je nejpoužívanějším představitelem fluoropyrimidinových chemoterapeutik. Byl syntetizován Heidelbergerem před více než 40 lety. Používá se jako chemoterapeutikum u různých forem solidních nádorů, především kolorektálních karcinomů, nádorů žaludku, jater a pankreatu. Nevýhodou je jeho toxicita, široká inter i intraindividuální variabilita a ovlivnění léčebné odpovědi cirkadiálním rytmem. Nejvyšší koncentrace 5-FU v plazmě byly naměřeny ve 4 hodiny ráno, nejnižší pak ve 13 hodin odpoledne. (1, 2)

Metabolismus 5-FU normálně probíhá v játrech (80%). Přes 10 % 5-FU je vyloučeno močí v nezměněné podobě. 5-FU je do buněk přijímán stejnou transportní cestou jako uracil. Tento systém je energeticky nezávislý. Anabolickou cestou vznikají aktivní metabolity, katabolickou cestou je 5-FU inaktivován a vyloučen z organismu. Pro uplatnění cytotoxického a protinádorového účinku je nezbytná jeho intracelulární anabolická aktivace. Poločas rozpadu 5-FU je velmi rychlý, asi 5 až 20 minut. Citlivost buněk k 5-FU závisí na mnoha faktorech, jako je například aktivita enzymů zahrnutých do metabolismu fluoropyrimidinů, dostupnost kofaktorů pro tyto enzymy, množství redukováných folátů v buňce, které stabilizují ternární komplex s tymidylát syntázou, a endogenních deoxyuridinmonofosfátů (dUMP). (3, 4)

Vzniklé aktivní metabolity 5-FU (FUTP, FdUMP a FdUTP) způsobují poškození buňky. FUTP je inkorporován do jaderné a cytoplazmatické RNA, tím se změní její funkce a sníží se

životaschopnost buňky. FdUMP inhibuje enzym tymidylát syntázu (TS), která je nezbytná pro tvorbu jednoho z deoxyribonukleotidů pro syntézu DNA, tvorbou stabilního komplexu. FdUTP může být začleňován enzymem DNA polymerázou do DNA, tím se sníží její stabilita a vznikají fragmenty DNA. (1, 3 – 5)

Protinádorový účinek 5-FU tedy spočívá ve dvou hlavních účincích:

- a) v tvorbě 5-fluoro-2'-deoxyuridin-5-monofosfátu (FdUMP), který se váže na enzym tymidylát syntázu a brání tak tvorbě nukleotidu tymidin monofosfátu (TMP) a inhibuje syntézu DNA.
- b) 5-FU je také přeměňován na 5-fluorouridin-5'-trifosfát (FUTP), který se začleňuje do RNA a tím ovlivňuje její funkce v zasažené buňce.

Na úrovni buněčného cyklu působí 5-FU na buněčné linie v různých fázích, podle typu linie a aplikované dávky. U pacientů s kolorektálním karcinomem byla po chemoterapii pozorována zástava buněk v S a G2/M fázi. (6)

### DPD a její vliv na rezistenci k fluoropyrimidinům

Prvním katabolickým krokem je redukce pyrimidinového kruhu 5-FU enzymem *dihydropyrimidin dehydrogenázou* (DPD). Deficience tohoto enzymu u pacientů léčených fluoropyrimidiny je spojena s vážnou toxicitou (5). Výsledným produktem katabolismu 5-FU je fluoro-β-alanin (FBAL). Tento metabolit je vylučován močí, má dlouhý poločas rozpadu a může působit neurotoxicky. (1, 3 – 5)

Aktivita 5-FU je limitována jeho rychlou degradací dihydropyrimidin dehydrogenázou. Více než 80 % 5-FU je degradováno v játrech. Jen malá část přijaté dávky 5-FU se dostane do nádoru, kde se mohou uplatnit protinádorové účinky látky. Vysoká hladina nádorové DPD umožní katalyzovat přeměnu 5-FU na neaktivní produkty dříve, než mohou být vytvořeny cytotoxické nukleotidy a neprojeví se tak protinádorový efekt léčiva. Deficience DPD vede k vyššímu riziku vážné toxicity zásluhou vysoké expozice organismu 5-FU. U pacientů s kolo- rektálním nádorem reagujících na léčbu 5-fluorouracilem byla nalezena nižší exprese DPD ve srovnání s pacienty, kteří na léčbu neodpovídali. (3, 7) Na druhé straně, v některých studiích souvislost aktivity DPD s reakcí na 5-FU a přežíváním pacientů nebyla pozorována. (9 - 11)

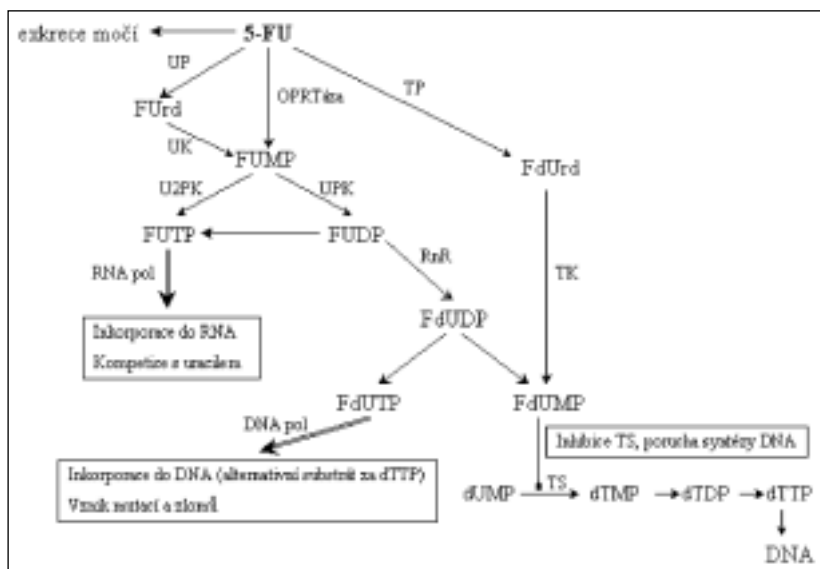
Byla pozorována závislost mezi hladinou DPD mRNA a aktivitou DPD enzymu u kolorektálních nádorů. (7, 12 - 15) Je-li v tkáni vysoká hladina mRNA a vysoká aktivita DPD enzymu, je 5-FU rychle katabolizován na 2-fluoro- $\alpha$ -alanin a je potlačena anabolická konverze 5-FU fosforylací na FUMP a FUTP. Hladina mRNA a enzymatická aktivita DPD by mohly předpovědět senzitivitu pacienta k léčbě 5-FU. Vysoká hla-

dina DPD může snížit citlivost buněk k 5-FU a způsobit rezistenci.

Variabilita v toxicitě a reakci na lék může být částečně způsobena genetickou deficiencí enzymu DPD. U malého procenta populace (méně než 3%) je aktivita DPD významně snížená (až o 50% proti průměrné kontrole). Tato porucha (tzn. neschopnost degradovat 5-FU) může mít za následek předem neočekávatelné a velice závažné toxické účinky u pacientů podstupujících 5-FU chemoterapii. Nejčastější mutací vedoucí k deficienci DPD je záměna nukleotidu G za A v intronu 14, která způsobuje špatný sestřih mRNA a vznik nefunkčního enzymu. Pacienti, pro něž je 5-FU vysoce toxický, mohou být zřejmě heterozygotní nebo homozygotní pro mutantní gen DPD. (9, 16 - 19)

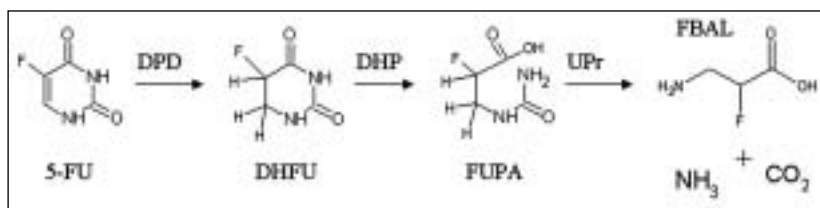
DPD aktivita může být ovlivněna různými faktory: obsah enzymu, přítomnost DPD inhibitorů (cisplatina, uridin, allopurinol), hladina NADPH kofaktorů. (2, 20) Některé studie poukazují na souvislost mezi hladinou nádorové DPD a pohlavím, u žen byla nalezena nižší hladina. (16, 21, 22). Hladina DPD je také zřejmě ovlivněna cirkadiálním rytmem. (2, 22, 23) Jiné studie tuto skutečnost nepotvrdily. (24)

Obr. 1: Anabolismus 5-fluorouracilu



Počáteční anabolická aktivace 5-fluorouracilu (5-FU) může probíhat dvěma cestami. Buď přímým přenosem ribóza fosfátu z fosforibozyl pyrofosfátu, katalyzovaným enzymem OPRTázou (fosforibozyltransferáza kyseliny orotové) za vzniku fluorouridinmonofosfátu (FUMP), nebo dvojkrokovým procesem, zahrnujícím navázání ribózy enzymem uridin fosforylázu (UP) za vzniku fluorouridinu (FUrđ) a jeho následnou fosforylací uridin kinázou (UK). Produkty těchto reakcí jsou dále fosforylovány uridin monofosfát kinázou (UPK) a uridin difosfát kinázou (U2PK) na fluorouridin difosfát (FUDP) a fluorouridin trifosfát (FUTP), který je inkorporován RNA polymerázou do RNA. FUDP může být konvertován ribonukleotid reduktázou (RnR) na fluorodeoxyuridin difosfát (FdUDP), který je poté metabolizován na fluorodeoxyuridin monofosfát (FdUMP) nebo fluorodeoxyuridin trifosfát (FdUTP) začleňovaný DNA polymerázou do DNA. Účinkem enzymu tymidin fosforyláza (TP) na 5-FU vzniká fluorodeoxyuridin (FdUrd), který je tymidin kinázou přeměněn na FdUMP.

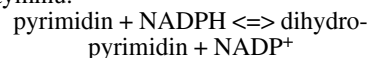
Obr. 2: Katabolické odbourávání 5-FU



Dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD) inaktivuje 5-fluorouracil (5-FU) redukcí pyrimidinového kruhu na 5',6'-dihydrofluorouracil (DHFU), který může být přeměněn dihydropyrimidinázou (DHP) na 5-fluoroureido propionovou kyselinu (FUPA). Ta je za katalýzy  $\beta$ -ureido propionázy (UPr) a za uvolnění  $\text{NH}_3$  a  $\text{CO}_2$  konvertována na fluoro- $\beta$ -alanin (FBAL).

### Struktura a funkce dihydropyrimidin dehydrogenázy

Dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD, EC 1.3.1.2) je počátečním a limitujícím enzymem v katabolismu pyrimidinových bází, redukuje dvojnou vazbu uracilu i tyminu:



a podílí se na vzniku  $\beta$ -alaninu u savců. V buňce je přítomna v cytoplazmě. Nativní savčí enzym má molekulární hmotnost 210 kDa a je tvořen dvěma identickými podjednotkami. (28)

Lidský DPD gen byl lokalizován na prvním chromozóm (1p22) a je dlouhý nejméně 950 kb. Je tvořen 23 exony, z nichž nejdelší je exon 23 (961 bp) a nejkratší je exon 15 (69 bp). Transkripce vzniká mRNA o velikosti 3,4 kb. Lidská cDNA kóduje protein skládající se z 1025 aminokyselin s předpokládanou molekulární hmotností 111 kDa. (25 - 26)

Expres DPD mRNA je tkáňově specifická, DPD enzym je u zdravých jedinců přítomen hlavně v játrech. (30 - 32) Aktivita v normální tkáni je variabilní. Vyšší aktivita DPD enzymu byla mimo jaterní tkáň detekována také v pankreatu, cervixu a nádorech prsu. Nižší hladina DPD je v buňkách žaludku, prostaty, močového měchýře a močovodů. (11, 30) V primárním kolorektálním nádoru i metastázách je nižší stupeň exprese DPD než ve zdravé mukóze. (7, 11, 13, 33, 34) V nádorech močového měchýře a močových cest byla pozorována vyšší hladina DPD ve srovnání s příslušnou zdravou tkání. (35 - 37)

### Inhibitory dihydropyrimidin dehydrogenázy, jejich výhody a nevýhody

Potlačení účinku DPD je spojeno s prodloužením přítomnosti 5-FU v plazmě. Látky, které slouží jako inhibitory DPD aktivity, zvyšují účinek 5-FU v případě, je-li hladina DPD příliš vysoká. 5-FU není tak rychle přeměňován na neaktivní metabolity a u pacienta se může snížit stupeň

rezistence. Dramatická redukce 5-FU katabolismu ovšem musí být doprovázena také snížením dávek 5-FU, aby bylo zamezeno případným závažným toxickým účinkům. (38)

Tyto inhibitory lze rozdělit do dvou skupin podle jejich účinku: ireverzibilní inaktivátory (eniluracil) a reverzibilní inhibitory (uracil, CDHP, CNDP).

Do první skupiny patří eniluracil (5-ethynyluracil). Kovalentně se váže na DPD a nevratně tak inhibuje katalytickou aktivitu tohoto enzymu. Jeho podání snižuje inter a intraindividuální variabilitu a vliv cirkadiálního rytmu. Perorálně podávaný eniluracil inaktivuje DPD v gastrointestinálním traktu a játrech, čímž zesílí dostupnost (až na 100%) a poločas života 5-FU (až na 4–6 hodin). Eniluracil v kombinaci s 5-FU byl testován na zvířatech a bylo pozorováno výrazné zvýšení 5-FU účinnosti. Mezi nežádoucí účinky patří nevolnost a průjmy. (1, 5, 39, 40)

Reverzibilně působí uracil, který v nádorové tkáni selektivně inhibuje degradaci 5-fluorouracilu tím, že kompetitivně inhibuje DPD. Malé množství 5-FU je tedy degradováno katabolickou cestou. Uracil v kombinaci s tegafurem v poměru 4:1 představuje další léčivo UFT (uracil/tegafur). Tegafur slouží jako „prodrug“ 5-FU, je konvertován enzymy v játrech na 5-FU a navozuje vysokou hladinu 5-FU v plazmě. Podávání UFT tedy zajistí vysokou zásobu 5-FU a jeho aktivních metabolitů a minimalizuje produkci inaktivních potenciálně toxických katabolitů 5-FU. UFT byl v klinických studiích většinou dobře tolerován a byl účinný u pacientů s nádory tlustého střeva, žaludku a prsu. Výhodou je i orální aplikace léku. Mezi nežádoucí účinky opět patří nevolnost a průjmy. (1, 4, 5, 39)

Dalším účinným reverzibilním inhibitorem DPD je CDHP (5-chloro-2,4-dihydropyridin), působí mnohem silněji než uracil. Je součástí chemoterapeutika S-1 vyvinutého v Japonsku v roce 1996. S-1 je kombinací tegafuru, 5-chloro-2,4-dihydropyridinu a oxonové kyseliny s pevným molárním poměrem 1 : 0,4 : 1. CDHP redukuje degradaci 5-FU a prodlužuje vysokou koncentraci 5-FU v plazmě, oxonová kyselina působí proti přeměně 5-FU na FUMP, sami o sobě nemají protinádorový účinek. V preklinických zkouškách měl S-1 vyšší protinádorový účinek a menší toxicitu než tegafur podávaný samostatně. Dávkou limitovanou toxicitou byla v klinických zkouškách myelosuprese; diarrhoea a stomatitida byly velice mírné. Gastrointestinální toxicitu S-1 snižovala kyselina oxonová. Účinky léku byly podobné účinkům konvenčních terapií, snížila se ovšem toxicita stupně tři a čtyři. (1, 4, 5, 39, 41)

CNDP (3-cyano-2,6-dihydropyridin) funguje jako reverzibilní inhibitor DPD v játrech až 200 krát účinněji než uracil. Společně s 1-ethoxymetyl-5-fluorouracilem (EM-FU) v poměru 1:1 tvoří látku označovanou jako BOF-A2 (emitefur). EM-FU je pomalu konvertován mikrozomálními enzymy, CNDP snižuje eliminaci 5-FU v játrech. Experimentálně bylo zjištěno, že u zvířat po podání BOF-A2 se v periferní krvi udržela vysoká hladina 5-FU po dlouhou dobu a BOF-A2 měl protinádorový účinek. (5, 42)

### Metody stanovení dihydropyrimidin dehydrogenázy

Dihydropyrimidin dehydrogenázu je možno detekovat různými technikami na úrovni RNA nebo proteinu. Jednotlivé metody se liší citlivostí, cenou a náročností provedení. Následující přehled pojednává o nejčastěji využívaných metodách při detekci DPD.

#### Analýza nukleových kyselin

Po izolaci celkové mRNA z testované vzorku je provedena reverzní transkripce a amplifikace cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Pro tuto metodu je postačující menší množství materiálu, další výhodou je vysoká citlivost a snadná příprava vzorku. Vzniklé produkty PCR reakce je nutné nějakým způsobem detekovat. Je možné využít elektroforetickou separaci v agarózovém gelu nebo chromatografii. (13, 34)

Vysokou účinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Per-

formance Liquid Chromatography) je modifikací chromatografie – techniky sloužící k separaci molekul mobilní a stacionární fáze. Její výhodou oproti jednodušší a levnější elektroforeze je vyšší citlivost metody. Analyzovaná látka je rozpuštěná v rozpouštědle, tato kapalná mobilní fáze je nanesena na chromatografickou kolonu, kde dochází k interakcím mezi pevnou složkou a mobilní fází. Různé složky analyzované směsi mají různou afinitu ke stacionární fázi, jsou rozdílně zadržovány a zpožďovány. Přístroj detekuje jednotlivé procházející složky analyzované směsi, které dospějí k detektoru v různých retenčních časech. (13, 16, 34)

Klasická PCR metoda slouží k specifické amplifikaci fragmentu DNA. Po několikanásobném opakování cyklu denaturace dvouřetězce DNA na jednořetězce – hybridizace primerů – polymerace, se mnohonásobně zvýší počet kopií amplifikovaného úseku DNA.

Metoda real-time PCR umožňuje sledování vznikajícího PCR produktu přímo v průběhu celého amplifikačního procesu a následné stanovení koncentrace neznámého vzorku. Pro kvantifikaci se mohou využívat interkalační barviva, např. Sybr Green I, specifickou detekci umožňují sondy, což jsou uměle nasynthetizované oligonukleotidy, o velikosti 20–30 nukleotidů, komplementární k amplifikované oblasti, které se váží mezi primery specifické pro danou oblast. Fluorescenční záření vznikající během reakce je zaznamenáno přístrojovým analyzátozem a s každou vytvořenou molekulou ampikonu narůstá jeho intenzita. Jako referenční geny se využívají *housekeeping* geny, nejčastěji gen pro GAPDH nebo  $\beta$ -aktin, které slouží jako endogenní kontrola se známým počtem kopií. Tato metoda umožňuje stanovení koncentrace v rozsahu několika řádů, je přesnější a citlivější než klasická PCR, probíhá v uzavřeném systému, redukuje chyby a podmínky PCR lze poměrně rychle optimalizovat. (12, 43, 44)

Nevýhodou metod založených na studiu nukleových kyselin je fakt, že není detekována přímo aktivita proteinu v dané tkáni.

#### Stanovení DPD na úrovni proteinu

Imunochemické metody detekce DPD jsou založeny na specifické reakci antigenu a protilátky. Nejčastěji se využívají metody ELISA a Western blotting.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je metoda sloužící k zjišťování přítomnosti protilátek proti určitému antigenu. Umožňuje stanovení DPD enzymu za využití protilátek proti DPD. V případě stanovení DPD lze využít tzv. sendvičovou modifikaci. Vzorek, obsahující zjišťovaný antigen, se aplikuje na destičku, na kterou je vázána protilátka proti DPD. Druhá protilátka je značená enzymem a reaguje s jinými determinanty na povrchu molekuly zjišťovaného antigenu (v tomto případě enzymu DPD). Po přidání chromogenního substrátu je možné detekovat fotometricky barevnou změnu substrátu. Jde o jednoduchou, rychlou a finančně nenáročnou techniku s vysokou citlivostí a specifitou. Nevýhodou je to, že není stanovena přímá aktivita proteinu v tkáni. (3, 5, 10, 11, 33, 34, 45)

Metoda Western blotting využívá polyklonální protilátky a sekundární protilátky. Detekované proteiny jsou elektroforeticky rozděleny za denaturačních podmínek, přeneseny z gelu na pevnou membránu a místa, na která se proteiny nenařadily, se nespecificky zablokují, čímž se zabrání vzniku falešně pozitivních výsledků. K detekci antigenu zachyceného na membráně se využije primární protilátka, která se specificky váže na detekovaný protein. Komplex protilátek a antigenů je vizualizován pomocí enzymu a chromogenního substrátu podobně jako u metody ELISA, na membráně vzniká viditelný band v místě, kde je primární protilátka navázána na detekovaný protein. (7, 13)

### Význam stanovování DPD v predikci chemorezistence nádorů

Sledování enzymů zapojených do metabolismu 5-fluorouracilu (DPD, tymidylát syntáza, tymidin fosforyláza), ať už jed-

notlivě nebo společně, umožňuje optimalizaci terapie fluoropyrimidiny, výběr vhodného preparátu a jeho dávkování. Detekce exprese a aktivity těchto enzymů před zahájením terapie může odhalit pacienty, kteří s velkou pravděpodobností na léčbu fluoropyrimidiny nebudou reagovat, nebo se u nich dokonce objeví vážná toxicita. V těchto případech by pak pacient nemusel být vystavován známému riziku toxicity a mohla by pro něj být navržena jiná forma terapie. Dihydropyrimidin dehydrogenáza je enzym, který katabolicky degraduje více než 80 % přijatého 5-fluorouracilu a limituje jeho účinnost. Sledování hladiny mRNA a enzymatické aktivity DPD dovolí ještě před léčbou předpovědět reakci pacienta na

lék. Je-li u pacienta detekována vysoká hladina DPD v nádorové tkáni, neprojeví se dostatečně protinádorová aktivita 5-FU a pacient bude na léčbu fluorouracilem rezistentní. V tomto případě by nasazení inhibitorů DPD zpomalilo odbourávání a zvýšilo terapeutický účinek 5-FU. Pacientovi mohou být také podávány nižší dávky léku. Naopak, příliš nízká hladina nebo deficeience DPD zvyšuje riziko toxických účinků terapie způsobených vystavením organismu nadměrným dávkám 5-FU. Stanovení dihydropyrimidin dehydrogenázy a dalších enzymů podílejících se na metabolismu chemoterapeutik povede k větší individualizaci léčby, nižší toxicitě a větší účinnosti léčby nádorových onemocnění.

## Literatura:

- Kuhn JD: Fluorouracil and the new fluorinated pyrimidines. *The Annals of Pharmacotherapy* 2001; 35: 217–226.
- Grem JL, Yee LK, Venzon DJ, Takimoto CH, Allegra CJ.: Inter- and intraindividual variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40: 117–125.
- Gorlick R, Bertino JR: Drug resistance in colon cancer. *Seminars in oncology* 1999; 26 (6): 606–611.
- Malet-Martino M, Martino R: Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): A review. *The Oncologist* 2002; 7: 288–323.
- Lamont EB, Schilsky RL: The oral fluoropyrimidines in cancer chemotherapy. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 2289–2296.
- Yoshikawa R, Kusunoki M, Yanagi H, Noda M, Furuyama J, Yamamura T, et al: Dual antitumor effects of 5-fluorouracil on the cell cycle in colorectal carcinoma cells: A novel target mechanism concept for pharmacokinetic modulating chemotherapy. *Cancer Research* 2001; 61: 1029–1037.
- Collie-Duguid ESR, Johnston SJ, Boyce L, Smith N, Cowieson A, Cassidy J, et al: Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase protein expression in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2001; 94, 297–301.
- Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al: Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidilate synthase and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000; 6, 1322–1327.
- Fernandez-Salguero P, Gonzales FJ, Etienne MC, Milano G, Kimura S.: Correlation between catalytic activity and protein content for the polymorphically expressed dihydropyrimidine dehydrogenase in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 1995; 50 (7), 1015–1020.
- Hiroyasu S, Shiraiishi M, Samura H, Tokashiki H, Shimoji H, Isa T, Muto Y: Clinical relevance of the concentrations of both pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in colorectal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2001; 31(2): 65–68.
- Ikeguchi M, Hirooka Y, Makino M, Kabara N: Dihydropyrimidine dehydrogenase activity of cancerous and non-cancerous tissues in liver and large intestine. *Oncol Rep* 2001; 8(3): 621–625.
- Johnson MR, Wang K, Smith JB, Heslin MJ, Diasio RB.: Quantitation of dihydropyrimidine dehydrogenase expression by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2000; 278, 175–184.
- Johnston SJ, Ridge SA, Cassidy J, McLeod HL.: Regulation of dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5, 2566–2570.
- Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, et al: Dihydropyrimidine dehydrogenase and messenger RNA levels in gastric cancer: Possible predictor for sensitivity to 5-fluorouracil. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91, 105–112.
- Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, et al: Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5-fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999; 5, 883–889.
- Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, René N.: Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil related toxicity. *Br J Cancer* 1999; 79 (3/4), 627–630.
- Raida M, Schwabe W, Häusler P, Van Kuilenburg ABP, Van Gennip AM, Behnke D, et al: Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001; 7, 2832–2839.
- Wei X, McLeod HL, McMurrough J, Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P: Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *The Journal of Clinical Investigation* 1996; 3: 610–615.
- Van Kuilenburg ABP, Vreken P, Abeling NG, Meinsma R, Van Lenthe H, De Abreu RA, et al: Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum Genet* 1999; 104: 1–9.
- Takechi T, Okabe T, Fujioka A, Mukarami Y, Fukushima M.: Relationship between protein levels and gene expression of dihydropyrimidine dehydrogenase in human tumor cells during growth in culture and in nude mice. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89, 1144–1153.
- Yamashita K, Mikami Y, Ikeda M, Yamamura M, Kubozoe T, Urakami A, et al: Gender differences in the dihydropyrimidine dehydrogenase expression of colorectal cancers. *Cancer Letters* 2002; 188: 231–236.
- Bressolle F, Julia JM, Pinguet F, Uchou M, Astre C, Duffour J, et al: Circadian rhythm of 5-fluorouracil population pharmacokinetics in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44: 295–302.
- Porsin B, Formento JL, Filipiński E, Etienne MC, Francouze M, René N, et al: Dihydropyrimidine dehydrogenase circadian rhythm in mouse liver: comparison between enzyme activity and gene expression. *European Journal of Cancer* 2003, 39: 822–828.
- McLeod HL, Sludden J, Murray GI, Keenan RA, Davidson AI, Park K, et al: Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase in human colorectal tumours. *British Journal of Cancer* 1998; 77(3): 461–465.
- Yokota H, Fernandez-Salguero P, Furuya H, Lin K, McBride OW, Podschun B, et al: cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, an enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J Biol Chem* 1994; 269 (37), 23192–23196.
- Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, Albin N, Diasio RB: Structural organisation of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Cancer Research* 1997; 57: 1660–1663.
- Wei X, Elizondo G, Sapone A, McLeod HL, Faunko H, Fernandez-Salguero P, et al: Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics* 1998; 51: 391–400.
- Lu ZH, Zhang R, Diasio R.: Purification and characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase from human liver. *J Biol Chem* 1992; 267 (24), 102–117.
- Dobritzsch D, Schneider G, Schnackerz KD, Lingvist Y: Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *The EMBO Journal* 2001; 20(4): 650–660.
- Mori K, Hasegawa M, Nishida M, Toma H, Fukuda M, Kubota T, et al: Expression levels of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in various human tissues. *Int J Oncol* 2000; 17(1): 33–38.
- Stéphan T, Etienne MC, Wallays C, Milano G, Clergue F.: Depressed hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil-related toxicities. *The Am J Med* 1995; 99, 685–688.
- Chazal M, Etienne MC, René N, Bourgeon A, Richelme H, Milano G.: Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. *Clin Cancer Res* 1996; 2, 507–510.
- Ikeguchi M, Makino M, Kabara N: Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in colorectal carcinoma and patients prognosis. *Lagenbeck's Arch Surg* 2002; 387: 240–245.
- Tanaka-Nozaki M, Onda M, Tanaka N, Kato S: Variations in 5-fluorouracil concentrations of colorectal tissues as compared with dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) enzyme activities and DPD messenger RNA levels. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2783–2787.
- Hirano Y, Kageyama S, Ushiyama T, Suzuki K, Fujita K: Clinical significance of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in transitional cell cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51(1): 29–35.
- Iizumi T, Hariu K, Sato M, Sato S, Shimizu H, Tomomasa H, et al: Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in bladder cancer. *Urol Int* 2002; 68(2): 122–125.
- Hirano Y, Takayama T, Kageyama S, Ushiyama T, Suzuki K, Fujita, K: Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in renal cell carcinoma: relationship between histological parameters and chemosensitivity to 5-fluorouracil. *Eur Urol* 2003; 43(1): 45–52.
- Haaz MC, Fishel JL, Formento P, René N, Etienne MC, Milano G: Impact of different fluorouracil biochemical modulators on cellular dihydropyrimidine dehydrogenase. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38, 52–58.
- Meropol NJ: Oral fluoropyrimidines in the treatment of colorectal cancer. *European Journal of Cancer* 1998; 34(10): 1509–1513.
- Saleem A, Yap J, Osman S, Brady F, Suttle B, Lucas SV, et al: Modulation of fluorouracil tissue pharmacokinetics by eniluracil: in-vivo imaging of drug action. *Lancet* 2000; 355: 2125–2131.
- Hirata K, Horikoshi N, Aiba K, Okazaki M, Denno R, Sasaki K, et al: Pharmacokinetic study of S-1, a novel oral fluorouracil antitumor drug. *Clinical Cancer Research* 1999; 5: 2000–2005.
- Yoneda K, Samoto T, Ueba E, Osaki T: The inhibitory action of BOF-A2, a 5-fluorouracil derivative, on squamous cell carcinoma. *Cancer Letters* 1999; 137: 17–25.
- McCullin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM: Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends in Molecular Biology* 2003; 9(5): 189–195.
- Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002; 29: 23–39.
- Crowther JR: The ELISA Guidebook. *Methods in molecular biology*, volume 149. Humana Press Inc, 2000.

## VZTAH MOTILITY A INVAZIVITY TRANSFORMOVANÝCH BUNĚK – MODEL H2-K/V-JUN FIBROSARKOMOVÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍ

### RELATIONSHIP BETWEEN MOTILITY AND INVASIVENESS OF TRANSFORMED CELLS – A MODEL OF H2-K/V-JUN FIBROSARCOMA-DERIVED CELL LINES

PEYCHL J.#, HATINA J.\*, REISCHIG J.\*, ČERVINKA M.#

#UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ, ÚSTAV LÉKAŘSKÉ BIOLOGIE  
A GENETIKY

\*UNIVERSITA KARLOVA, LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

**Souhrn: Východiska:** Invazivita nádorů představuje jeden z klíčových momentů metastatického procesu. Vlastní schopnost či neschopnost invaze je výslednicí několika dílčích fenotypů, zejména motility nádorových buněk a jejich schopnosti proteolytické degradace tkáňových bariér (bazální membrána, extracelulární matrix). Jednou z možností jak objasnit vztah komplexního invazivního fenotypu a jednotlivých dílčích fenotypů je vyjít z definované série nádorových buněčných linií vykazujících polymorfismus v uvedených fenotypových charakteristikách. **Typ studie:** Vyšli jsme z fibrosarkomu H2-K/v-jun transgenní myši a rozsáhlou manipulací v tkáňové kultuře jsme vytvořili sérii nádorových buněčných linií lišících se ve stupni vyjádření invazivního a motilitního fenotypu. **Metody a výsledky:** K odvození jednotlivých buněčných linií jsme využili kombinaci tří experimentálních strategií. 1. Buněčná heterogenita vstupního nádorového vzorku umožnila odvození základních buněčných linií JUN-1, -2 a -3. 2. Spontánní transformace v kontinuální kultuře umožnila rozlišit sublinie odvozené z buněčných linií JUN-1 a JUN-2. 3. Stablní transfekce expresního vektoru pro onkogen *c-fos* dala vznik klonům u různých sublinií JUN-1 a JUN-2. Všechny buněčné linie, sublinie a klony byly fenotypicky charakterizovány jednak na úrovni invazivity testem invaze do Matrigelu, jednak na úrovni motility testem hojení rány *in vitro*. **Závěry:** H2-K/v-jun série fibrosarkomových buněčných linií představuje experimentální nástroj pro studium nádorové motility a invazivity, a to jak ve vzájemné závislosti v rámci komplexního invazivního fenotypu, tak i navzájem nezávisle, a jako taková představuje vhodný vstup do dalších projektů zaměřených na molekulární analýzu nádorové invazivity.

**Klíčová slova:** nádorové buněčné linie, invazivita, motilita

**Summary: Backgrounds:** Tumour invasiveness represents one of the key points in the metastatic process. The ability of invasion or a lack thereof result from interplay of several intermediate phenotypes, like cellular motility or an ability of proteolytic degradation of tissue barriers (basement membrane, extracellular matrix). One of the possibilities how to define a relationship between the invasiveness as a complex phenotype and the respective intermediate phenotypes is to analyze a defined tumour cell line series, with a relevant phenotypic polymorphism among individual cell lines. **Design:** We used a fibrosarcoma developed in the H2-K/v-jun transgenic mouse and by means of an extensive manipulation in tissue culture we generated a series of cell lines polymorphic in the expression of the invasive and motile phenotype. **Methods and Results:** In establishing the series, three chief principles were exploited. 1. Cellular heterogeneity within the original tumour sample was used to derive the founder cell lines JUN-1, -2, and -3. 2. Spontaneous transformation upon continuous culture made it possible to distinguish sublines derived from the cell lines JUN-1 and JUN-2. 3. Stable transfection of an expression vector for the *c-fos* oncogene gave rise to an array of clones from individual JUN-1- and JUN-2- derived sublines. All the cell lines, sublines, and stably transfected clones were characterized in terms of invasiveness, by means of the Matrigel invasion assay, and as to the motility, by means of the *in vitro* wound healing assay. **Conclusions:** The complete series of H2-K/v-jun fibrosarcoma-derived cell lines enables to regard invasiveness and motility either as integral parts of a common phenotype, or independently of each other. As such, the series provides a convenient input into studies aimed at molecular characterization of invasive phenotype.

**Key words:** tumour cell culture, invasiveness, motility

#### Úvod

Rozhodující část mortality v souvislosti s nádorovými onemocněními připadá na vrub metastatické kapacity nádorových buněk v pokročilých fázích nádorové transformace. Samotná metastatická kaskáda zahrnuje přesně sladěný sled několika událostí. Na samotném počátku musí být buňka schopna opustit primární nádor a současnou destrukcí tkáňových bariér (bazální membrána, extracelulární matrix) a aktivní lokomoce dosáhnout krevní nebo lymfatické kapiláry. Tato počáteční invaze a lokomoce plynule přechází v intravazaci do krevního nebo lymfatického řečiště, která je opět provázena destruk-

cí bazální membrány endotelu. Nádorová buňka pak musí být schopna na určitém místě z krevního nebo lymfatického oběhu vystoupit a znovu zahájit proliferaci na sekundárním místě. Toto je klasický průběh metastatické kaskády (1,2).

V naší práci se soustředíme na samotný počátek celého metastatického procesu, tj. nádorovou motilitu a invazivitu. Ukazuje se, že vztah mezi oběma těmito procesy bývá nežidka obtížné definovat. V řadě prací jsou pojmy „migration“, „motility“, „movement“ a „invasion“ užívány v zásadě synonymně. Je jasné, že invazivní buňka musí být zároveň motilitní, zároveň ovšem také platí, že samotná schopnost motility ještě nevysti-

huje celý rozsah vlastností charakterizujících invazivní fenotyp. Nedílnou součástí invazivního fenotypu je schopnost proteolytické destrukce biologických bariér (2,3). V naší práci proto nazýváme na nádorovou invazivitu jako na jakýsi zastrešující a komplexní fenotyp, který je možné rozložit do přinejmenším dvou dílčích intermediárních fenotypů . schopnosti aktivního pohybu (motility) a schopnosti proteolytického útoku vůči bazální membráně a extracelulární matrix.

Jednou z možností, jak studovat a na molekulární úrovni charakterizovat různé aspekty transformovaného fenotypu včetně motility a invazivity je odvodit určitou definovanou sestavu nádorových buněčných linií, pokrývající co nejširší část vývoje a progresu nádoru. Existuje několik strategií odvození takové uspořádané série buněčných linií. Je například možné odvodit buněčné linie z různých stádií vývoje nádoru (např. primárního nádoru a metastázy) u téhož pacienta (4). Je samozřejmě také možné využít principu nádorové heterogenity a odvodit několik buněčných linií reprezentujících různé etapy nádorové progresu z jediného nádoru (5). Jinou strategií je odvodit v první fázi z daného nádoru jedinou buněčnou linii a sérii buněčných linií kryjících určitou část nádorové progresu odvodit různými postupy *in vitro* transformace této výchozí buněčné linie. Tato transformace může probíhat spontánně při dlouhodobé nepřetržité kultivaci, nebo může být specificky směřována např. mutagenézí, genovou manipulací či opakovaným převedením do stavu nádoru *in vivo* ve vhodném zvířecím hostiteli. Příkladem takto vytvořených komplexních sérií nádorových buněčných linií jsou lidské série MCF-10a HMT-3522 nádoru prsu (6,7), série krysích buněčných linií odvozených ze spontánního karcinomu prostaty (Dunning rat prostatic carcinoma series) (8) nebo QRSP-série myších fibrosarkomových linií (9).

## Cíl práce

Cílem naší práce bylo odvození nové původní série buněčných linií, a to původu fibrosarkomu vytvářejícího se v reakci na hluboké poranění u H2-K/v-jun transgenní myši (10). Jednotlivé buněčné linie byly odvozeny kombinací shora naznačených experimentálních strategií. Základní linie (JUN-1, -2 a -3) odrážejí vstupní nádorovou heterogenitu. Další sublinie byly odvozeny kontinuální kultivací a stabilní transfekcí kooperujícího onkogenu. Jednotlivé buněčné linie a sublinie byly charakterizovány z hlediska motility a invazivity, což nám umožnilo přesněji vymezit podíl intermediárních fenotypů na komplexním invazivním fenotypu.

## Metody

### Vstupní nádorový vzorek

H2-K/v-jun transgenní myši byly laskavě poskytnuty Dr. Martinem Breitmanem (Samuel Lunenfeld Research Institute, University of Ontario, Kanada). U této transgenní myši se v reakci na hluboké poranění, jako je biopsie ocasu, vytváří lokálně invazivní nemetastazující fibrosarkom (10). Buněčné linie JUN-1 a JUN-2 byly odvozeny z téhož fibrosarkomu vyvíjejícího se po dobu 7 měsíců od biopsie ocasu, buněčná linie JUN-3 byla odvozena z následujícího fibrosarkomu téže transgenní myši, jenž se vyvíjel po dobu 11 měsíců.

### Plasmidy

CMV-*c-fos* expresní vektor byl laskavě poskytnut Dr. Charlese Vinsonem (National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda U.S.A.) (11), pSTneoB vektor byl laskavě poskytnut Dr. Petrem Dráberem (Ústav molekulární genetiky AV ČR v Praze) (12). Plasmidy byly purifikovány systémem Nucleobond Plasmid Purification Kit fy Clontech, podle pokynů udaných výrobcem.

### Základní buněčná kultura

Nádor byl mechanicky rozmělněn na kousky o přibližné velikosti 1 mm<sup>3</sup>, které byly přímo naneseny na dno kultivační mis-

ky. Kultivace byla prováděna v médiu DMEM (Sigma) doplněném fetálním telecím sérem (Sigma) na výslednou koncentraci 10 % a antibiotiky penicilinem (výsledně 100 U/ml) a streptomycinem (výsledně 100 µg /ml) (BioWhittaker). Všechny buněčné linie byly odvozeny z primární nádorové kultury odpíchnutím izolovaně rostoucí kolonie žlutou mikropipetovou špičkou pod inverzním mikroskopem po předchozí krátkodobé trypsinizaci příslušné kolonie.

### Odvození stabilně transfekovaných klonů

Stabilně transfekované klony nesoucí CMV-*c-fos* expresní vektor byly odvozeny z linie JUN-1 po 40 buněčných generacích v kultuře (population doubling –PD) a 200 PD a z buněčné linie JUN-2 po 200 PD kontinuální kultury. Transfekce byla provedena kalcium-fosfátovou precipitační metodou prostřednictvím systému CalPhos Transfection Kit fy Clontech, podle pokynů výrobce. Subkonfluentní buněčná kultura na 100 mm- kultivační misce byla přítomně transfekována směsí 10 µg CMV-*c-fos* a 1 µg pSTneoB. Selektce byla provedena kultivačním médiem doplněným antibiotikem G418 (Sigma) ve výsledné koncentraci 500 µg/ml. Odvození individuálních stabilně transfekovaných klonů bylo provedeno totožně jako izolace původních linií z primární nádorové kultury.

### Test motility

Buněčná motilita byla analyzována jako tzv. test hojení rány *in vitro* (*in vitro* wound healing assay). Podstatou je mechanické narušení konfluentní buněčné kultury, čímž dochází k uvolnění kontaktní inhibice pohybu a buňky na okrajích rány mohou migrovat do uvolněného prostoru. Průběh této migrace je pozorován v pravidelných časových intervalech a fotograficky zaznamenáván. Vyhodnocení buněčné motility bylo provedeno po 11 hodinách hojení rány, a to přiřazením dané buněčné linie, sublinie či klonu do jedné z následujících kategorií : –: žádná aktivita +: sporadická aktivita undulujících membrán (ruffling) na okrajích rány ++: uniformní aktivita undulujících membrán (ruffling) na okrajích rány +++: sporadický pohyb buněk do prostoru rány ++++: uniformní pohyb buněk do prostoru rány spojený se změnou jejich uspořádání do polohy kolmé k ose rány (viz Tabulka 1.).

### Test invazivity

Invazivita byla analyzována prostřednictvím testu invaze do Matrigelu (BD BioCoat Matrigel Invasion chamber – Becton Dickinson), podle pokynů udaných výrobcem. Test vychází z modifikované Boydenovy komůrky, jejíž horní a dolní kompartment je oddělen membránou s mikropóry o průměru 8 µm. Tato membrána je pokryta vrstvou Matrigelu, který slouží jako model extracelulární matrix či bazální membrány (13). Buňky se nanášejí v jednobuněčné suspenzi do horního kompartmentu a mají-li invazivní schopnost, jsou schopny překonat vrstvu Matrigelu, projít mikropóry membrány a adherovat na její opačné straně. Zde jsou pak fixovány, obarveny a kvantifikovány. V našem případě byla kvantifikace provedena přímým počítáním invadujících buněk pod inverzním mikroskopem, přičemž jako vyjádření invazivity jsme použili součet invadujících buněk z pěti náhodně vybraných optických polí inverzního mikroskopu, s použitím 15-krát zvětšujícího objektivu. Každá linie, sublinie či klon byly analyzovány v triplikátu.

## Výsledky

Ze dvou fibrosarkomů indukovaných u jedné a téže transgenní myši se podařilo celkem odvodit tři buněčné linie JUN-1, JUN-2 a JUN-3. Analýza motility a invazivity byla provedena po 100 PD v kontinuální kultuře a odhalila značné rozdíly v obou těchto charakteristikách. Buněčná linie JUN-2 byla málo motilní a neinvazivní, buněčná linie JUN-3 byla naopak velmi motilní a invazivní a u linie JUN-1 byla motilita a invazivita intermediární mezi oběma zbylými vyhraněnými buněčnými liniemi.



**Tabulka 1: Korelace motility a invazivity v sérii fibrosarkomových buněčných linií odvozených z H2-K/v-jun transgenní myši\*.**

Buněčná linie	Motilita	Invazivita
JUN1(40)	+	52±10
JUN1(100)	+++	599±125
JUN1(200)	++++	4659±403
JUN2(40)	-	130±27
JUN2(200)	+++	244±36
JUN3(100)	++++	300±210
JUN1(40)fos1	+++	166±23
JUN1(40)fos2	-	109±64
JUN1(40)fos4	++++	308±102
JUN1(200)fos4	-	1747±133
JUN1(200)fos6	+	1946±109
JUN1(200)fos8	++	2175±279
JUN2(200)fos3	++++	772±152
JUN2(200)fos4	+++	231±25
JUN2(200)fos7	++	93±13
JUN2(200)fos10	-	91±27

\*JUN-1, -2 a -3 představují základní klonální fibrosarkomové buněčné linie, číslo v závorce udává počet buněčných generací v tkáňové kultuře a fos1 až fos10 označuje konkrétní stabilně transfektované klony nesoucí CMC-*c-fos* expresní vektor. Úroveň motility byla analyzována prostřednictvím testu hojení rány in vitro 11 hodin po zavedení rány do konfluentního buněčné kultury, přičemž jsme rozlišili pět úrovní: -: žádná aktivita +: sporadická aktivita undulujících membrán (ruffling) na okrajích rány ++: uniformní aktivita undulujících membrán (ruffling) na okrajích rány +++: sporadický pohyb buněk do prostoru rány ++++: uniformní pohyb buněk do prostoru rány spojený se změnou jejich uspořádání do polohy kolmé k ose rány. Invazivita byla analyzována jako test invaze do Matrigelu. Kvantifikace představuje součet invadujících buněk z pěti náhodně vybraných optických polí inverzního mikroskopu, s použitím 15-krát zvětšujícího objektivu. Každá buněčná linie či klon byly analyzovány v triplicátu a invazivita je vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka.

Buněčná linie JUN-1 byla ovšem předmětem intenzivní transformace v průběhu kontinuální kultury. Byla-li analyzována po 40 PD v kultuře, vykazovala nízkou motilitu a byla neinvazivní, srovnatelná s linií JUN-2(PD100). Naopak po 200 PD se linie JUN-1 ukázala jako intenzivně motilitní a invazivní, srovnatelná s buňkami JUN-3(PD100). Principiálně podobný fenotypový posun byl u buněk linie JUN-2 s ohledem na buněčnou motilitu, která se po 200 PD v nepetržité kultuře zřetelně zvýšila, buňky ovšem stále zůstaly neschopny invaze do Matrigelu.

Ze sublinií JUN-1(PD40), JUN-1(PD200) a JUN-2(PD200) jsme odvodili sadu stabilně transformovaných klonů nesoucích expresní vektor kódující onkoprotein *c-fos*; původní buněčné linie byly odvozeny z transgenní myši exprimující onkogen *v-jun* pod kontrolou promotoru genu hlavního histokompatibilního komplexu I. třídy *H2-K<sup>b</sup>* (10), přičemž rodiny onkoproteinů *jun* a *fos* heterodimerizují – vzniklé komplexy se označují jako AP-1 a působí jako transkripční faktory (14). Zajímalo nás proto, do jaké míry se změni stupeň transformace fibrosarkomových buněčných linií řízenou nadměrnou expresí kooperujícího onkogenu.

Výsledek získaný u stabilně transfektovaných klonů JUN-1(PD40) a JUN-2(PD200) v podstatě odpovídal očekávání, tj. alespoň u některých z klonů došlo ke zvýšení úrovně motility a invazivity, přičemž ve všech případech byla zachována dokonalá korelace mezi motilitou a invazivitou.

Výsledky získané u stabilně transfektovaných klonů JUN-1(PD200) byly přesně opačné. Překvapivě zde došlo k výraznému snížení celkové úrovně motility a invazivity, mezi jed-

notlivými stabilně transfektovanými klony ovšem i nadále existovala dokonalá korelace mezi motilitou a invazivitou.

Kvantifikaci úrovně motility a invazivity všech analyzovaných buněčných linií a klonů udává Tabulka 1.

## Diskuse

V tomto článku referujeme o odvození série myších fibrosarkomových buněčných linií a jejich fenotypové charakterizaci z hlediska motility a invazivity. Bližší srovnání jednotlivých linií a klonů odhaluje několik zajímavých skutečností.

Na prvním místě je z našich výsledků patrné, že efekt řízené exprese kooperujícího onkogenu kriticky závisí na příjemcovské buněčné linii. Zatímco u nízké motilitních a neinvazivních sublinií dochází alespoň u určitých klonů k vyjádření motilitního a invazivního fenotypu, u silně motilitní a invazivní buněčné sublinie JUN-1(PD200) je výsledek přesně opačný – všechny stabilně transfektované klony mají charakter revertantů, s velmi výrazně sníženou motilitou a s invazivitou sníženou na zhruba polovinu.

Srovnání úrovně motility a invazivity jednotlivých sublinií a klonů nám dále umožňuje blíže pochopit vztah mezi těmito dvěma fenotypy. Především je patrné, že v rámci každé logické série sublinií a klonů (tj. buněčná linie JUN-1 v průběhu kontinuální kultury a jednotlivé sady *c-fos*-stabilních transfektantů) zde existuje dokonalá korelace mezi úrovní motility a invazivity – neinvazivnější klony jsou také nejvíce motilitní a obráceně. Toto pozorování je v souladu s limitním postavením motility v determinaci komplexního invazivního fenotypu (15). Zcela jiný obraz nám vyvstává při srovnání úrovně motility a invazivity mezi jednotlivými logickými skupinami sublinií a klonů. Za povšimnutí v tomto ohledu především stojí skupina *c-fos* – stabilně transfektovaných klonů sublinie JUN-1(PD200). Fenotypická reverze pozorovaná u těchto klonů má charakter dramatického snížení úrovně motility, přece však zůstává reziduální invazivita vysoko nad úrovní neinvazivnější motilitních klonů odvozených ze sublinií JUN-1(PD40) a JUN-2(PD200). Zdá se tedy, že každá příjemcovská buněčná sublinie použitá pro transfekci má určité dané „genetické pozadí“, které spoludeterminuje celkovou úroveň invazivity společně s motilitou. Logickým kandidátem tohoto „genetického pozadí“ je proteolytická aktivita buněk destrující Matrigelovou bariéru v průběhu testu invazivity (3, 15, 16). Kvantifikace této proteolytické aktivity představuje tedy bezesporu prioritní krok v další charakterizaci H2-K/v-jun fibrosarkomových buněčných linií.

## Závěr

V práci prezentovaná série myších fibrosarkomových buněčných linií umožňuje analyzovat buněčnou motilitu a invazivitu jak společně jako části jednotného invazivního fenotypu (srovnání v rámci jednotlivých skupin sublinií a stabilně transfektovaných klonů), tak i odděleně jako nezávislé fenotypy (srovnání mezi jednotlivými skupinami stabilně transfektovaných klonů). V této podobě představuje zde prezentovaná série nádorových buněčných linií výhodný výchozí model pro zahájení do projektů zaměřených na molekulární analýzu motility a invazivity.

**Poděkování:** Děkujeme Dr. Martinu Breitanovi za laskavé poskytnutí H2-K/v-jun transgenní myší linie, Dr. Charlesu Vinsonovi za CMV-*c-fos* expresní vektor a Dr. Petru Dráberovi za pSTneoB plasmid. Práce na tomto projektu byla podpořena grantem 301/01/P059 Grantové agentury České republiky a výzkumnými záměry MSM 111500002 a MSM 111400003 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

## Literatura

1. Hatina J. – Genetika rakoviny. In J.Hatina, B.Sykes: Lékařská genetika. Problémy a přístupy. Academia, Praha 1999, str. 195-225.
2. Sherbet G.V., Lakshmi M.S. – The Genetics of Cancer. Genes Associated with Cancer Invasion, Metastasis and Cell Proliferation. Academic Press, San Diego 1997.
3. Staff A.C. – An introduction to cell migration and invasion. Scand. J.Clin.Lab.Invest. 61:257-268, 2001.
4. Hewitt R.E., McMarlin A., Kleiner D., Wersto R., Martin P., Tsoskas M., Stamp G.W.H., Stetler-Stevenson W.G. - Validation of a model of colon cancer progression. J.Pathol 192: 446-454, 2000.
5. Geldof A.A., Versteegh R.T., van Mourik J.C., Roomans M.A., Arwert F., Hermens M.A.J.A., Schadee-Eestermans I.L., van Dongen G.A.M.S., van der Valk P., van der Poest Clement E.H., Lips P., Teule G.J.J. - Clonally related but phenotypically divergent human cancer cell lines derived from a single follicular thyroid cancer recurrence (TT2609). Thyroid 11: 909-917, 2001.
6. Briand P., Lykkesfeldt A.E. – An in vitro model of human breast carcinogenesis: Epigenetic aspects. Breast Cancer Res.Treatment 65: 179-187, 2001.
7. Pauley R.J., Soule H.D., Tait L., Miller F.R., Wolman S.R., Dawson P.J., Heppner G.H. - The MCF10 family of spontaneously immortalized human breast epithelial cell lines: Models of neoplastic progression. Eur.J.Cancer Prevention 2(Suppl 3): 67-76, 1993.
8. Isaacs J.T., Isaacs W.B., Feitz W.B., Scheres J. - Establishment and characterization of seven Dunning rat prostatic cancer cell lines and their use in

- developing methods for predicting metastatic abilities of prostate cancers. Prostate 9: 261-281, 1986.
9. Kobayashi T., Okada F., Fujii N., Tomita N., Ito S., Tazawa H., Aoyama T., Ki Choi S., Shibata T., Fujita H., Hosokawa M. - Thymosin-β4 regulates motility and metastasis of malignant mouse fibrosarcoma cells. Am.J.Pathol. 160: 869-882, 2002.
10. Schuh A.C., Keating S.J., Monteclaro F.S., Vogt P.K., Breitman M.L. - Obligatory wounding requirement for tumorigenesis in v-jun transgenic mice. Nature, 346: 756-760, 1990.
11. Rutberg S.E., Saez E., Lo S., Jang S.I., Markova N., Spiegelman B.M., Yuspa S.H. – Opposing activities of c-Fos and Fra-2 on AP-1 regulated transcriptional activity in mouse keratinocytes induced to differentiate by calcium and phorbol esters. Oncogene 15:1337-1346, 1997.
12. Katoh K., Takahashi Y., Hayashi S., Kondoh H. - Improved mammalian vectors for high expression of G418 resistance. Cell Struct.Funct. 12: 575-580, 1987.
13. Albini A., Iwamoto Y., Kleinman H.K., Martin G.R., Aaronson S.A., Kozlowski J.M., McEwan R.N. – A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumour cells. Cancer Res. 47: 3239-3245, 1987.
14. Göttlicher M., Rahmsdorf H.J., Herrlich P. - The AP-1 family of transcription factors: Multi-level control of activity. In Papavassiliou AG (ed.): Transcription Factors in Eukaryotes, Springer, Heidelberg 1997, str. 67-93.
15. Wells A. - Tumor invasion: Role of growth factor-induced cell motility. Adv.Cancer Res. 78: 31-101, 2000.
16. Holubec L. Jr., Topolčan O., Píknar R. – Biologická aktivita u kolo-rektálního karcinomu. Čas.Lék.čes. 141: 508-512, 2002.

# informace

## STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA NOVOTVARŮ Z DAT NÁRODNÍHO ONKOLOGICKÉHO REGISTRU ČR UP-DATE SUMMARY FROM CZECH CANCER REGISTRY

GERYK E.<sup>1</sup>, HOLUB J.<sup>2</sup>, ŽÁČEK V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

<sup>2</sup> ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR, PRAHA

Dostupné celostátní statistické přehledy Národního onkologického registru (NOR) umožňují následující stručné závěry a doporučení (1):

1. V roce 1999 nově diagnostikováno 59.535 onemocnění, tj. 579 na 100 tisíc obyvatel, což je nárůst o 22% ve srovnání s rokem 1992. Za období let 1992-99 bylo v ČR nově zjištěno 438.334 nemocných, doplňujících přes 2 miliony nádorů, evidovaných za uplynulých 50 let. V roce 2003 je očekáváno 70 tis. nových případů.
2. V roce 1999 zemřelo na novotvar 28.038 pacientů, tj. 273/100 tis. obyvatel, což je nárůst o 0,6% proti roku 1992. V letech 1992-999 zemřelo v ČR na malignitu jako hlavní příčinu smrti 223.801 nemocných. Ve srovnání s incidencí počty zemřelých stagnují, v některých oblastech klesají z důvodů včasější diagnostiky a efektivnější terapie, významně prodlužující dobu života onkologicky nemocných, častěji umírajících na jinou příčinu, např. embolizaci, kardiovaskulární selhání aj. Úmrtnost na nádory v 55% převažují muži nad ženami se 45%.
3. K 31.12. 1999 bylo dispenzarizováno 336.626 nádorů, ze kterých ženy v 60% převažovaly nad muži se 40%. Ve věku 30-59 let je léčeno o 8,6% více žen než mužů a naopak ve věku 60-79 let léčeno o 8,4% více mužů než žen. Po odečtení nádorů kůže, které mohou jako vícečetné spinaliomy a bazaliomy zkrusovat hodnocení, je ve věku 30-59 let léčeno o více než 33 tis. žen než mužů. Za období let 1992-99 činil průměrný meziroční nárůst léčených téměř o 15 tisíc, přičemž u 4,2% onkologicky nemocných byly evidovány dvě nebo více histologicky a topograficky odlišných malignit. Jejich postupný nárůst je důsledkem dědičné predispozice a nezřídka razantní chemo a radioterapie prvotního nádoru, indukujícího novotvar následně. V roce 2003 je očekáváno přes 360 tis. dispenzarizovaných a v roce 2010 překročení hranice půl milionu případů, tj. 5% obyvatel.

Pokud se týká zastoupení deseti nejpočetnějších nádorových skupin podle pohlaví, nevykazuje jejich rozložení v posledních letech výraznější změny:

	Muži	Ženy
Novotvary hlavy a krku (C00-C14)	3%	1%
Novotvary digestivní (C15-C26)	25%	20%
Novotvary respirační (C30-34)	17,5%	4,5%
Novotvary kůže a melanomu (C43-C44)	22,5%	21,5%
Novotvary prsu (C50)	0,2%	17%
Novotvary rodidel (C51-C58)	–	14,5%
Novotvary pohlaví (C60-C63)	11%	–
Novotvary vylučovací (C64-C68)	10%	5%
Novotvary mizní, krvetvorby (C81-C96)	5%	4%
Novotvary in situ (D00-D09)	1%	6,5%

Rozdíl v incidenci mezi muži a ženami, zasahující do jednotlivých věkových skupin, klinických stádií, geografických oblastí aj. vyplývají z odlišností ve stylu života během předchozích desetiletí. V rozdílné kumulaci dlouhodobě působících rizikových návyků, zahrnujících kouření, vysokou spotřebu alkoholu a živočišných tuků, nadměrné sluneční záření, promiskuitu, profesní expozici a trvalý stres, lze mezi pohlavími spatřovat rozdíly v incidenci nádorů hlavy a krku, zažívacího, dýchacího a vylučovacího systému. Zatímco vyšší věk a dědičná predispozice limitují možnosti preventivního úsilí jednotlivce, pak eliminace uvedených rizik při podpoře zdraví je záležitostí osobní odpovědnosti a týká se (podle různých epidemiologických studií) až 80% všech nově diagnostikovaných onemocnění. Zdravou změnou životního stylu by tak bylo možné dosáhnout oddálení výskytu až několika desítek tisíc preventabilních nádorů do vyššího věku a docílit snížení nejen osobního a rodinného utrpení, ale i objemu onkologické péče a následně finančních nákladů, jejichž odhad v roce 2000 činil u cca 350 tisíc dispenzarizovaných přes 12 miliard korun. Pokračujícím výskytem nových onemocnění v mladších věkových skupinách, vyjádřeným výpočtem hodnoty standardizace (ASR-age standardized rate) na 100 tis. obyvatel zaujímá česká populace postupně trvale nepříznivější pořadí v rámci mezinárodního porovnání (2, 3, 4). Jestliže vývoj nových léků, ozařovacích postupů i operačních technik v onkologii vykazuje za poslední roky mimořádně zlepšení, pak postižení každého třetího obyvatele ČR novotvarem je iritujícím signálem pro jednotlivce i zdravotní politiku státu. Zachování relativního zdraví až do vysokého věku není samozřejmostí, ale výsledkem trvalé osobní snahy. Z toho plynoucí jistota je zdrojem životní pohody, pracovní vykonatosti a potřebného sebevědomí.

Ke 20 milionům celosvětově onkologicky léčených přibývá každoročně dalších 10 milionů a při jejich zvyšující se mortalitě bude na naší planetě po roce 2015 asi 30 milionů nemocných, z toho přes polovinu v rozvojových zemích. Vzhledem k pokračujícímu globálnímu působení rizikových faktorů se i přes řadu národních a mezinárodních projektů předpokládá fatální vývoj nádorové mortality. Za uvedených podmínek představují celkové a detailní údaje o počtech nově léčených, dispenzarizovaných a zemřelých mimořádný informační zdroj pro rozhodování odborné a laické veřejnosti. K využívání i ochraně těchto údajů jsou určena pravidla pro registry nádorů v zemích Evropské Unie (5). V jejich smyslu připravila Rada NOR za účasti mezioborového týmu řešitelů návrh grantu, jehož přijetí nebo zamítnutí bude projevem nejen finančních možností grantové agentury, ale také náhledu na potřebu podrobného rozboru statistiky nádorů, jejich příčin a následků za období let 1992-2001 (6). Zejména v hodnocení statistiky nádorů platí, že bez jejich trvalého srovnání není poznání.

## Literatura

1. ÚZIS: Zhoubné novotvary ČR, 1992-1999. ÚZIS ČR, Praha, 276 s.
2. Kolcová, V., kol.: Zhoubné novotvary – ČR a vybrané státy. Galén, Praha, 1999, 57 s.
3. Geryk E., kol.: Srovnání výskytu zhoubných novotvarů – ČR a vybrané státy. Galén, Praha 2003, 57 s. v tisku
4. Bray, F. et al.: Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. European J. Canc. 2002, 38, p. 99-166
5. ENCR: Guidelines on confidentiality in population-based cancer registration in the European Union. IARC Lyon, 2002, 20 p.
6. Geryk E., kol.: Atlas nádorů a pořadí okresů podle výskytu malignit v letech 1992-2001. Návrh GÚ do IGA MZ, MOU Brno, 2003, 35 s.

# EPIDEMIOLOGICKÉ ASPEKTY IN SITU KARCINÓMOV PRSNÍKA U ŽIEN NA SLOVENSKU

## EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF IN SITU FEMALE BREAST CANCER IN SLOVAKIA

PLEŠKO, I.<sup>1,2</sup>, OBŠITNÍKOVÁ, A.<sup>1</sup>, CUNINKOVÁ, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> NÁRODNÝ ONKOLOGICKÝ REGISTER, NÁRODNÝ ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

<sup>2</sup> ODD. EPIDEMIOLOGIE NÁDOROV, ÚSTAV EXPERIMENTÁLNEJ ONKOLOGIE SAV V BRATISLAVE

**Súhrn:** *Východiská:* V súvisi so zlepšovaním metód skríningu karcinómov prsníka u žien, najmä mammografiou a následnej biopsiou, narastá vo vyspelých krajinách v posledných desaťročiach podiel in situ karcinómov. *Súbor a metódy:* Analýza prípadov karcinómov prsníka u žien na Slovensku z rokov 1980-1999 z databázy Národného onkologického registra SR z hľadiska klinických štádií, so zameraním sa na vývoj incidencie a podielov in situ karcinómov. *Výsledky:* Napriek sústavnému rastu invazívnych karcinómov prsníka u žien v danom období a zvyšovaní nižších klinických štádií sa podiel in situ karcinómov nemenil a predstavoval približne 1,5% z celkového počtu karcinómov prsníka. Prevalencia duktálnych, lobulárnych a podiely ďalších morfológických typov zodpovedali nálezom, popísaným v iných vyspelých štátoch. *Záver:* Podobne ako v iných štátoch strednej, východnej ale i západnej Európy je podiel in situ karcinómov prsníka u žien na Slovensku neúmerne nízky. Indikuje to potrebu plošného skríningu nádorov tejto lokalizácie s využitím moderných metód.

**Kľúčové slová:** Karcinóm prsníka, in situ, vývoj, morfológické typy

**Summary:** *Backgrounds:* Improvement of methods used in the screening of breast cancer, particularly larger use of mammography followed by biopsy led to the increase of in situ stages in women in developed countries during recent decades. *Subjects and methods:* All cases of female breast cancers occurring in Slovakia in the years 1980 – 1999 derived from the file of the National cancer registry were analyzed from the viewpoint of the development of the proportions of clinical stages, particularly of in situ cancers. *Results:* Despite gradual increase of invasive breast cancers in women during the given time period together with the increasing rates of lower clinical stages, the proportion of in situ carcinomas remained stable and low and presented only about 1,5% of the total number of all breast cancers. Predominance of ductal and lobular as well as the share of other morphologic types did not differ from those described in other developed countries. *Conclusions:* Like in other countries of Central, Eastern but also of Western Europe the proportion of in situ carcinomas of female breast cancer in Slovakia remained stable and low, indicating the need for the well organised screening of malignancies of breast using modern methods.

**Key words:** Breast cancer, female, in situ, development, morphologic types

### Úvod:

Karcinómy prsníka žien v štádiu in situ boli popísané a definované ešte v roku 1934 (5). I napriek tejto skutočnosti, väčšina lekárov zhruba do roku 1960 brala do úvahy karcinómy prsníka ako celok, bez rozlišovania invazívnych a in situ štádií pri plánovaní a realizovaní terapie (23). Podiel in situ štádií na celkovom počte diagnostikovaných karcinómov prsníka bol v klinických i epidemiologických štúdiách dlho nepatrný a k zvýšenému záujmu došlo po ich častejších nálezoch pri pitvách (4, 17).

Konkrétnejšie poznatky o výskyte samotných karcinómov prsníka v štádiu in situ, prípadne častých duktálnych a zriedkavejších lobulárnych karcinómov in situ (ďalej DCIS a LCIS) i ďalších morfológických typov sú známe iba v posledných dvoch desaťročiach, kým ich dlhodobé trendy, hlavne na úrovni morfológických typov možno hodnotiť iba v ojedinelých regiónoch vyspelých krajín (29). Pripisuje sa zavedeniu mammografie do skríninových programov, zlepšenej interpretácii mammografických náleзов spolu s kompletizovaním náleзов cielenou biopsiou (27). V súčasnosti predstavujú nálezy in situ karcinómov i jedno z kritérií určenia skupín žien so zvýšeným rizikom vzniku invazívneho karcinomu prsníka (22). Vzhľadom na veľmi nízky výskyt samotných invazívnych karcinómov prsníka u mužov, sú prípady in situ nádorov u mužov mimoriadne vzácne (2, 8, 23).

V tomto príspevku chceme demonštrovať v náväznosti na náš predošlý príspevok (1) vývoj karcinómov prsníka u žien na

Slovensku podľa klinických štádií v posledných dvoch desaťročiach so zameraním sa na in situ štádia a porovnať naše nálezy s identickými ukazovateľmi v iných krajinách.

### Materiál a metódy

Hodnoty a podiely jednotlivých klinických štádií karcinómov prsníka na Slovensku, vrátane zachytených v štádiu in situ v rokoch 1980-1999 sme získali z údajov uložených v databáze Národného onkologického registra SR (NOR-SR). Pri definovaní in situ nádorov prsníka sme vychádzali z 10. revízie Medzinárodnej klasifikácie chorôb a príbuzných zdravotných problémov (MKCH-10) platnej na Slovensku od roku 1994 a v ktorej majú tieto nádory samostatný 3-miestny kód D05. V predchádzajúcej revízii MKCH-9 boli jednotlivé orgánové lokalizácie nádorov prsníka, močovej a pohlavnej sústavy v štádiu in situ definované na 4 mieste topografického kódu, pri lokalizácii v prsníku kódom 233.0. Požívanie 4- miestneho kódu MKCH-9 v NOR-SR od roku 1968 nepredstavovalo preto problémy pri sledovaní dlhších časových trendov vývoja výskytu tohto i ďalších klinických štádií zhubných nádorov prsníka v podmienkach Slovenska. Morfológickú štruktúru jednotlivých nádorov prsníka v štádiu in situ sme taktiež mohli sledovať z údajov uložených v databáze NOR-SR, keďže všetky mikroskopicky potvrdené nádory evidované od roku 1968 boli kódované pomocou 5-miestneho kódu 1 a 2 vydania Medzinárodnej klasifikácie nádorov pre onkológiu (MKCH-O -1 a 2).

Pri sledovaní časových trendov vývoja in situ i ďalších klinic-

kých štádií karcinómov prsníka u žien sme sa zamerali na počty a podiely karcinómov prsníka. Tak isto sme postupovali pri porovnaní našich výsledkov s údajmi z iných štátov, kde sme použili štandardizované hodnoty incidencie s použitím svetovej štandardnej populácie (6) a štandardizované hodnoty incidencie publikované niektorými populačnými onkologickými registrami zhruba v posledných dvoch desaťročiach minulého storočia (7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 21, 26). Žiaľ nemohli sme použiť mnohé údaje z USA, keďže hodnoty incidencie štandardizované na populáciu USA sú podstatne vyššie ako hodnoty, štandardizované na svetovú populáciu bežne používanú v registroch. Iba v jednom prípade, s použitím údajov z projektu Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) v USA (2) sme mohli porovnať podiely jednotlivých morfológických typov karcinómov prsníka v štádiu in situ. Vzhľadom na veľmi nízke počty karcinómov prsníka u mužov vôbec, vrátane Slovenska, sme sa s karcinómami in situ tejto lokalizácie u mužov nezaoberali.

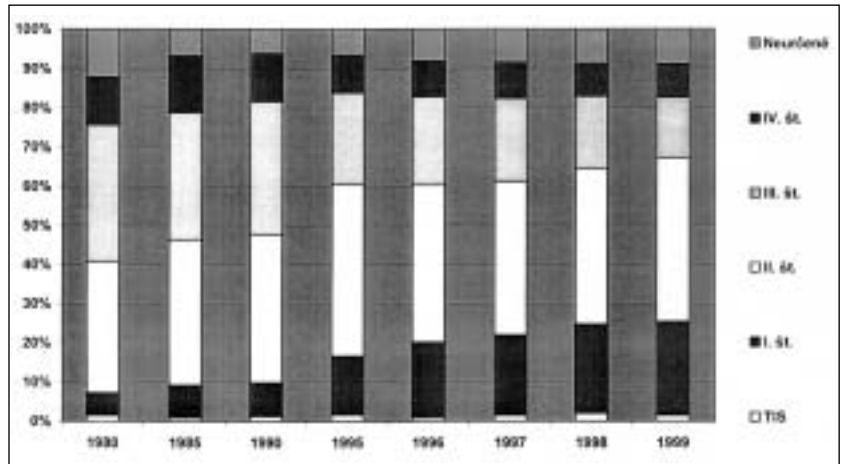
### Výsledky

Na obr. č. 1 uvádzame vývoj podielov jednotlivých klinických štádií karcinómov prsníka u žien na Slovensku v rokoch 1980 až 1999. Z tohto grafu je zrejmy markantný posun k nižším, prognosticky priaznivejším klinickým štádiám, pričom však podiel in situ štádií karcinómov prsníka sa napriek trvalému vzostupu počtov invazívnych karcinómov nemenil a zotrval na hladine okolo 1,5%. Na ďalšom grafe č. 2 uvádzame podiely in situ štádií na celkovom počte všetkých invazívnych a in situ nádorov prsníka v jednotlivých krajoch Slovenska od roku 1996 do roku 1999 pričom rešpektujeme nové územné členenie SR z roku 1996. Ako z grafu vyplýva, najvyšší podiel in situ štádií sme zaznamenali v Bratislavskom a Nitrianskom kraji, nižšie hodnoty na strednom a najnižšie na východnom Slovensku. Tento prehľad dopĺňujeme na tabuľke č. 1 medzinárodným porovnaním počtov, štandardizovaných hodnôt incidencie

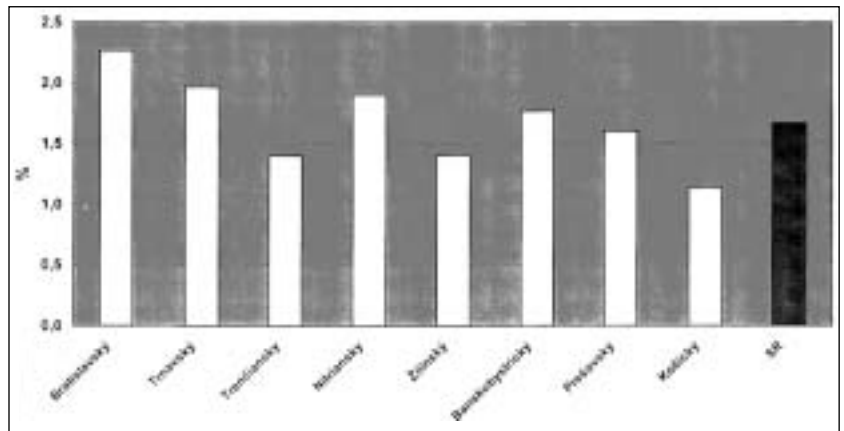
a podielov in situ štádií na celkových počtoch karcinómov prsníka ktoré sú k dispozícii iba v niektorých krajinách alebo oblastiach sveta s dobrým pokrytím obyvateľstva populačnými onkologickými registrami. I tak však vidieť, že podiel in situ karcinómov prsníka v jednotlivých krajinách, prípadne regiónoch sveta značne varíroval.

Na obrázku č. 3 uvádzame podiely jednotlivých morfológických typov in situ karcinómov prsníka na Slovensku v rokoch

Obr. 1: Vývoj in situ a jednotlivých klinických štádií invazívnych karcinómov prsníka na Slovensku v rokoch 1980 až 1999.



Obr. 2: Podiel in situ štádií na celkových počtoch karcinómov prsníka v krajoch Slovenska v rokoch 1996-1999.

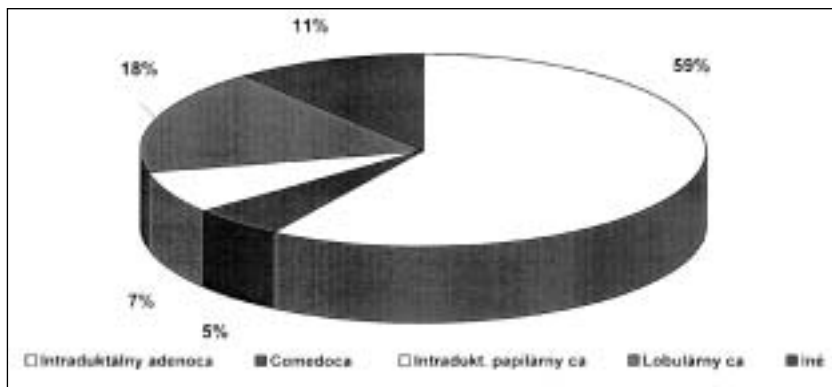


Tab. č. 1: Carcinoma in situ prsníka u žien – medzinárodné porovnanie.

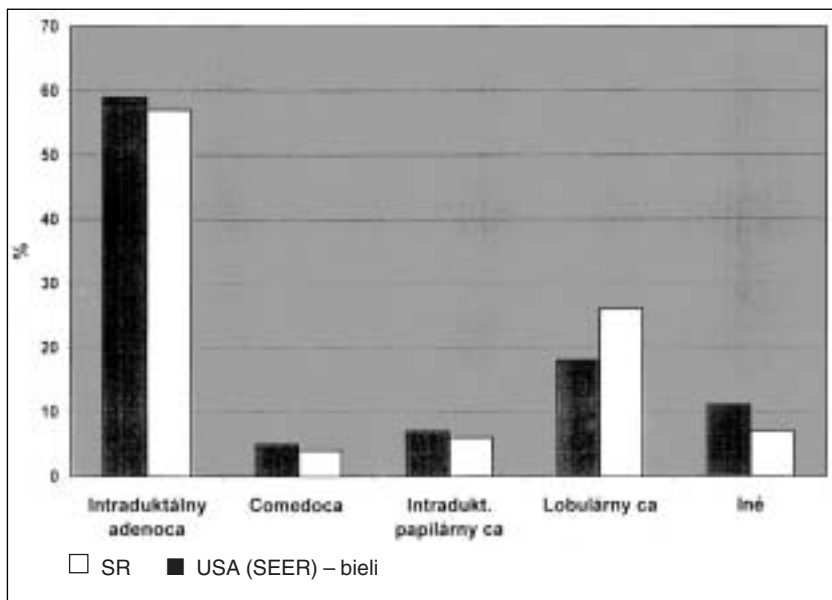
Štát, región	Obdobie	Invazívne karcinómy		Carcinoma in situ		
		Abs. počty*	WSR**	Abs. počty*	WSR**	Podiel (%)***
USA, Iowa	1988–1992	10 296	90,0	1 075	11,0	9,5
Rumunsko, Bihor	1980–1998	2 553	33,3	3	?	0,1
Poľsko	1999	10 031	36,0	30	0,1	0,3
Španielsko, Mallorca	1993–1996	1 048	55,8	54	0,9	0,5
<b>Slovensko</b>	<b>1999</b>	<b>1 836</b>	<b>48,1</b>	<b>28</b>	<b>0,8</b>	<b>1,5</b>
ČR	1999	5 013	56,9	146	1,9	2,8
Fínsko	1999	3 471	77,0	102	2,5	2,9
Slovinsko	1999	1 006	59,6	47	3,2	4,5
Taliansko, Modena	2000	564	100,9	70	?	11,0
Australia, Victoria	1999	2 795	84,4	324	10,8	10,4
Maďarsko, Szabolcz-Szatmár	1988–1992	3 245	32,0	18	?	0,6
Francúzsko, Haut Rhin	1994–1996	1 215	79,3	57	3,5	4,5
Švajčiarsko, Ženeva	1991–1994	1 138	96,3	62	5,1	5,2

Legenda: \* Počet prípadov v daných rokoch \*\* Štandardizované na svetovú štandardnú populáciu (na 100 000/rok) \*\*\* Podiel zo všetkých zhubných nádorov prsníka

Obr. 3: Podiely hlavných morfológických typov na celkových počtoch karcinómov prsníka u žien na Slovensku v rokoch 1980-1999.



Obr. 4: Porovnanie podielov hlavných morfológických typov karcinómov prsníka v štádiu in situ u žien na Slovensku a v USA.



1980-1999 s jasnou prevahou duktálnych a na druhom mieste lobulárnych karcinómov. Konečne na poslednom obrázku č. 4 porovnáваме zastúpenie jednotlivých morfológických typov in situ karcinómov prsníka u žien na Slovensku s identickými údajmi v USA. Je zrejme, že podiel jednotlivých morfológických typov bol v oboch porovnávaných krajinách približne rovnaký, i keď počty prípadov, evidovaných v USA ďaleko prevyšoval počty ochorení zistených na Slovensku.

### Diskusia

Na nepriaznivú štruktúru klinických štádií karcinómov prsníka na Slovensku s vysokými podielmi III. a IV. štádia sme poukázali pred niekoľkými rokmi (1). Ako uvádzame v tomto príspevku, v poslednom desaťročí nastal posun s vyšším zastúpením nižších, prognosticky priaznivejších štádií. Tento fakt sa zrejme postupne prejaví i na lepšom prežívaní pacientiek s karcinómami prsníka, ktoré je zatiaľ na Slovensku v európskom kontexte pomerne krátke (3). Na druhej strane boli na Slovensku prvé prípady karcinómov prsníka in situ u žien hlásené postupne, najmä po roku 1980 a ich podiely, spolu so štandardizovanými hodnotami incidence zostávajú nízke a až na malé výkyvy sa nemenili, i napriek rýchlo stúpajúcim počtom prípadov invazívnych karcinómov. Rozdiely v podieloch karcinómov prsníka in situ v jednotlivých krajoch Slovenska bolo možné indikovať iba za posledné štyri roky, po zavedení nového územného rozdelenia. Zdá sa, že aspoň

častočne indikujú i rozdiely v jednotlivých klinických štádiách invazívnych karcinómov tejto lokalizácie u žien.

Porovnávanie hodnôt incidence i podielov karcinómov in situ prsníka u žien v rôznych krajinách a regiónoch je ťažké. Prvé pomerne vysoké podiely DCIS priniesli predovšetkým pitevné nálezy, menšie okolo 6% v prípade pitiev u starších žien (4) ale pomerne vysoké, až do 18% v prípadoch súdnych pitiev, do ktorých sa dostali najmä mladšie ženy (17). V prevážnej väčšine krajín alebo regiónov sa napriek dobre fungujúcim populačným registrom karcinómy prsníka in situ vôbec nevykazovali v pravidelne publikovaných ročenkách, tak isto neboli publikované v periodických medzinárodných prehľadoch incidence zhubných nádorov („Cancer Incidence in Five Continents“) vydávaných SZO. Bolo to spôsobené hlavne častými zmenami definície karcinómov prsníka in situ, pričom niektorí autori akceptovali ich existenciu i v prípade 50% invázie, iní zahrňovali pod označenie „minimálny karcinóm prsníka“ nielen DCIS a LCIS ale aj invazívny karcinóm prsníka s inváziou nepresahujúcou 5 mm. Tým sa medzi karcinómy prsníka in situ dostali ešte v nedávnej minulosti aj prípady s pozitívnymi axilárnymi uzlinami, prípadne i vzdialenými metastázami. Tieto skutočnosti boli predmetom početných kontroverzných diskusií (20) a sťažujú aj interpretáciu starších náleзов pri hodnotení dlhodobých trendov ich vývoja (15). V súčasnosti podiely in situ karcinómov prsníka vo vyspelých štátoch v súvisi s rozvojom plošných skrínigov, výrazne narastajú a to u starších i mladších žien, pričom je snaha rozlišovať hlavné morfológické typy - DCIS a LCIS. DCIS sa zisťujú pomocou mammografie a pred-

stavujú v 25-50% prechodné štádium pri vzniku invazívneho karcinómu na identickom prsníku, kým LCIS sa pomocou mammografie nezistí, ale predstavuje väčšinou náhodný nález pri biopsii a považuje sa za indikátor vysokého rizika vzniku invazívneho karcinómu na oboch prsníkoch. Ide teda o samostatné klinické jednotky s rozdielnou prognózou a tým i terapiou (15, 24, 28).

Prvý údaj o trendoch karcinómov prsníka in situ vo veľkom súbore žien, ohraničený iba na výskyt DCIS vychádza z analýzy údajov zozbieraných v rámci programu SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) v USA v rokoch 1983-1989 (25). Hodnoty in situ karcinómov prsníka v priebehu siedmich rokov rýchlo narastali z 3,0 na 9,2 / 100.000, rýchlejšie u belošíek. Rovnaké hodnoty incidence karcinómov prsníka in situ boli zaznamenané aj žien čiernej rasy (26).

Dlhodobé sledovanie v rokoch 1973 - 1992 zamerané iba na dva hlavné morfológické typy DCIS a LCIS karcinómov prsníka u žien je dostupné iba v materiáloch regionálneho onkologického registra v Connecticut, USA. Celkove bolo zaznamenaných 3.217 prípadov z toho 70% DCIS, 24% LCIS a 4% s neurčeným morfológickým typom. Kým v prvom trojročnom období bolo zaznamenaných 181 v posledných dvoch rokoch už 706 prípadov (29). Detailnejšie porovnanie morfológických typov in situ karcinómov prsníka u žien nachádzame v ďalšej rozsiahlej štúdií z USA, vychádzajúcej taktiež z programu SEER za roky 1973-1987, v ktorej je analyzovaných až 10.550

in situ karcinómov prsníka u žien (2). Indikuje tak isto prevahu DCIS v 57 % a LCIS v 25,2 %. Ďalšie morfológické typy boli zastúpené menším podielom – komedový karcinóm (4,6%), papilárny adenokarcinóm (6,4 %) teda hodnoty podobné údajom zo značne menšieho súboru zo Slovenska (2). Veľký súbor z USA dovolil aj sledovanie vekovo–špecifických hodnôt, pričom DCIS vrcholili vo vekových skupinách 60–75 ročných a LCIS u 40–54 ročných žien (2). Malé počty in situ karcinómov na Slovensku neumožnili zostaviť vekovo–špecifické hodnoty incidencie podľa morfológických typov. Ako sme uviedli vyššie, nepokúsili sme sa o analýzu výskytu a vývoja karcinómov prsníka in situ u mužov vzhľadom na nízky výskyt samotných invazívnych karcinómov tejto lokalizácie u mužov vôbec a zanedbateľný aj na Slovensku. Bližšie poznatky o tejto problematike u mužov sme našli iba v dvoch prácach (2, 7).

**PodĎakovanie:** Autori práce sú vďační Lige proti rakovine SR za trvalú morálnu a materiálnu pomoc Národnému onkologickému registru SR a tým pri realizácii tohto príspevku.

## Záver

Záverom možno konštatovať, že v porovnaní s vyspelými štátmi, najmä s USA predstavujú karcinómy prsníka u žien v štádiu in situ pomerne vzácny nález nielen na Slovensku, ale i v mnohých štátoch strednej, východnej ale i západnej Európy. Vyšší podiel karcinómov in situ možno očakávať v našich podmienkach iba vo vzdialenejšej budúcnosti, po zavedení plošného skríningu nádorov tejto lokalizácie, s vyšším využitím mammografie, lepšou interpretáciou mammografických náleзов a ich potvrdením ďalšími vyšetreniami, predovšetkým cielenou biopsiou. Treba však zdôrazniť, že zvyšujúci sa podiel nádorov prsníka zachytených v štádiu in situ, spolu s určením ich morfológie je jedným zo základných predpokladov uplatnenia adekvátnych metód pri ich liečení a tým i lepšieho prežívania pacientiek s karcinómami prsníka.

## Literatúra

- Bella, V., Pleško, I., Vlasák, V., Obšitníková, A., Korienková, E.: Epidemiologické aspekty skríningu zhubných nádorov prsníka na Slovensku. *Klin. Onkol.*, 8, 1995, 172–176.
- Berg, J. W., Hutter, R. V. P.: Breast cancer. *Cancer* 75, 1995, 1 (suppl.) 257–269.
- Berrino, F., Capocaccia, R., Esteve, J., Gatta, G., Hakulinen, T., Micheli, A., Sant, M., Verdecchia, A. (eds.): Survival of cancer patients in Europe: the EURO-CARE-2 study. IARC Scientific Publications No. 151. Lyon, IARC, 1999, 571 s.
- Bhathal, P. S., Brown, R. W., Lesueur, G. C., Russel, I. S.: Frequency of benign and malignant breast lesions in 207 consecutive autopsies in Australian women. *Br. J. Cancer* 51, 1985, 271–278.
- Blodgood, J. C.: Comedo carcinoma (or comedoadenoma) of the female breast. *Am. J. Cancer* 22, 1934, 842–849.
- Boyle, P., Parkin, D. M.: Statistical methods for registries. In: Jensen, O. M., Parkin, D. M., MacLennan, R., Muir, C. S., Skeet, R. G. (eds.): Cancer registration: Principles and methods. IARC Scientific Publications No. 95, Lyon, IARC 1991, 126–158.
- Buemi, A., Halna, J. M., Grandadam, M.: Le Cancer dans le Haut Rhin 1994, 1995, 1996. Mulhouse, Régistre de Cancers du Haut-Rhin 2001, 150 s.
- Cutulii, B., Dilhuydy, J. M., De Lafontan, B., Berlie, J., Lacroze, M., Lesaunier, F., Graic, Z., Tortochaux, J., Resbeut, M., Lesimple, T., Gamelin, E., Campana, F., Reme-Saumon, M., Moncho-Bernier, V., Cuilliere, J. C., Marchal, C., De Gislain, G., N'Guyen, T. D., Teissier, E., Velten, M.: Ductal cancer in situ of male breast. Analysis of 31 cases. *Eur. J. Cancer* 33, 1997, 35–38.
- Didkowska, J., Wojciechowska, U., Tarkowski, W., Zatonski, W.: Cancer in Poland in 1999. Warszawa, Polish National Cancer Registry 2002, 129 s.
- Federico, M., Artioli, M. E., Rashid, I., Cirilli, C., Maiorana, A., De Girolamo, G. (eds.): I tumori in provincia di Modena nel 2000. Modena, Progress Mo, 2003, 86 s.
- Finnish Cancer Registry: Cancer Incidence in Finland 1998 and 1999. Helsinki, Cancer Society of Finland Publication No. 63, 2002, 76 s.
- Giles, G., Whitfield, K., Thursfield, V. (eds.): Cancer in Victoria, 1998. Carlton Victoria, Anti-Cancer Council of Victoria, 2000, 23 s.
- Juhász, L. (ed.): Cancer incidence in the county Szabolcs-Szatmár-Bereg, Hungary, 1953–1992. Nyiregyháza, Printing Office of Mohácsi Art, 1996, 96 s.
- Karnell, L. H., Kelley, S. L., Olson, D. B., McKeen, K. M., Platz, C. E., Lynch, C. F. (eds.): Cancer in Iowa: 1973–1992. Iowa City, The University of Iowa Press, 1995, 132 s.
- Molino, A., Bozzi, P., Cetto, G. L.: Epidemiology of ductal carcinoma in situ (DCIS). *Med. Biol. Environm.*, 26, 1998, 3–7.
- Národný onkologický registr ČR: Novotvary 1999 ČR. Praha, Ústav zdravotníckych informácií a štatistiky 2002, 278 s.
- Nielsen, M., Thomsen, J. L., Primdahl, S., Dyreborg, U., Andersen, J. A.: Breast cancer and atypia among young and middle-aged women. A study of 110 medicolegal autopsies. *Br. J. Cancer* 56, 1987, 814–819.
- Obrador, A., Garau, I. (eds.): El cancer a Mallorca 1993–1996 Incidencia i mortalitat. Palma, UIB. Edifici Sa Riera, 2002, 35 s.
- Obradovic, M., Fioretta, G., Droin, N., Raymond, L., Bouchardy, C. (eds.): Le cancer à Genève. Incidence, Mortalité, Survie, 1970–1994. Geneve, République et Canton de Geneve, 1999, 72 s.
- Page, D. L., Jensen, R. A.: Ductal carcinoma in situ of the breast. Understanding the misunderstood stepchild. *J. Amer. Med. Ass.*, 275, 1996, 948–949.
- Pompe-Kirn, V. (Ed. in chief): Cancer incidence in Slovenia 1999. Ljubljana, Institute of Oncology 2002, 75 s.
- Sakorafas, G. H., Krespis, E., Pavlakis, G.: Risk factors for breast cancer development: A clinical perspective. *Surg. Oncol.*, 10, 2002, 183–192.
- Silverstein, J. M.: Incidence and treatment of ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur. J. Cancer* 33, 1997, 10–11.
- Smith-Bindheim, R., Kerlikowske, K., Gebretsadik, T., Newman, J.: Is screening mammography effective in elderly women? *Amer. J. Med.*, 108, 2000, 112–119.
- Swanson, M. G., Ragheb, N. E., Lin, C. S., Hankey, B. F., Miller, B., Horn-Ross, P., White, E., Liff, J. M., Harlan, J. C., McWhorter, J. P., Mullan, P. B., Key, C. R.: Breast cancer among white and black women in the 1980s. Changing patterns in the United States by race, age and extent of disease. *Cancer* 72, 1993, 788–798.
- Szabo, E., Pacurar, V., Palcu, A., Lintu, O.: Breast cancer special registry of Bihor County 1980–2000. *Yearly Journal University of Oradea*, 1, 2000, 3 / 4, 283–291.
- Urbanowicz, Z., Witkowska, J., Krol, J.: Zwapnienia uvidocynione v badaniu mammograficznym jako problem diagnostyczny. *Gynek. Pol.*, 67, 1996, 366–369.
- Weiss, H. A., Brinton, L. A., Brogan, D., Coates, J. R., Gammon, M. D., Malone, K. E., Schoenberg, J. G., Swanson, C. A.: Epidemiology of in situ and invasive breast cancer in women aged under 45. *Br. J. Cancer* 73, 1996, 1298–1305.
- Zheng, T., Holford, T. R., Chen, Y., Jones, B. A., Flannery, J., Boyle, P.: Time trend of female breast carcinoma in situ by race and histology in Connecticut, USA. *Eur. J. Cancer* 33, 1997, 96–100.

## SYSTÉMOVÉ ŘEŠENÍ

## SYSTEMIC SOLUTION

HORVÁTH T. A.

LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY V BRNĚ

**Souhrn:** Stav hrudní onkologie ve světle výzkumu a klinické praxe na 9. Světovém kongresu Mezinárodní fotodynamické asociace v japonském Miyazaki, květen 2003.

**Klíčová slova:** Endoskopie, fotodynamická léčba, chirurgie, onkologie

**Summary:** Thoracic oncology issue as reflected by research and clinical practice on 9<sup>th</sup> IPA World Congress Miyazaki, Japan, May 2003.

**Keywords:** Endoscopy, Oncology, Photodynamic therapy, Surgery

### Úvod

Systémové řešení biologických, zdravotnických, etických, ekonomických a organizačních úkolů současnosti v souvislosti s rozvojem nových vyšetřovacích a léčebných postupů v hrudní medicíně je nanejvýš žádoucí. Informovanost je *conditio sine qua non*, entuziasmus vítán, nezávislost potřebná, kritika žádoucí, aktivní a globální přístup vhodný.

Podávám stručný přehled technologických novinek, inspirujících výsledků laboratorních výzkumů, klinické aplikace fotodynamické léčby a z toho plynoucí pohled na pohyb jak v torakochirurgii, tak v hrudní onkologii.

### Zobrazovací metody

OCT - Optická koherentní tomografie - Optical Coherence Tomography. Nová třída analytické zobrazovací technologie využívající širokospektrý zdroj světla, vláknovou ohebnou optiku s laterálním i longitudinálním snímáním obrazu a počítačovou techniku vytvářející na monitoru věrný obraz průřezu bronchiální stěny. (Vyvinul Massachusetts Institute of Technology ve spolupráci Light Lab USA.) Reference: M. Tsuboi, Tokyo Medical University (TMU).

DAFE System (Federal Institute of Technology Switzerland) další z modifikací rozrůstající se rodiny autofluorescenčních technologií. Snímá autofluorescenci bronchiální sliznice v modré, červené a fialové oblasti spektra třemi samostatnými CCD kamerami. Signál pak analyzuje počítač se zohledněním úhlu osvětlení a vzdálenosti od povrchu sliznice. V porovnání s bílým světlem je v detekci bronchiálních premalignit a CIS dvakrát citlivější. Na vývoji spolupracoval Lutz Freitag, představil H. van den Bergh, Lausanne, CH.

Autofluorescenční systém SAFE-2000 vyvinul Pentax pro uživatele videobronchoskopů. Úplně čerstvé první výsledky přednesl Takaaki Tschuchida, TMU. Prototyp čekají referenční studie v Evropě a v USA.

EBUS - endobronchiální ultrasonografie - je rutinním vyšetřením v časně diagnostice. Laterální ultrazvukové sondy pro pracovní kanál běžného endoskopu (např. Ultrasonic Probe FB-19UV), sloužící k detekci a posouzení event. postižení mízních uzlin u mikroinvazivních časných forem bronchogenní

ho karcinomu jak z charakteru zobrazení, tak k cílené aspirační punkci vystavovali jak Pentax, tak Olympus Co.

### Od poznatků buněčné a molekulární onkologie k experimentální farmakologii a protinádorové vakcinaci

Tayyaba Hasan z Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, sumarizovala současně poznatky angiogenezy a upozornila, že PDT v nízkých dávkách může stimulovat sekreci cytokinů a růstových faktorů, které mohou mít pro-angiogenní efekt.

Charles J. Gomer (University of Southern California, Los Angeles) je přesvědčen, že tomu tak skutečně je. Prokázal zlepšení výsledků PDT aplikací anti - Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) například IM862, inhibitorů cyklooxygenázy 2 (COX-2) např. NS398 (Celeboxid), anebo inhibitorů MMP 1 a MMP 2 (Matrixmetalloproteinázy 1 a 2).

Mladen Korbelik s Ivanou Cečić z British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Canada dokazují, že PDT léčba tumorů vytváří unikátní prostředí pro extrémně efektivní imunitní odpověď, která má podstatnou úlohu v léčebných výsledcích PDT a mohla by pomoci osvětlit otázky protinádorové vakcinace.

Jitzuo Usuda z Tokyo Medical University, se zabývá otázkami účinku PDT na celulární úrovni. Signální cesty aktivované PDT mohou podporovat anebo inhibovat buněčnou smrt. Prokazuje celou škálu odpovědí včetně apoptózy. Pomocí pthalocyaninu Pc4 upřesnil cíle PDT na membránách: anti-apoptotické proteiny Bcl-2, Bcl-xL a skupina ER membránových proteinů. Definoval kritické oblasti transmembránových domén a upozornil, že vysoká hladina / overexprese Bcl-2 může chránit nádorovou buňku natolik, že ji PDT nepoškodí.

### Fotodynamická léčba (PDT) samostatně, jako alternativa chirurgie nebo jako její doplnění

PDT je pro časné a pokročilé centrální bronchogenní nádory zavedenou rutinní léčebnou modalitou v řadě zemí Evropy, v Severní Americe a v Japonsku. Krom toho má celou řadu jiných indikací od pokročilých tumorů jícnu, nádorů hlavy a krku, urologických, gynekologických a dermatologických indikací také indikace neurochirurgické a jiné například nehojící se septické defekty dolních končetin o nichž referoval Jev-

genij Stranadko, Gosudarstvennyj Issledovatel'skij Institut, Moskva, Rusko)

Uvedme, že Brazílie, která začala usilovat o zavedení PDT zhruba ve stejném období jako ČR prezentovala v Miyazaki zkušenosti s léčbou dvou set čtyřiceti pacientů ( V. Bagnato, Universidad Sao Paulo).

Systémová aplikace fotosenzibilizátorů druhé generace (Photofrin II, Foscan) má své nevýhody, zvl. relativně dlouhé přetrvávání kožní fotosenzibility. Proto se s napětím očekávala zpráva o výsledcích multicentrické japonské klinické studie s Talaporfyrimem (NPe6).

Vyzněla příznivě, jak po stránce farmakokinetické s maximální akumulací farmaka v tumoru již za 5 hodin po i.v. aplikaci, tak pro minimální vedlejší účinky včetně kožní fotosenzibilizace (referoval K. Furukawa, TMU). Povolení k distribuci lze očekávat do konce t. r. Talaporfyrim má maximum absorpce na vlnové délce 672 nm, příslušný diodový laser patentoval Panasonic.

Jak důležitou oblastí pro uplatnění PDT je ezofagologie dokládá prezentace prací hned několika průkopníků:

5-ALA PDT je léčebnou minimálně invazivní alternativou primární ezofagektomie, která má vysokou perioperační morbiditu a mortalitu uzavírají Steven Brown se spolupracovníky z Free and University Medical College School, London, UK. Referují o PDT ablaci těžké dysplazie (High grade dysplasia - HGD) v Barrettově jícnu u 40 pacientů. Ezofagektomie nebyla indikována buď pro přidružená onemocnění nebo pro odmítnutí operace. Dávkování 5-ALA 60mg/kg p.o., endoskopie 4-6 hodin poté, monochromatické světlo laseru 633 nm, cylindrický difuzér, optimální dávka je 2 x 1000 J/cm<sup>2</sup> s časovým odstupem 4 týdnů. Ve skupině nezaznamenali žádné úmrtí ani žádnou strikturu, 75% pacientů zůstává prosto HGD, u 4 je vyvinul karcinom, který dvakrát úspěšně řešili chirurgicky, 1x chemoterapií a 1x PDT s mesotetrahydroxyfenylchlorinem (mTHPC), který použili celkem u 16 pacientů s adenokarcinomem Barrettova jícnu od r. 1995, jak referují v jiné studii.

Tuto myšlenku podporuje práce Luigi Cortiho, Universitá di Padova, Italia, který léčil celkem 55 pacientů s časným karcinomem jícnu ( z toho 22 CIS) Photofrinem 2mg/kg i.v. argonovým anebo diodovým laserem 630 nm dávkou 200 - 300 J/cm<sup>2</sup>. Pacienti s reziduální nemocí po dvou PDT cyklech byli léčeni kurativní radioterapií. Kompletní remise po PDT byla pozorována u 87% pacientů s CIS.

Patrick Ross z The Ohio State University Medical Center, Columbus, USA se spolupracovníky úspěšně léčili od července 1998 do prosince 2002 celkem 315 pacientů PDT - 48 h po aplikaci Photofrinu 2 mg/kg iv, z toho 99 osob s pokročilým

karcinomem jícnu s dysfagií a 18 pacientů s HGD jícnu. Ostatní pacienti byli léčeni pro bronchogenní karcinom, většinou pokročilý.

PDT je indikovaná i v případě multilokulárního výskytu bronchogenního karcinomu, jehož výskyt jak známo s rostoucím věkem a snižováním funkční zdatnosti dýchacího systému narůstá. Zde mají samostatná PDT modalita anebo simultánní PDT a resekční léčba nebyvalý prostor k uplatnění a dobré výsledky jak sdělil T. Okunaka, Respiratory Disease Center, Akasaka, Japan.

Profesor Okunaka definoval i novou klinickou indikaci fotodynamické léčby - intersticiální aplikace u pacientů s malým plicním karcinomem v intermediální zóně plic („ v zemi nikoho“) mezi centrálními dýchacími cestami vhodnými k PDT bronchoskopické intervenci a plicní periferií dostupnou videoasistované plicní resekci (V shaped neboli cuneiformis tj. klínovité) zvl. u pacientů se špatnými ventilacími parametry, protože s rostoucí vzdáleností od periferie se rozměry případné klínovité resekce dotýkají funkčních i technických limitací metody. Lze očekávat nárůst těchto indikací v souvislosti s CT screeningovými plicními programy v USA, Japonsku, Evropě, ale např. také v Izraeli (D. Stav, General Hospital, Tel Aviv).

Průkopnickou preklinickou práci v intersticiální aplikaci PDT u nádorů plic na prasečím modelu s Photofrinem vykonal s týmem TMU Hidemitsu Tsutsui. V Miyazaki již přednesl povzbudivé výsledky klinické studie u deseti pacientů s tumory průměru od jednoho do deseti centimetrů. Světlovodivá vlákna byla vpravena do tumorů pod CT kontrolou. Nemocní tolerovali proceduru dobře, bez závažných komplikací. Autoři uzavírají : Intersticiální PDT by mohla být slibnou metodou u pacientů s tumory v intermediální zóně plic nevhodnými pro chirurgii. Z diskuse vyplynulo, že několik center na této problematice, v níž je TMU o krok napřed, také usilovně pracuje.

### **Závěr**

Je zřejmé, že pohodlí minulého tisíciletí je v nenávratu a věci jsou v pohybu. Hustá síť všeobecné a specializované rutinní lékařské péče, solidní výzkumná báze, relativně kompaktní i mediálně dobře dosažitelná riziková populace vytvářejí českému prostoru nebyvalou šanci změnit handicap v přednosti. Neztrácejme čas naříkáním, že to nejde. Kde je vůle, tam je i cesta. Substrát a důkazy nechybí. Klíčem je horizontální spolupráce. Podmínkou pozitivní myšlení.

### **Poděkování:**

Děkuji za podporu Odborovému sdružení pracujících v hornictví, geologii a naftovém průmyslu.



## STANOVISKO ODBORNÝCH SPOLEČNOSTÍ K INDIKACI A POUŽITÍ ANTIMYKOTIK SE SYSTÉMOVÝM ÚČINKEM

## STANOVISKO ODBORNÝCH SPOLEČNOSTÍ K INDIKACI A POUŽITÍ ANTIMYKOTIK SE SYSTÉMOVÝM ÚČINKEM

<sup>1</sup>HABER J. A ODBORNÉ SPOLEČNOSTI <sup>(1-6)</sup>

<sup>1</sup>ČERMÁK J., <sup>1</sup>INDRÁK K., <sup>3</sup>KLENER P., <sup>4</sup>MAREŠOVÁ V., <sup>2</sup>STARÝ J., <sup>5</sup>RYSKA M., <sup>6</sup>ŠVIHOVEC J., <sup>3</sup>VORLÍČEK J.

<sup>1</sup>ČESKÁ HEMATOLOGICKÁ SPOLEČNOST; <sup>2</sup>PRACOVNÍ SKUPINA DĚTSKÉ HEMATOLOGIE ČR;

<sup>3</sup>ONKOLOGICKÁ SPOLEČNOST; <sup>4</sup>SPOLEČNOST INFEKČNÍHO LÉKAŘSTVÍ;

<sup>5</sup>SPOLEČNOST TRANSPLANTOLOGICKÁ; <sup>6</sup>FARMAKOLOGICKÁ SPOLEČNOST

Na podzim roku 2002, v rámci Komise pro lékovou politiku a kategorizaci ČLS JEP, probíhala jednání zástupců odborných společností (Společnost infekčního lékařství, Česká hematologická společnost, Onkologická společnost, Farmakologická společnost), jejichž výsledkem bylo společné stanovisko ke kategorizaci a zejména k racionálnímu použití antimykotik se systémovým účinkem. Na vypracování závěrečné verze racionální indikace antimykotik se následně účastnila i společnost transplantologická (IKEM) a pracovní skupina dětské hematologie ČR. Podklady byly předloženy MZd a VZP a v říjnu 2002 projednány na kategorizační komisi MZd ČR. Materiály připravené k jednání v říjnu 2002 byly počátkem roku 2003 aktualizované v odborné oblasti o výsledky dokončených studií. Odborné společnosti vyjádřily již dříve v dopisech MZd a i ve společné diskusi při jednání se zástupci MZd a VZP nutnost plné úhrady těchto velmi drahých antimykotik mimo paušál. Půlroční zkušenost roku 2003 potvrzuje názor odborných společností, že významným limitujícím faktorem použití je dosud vysoká cena, jejíž úhrada z paušálu nemocnic překračuje ekonomické možnosti těchto pracovišť a vede k podléčení pacientů s tragickými následky. Proto předkládají MZd žádost o vyjmutí vyjmenovaných antimykotik z paušálu a jejich hrazení - v uvedených centrech - plně mimo paušál.

Následující text obsahuje stanovisko uvedených odborných společností k racionální indikaci vybraných systémových antimykotik: 1. Seznam vybraných pracovišť s nejvyšší incidencí život ohrožujících systémových mykóz. 2. Obecné stanovisko k použití antimykotik se systémovým účinkem pro návrh plné úhrady mimo paušál. 3. Základní charakteristiky vybraných antimykotik pro návrh plné úhrady mimo paušál. 4. Přehled antimykotik v indikaci 1. a 2. volby u vybraných diagnóz. 5. Kvalifikovaný odhad počtu nemocných / rok, u nichž je možné předpokládat použití těchto antimykotik. 6. Kalkulace nákladů za rok, spojených s použitím systémových antimykotik ve vybraných centrech.

### ad 1. Seznam vybraných pracovišť s nejvyšší incidencí život ohrožujících systémových mykóz.

#### Hematoonkologická centra

Interní klinika hematoonkologická FN Brno

Hematoonkologická klinika FN Olomouc

II. interní klinika OKH FN Hradec Králové

Praha (ÚHKT, I. interní klinika VFN, OKH FN KV)

OKH FN Plzeň

#### Centra pediatrické hematologie

II. dětská klinika FN Motol

Klinika dětské onkologie FN Brno

Dětská klinika FN Olomouc

Dětská klinika FN Ostrava

Dětská klinika FN Hradec Králové

Dětská klinika FN Ústí nad Labem

Dětská klinika FN Plzeň

Dětská klinika NsP České Budějovice

#### Centra HIV/AIDS pacientů

Infekční klinika, FN Na Bulovce Praha

Infekční klinika, FN Plzeň

Infekční klinika, FN Hradec Králové

Infekční klinika, FN Brno-Bohunice

Infekční oddělení, Nemocnice České Budějovice

Infekční oddělení, MN, Ústí nad Labem

Infekční oddělení, FN Ostrava

#### Centra transplantace solidních orgánů

Praha IKEM

### ad 2. Obecné stanovisko k použití antimykotik se systémovým účinkem

1/ Antimykotika se systémovým účinkem jsou indikována zejména u imunoalterovaných nemocných, u nichž je porucha imunity predisponujícím faktorem vzniku oportunních mykóz. Incidence invazivních mykóz narůstá, mortalita na systémové mykózy se pohybuje mezi 40–90%. Ohroženi jsou zejména nemocní po alogenní transplantaci kostní dřeně, akutní leukémie v indukční léčbě, jiné hematologické malignity léčené vysokodávkovanou agresivní chemoterapií včetně autologních transplantací periferních kmenových buněk. Dále nemocní s HIV, nemocní po transplantaci orgánů (zvláště plic, jater) a někteří nemocní na jednotkách intenzivní péče.

2/ Indikace antimykotika se řídí z hlediska

- stavu pacienta v době zahájení antimykotické léčby, a to zejména podle a/ předpokladu délky přežití (měsíce), b/ stavu renálních a jaterních funkcí, c/ současné medikace nefro (hepato) toxickými léky,

- léčiva a/ charakterem účinku (fungicidní-fungistatické) b/ farmakokinetickými vlastnostmi (dosažení účinných tkáňových koncentrací, včetně koncentrace v moči a v likvoru;

cestou biotransformace), c/ farmakodynamickými vlastnostmi (spektrum účinku, orgánová toxicita, snášenlivost), lékovými interakcemi, možností antimykotické kombinace, - **výsledků klinických studií** („evidence based“) a doporučení mezinárodních odborných společností - nejsou-li přesvědčivé klinické studie z nichž vyplývá indikace určitého antimykotika jako léku 1. volby (např. aspergilóza - Vfend), pak, není-li kontraindikace podání konvenčních antimykotik z důvodů stavu nemocného nebo rizik závažných lékových interakcí, podávat nová antimykotika až jako 2. linii po selhání léčby 1. řady. - **stavu epidemiologické situace** na pracovišti, na oddělení (stavu rezistence)

3/ U vybraných imunoalterovaných nemocných je včasné nasazení adekvátní antimykotické léčby život zachraňujícím postupem.

4/ Plně racionálnímu použití systémových antimykotik brání nedostatečné diagnostické možnosti včasného průkazu invazivní mykózy (jistá diagnóza = cílená léčba). Proto jsou systémová antimykotika podávána převážně preemptivně (= pravděpodobná diagnóza) a u těžce imunosuprimovaných nemocných často i empiricky (= možná diagnóza). (Haber 2002).

5/ Lékem volby leishmaniózy je amfotericin B na tukových nosičích (u nás importovaná nákaza do 5 pacientů ročně).

### ad. 3. Základní charakteristiky vybraných antimykotik pro návrh plné úhrady mimo paušál.

Uvedeny jsou pouze zásadní údaje relevantní pro klinickou praxi a systémové mykózy.

a/ polyeny	1/ Abelcet (i.v.) (lipidový komplex amfotericinu B)
	2/ Amphocil (i.v.) (koloidní disperze amfotericinu B)
b/ azoly	3/ Vfend (inf., tbl) (vorikonazol)
	4/ Sporanox (i.v., p.o. susp.) (itraconazol)
c/ echinokandiny	5/ Cancidas (i.v.) (caspofungin)
d/ antimetaboly	6/ Ancotil (i.v.) (flucytosin)(5-FC)

#### ad a/ polyeny

##### Amfotericiny na lipidovém nosiči

##### 1/ Abelcet (i.v.) (lipidový komplex amfotericinu B)

##### 2/ Amphocil (i.v.) (koloidní disperze amfotericinu B)

**Mechanismus antimykotického účinku:** fungistatický (fungicidní pouze *in vitro*).

**Spektrum účinnosti:** (odpovídá c-AmB) - širokospektré - kandidy (vč. flukonazol rezistentních), aspergily, kryptokoky; v zásadě shodné s itraconazolem a „novými“ antimykotiky s protiaspergilovým účinkem (vorikonazol, caspofungin) + další včetně parazitů (Leishmania, Plasmodium). Jediný AmB je účinný proti zygomycetám, hůře proti Malassezia furfur, některým kmenům Candida lusitanae, Fusarium (viz vorikonazol), Trichosporon spp., neúčinný u Pseudoallescheria boydii, aktinomykózy.

**Farmakokinetika:** viz tabulka (podle: Dodds 2000)

Lék – dávka	(t <sub>1/2</sub> ) (hod)	C <sub>max</sub> (µg/ml)	Clearance (ml/h/kg)	V <sub>dss</sub> (L/kg)
c-AmB (Amphotericin B) 0.5-1 mg/kg/den	24-48	1.2-2.4	10.2	4
ABLС (Abelcet) 5 mg/kg/den	173.4	1.7	436	131
ABCD (Amphocil) 3 mg/kg/den	27.5	2.6	105	3.8
L- AmB (AmBisome)* 5 mg/kg/den	6.8	83	11	0.1

**Zkratky:** t<sub>1/2</sub> = biologický poločas eliminace z plazmy; C<sub>max</sub> = maximální (vrcholové) koncentrace v plazmě; CL = celková plazmatická clearance; V<sub>dss</sub> = distribuční objem za ustáleného stavu; \* v ČR není dostupný

Proti amfoternímu c-AmB mají amfotericiny vázané na tukový nosič, vzhledem k lipofilnímu charakteru molekuly, jiné farmakokinetické (tkáňové distribuce - s depozicí nejvyšších koncentrací v RES systému jater, sleziny a plic) a farmakodynamické vlastnosti. které jsou podstatou snížené (20 %) nefrotoxicity. I když jsou některé farmakokinetické vlastnosti lipidových amfotericinů odlišné (rozdílné koncentrace ABLС a ABCD v plazmě, plocha pod křivkou včetně distribučního objemu, rozdíly v dosažených koncentracích v různých tkáňích souvisí s rozdílnou velikostí molekuly /1600-6000 nm, 122 nm resp/), z hlediska klinického použití mají zásadní přínos stejný. Vazba na lipidový nosič umožňuje „dopravit“ amfotericin specificky do infikované tkáně, k fungální membráně, kde se z vazby na lipidový nosič uvolňuje, a jako volný AmB v lokálně vysoké koncentraci eliminuje infekci. Tak jen malá část volného AmB postupně interaguje s cholesterolem savčích membrán včetně tubulárního aparátu ledvin (výrazně nižší koncentrace AmB v ledvině). U ABLС slouží cirkulující makrofágy (granulocyty, monocyty) jako transportér AmB do místa fungální infekce.

**Lékové interakce** jsou minimální, cave! nefrotoxické léky.

**Bezpečnostní profil:** Nefrotoxicita ve srovnání s c-AmB pouze 20%; při léčbě nemocných s renální insuficiencí nedochází k progresi nefropatie. Komplexace AmB do lipidových struktur omezila výskyt akutních projevů toxicity (horečka, třesavka...) jen nevýznamně.

**Dávkování:** ABLС: 5 mg/kg/den; ABCD: 3 mg/kg/den. U obou preparátů lze dávky zvyšovat.

**Klinické použití (klinické studie), souhrn:**

Postavení lipidových forem amfotericinu charakterizuje aktuálně panel expertů (Kontoyannis, 2001) a předchozí rozsáhlá metaanalýza (Johansen 2000). K objektivnímu posouzení účinnosti však chybějí dostatečně dvojité slepé srovnávací studie. Tým expertů doporučuje použití lipidových forem AmB pouze v následujících případech:

a) Kandidóza. Empirická léčba druhé řady u refrakterní febrilní neutropenie, u nemocných při toxickém poškození ledvin po předchozí léčbě konvenčním amfotericinem B nebo jako záchrannou léčbu invazivní kandidózy způsobené non-albicans kandidami po selhání 1. linie (flukonazol, c-AmB, caspofungin). V první linii ve vzácných případech chronické diseminované kandidózy.

b) Invazivní aspergilóza. Údaje o efektivitě léčby ABLС (a dalšími lipidovými AmB) jsou získány ve studiích většinou bez kontrolních, srovnávacích souborů. Účinnost je cca u 40-60 % nemocných, u nichž předchozí léčba c-AmB selhala nebo musela být pro toxicitu přerušena. Není pochyb o účinnosti léčby, avšak limitujícím faktorem je cena léku, i přes „zlevnění“ nákladů na léčbu při snížení rizika nefrotoxicity a kratšímu pobytu v nemocnici.

Možné kombinace s caspofunginem.

**Použití u dětí:** Klinické studie potvrzují dobré zkušenosti (účinnost, tolerance) (Lister 1996).

#### **Souhrn: Současné indikace amfotericinů na lipidových nosičích:**

- 1/ selhání léčby konvenčního amfotericinu B (c-AmB)
- 2/ potřeba vyšších dávek amfotericinu pro dosažení terapeutického efektu
- 3/ intolerance konvenčního amfotericinu B i přes odpovídající premedikaci
- 4/ preexistující renální postižení (ren. insuf.) vylučuje použití c-AmB
- 5/ zhoršování renálních funkcí při léčbě c-AmB (včetně kome-dikace nefrotoxicými léky)
- 6/ při léčbě c-AmB nelze (většinou z kardiálních důvodů) zajistit odpovídající hydrataci s doplněním elektrolytů.

#### ad b/ azoly

##### 3/ Vfend (inf., tbl) (vorikonazol)

**Mechanismus antimykotického účinku:** fungicidní (jako jedi-

ný !) u vláknitých hub (aspergily, Fusaria, Scedosporium), fungistatický u kandid.

**Spektrum účinnosti:** široké, stejné jak L-AmB a Itra, navíc je jako jediný skutečně účinný i u Fusarií (!) a Scedosporií.

**Farmakokinetika:** Malá molekula (350 kD), dobrý průnik do tkání, vazba na bílkoviny plasmy 58%, průnik do likvoru (50%) je vyšší než itra a AmB, nelineární farmakokinetika (vysycovací dávka 1. den - analogie s itra-konazolem), kvantitativní biotransformace v játrech (izoenzymy P-450= analogie s itra-konazolem), resorpce orální formy nalačno 96% (= podobný režim jako itra p.o. soluče). Clearance 85% látky/24 hod.

**Bezpečnostní profil:** Jaterní biotransformace zatíží hepatocyt, u těžších jaterních lézí (Child Pugh A,B) je nutné redukovat dávku na 50% (cave: a/ hepatotoxicita b/ preexistující jaterní léze). Není nefrotoxický, vehikulum (derivát cyklohextrinu - SBEDC) má parametry vylučování jako kreatinin. Při renální insuficienci (GF< 0.9 ml/sec) KI nitrožilní formy (kumulace vehikula) – lze podat orální formu.

Hlavní nežádoucí projevy - porucha visu (30%), i když přechodná a elevace JT. Kardiální deprese se nepotvrdila (na rozdíl od Itra-).

**Lékové interakce:** Biotransformace CyP450 (izoenzymy) je podstatou lékových interakcí, podobně jako u Itra (KI podání = omezení klinického použití). V praxi (transplantologie) nutné redukovat dávku cyklosporinu (50%), takrolimu (na 1/3), omeprazolu (50%), mykofenolátu neovlivněn.

**Dávkování:** Dospělí (nad 40 kg): i.v. 1. den 6 mg/kg à 12 hodin, další dny 4 mg/kg à 12 hodin; per os: 1. den 400 mg à 12 hodin, dále 200 mg à 12 hodin.

Děti: i.v. 1. den 6 mg/kg à 12 hodin, další dny 4 mg/kg à 12 hodin; per os: 1. den 6 mg/kg à 12 hodin, další dny 4 mg/kg à 12 hodin Výhodou je přechod z i.v. formy na orální (stejně jako Itra) s možností dlouhodobější léčby u dlouhodobě neutropenických (high risk) dětí, u nichž většinou tak dlouho c-AmB nelze podávat. Nezanedbatelná je pak i ekonomická úspora p.o. léčby. Redukce dávky: těžší jaterní léze (Child-Pugh A,B) -50% udržovací dávka.

**Klinické použití (klinické studie):** Výsledky dvojité slepé studie (Vori vs. c-AMB) (Herbrecht 2002) u invazivních aspergilóz (RR 52,8% vs 31,6%; přežití 70,8% vs 57,9%) byly podkladem registrace Vori (FDA) jako léku 1. volby u prokázané (proven) a pravděpodobné (probable) aspergilózy. Empirická srovnávací otevřená studie Vori versus AmBisome (N= 837, Walsh 2002) v globálním hodnocení hraničně (26% vs 30%) neprokázala non-inferioritu (stanovisko FDA), i když v dílčích hodnoceních (vysoce riziková nemocní) byl Vori statisticky signifikantně lepší. Jde o velmi seriózní studii (počet nemocných, srovnání proti AmBisomu), která favorizuje Vori u nejtěžších nemocných.

**Použití u dětí:** U dětí v otevřené studii „compassionate basis“ po selhání konvenční léčby (Walsh 2002 (a); N= 69; věk 9 měsíců - 15 let; 42 dětí s aspergilózou) byla klinický odpověď ve 45 %, stabilizace u 7%, přerušení u 7% pro intoleranci. Hlavní NÚ byly elevace JT. Závěr- 2. linie po selhání jiných antimykotik.

**Souhrn:** Indikace: Vori je lék 1. volby u prokázané a pravděpodobné aspergilózy (Herbrecht 2002). Má nejlepší pozici u vysocí rizikových nemocných v empirické léčbě, lepší než tukové amfotericiny (Walsh 2002). Kontraindikací je zde těžké jaterní postižení. V jiných, nekomparabilních studiích vykazovaly dobré výsledky i liposomální amfotericiny. Vori je lék 1. volby u Fusarií (FDA) a Scedosporií (u nás našťastí téměř nejsou). Kombinace s caspofunginem. Určitým limitem použití jsou lékové interakce- podobně jako itra-konazol (cave!). Nutná redukce dávky Vori u těžších jaterních lézí, u nejtěžších jaterních lézí (Child Pugh C) nejsou zkušenosti.

#### 4/ **Sporanox (i.v., p.o. susp.) (itra-konazol)**

**Mechanismus antimykotického účinku:** fungistatický.

**Spektrum účinnosti:** Širokospektré - kandidy (vč. flukonazol

rezistentních), aspergily, kryptokoky; v zásadě shodné s amfotericiny včetně asociovaných s lipidy, i s „novými“ antimykotiky s protiaspergilovým účinkem (vorikonazol, caspofungin). Velmi dobře účinný i proti blastomykóze, histoplazmóze, sporotrichóze a kokcidioidomykóze u Penicillium marneffeii. Liší se pouze u vzácných hub - neúčinný u Fusarií (viz vorikonazol) parazitů (Leishmania, Plasmodium – viz c-AmB, Abelcet, Amphocil), u zygomycózy (viz amfotericiny). Synergní účinek s makrofágy dosahuje až fungicidního efektu.

**Farmakokinetika:** Vysoká (99%) vazba na plazmatické bílkoviny, terapeutické koncentrace jsou ve většině tkání (včetně mozkové) a tělesných tekutinách, neproniká do likvoru, do moči, proniká do mateřského mléka. Biotransformace v játrech (izoenzymy cytochromu P-450 - CYP3A4), je zpomalena při poškození hepatocytu, je vylučován stolicí (55%) a močí (35%) jako neaktivní metabolity. Biologický poločas 15 - 35 hodin. Není eliminován hemodialýzou ani peritoneální dialýzou.

**Farmakodynamika:** Možná izolovaná hypokalémie(!), hypertriglyceridémie (9%), přechodná elevace jaterních enzymů (5%) (jaterní léze -relativní kontraindikace).

**Lékové interakce,** četné, některé velmi závažné (kontraindikace), v praxi např. cyklosporin, vincristin, statiny, antihistaminika...).

**Bezpečnostní profil:** relativně příznivý, cave interakce, měštnává ICHS.

**Dávkování:** 2x200 mg i.v. první dva dny, dále 1x 200 mg i.v. (nebo 2x200 mg orální soluče). Dávku nelze zvyšovat (nephrotoxicita vehikula).

**Klinické použití (klinické studie):** Jediná významnější srovnávací studie empirické léčby i.v. Itra vs. c-AmB (N=384, Boogaerts, 2001) prokázala statisticky nejméně stejný účinek jako c-AmB (RR 47% vs 38%), ale s lepší tolerancí (5% vs 54%). U plicní aspergilózy (Cailot 2001) v nekomparativní studii na malém souboru (N=31) byl RR 15/31=48% a stabilizace u 6/31 = 19%.

**Použití u dětí:** Nejsou k dispozici studie použití nitrožilního Itra u dětí.

**Souhrn:** Lék 2. volby v léčbě invazivních mykóz (kandidóza, aspergilóza). Kombinace s caspofunginem.

#### ad c/ **echinokandiny**

##### 5/ **Cancidas (i.v.) (caspofungin)**

**Mechanismus antimykotického účinku:** fungicidní (jako jediný !) u kandid, fungistatický u vláknitých hub.

**Mechanismus účinku:** zcela odlišný od dosavadních systémových antimykotik – inhibice syntézy buněčné stěny (inhibice syntézy b(1.3)-D-glukanu) – potenciál pro kombinace s jinými antimykotiky (+ Vori, AmB, Itra...).

**Spektrum účinnosti:** prakticky stejné (širokospektré) jak u Itra, tak u L-AmB a vorikonazolu; vedle kandid (méně však na *C. parapsilosis*) a aspergilů účinný i na *Saccharomyces cerevisiae*, cystickou formu *Pneumocystis carinii*.

Významné: nebyla zjištěna primární rezistence kandid vůči caspo (= není substrátem multiválcového transportéru (geny ERG11, MDR, CDR) /P-glykoprotein –eflux/.

**Farmakokinetika:** vysoká vazba na plazmat. bílkoviny (92%), velká molekula (1200 kD), distribuční objem 9,67 l, dobré koncentrace v tkáních, nejvyšší v plicích, slezině, akumulace játra, ledviny, GIT, neproniká do likvoru, do moči; mírně nelineární farmakokinetika (akumulace se zvyšováním dávky - vysycovací dávka - analogie s vori, itra). Biotransformace (spontánní degradace) v játrech, 2 hlavní metabolity potenciálně účinné, enzymatický systém není znám, ale nezatíží cytochrom. systém (není inhibitorem enzym. systému cytochromu P-450). Definitivní metabolity se vylučují do moči (41%), do stolice (34%). Není induktorem metabolismu CYP3A4 jiných látek (potenciál pro kombináční antimykotickou léčbu).

**Bezpečnostní profil:** je špatným substrátem enzymů cytochromu P-450 (minimum interakcí!), velmi (!) dobře tolerován (14% nezávažných nežádoucích účinků).

**Lékové interakce:** tacrolimus, mykofenolát (transplantologie) = bez omezení

cyklosporin, rifampicin (zvýší hladinu caspo o 30 %, resp. 65%, limit dávky u těžkých jaterních lézí); efavirenz, nevirapin, dexametazon, fenytoin, karbamazepin – zvýší dávku caspo na 70mg/den.

**Dávkování:** pouze i.v forma, vysycovací dávka 70 mg l .den, dále 50 mg; u jaterní léze udržovací dávky 35 mg/den. Hmotnost nad 80 kg udržovací dávka 70 mg.

**Klinické použití (klinické studie):** Ve dvojité slepé studii (Mora Duarte 2002) invazivní kandidózy Caspo (N=109) proti c-AMB (N=115) dosáhl globálně podobných výsledků (RR 73,4% vs 61,7%) a ve specifikované skupině lepších (!) (RR 80,7 vs 64,9%) = alternativa 1. volby pro invazivní kandidózu (vedle c-AMB a flukonazolu) (Walsh 2002).

Zatím lék 2. volby po selhání konvenčních antimykotik (chybí výsledky dvojité slepé empirické studie proti AmBisomu). V otevřené studii (po selhání konvenčních antimykotik) u invazivní aspergilózy (Maertens 2000) RR=45 % (N=58); ve srovnání s c-AMB (historická kontrola N=206) byl caspo významně lepší (RR 49% vs 17%).

**Použití u dětí:** dosud jen sporadické zprávy (kazuistiky).

**Souhrn:** Specifický mechanismus účinku, velmi dobrá tolerance. Indikace: alternativa 1. volby invazivní kandidózy; lék 2. volby u těžkých, život ohrožujících mykotických infekcí; synergní v kombinacích (s vori, AmB /i lipidovými/, itra) - předpoklad vysoké účinnosti u kandidóz, aspergilóz. Definitivní postavení bude možné upřesnit po dokončení dvojité slepé prospektivní srovnávací (AmBisome) studie u febrilní neutropenie.

d/ antimetabolity

## 6/ Ancotil (i.v.) (flucytosin) (5-FC)

**Mechanismus antimykotického účinku:** fungistatický.

**Spektrum účinnosti:** úzké spektrum, časné rezistence; kandidy, kryptokoky, patogeny chromomykózy (Phialophora, Cladosporium), nejistý proti aspergilům.

**Farmakokinetika:** hydrofilní; prakticky se neváže na plazmat. bílkoviny; vysoká biologická dostupnost (v účinné formě do moči /100x více než v plasmě/, i do likvoru) a široká orgánová distribuce (podobně flukonazolu). Koncentrace v plazmě pod 25 mg/l vedou k rychlé selekci rezistentních kmenů, hodnoty nad 100 mg/l jsou spojeny s nedůležitým vzestupem toxicity - doporučeno monitorovat hladiny. Není biotransformován, v účinné formě vylučován do moči. Biologický poločas 3-6 hodin, při renální insuficienci je prodloužen. Eliminace hemodialýzou, peritoneální dialýzou. Podstata synergismu kombinace s AmB, jehož výsledkem je omezení rezistence k 5-FC a současně rozšíření jeho antimykotického spektra na původně necitlivé nebo málo citlivé původce, spočívá zejména ve snazším průniku do buňky a současně i usnadnění penetrace do těch buněk, do nichž by se 5-FC kvůli chybění transportních mechanismů nedostal. Dávku c-AmB lze v kombinaci efektivně redukovat na 1/3.

**Lékové interakce:** Cytosin-arabinosid může kompetitivně inhibovat jeho efekt, allopurinol naopak snižuje jeho myelotoxicitu aniž ovlivní antimykotický účinek. Dávku flucytosinu upravit při poruše renálních funkcí, jeho toxicitu zvyšují všechny léky omezující jeho renální vylučování.

**Bezpečnostní profil:** Určité procento 5-FC je činností anaerobních střevních bakterií konvertováno na cytostatikum 5-fluorouracil a tímto mechanismem je vysvětlována příčina myelotoxicity (granulocytopenie) flucytosinu.

5-FC je dodáván v isotonicném roztoku 0,9% NaCl, takže nemocný vážící 70 kg dostane při dávce 150 mg/kg/den celkem 1000 ml fyziologického roztoku a tedy 8,4 g NaCl denně (přetížení oběhu !). Pokud je 5-FC podáván s amfotericinem B, je přirozená substituce NaCl žádoucí.

**Dávkování:** 75-150 mg/kg/den - podávat rozděleně ve 3-4 dílčích dávkách po 6-8 hodinách.

**Klinické použití:** Vyžaduje složitý proces intracelulární aktivační účinné léčivo. S tím souvisí úzké spektrum účinnosti, vázané na přítomnost příslušných enzymů v buňce mikromycety a relativně časný výskyt získané rezistence. Proto se prakticky nepoužívá v monoterapii (pouze u dětí - kandidóza moč. systému), ale zejména v kombinaci s AmB, azoly a dalšími. Před léčbou i během ní je nutné kontrolovat citlivost. V kombinacích se dávka flucytosinu nemění. Nevýhodou je myelotoxicita a krátký biologický poločas, který vyžaduje časté denní dávkování. Z těchto důvodů se dnes používá jen okrajově.

V kombinaci s AmB se osvědčuje při léčbě kandidové a kryptokokové meningitidy, kandidové oftalmity a hepatosplenické kandidózy. Synergické působení s flukonazolem lze využít zejména při útočné léčbě kryptokokové meningitidy (není však lepší než c-AMB).

**Použití u dětí:** ano.

**Souhrn:** Výborné farmakokinetické vlastnosti. Lék do kombinací léčby -fluko, itra, c-AMB, lipidové AmB (kandidóza, kryptokokóza; ± aspergilóza).

## ad 4. Přehled antimykotik v indikaci 1.a 2. volby u vybraných diagnóz

Indikace antimykotik u invazivní mykózy (nejčastějších agens):

Základní Dg	stupeň dg jistoty	Asp	Kand	lék 1. volby	léky 2. volby
akutní leukémie +	J, P	+		VORI*, c-AMB*	ABLC, ABCD, c-AMB CASPO*, ITRA*
alogení transplantace kostní dřevě	M	+		VORI, c-AMB*	ABLC, ABCD, CASPO*, ITRA*, ±5-FC*
+ jiné malignity léčené	J		+	c-AMB*, CASPO*, FLU**	ABLC, ABCD, ITRA*, VORI, ±5-FC*
vysokodávkovanou chemoterapií †	P, M		+	c-AMB*	VORI*, CASPO*, ABLC, ABCD, ITRA*
transplantace orgánů	J, P	+		VORI*, c-AMB*	ABLC, ABCD, CASPO*, ITRA*
	M	+		c-AMB*	ABLC, ABCD, CASPO*, ITRA*, VORI
	J		+	c-AMB, FLU**	CASPO*, ABLC, ABCD, ITRA*, VORI
	P, M		+	c-AMB*	CASPO*, ABLC, ABCD, ITRA*, VORI*
HIV	J, P	+	+	VORI*	ABLC, ABCD, CASPO*, ITRA*
	M			c-AMB*	
Leishmaniáza	J			ABCD, ABLC	

**Asp:** aspergilóza, **Kand:** kandidóza; †: s nízkou incidencí, **J:** Dg jistá = cílená léčba, **P:** Dg. pravděpodobná= preemptivní léčba. **M:** Dg. možná = empirická léčba, ±: možné použití do kombinace

\*pokud nejsou kontraindikace (lékové interakce, orgán.toxicita...), \*\* převážně Candida albicans,

**c-AMB:** konvenční amfotericin B (Amphotericin); **VORI:** vorikonazol (Vfend), **ABCD:** Abelcet, **ABLC:** Amphocil, **CASPO:** caspofungin (Cancidas), **ITRA:** itraconazol (Sporanox), **FLU:** flukonazol (Mycamax, Diflucan), **5-FC:** flucytosin (Ancotil)

## Ad 5. Kvalifikovaný odhad počtu nemocných / rok, u nichž je možné předpokládat použití antimykotik se systémovým účinkem

hematologie cca	100-110
Dětská hematologie	25
HIV infekce	5-10
transplantace solidních orgánů	8-10
Leishmaniáza	5
jiné diagnózy splňující kritéria léčby	20
<b>Celkem</b>	<b>170</b>

ad 7. Kalkulace nákladů/rok spojených s použitím systémových antimykotik ve vybraných centrech (v cenách dle číselníku VZP platného od 1.1.2003). Výpočet vychází z doporu-

čené denní dávky x 14 resp. 21 dní a celková suma je dělena počtem dostupných antimykotik se systémovým efektem (viz výše). Takže celková částka, která vyjadřuje cenový průměr všech antimykotik, je nepřesná v tom smyslu, že některá antimykotika se budou užívat častěji (dražší? - levnější?), jiná méně často.

	Ceny x 14 dní léčby	Ceny x 21 dní léčby
dospělí (N=170) / rok	26 356 334	39 182 855
děti (N=25) /rok	1 916 221	2 858 850
<b>Celkem/ rok</b>	<b>28 272 555</b>	<b>42 041 705</b>

#### Literatura

Bogaerts M, Winston DJ, Bow EJ, et al: Intravenous and oral itraconazole versus intravenous amphotericin B deoxycholate as empirical antifungal therapy for persistent fever in neutropenic patients with cancer who are receiving broad-spectrum antibacterial therapy. *Ann Int Med* 2001, 135,6: 412-22

Caillot D, Bassaris H, McGeer, et al. Intravenous itraconazole followed by oral itraconazole in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies, chronic granulomatous disease, or AIDS. *CID*; 2001,33:

Dodds ES, Drew RH, Perfect JR. Antifungal Pharmacodynamics: Review of the Literature and Clinical Applications. *Pharmacotherapy* 2000; 20(11):1335-1355

Haber J: Mezinárodní konsensus k definici invazivních mykotických infekcí u nemocných s maligním onemocněním a po transplantaci hematopoetických buněk. *Transfuz.Hemat.dnes*, 2002,2:72-76

Herbrecht et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *NEJM* 2002; 347: 408-415

Johansen HK; Gotzsche PC. Amphotericin B lipid soluble formulations vs amphotericin B in cancer patients with neutropenia (Cochrane review). *Cochrane Database Syst Rev* 2000;36(3):CD000969

Lister J. Amphotericin B lipid complex (ABLC) in the treatment of invasive mycoses: The North American experience. *Eur. J. Haematol*, 1996, 56 (Suplement): 18-23

Kontoyiannis, 2001

Maertens 2000

Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *NEJM* 2002;347:2020-9.

Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD et al. Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases* 2000;30:662-678

Stone EA, Fung HB, Kirschenbaum HL. Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin Ther*. 2002; 24(3):351-77

Walsh TJ (a), Lutsar I, Driscoll T et al. Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2002 21(3):240-8

Walsh TJ (b), Pappas P, Winston DJ et al. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever. *NEJM*, 2002; 24;346(4):225-34

Walsh TJ(c). Echinocandins an advance in the primary treatment of invasive candidiasis. *NEJM* 2002, 347, 5:2001

## knihy

### CLINICAL TRIALS IN CANCER: PRINCIPLES AND PRACTICE

GIRLING, A. J., PARMAR, M. K. B., STENNING, S. P., STEPHENS, R. J., STEWART, L. A.

OXFORD UNIVERSITY PRESS, OXFORD 2003

367 str., 65 obr., 30 tab., ISBN 0-19-262959-X, cena 49,95 GB

Cílem autorů při psaní této knihy bylo poskytnout týmům lékařů a dalších odborníků praktickou a přehlednou příručku jak provádět klinické zkoušky nových léčebných metod u nemocných se zhoubnými nádory počínaje záměrem a konče publikovanou zprávou o výsledcích. Výklad je zaměřen na plánování, realizaci a interpretaci fáze III a rovněž na randomizovanou fázi II trialů. Jen krátce jsou zmiňovány studie týkající se fáze I. Počínaje 3. kapitolou je dále obsah jednotlivých statí blíže charakterizován.

V kap. 3 je podán přehled obecného procesu, kterým jsou nové způsoby léčby posuzovány; jsou zmíněny faktory, jež mohou v každém stadiu určovat, zdali je zamýšlený klinický trial opodstatněný či nikoliv. Základním kamenem dobrého projektu trialu je randomizace (4. kap.). Pravděpodobně nejdůležitějším rozhodnutím při plánování randomizovaného trialu je volba velikosti výběrového souboru. V tomto směru je nutné žádat o radu zkušební statistika, který rovněž provede předpoklady, za nichž byla studie plánována a zda studie je dostatečně robustní ke změnám v těchto předpokladech (5. kap.). Klíčem k úspěšnému hodnocení kvality života (QL), důležité složky trialu, je definovat předem QL hypotézu, jež pomůže identifikovat vhodný dotazník, stanovit dobu jeho použití a způsoby jeho analýzy. Je důležité mít na paměti, že pacienti potřebují znát dopad léčby na jejich QL – k tomu musí ovšem obdržet spolehlivé informace (6. kap.).

V 7. kap. se vypočítávají postupy, jež musí být realizovány, aby trial byl zahájen: zajištění finanční podpory, etický souhlas, vytištění pro-

tokolů a dalších dokumentů, stanovení spolupracujících ústavů a informování obhájců pacientů. Úspěšný a etický průběh trialu vyžaduje monitorování dat a kontrolu vstupních dat, dodržování zásad dobré klinické praxe, zajištění dobré spolupráce mezi koordinátory a spolupracujícími institucemi, ochranu osobních dat, opatření k prevenci falzifikace výsledků aj. (8. kap.). Statistické metody analýzy výsledků trialu jsou předmětem 9. kap. V 10. kap. se doporučuje, aby při psaní zprávy o trialu se postupovalo podle směrnic CONSORT, jež jsou též na webové stránce <http://www.consort-statement.org>. Předposlední kapitola se zabývá systematickými přehledy a různými typy meta analýzy. Knihu uzavírá pojednání o výhodách zavedeného centra pro klinické trial, které usnadňuje nejen plánování, vedení a publikování jednotlivých trialů, ale též strategické plánování dlouhodobých výzkumných programů na národní i mezinárodní úrovni.

V předmluvě autoři zdůvodňují, proč se kniha týká hlavně klinických trialů u pacientů s maligním onemocněním. Přehlednost textu je podpořena umístěním důležitých částí do rámečků s černobíle odlišným podkladem a v některých částech i pěknými schématy a grafy, příklady formulářů aj. Jedná se o prakticky zaměřenou příručku, v níž zájemce získá podrobné informace jak při klinických zkouškách postupovat krok za krokem. Výhodné je, že se pro její studium nepředpokládají u čtenáře žádné specializované znalosti. Rovněž je třeba vyzdvihnout mimořádnou stejnorodost textu napsaného podle tvzení v předmluvě ve spolupráci všech autorů. Je užitečná jak pro odborníky – členy pracovních týmů zabývajících se klinickým výzkumem tak i pro lékaře, kteří v odborné literatuře hledají především výsledky tohoto výzkumu; znalost této knihy jim bezpochyby usnadní studium publikací a jejich kritické hodnocení. Má význam také pro sponzory trialů, členy dohlížejících komisí, specialisty, od nichž se vyžadují nezávislé posudky a pro mnohé další odborníky angažované ve všech aspektech klinického výzkumu.

V. H.

## VŮDČÍ GEN P53: ZPRÁVA Z KONFERENCE

### THE LEADING GENE P53: REPORT ON THE CONFERENCE

ŠMARDOVÁ J.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO

Ve dnech 30. 6 až 3. 7. 2003 se konala v Lyonu ve Francii mezinárodní konference nazvaná „**Functional consequences of TP53 mutations: Characterization of common and rare p53 mutants and relevance to human cancer**“. Konferenci organizovaly společně francouzská IARC (*International Agency for Research on Cancer*) a americký NIEMS (*National Institute of Environmental Health Sciences*). Lyon nebyl hostitelským městem náhodou. Právě zde IARC spravuje pravděpodobně největší databázi mutací nádorového supresoru p53 (<http://www.iarc.fr/p53>). Lidé zabývající se vedením databáze a také analýzou v ní ukládaných dat (*Pierre Hainaut, Magali Olivier*) vyvolali diskusi o budoucí podobě a využití této databáze. Nádorový supresor p53 byl objeven v roce 1979 a od té doby se těší intenzivnímu zájmu badatelů a je také spojován s velkými nadějami klinických onkologů. A právě neuvěřitelný rozpor mezi stále bohatšími a detailnějšími znalostmi o struktuře a funkci tohoto velkého proteinu a především jeho klíčové roli v kancerogenezi na straně jedné a zatím minimálního praktického dopadu těchto znalostí v klinické praxi na straně druhé jsou již dlouho zdrojem určitého napětí mezi badateli a praktickými onkology. Konference v Lyonu shrnula některé zajímavé poznatky o p53, z nichž mnohé jasně ukazují, v čem je příčina tohoto rozporu.

Na úvod stručně: protein p53 je nádorovým supresorem. Zajišťuje adekvátní odpověď buňky na buněčný stres a zamezuje dělení, případně přežití poškozených buněk. Vyrazení této funkce představuje významný krok v progresi kancerogeneze. p53 je transkripční faktor, který po indukci některými buněčnými stresy (např. hypoxie, nedostatek nukleotidů, poškození mitotického vřeténka, aktivace onkogenů a především poškození DNA) spouští transkripci svých cílových genů, a to prostřednictvím vazby na specifické sekvence DNA v jejich promotorech. Cílových genů bylo popsáno více než 60, včetně takových, jejichž produkty navozují blok buněčného cyklu (p21, 14-3-3σ, GADD45,...), apoptózu (Bax, Apaf-1, CD95/Fas/APO1, PIGs,...), opravy DNA (p48, R2) a další procesy (TSP1, cyklin G,...). Vedle vysokého počtu proteinů, s nimiž p53 interaguje formou meziproteinových interakcí, právě obrovský počet genů, jejichž expresi protein p53 reguluje, a množství buněčných procesů, které tak p53 může ovlivnit, vynesl genu p53 označení „a master gene“ (*Michael Resnick*), tedy gen, který vládne ostatním a rozhoduje o nich. Můžeme mu pro jednoduchost říkat česky ne zcela přesně **vůdčí gen**.

Mutace p53 jsou častou událostí při vývoji řady různých nádorů. Na rozdíl od některých jiných nádorových supresorů, které jsou v buňkách inaktivovány většinou formou zkrácení výsledného proteinu, který potom postrádá některé své strukturální složky a tím zcela svou funkci (např. APC, BRCA1,...), gen p53 je postížen zdaleka nejčastěji bodovými mutacemi, tedy záměnami jednoho nukleotidu za jiný. K dnešnímu dni bylo v databázi IARC zaznamenáno celkem 18 500 mutací p53, z toho více než 1 300 různých bodových („*missense*“) mutací, což při délce kódující sekvence odpovídající výsledným 393 aminokyselinám v proteinu p53 je počet mimořádně

Samotný počet odlišných mutací by nebyl až tak zajímavý, nebýt toho, že všechny mutace p53 nejsou stejné ve svých důsledcích pro funkci p53.

Opakovanou analýzou mutací p53 v různých typech nádorů byla postupně sestavována mutační spektra p53, byly nalézány „hot spot“ oblasti, a tak se tvořila představa o povaze mutací. Mutace postihují ty části molekuly p53, které buď bezprostředně ovlivňují kontakt proteinu p53 s DNA nebo mění konformaci molekuly p53 takovým způsobem, který vazbu na DNA znemožní. Tato historicky původní představa mutací p53 je tedy spojena s úplnou ztrátou schopnosti p53 vázat se na cílové sekvence a tedy se ztrátou schopnosti regulovat transkripci cílových genů – tzv. mutace „**loss-of-function**“. Jedním z důsledků této ztráty funkce je neschopnost transaktivovat gen *mdm2*, který představuje zpětnovazební regulační smyčku p53 a zprostředkovává jeho degradaci. Neschopnost mutantního p53 aktivovat expresi *mdm2* má za následek akumulaci p53 v buňce.

Během několika minulých let se ale hromadily informace o tom, že to zřejmě s povahou mutací p53 není tak jednoduché nebo jednoznačné. Jedním z cílů konference v Lyonu bylo tyto informace shromáždit, vyhodnotit a zohlednit je v plánech na další rozvoj databáze mutací p53. Pokusím se teď krátce charakterizovat některé typy mutací p53, které byly v Lyonu diskutovány a které se odlišují od zmíněných „klasických“ mutací spojených s úplnou ztrátou funkce p53.

Jestliže klasická představa mutace p53 je spojena se ztrátou transaktivace schopnosti postiženého proteinu, potom můžeme na prvním místě mezi „neklasickými“ mutacemi jmenovat tzv. **superaktivní** mutace. To jsou mutace, které ve srovnání se standardním proteinem zvyšují specifickou i nespecifickou vazbu p53 na DNA a tím jeho schopnost transaktivovat cílové geny (*Carol Prives*).

Výraznou skupinu mutant p53 představují tzv. mutace „**gain-of-function**“, tj. takové, které struktuře proteinu p53 přinášejí nějakou novou funkci (*Moshe Oren, Varda Rotter, Giovanni Blandino, Kent Soe, Guillermina Lozano, Arnold J. Levine*). Zdá se, že pro „gain-of-function“ je nezbytná N-koncová část proteinu p53 (*Moshe Oren*) nebo je zprostředkována DNA vazebnou doménou. Ta není u mutantů schopná vázat DNA a zůstává tak „volná“ pro jiné funkce. Všichni se shodli na tom, že „gain-of-function“ nesouvisí s transaktivací, možná spíše s represí transkripce některých genů (např. CD95/Fas), ale obecně je přijímána představa, že „gain-of-function“ je realizována mechanismem protein-proteinových interakcí. V těchto interakcích mohou být partnerem p53 další členové téže rodiny – p63, p73 (*Moshe Oren, Giovanni Blandino, Arnold J. Levine*) nebo proteiny se zcela odlišnou funkcí jako např. topoizomeráza I (*Kent Soe*).

Další stále se rozrůstající skupinou mutací p53 jsou mutace **podmínečné**, především **teplotně senzitivní** (*ts*), případně **chladově senzitivní** (*cs*). Původně byly tyto vzácně detekované mutace považovány za spíše zajímavé, případně experimentálně využitelné výjimky mezi mutacemi p53. Se stále častějším používáním funkčních testů na místo molekulárních analýz struktury DNA při vyšetřování statutu p53 ale podíl těchto mutací neustále narůstá. Status teplotní senzitivity je sám o sobě zajímavý, protože poukazuje na skutečnost, že všechny mutace nejsou stejné. Zatímco některé rozvrací strukturu proteinu p53 zcela a nevratně, znemožňují bezvýhradně jeho transaktivaci funkci a jsou tedy **zcela inaktivující**, jiné mutace sice rozvrací standardní strukturu p53, ale ponechávají ji poněkud flexibilní a za určitých podmínek (např. změnou

teploty) umožňují její návrat do funkční podoby, jsou tedy jen **částečně inaktivující**. Mnohem podstatnější okolností teplotně senzitivních mutací p53 je ale fakt, že jsou často doprovázeny dalším fenotypovým znakem naplňujícím podstatu částečně inaktivace. Zatímco standardní protein umí rozpoznat a následně fungovat na všech svých popsaných responzivních elementech (i když s odlišnou afinitou), *ts* mutanty jsou často **diskriminující**, to znamená, že jsou více nebo méně funkční na některých responzivních elementech p53, zatímco jsou zcela nefunkční na jiných (*Michael Resnick*). A samozřejmě fenotyp buňky, která nese zcela inaktivující mutaci p53 může být významně odlišný od fenotypu buňky, ve které jsou některé funkce p53 zachovány.

Další kategorií mutací p53 jsou mutace **supresorové**. Ty po svém vnesení do již mutovaného genu p53 mohou „vyrušit“ účinek první mutace a navrátit tak molekulu p53 do částečně nebo zcela funkčního stavu (*Rainer K. Brachmann, Penka Nikolova*). Ze zmíněných typů mutací p53 jsou právě supresorové možná na první pohled nejméně klinicky relevantní. Jistě se s nimi při analýze p53 v nádorech nesetkáváme často a také cílené vnášení dalších mutací do poškozeného genu p53 nebude hlavní formou terapie ani v budoucnu. Jejich studium nás ale přibližuje pochopení na jedné straně podstaty fungování a struktury mutací p53 a na straně druhé odhalení možných mechanismů jejich reaktive.

**Reaktivace** mutantů p53, to bylo další velké téma, které se prolínalo celou konferencí v Lyonu. Hned několik autorů přednášelo své výsledky dokumentující reaktivace některých mutantů p53, a to pomocí CDB3 (*Assaf Friedler, Galina Selivanova*), pomocí nízkomolekulárních látek PRIMA-1 a RITA (*Klas Wiman, Galina Selivanova*), sloučenin „98“ (*Karen S. Vousden*) nebo dokonce prostřednictvím tzv. adaptorového proteinu (vytvářením chiméry mutantní p53 s dalším proteinem – p73) (*Matthias Dobbstein*). Klíčové a opakující se bylo zjištění všech autorů, kteří se o reaktivaci mutantního proteinu p53 pokoušejí, že rozdíly mezi mutantami p53 jsou velké a žádná forma reaktive není účinná beze zbytku na všechny kategorie mutantů, ale vždy jen na určitý okruh mutantních forem p53.

Mezi další náměty, kterým se na konferenci věnovala pozornost, patřila např. struktura proteinu p53, což má těsnou návaznost na pochopení funkce a také dysfunkce a možné reaktive mutantních p53 (*Thanos D. Halazonetis, Assaf Friedler, Penka Nikolova*), posttranslační úpravy p53 (*Carl W. Anderson*), vazba p53 na DNA (*Wolfgang Deppert, Ella Kim,*

*Richard Iggo*), polymorfismus p53 (*Anne-Lise Borresen-Dale, Kanaga Sabapathy*) a polymorfismus MDM2 (*Arnold J. Levine*) a samozřejmě také novinky týkající se dalších molekul bezprostředně signalizujících k p53 (*Karen S. Vousden, Klas Wiman, Kent Soe, Anne-Lise Borresen-Dale*). Hlavním smyslem konference ale bylo na základě současných poznatků vytýčit nové směry a tendence ve vývoji databáze mutantů p53. A z několikadenní debaty jasně vyplynulo: mutace p53 jsou velmi rozmanité a mohou velmi odlišným způsobem ovlivnit vlastnosti výsledného proteinu. Proto se zdá, že bude nezbytné do budoucna vytvářet „funkční“ databázi, tj. sbírat data o přesnějších funkčních dopadech jednotlivých mutací na výsledný protein p53. Do budoucna bude také nutné přesně popsat a pochopit, jak adekvátně jednotlivé funkční testy (v kvasinkách, v savčích buňkách,..) vystihují skutečnou biologicky a klinicky relevantní povahu jednotlivých mutantů (*Alberto Inga*). Jestliže byl gen p53 nazván vůdčím pro velký počet různých genů, jejichž expresi ovlivňuje, a pro velký počet různých proteinů, s nimiž interaguje, tak byl také nazván **vůdčím genem rozmanitosti** („a master gene of diversity“) pro obrovskou rozmanitost mutantů s různými funkčními vlastnostmi, které mohou ze standardní molekuly p53 vznikat v důsledku záměn jednotlivých aminokyselin za jiné.

Na závěr bych si dovolila vypůjčit model *Michaela Resnicka*, kterým se pokusil vystihnout současný pohled na funkci standardního p53 a jeho mutantních forem. Svůj model označil jako „**p(piano)53**“. Standardní p53 je protein, který transaktivuje celou řadu genů, na pomyslném pianu tyto geny představují jednotlivé klávesy a p53 je schopen hrát určitý, harmonický akord. Naše původní představa o mutantech p53 byla taková, že ztrácejí svou funkci a tím svou schopnost hrát a výsledkem je ticho. Současná představa je taková, že různí mutanty jsou ve své schopnosti hrát na piano poškození do různé míry a výsledkem jejich hry je spíše než ticho změněný, poškozený, neharmonický akord. To má samozřejmě odlišné dopady na buňku a také to vyžaduje odlišné způsoby nápravy, reaktive. A právě v této rozmanitosti je určité vysvětlení toho, proč zjednodušené přístupy k pochopení mutací p53 a vyvození jednoduchých klinických souvislostí zatím selhávalo. Uvidíme, co přinese tento novější pohled na p53 a na „hudbu“, kterou hrají jednotlivé varianty tohoto úžasného proteinu.

*Účast na konferenci i tato práce byly podpořeny grantem IGA MZ ČR č. MZ00020980501*

## ZÁPIS Z JEDNÁNÍ VÝBORU ČESKÉ ONKOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI ČLS JEP KONANÉ DNE 2. 9. 2003 NA INTERNÍ HEMATOONKOLOGICKÉ KLINICE FN V BRNĚ

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

*Hosté:* dr. Matějka, dr. Skála

*Omluveni:* Aschermannová

Výborovou schůzi zahájil a přítomné v Brně přivítal prof. Vorlíček, předseda společnosti.

### *Projednávané body:*

- domluva s LPR a pozvání prof. Dienstbiera na listopadový výbor
- otázka členství ČOS v UICC – zatím není jasno o přínosu, ČOS pro rok 2003 příspěvek 2200 USD do UICC platit nebude (hlasováno: jednomyslně)
- doc. Abrahámová bude na doporučení výboru ČOS odborníkem pro posuzování stížností ve Středočeském kraji – žádost hejtmána
- doc. Eckschlager bude reprezentovat ČOS v transplantační komisi Hematologické společnosti
- výbor ČOS potvrdil stanovisko k enzymové terapii, které bylo uveřejněno ve Zdravotnických novinách, na repliku firmy dále nebude reagováno – nejde o skutečnosti, které by stanovisko výboru ČOS jakkoli měnily
- výbor dodatečně projednal letošní rozdělení prostředků z Běhu T. Foxe, které bylo provedeno ještě minulým výborem, soutěž pro příští rok připravena standardním způsobem, přihlášky již předány posuzovateli
- výbor ČOS schválil letošní členský poplatek 255,- USD za Sekci onkochirurgie pro WFSOS (World Federation of Surgical Oncology Societies)
- jednáno o koncepci prediktivní onkologie na základě písemně zpracovaného návrhu dr. Hajdúcha a prof. Žaloudíka, se záměrem výbor souhlasí, stejně tak i s návrhem na vznik Sekce diagnostické a prediktivní onkologie – uvítá, když se organizace sekce ujmou iniciátoři a proces vyústí ve standardní volbu předsedy sekce včetně programu
- jednáno o centrech pro léčbu c-kit pozitivních stromálních sarkomů preparátem Glivec, jde o raritní nádor (cca 30/rok v ČR) s nákladnou cílelou léčbou přísně vázanou na diagnostiku prediktoru efektu, po diskuzi řady aspektů centralizace dohodnuto ponechat dosavadní dvě centra (FN Motol, MOÚ Brno) fungovat do auditu ČOS v lednu 2004, poté bude jednáno o kritériích výběru center v delší perspektivě – zdůrazněna potřebná návaznost na diagnostická a chirurgická pracoviště, které se problematikou zabývají
- jednáno o centralizaci další cílené léčby preparátem trastuzumab (Herceptin), dosavadní stav pověření několika center je revokován návrhem na jednání o dalších pracovištích, vykazujících dostatečné celkové počty léčených nemocných s karcinomem prsu (ve stovkách ročně), též s perspektivou trastuzumabu zvýšení počtu indikovaných v pokročilých stádiích a do budoucna také v adjuvanci. Doporučujeme tedy zachovat stávající počet center s tím, že budeme usilovat o navýšení počtu léčených pacientek zvláště v centrech, kde současné limity jsou nedostatečné. V případě pražských pracovišť je nutné při jednání s pojišťovnou domluvit respektování existence Komplexního onkologického centra (tím samozřejmě i pracoviště na Bulovce) a adekvátního navýšení limitu pro léčbu.
- výbor podpořil námět dr. Malinové (RTO Motol) k hrazení některých úkonů spojených se zachováním fertility v průběhu onkologické léčby (kryoprezervace spermatu, specifická ochrana před zářením, LHRH agonisté ve specifických indikacích)
- bylo upozorněno na narůstající problémy se SÚKL při schvalování účastí na studiích v EORTC a jinde, navrženo vyčkat do nastolení nových pravidel harmonizovaných v rámci EU od roku 2004, doporučeno všem, kteří mají se studii problémy, aby překážky připomínkovali přímo SÚKL
- výbor vyslechl informaci o kontaktu s WHO programem na téma konzultací „cancer control activities in East European countries“, dotazník WHO byl vyplněn a cestou odbor zdrav. péče MZ odeslán centrále WHO, zdůrazněno postavení ČOS i příznivý stav organizace onkologie v ČR včetně NOR, dále zařizuje kontakty dr. Řízková z MZ

- projednán námět LPR k orientaci na prevenci karcinomu hrdla dleložního, komentováno doc. Robem – existují značné rezervy a výbor ČOS bude nesporně podporovat programy zaměřené na prevenci C53
- výbor vyslechl informaci o dlouhodobém projektu HTA (Health Technology Assessment) v onkologii, výbor podporuje program jako dlouhodobý proces, jeho členové byli vyzváni aby se podíleli na iniciální publikaci formou souboru článků na téma HTA jako suplementa Klinické onkologie
- výbor projednal aktuální stav NOR, včetně příležitostí, které přináší pro hodnocení racionality a kvality onkologické péče, pověřil předsedu ČOS, aby odeslal MZ ČR a ÚZIS dopis v němž se čeští onkologové hlásí k NOR jako jedinečné zdrojové databázi onkologických dat a vyslovují zájem na jeho lepším výtěžování, v tomto kontextu navrhnou vznik Rady NOR pro analýzu a interpretaci onkologických dat, kam bude výbor ČOS delegovat své experty a která navrhne řadu opatření jak k modernizaci registrace tak i práci s daty jak je zpřístupňuje ÚZIS a projekt SVOD
- výbor vyslechl sdělení MUDr. Bohumila Skály, PhD., zástupce výboru Společnosti praktických lékařů, o zájmu na součinnosti s ČOS v onkologické prevenci, léčbě a dispenzarizaci, především jde o vytvoření společné metodiky pro vedení cílených preventivních prohlídek i interpretaci paralelně vznikajících vyšetření v rámci onkologické prevence, – uloženo zpracovat návrh dohody obou společností na společném postupu v organizačním zajištění časné diagnostiky nádorů a racionální distribuci onkologicky nemocných, v podstatě jde o strukturu sítě v zajištění onkologické péče v regionech
- diskutováno o stavu příprav DRG s ohledem na onkologii, prvním krokem bude dopis výboru ČOS zdravotním pojišťovnám a MZ ČR, v němž požadujeme registraci klinického stadia onemocnění jako součásti onkologické diagnózy a registrace všech procedur ve vztahu k diagnóze, výbor ČOS bude problematiku dále velmi intenzivně sledovat a zjišťovat možnosti odborných vstupů do tvorby systému DRG, který má v budoucnu v hrazení zdravotní péče převážít. Současná představa o DRG nerespektuje specifika oboru klinické onkologie
- zpráva dr. Fínka, pokladníka ČOS, o stavu účtu ČOS, který byl v srpnu 2003 celkem 347 788,90 Kč, za prvních 8 měsíců roku 2003 činily příjmy za členské příspěvky 97 388 Kč, 300 000 Kč činil dar LPR, byl přednesen a schválen návrh rozpočtu na rok 2004, odhadovaný v příjmové části na 400 000 Kč
- výbor ČOS odsouhlasil poplatek za schválené užití loga ČOS pro komerční účely na minimálně 50 000 Kč
- v dohodovacím řízení nových kódů dosud nebyla projednána položka aplikace léku do portu, což patří k základním výkonům v onkologii, urgenci pověřena dr. Příbylová
- Doc. Abrahámová informovala o konání tradičních mammologických a urologických symposií 20.–21. 11. 2003, výbor ČOS přebírá záštitu nad akcí
- Dr. Stáhalová nabídla své pracoviště jako místo pro jednání lednového výboru ČOS – souhlas
- Dr. Stáhalovou připomínkováno zohlednění centrálního ředění cytotatik v platbách, zainteresovaná pracoviště musejí nejprve dohodnout koordinovaný postup
- na základě připomínky doc. Konopásky si všichni členové výboru připraví své návrhy pro dokončení harmonizace kompetencí klinických a radiačních onkologů (internistů a radioterapeutů)

*Firmou Janssen Cilag byl výboru prezentován dlouhodobý projekt AMOS, který má usnadnit lékařům orientaci v problematice léčby chronické bolesti, má sekce nádorové a nenádorové bolesti, jde o měsíční interaktivní semináře vedené specialisty v 6 regionech spojené s řešením konkrétních kasuistik – pro zajištění interaktivity je maximální počet v jednom semináři 15 účastníků. Výbor ČOS pokládá projekt za užitečný a podporuje jej. V diskusi upozorněno na potřebu těchto školení také mezi praktickými lékaři. Výbor jednomyslně souhlasí s použitím loga ČOS ČLS JEP na materiál k tomuto projektu. Kontakt: MVDr. Petr Matějka pmatjeka@jnjcz.jnj.com.*

- Další výborové schůze v roce 2003 se konají:  
9. 10. 2003 v 15,30 hodin v Českém Krumlově u příležitosti JOD  
4. 11. 2003 v 10 hodin na Pleši (dr. Aschermannová)  
2. 12. 2003 v 10 hodin v Plzni (dr. Fínek)

*Zapsal:* Jan Žaloudík, vědecký sekretář ČOS  
*Schválil:* Jiří Vorlíček, předseda ČOS