

**Zpráva o řešení výzkumného záměru
Masarykova onkologického ústavu v Brně
s názvem
**Funkční diagnostika zhoubných nádorů
v roce 2006****

Struktura výzkumného záměru Masarykova onkologického ústavu s názvem Funkční diagnostika zhoubných nádorů ve zkratce FUNDIN zůstala zachována během celého roku 2006 včetně stanovených řešitelů nebo koordinátorů odpovědných za každý dílčí program i projekt.

Základní kostru komplexního záměru tvořily nadále 3 programy :

- a) program technologické podpory (PTP) pro vývoj a validaci nových diagnostických metodik a technologií,
- b) program informační podpory (PIP) zaměřený na archivaci a analýzu dat a digitalizaci obrazu
- c) program aplikovaných studií (PAS) sledující aplikace inovací a jejich výsledky u jednotlivých diagnostických skupin v klinické praxi

Do každého z programů je zařazena řada projektů jako samostatně fungujících nákladových středisek (NS) s vlastními dílčími úkoly. Jejich celkový počet přesahuje padesátku a vyvíjí se průběžně podle stavu řešení jednotlivých projektů a úkolů.

Tato robustní organizační struktura práce na záměru umožňuje jak jeho dlouhodobou stabilitu, tak ovšem i kritickou verifikaci nástrojů a cílů v konfrontaci potřebami praktické onkologie. Dvakrát ročně proběhla kontrola plnění úkolů před Vědeckou radou MOÚ a průběžně byly dílčí projekty diskutovány na seminářích a pracovních schůzkách zainteresovaných skupin.

Výzkumný záměr se ovšem , podobně jako všechny ostatní, potýkal v roce 2006 s nepříznivými zevními vlivy a nejistotami. Nelze velmi kriticky nekomentovat přístup centrální instituce, která chodí výzkumných záměrů řídí. Začátkem ledna 2006 bylo z centra písemně oznámeno, že zprávy po prvním roce řešení, tedy za rok 2005, nebudou požadovány a neproběhne ani zvláštní hodnocení výsledků. Zprávu jsme z důvodu vlastních potřeb i nedůvěry v oznámené stejně ve standardní podobě v lednu 2005 zpracovali a vystavili také na webových stránkách ústavu. V březnu

2006 vydalo centrum opačnou instrukci o urychlené potřebě zpracování zprávy do týdne a doplnění přehledem publikací za posledních léta, byť třeba ani nesouvisely se zadáním projektu. Mezitím se zcela lišily informace od kompetentních úředníků centra , a o od možnosti úplného zrušení výzkumných záměrů, přes podstatnou redukci financování určenou aktuálními možnostmi resortu až po financování expost zdůvodňované hodnocením dosažených výsledků. Tato práce v nejistotě a zahrávání s důvěrou a tvůrčím potenciálem výzkumných skupin byla ukončena až počátkem srpna 2006, kdy jsme nakonec obdrželi méně než polovinu plánovaných prostředků. Nutno konstatovat, že jak významně zpožděný termín dotace tak i rozsah její redukce jsou v rozporu se zákonem, který byl k práci na výzkumných záměrech vydán. Tento komentář má pouze charakterizovat podmínky, v nichž práce na výzkumném záměru v roce 2006 probíhala. Nesporně bylo za popsané nejistoty obtížné udržet pohromadě výzkumné týmy, zvláště v experimentálních laboratořích, a jejich rozpadu zabránila pouze schopnost Masarykova onkologického ústavu jako klinického diagnosticko-léčebného zařízení tyto výzkumné činnosti po dobu sedmi měsíců roku zálohovat.

Přestože nikde mimo výzkum snad nelze očekávat, že za méně než polovinu prostředků oproti původní smlouvě bude vykázána více než polovina činností výsledků, lze říci, že se to v Masarykově onkologickém ústavu vydatně podařilo. Prakticky žádný z dílčích projektů jsme nezrušili z důvodu redukováných prostředků, pouze jsme místy omezili objemy vyšetření, investice a odměny tak, aby celková struktura a cíle záměru zůstaly nenarušeny, dojde-li v příštích letech k normální situaci respektování smluv a zákonných norem.

Masarykův onkologický ústav vychází ve svých výzkumných a inovačních cílech kromě proměnlivých pravidel centra také z profesní odpovědnosti za stav oboru, který reprezentuje v ucelené podobě, a především z dlouhodobých cílů v boji se zhoubnými nádory, které časově i obsahově značně přesahují organizační a ideové turbulence ve státních institucích.

Prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.
ředitel Masarykova onkologického ústavu

Prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.
náměstek pro rozvoj, vědu a výuku

V Brně 5.1.2007

I. Program technologické podpory

Nové metody a nové geny v diagnostice hereditárních nádorových syndromů

(projekt NS 5711)

Řešitel : MUDr. L.Foretová, PhD

1) Charakterizace velkých genomických delecí v BRCA1 genu detekovaných metodou MLPA

V roce 2006 bylo metodou MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) detekováno 6 různých velkých intragenových delecí v BRCA1 genu u vysoce rizikových pacientů s hereditární formou nádoru prsu a ovaria. Tyto delece nelze zachytit screeningovými metodami založenými na PCR reakci.

V roce 2006 byly všechny detekované delece potvrzeny na úrovni genomické DNA metodou Long Range PCR (Expand Long Template PCR systém – Roche) a byly charakterizovány místa zlomu sekvenováním – viz tabulka.

Deletované exony	Potvrzení long range PCR	Charakterizace Ref.Seq.L78833	Efekt na úrovni proteinu	Fenotyp	Počet rodin
Promotor, 1-2	Ano	Del. Cca 37-39 kb	Bez transkripce	HBOC	1
5-14	Ano	g.21716_53298 del31583	Ztráta minimálně 75% proteinu	4 x HBC 3xHBOC	7
Část 11+12	Ano	g.34845_41405 del6561	Ztráta minimálně 2/3 sekvence	HOC	1+1
18-19	Ano	g.63651_65590 del1940	“frame shift” Stop 1693	HBC	1
20	Ano	g.68764_75792 del7029	“in frame” delece p.1732_1759del28	HBC	1
21-22	Ano	g.77097_80906 del3810ins268	“in frame” delece p.1760_1802del43	HBC	2

Všechny delece zachycené v České republice jsou popsány jako zcela nové a zatím nebyly popsány v jiné populaci. Výsledky byly prezentovány na mezinárodním kongresu ESHG 2006 v Amsterdamu i na kongresech v České republice (BOD 2006, 10. celostátní konference DNA diagnostiky). Výsledky byly také publikovány.

Celkem bylo do listopadu 2006 analyzováno 331 vysoce rizikových pacientů na přítomnost intragenového přeskupení v BRCA1 genu a 172 na přítomnost intragenového přeskupení v BRCA2 genu. Z toho u 15 pacientů byla zachycena velká delece v BRCA1 genu. Nově byla zachycena delece exonu 8 v BRCA1 genu, kde v současné době probíhá charakterizace bodů zlomu. V genu BRCA2 zatím nebylo detekováno žádné intragenového přeskupení.

V případě charakterizovaných delecí v BRCA1 genu byl zaveden jednoduchý screeningový PCR test pro testování příbuzných postižených pacientů. Do listopadu 2006 bylo provedeno prediktivní vyšetření u 22 zdravých příbuzných v postižených rodinách, kde 10 jedinců bylo potvrzeno jako nosiči familiární delece v BRCA1 genu.

2) Rozšíření spektra vyšetření v laboratoři OEGN

Gen CHEK2

Produkt genu CHEK2 (alternativně CHK2, homolog Cds1 a RAD53) je významnou protein kinázou, která se podílí na regulaci buněčného cyklu. Při poškození DNA je CHEK2 protein kináza významná pro aktivaci celé řady proteinů (mimo jiné také p53, BRCA1), které se podílejí na řízení DNA reparace a apoptózy. V současné době jsou některé mutace v CHEK2 genu popisovány jako nízko penetrantní alely zvyšující cca 2-4 násobně riziko vzniku nádoru prsu. Některé studie popisují zvýšenou predispozici ke vzniku nádoru prostaty, plic, ovaria, mozkových nádorů a osteosarkomů.

V současné době je prováděn screening na přítomnost 2 mutací v CHEK2 genu u vysoce rizikových pacientů s nádorem prsu, u kterých nebyla detekována mutace v BRCA1 nebo BRCA2.

- 1) Delece exonu 9 a 10 v CHEK2 genu je specifická pro Českou populaci (*viz. publikace Welsche z roku 2006*), byly zachyceny 4 rodiny s delecí exonu 9 a 10 v CHEK2 genu. Celkem bylo vyšetřeno 392 rizikových jedinců PCR testem a 172 jedinců metodou MLPA.
- 2) Mutace 1100delC CHEK2 genu je nejčastější mutací popsanou v Evropské populaci. Na našem pracovišti byl zaveden screening v letošním roce, kdy

bylo vyšetřeno 172 rizikových pacientů a mutace 1100delC byla zachycena u 1 rodiny. 1100delC mutace byla potvrzena sekvenováním.

Do listopadu 2006 byly provedeny 4 prediktivní testy u příbuzných s mutací v CHEK2 genu.

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom): geny MLH1; MSH2 a MSH6

Je nejčastější formou dědičné formy kolorektálního karcinomu. V roce 2006 byla optimalizovány podmínky PCR amplifikace pro vyšetření kompletní kódující sekvence genů MLH1; MSH2 a MSH6.

V letošním roce byly prováděny pouze prediktivní testy u HNPCC rodin sedmi vyšetřeními. V roce 2007 bude prováděno kompletní vyšetření kódující sekvence genů MLH1; MSH2 a MSH6 u indikovaných pacientů metodou HRMCA (High Resolution Melting Analysis) užitím přístroje Light Scanner (Idaho Technology inc.), který byl v prosinci zakoupen až z opožděně přiložených prostředků VZ.

Hereditární melanom – gen CDKN2A

Gen CDKN2A (lokalizace 9p21) je nádorový supresor, účastní se negativní regulace proliferace. Produktem genu je 9 různých proteinů, převážně tkáňově specifických.

Odhady rizika pro nosiče patogenní mutace v CDKN2A genu:

nádor	Popul. riziko	Nosič mutace v CDKN2A genu
melanom	<1% do 50 let cca 1% do 80 let	50% do věku 50 let 76% do věku 80 let 15% mnohočetné ložiska primárního melanomu
pankreas	<1% do 75 let	17% do 75 let
Jiné nádory		až 50 krát vyšší pravděpodobnost

V roce 2006 byla provedena optimalizace podmínek pro vyšetření kompletní kódující sekvence CDKN2A genu pro obě varianty p16/INK4a a p14/ARF. Vyšetření je prováděno metodou přímého sekvenování.

Do listopadu 2006 byly vyšetřeny 4 rodiny s podezřením na hereditární formu melanomu. Patogenní mutace v CDKN2A genu nebyla nalezena, pouze u jedné pacientky s diagnózou karcinomu prsu a maligního melanomu byla nalezena varianta nejasného významu: p16 / c.442G>C / p.Ala148Pro. Podle publikovaných informací by se však nemělo jednat o vysoce rizikovou alelu.

Možnost indikace vyšetření CDKN2A byla klinickým genetikům presentována na satelitním sympoziu Mezinárodního veletrhu zdravotnické techniky, rehabilitace a zdraví dne 26. října 2006 v rámci přednášek na HOSPIMedica s tématem Klinická genetika – DNA diagnostika. MOU je prvním pracovištěm v ČR, které vyšetření CDKN2A genu v indikovaných případech provádí.

Gen DSS1

Gen DSS1 se nachází v komplexu s BRCA2-RAD51 proteinem a pravděpodobně hraje významnou roli v průběhu homologní rekombinace a v reparačních procesech spřažených s rekombinací. V současné době se spekuluje, zda by ztrátové mutace v DSS1 genu mohly vést k nádorové predispozici obdobně jako mutace v BRCA2 genu. Výsledky mutační analýzy DSS1 genu zatím nebyly nikde v zahraničí publikovány.

Výzkumná studie ve spolupráci s Centrem molekulární biologie a genové terapie FN Bohunice: na spolupracujícím pracovišti pod vedením RNDr. Libora Kozáka, CSc. bylo provedeno přímé sekvenování genu DSS1 u 100 nepříbuzných pacientek diagnostikovaných s nádorem prsu a s vysoce rizikovou rodinnou anamnézou karcinomu prsu (bez anamnézy nádoru ovaria) a u 9 pacientů diagnostikovaných s nádorem prsu, u kterých nebyla v laboratoři OEGN nalezena mutace v BRCA1 nebo BRCA2 genu. Žádná mutace, která by mohla být příčinou predispozice ke vzniku nádoru prsu nebyla nalezena. Výsledky jsou v současné době připravovány k publikaci.

Publikace :

Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P, King MC. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. *JAMA*. 2006; 295(12): p.1379-88.

Foretova L, Petrakova K, Palacová M, Kalabova R, Navratilova M, Lukesova M, Vasickova P, Machackova E, Kleibl Z, Pohlreich P. Genetics and preventive services for hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* 2006 4(1), p.3-6.

Macháčková E, Plevová P, Lukešová M, Vašíčková P, Šilhánová E, Foretová L. Genetická predispozice ke vzniku maligního nádoru prsu. *Klinická onkologie* 2006, Supplement 2006, p.48-54.

Lukešová M, Macháčková E, Vašíčková P, Navrátilová M, Pavlů H, Urbánková V, Kuklová J, Foretová L. Výsledky testování BRCA1 a BRCA2 genů v molekulárně genetické laboratoři Masarykova onkologického ústavu. *Klinická onkologie* 2006, Supplement 2006, p.55-57.

Vašíčková P, Macháčková E, Lukešová M, Horký O, Pavlů H, Urbánková V, Kuklová J, Foltánková V, Navrátilová M, Foretová L. Varianty neznámého významu a intragenová přeskupení v genech BRCA1 a BRCA2. *Klinická onkologie* 2006, Supplement 2006, p.58-62.

Vasickova P, Machackova E, Lukesova M, Damborsky J, Horky O, Pavlu H, Kuklova J, Kosinova V, Navratilova M, Foretova L. High occurrence of BRCA1 intragenic rearrangements in hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic. *Submitted manuscript (BMC Clinical Genetics)*.

Publikovaná abstrakta konferencí :

Foretova L, Vasickova P, Lukesova M, Horky O, Navratilova M, Machackova E. The role of intragenic rearrangements in BRCA1 gene in the aethiology of hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic. Cancer 2006. Stará Lesná, Slovensko. Book of abstracts. P. 26

Lukesova M, Machackova E, Vasickova P, Navratilova M, Foretova L. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in male breast cancer patients in the Czech population. European Journal of Human Genetics 2006, Supplement 1, p.207.

Vasickova P, Lukesova M, Horky O, Pavlu H, Kuklova J, Urbankova V, Navratilova M, Machackova E, Foretova L. BRCA1 intragenic rearrangements in patients with hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the Czech Republic. European Journal of Human Genetics 2006, Supplement 1, p.208.

Machackova E, Foretova L, Lukesova M, Vasickova P, Coene I, Pavlu H, Urbankova V, Kuklova J, Navratilova M, Claes K. Molecular characterisation of splice site mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Czech families with hereditary breast cancer. European Journal of Human Genetics 2006, Supplement 1, p.216.

Lukešová M, Vašíčková P, Macháčková E, Navrátilová M, Horký O, Pavlů H, Urbánková V, Kuklová J, Foretová L. Charakterizace intragenových delecí BRCA1 genu detekovaných metodou MLPA u pacientek s dědičnou predispozicí ke vzniku nádoru prsa a ovaria. XXX Brněnské onkologické dny, Edukační sborník 2006.

Vašíčková P, Macháčková E, Lukešová M, Foretová L. Intragenové přestavby v BRCA1 genu v souvislosti s dědičným syndromem nádoru prsu a/nebo ovaria v České republice. 10. celostátní konference DNA diagnostiky 2006. Sborník příspěvků.

Farmakogenetika (projekt NS 5712)

Řešitel : MUDr. D.Valík, PhD

Farmakogenetické a metabolické biomarkery terapie antifoláty

Řešitelé: D. Valík, J. Štěrba, R. Demlová,

V průběhu roku 2006 pokračovala akvizice vzorků pacientů KDO léčených protokolem obsahujícím 2 g/m² i.v. methotrexát. Protokol zahrnující 5 g/m² methotrexát byl zpracován a publikován.

Farmakogenetické aspekty terapie fluoropyrimidiny

Řešitelé: D. Valík, R. Demlová, M. Bednaříková-Gálová

V průběhu roku pokračovaly práce na tomto projektu ve všech jeho třech úkolech:

1) V úkolu s názvem *stanovení eliminačního fenotypu přirozených pyrimidinů* probíhala další akvizice pacientů léčených 5-FU dle protokolů „de Gramont“ a „FUFA Mayo“. V současnosti je zpracováno jak klinicky tak farmakokineticky 65 pacientů z celkově 83 zařazených do tohoto projektu. Nábor bude dále pokračovat v roce 2007.

2) V úkolu s názvem *stanovení preterapeutické exkrece přirozených pyrimidinů* jsme pokračovali v akvizici materiálu od pacientů zařazených do úkolu. Na tomto úkolu budeme v roce 2007 dále pracovat metodou stanovení thyminu pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií metodou stabilní izotopové diluce.

3) V úkolu s názvem *genotypizace genu pro DPYD* jsme provedli ve spolupráci s laboratořemi Onkologického centra v Novém Jičíně pilotní sekvenaci vzorků u 20 pacientů. Tento materiál bude vyhodnocen v průběhu roku 2007.

Farmakogenetické aspekty terapie inhibitory topoisomerázy

Řešitelé: D. Valík, R. Demlová, E. Macháčková, M. Bednaříková-Gálová

V roce 2007 byl zahájen nový projekt zaměřený na *identifikaci jedinců se zvýšeným rizikem toxické reakce po podání irinotecanu*. Tato reakce bývá podmíněna zpomalenou eliminací aktivního metabolitu irinotecanu nazývaného SN-38. Tato látka je eliminována z organismu po konjugaci s glukuronovou kyselinou. U lidí s porušenou glukuronidací dochází ke zvyšování plasmatické koncentrace SN-38 s doprovodnými projevy toxicity – typicky jde o jedince, u nichž se vyskytuje jinak benigní hyperbilirubinemie zvaná Gilbertův syndrom.

Ve spolupráci s Oddělením genetiky a epidemiologie nádorů MOÚ byla zavedena metodika stanovení mutace v TATA boxu genu kódujícím enzym glukuronyltransferasa, isoforma UGT1A1. Elongace TATA boxu v promotorové sekvenci tohoto genu se považuje za příčinu Gilbertova syndromu. Farmakogenetickým projevem této jinak benigní metabolické úchytky je stav po podání irinotecanu bez následné eliminace metabolitu SN-38. Jedinci s Gilbertovým syndromem jsou v riziku zvýšené toxicity způsobeném irinotecanem.

V průběhu roku 2007 bude probíhat akvizice pacientů do projektu. Materiál, tedy genomová DNA, bude odebrán u všech pacientů s indikací k chemoterapii irinotecanem. Analýza bude provedena v první fázi retrospektivně u nemocných s projevy výrazné klinické toxicity.

Publikace:

Sterba J, Dusek L, Demlova R, Valik D. Pretreatment plasma folate modulates the pharmacodynamic effect of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: "folate overrescue" concept revisited. *Clinical Chemistry*, 2006 Apr;52(4):692-700.

Michalová, E., Hrstka R., Štěrba J., Mendelová D., Valík D., Babčanová S., Křivánková K., Vojtěšek B. Studium vlivu methotrexátu na expresi genů p53-signální dráhy v leukemických buňkách pomocí cDNA array.

Klinická onkologie, 2006, (přijato do tisku)

Detekce transkriptů genů vybraných enzymů ve vztahu k léčbě cytostatiky

(projekt NS 5714)

Řešitelé : RNDr. M. Svoboda, Mgr. Klocová, Mgr. Hrstka

Rokem 2006 byl uzavřen projekt sledování hladin TS,TP, DPD mRNA ve vztahu k chemorezistenci na fluoropyrimidiny. Bylo vyšetřeno 80 pacientů a zjištěna 68%-ní shoda predikce s realitou. Jako originální nález byla zjištěna indukce TS,TP po chemoradioterapii a selektivní výhoda podání capecitabinu. Byla odeslána publikace do odborného časopisu s impaktem.

Výsledkem práce na tomto projektu je nabídka dalších testů pro klinické použití :

- 1) stanovení hladin mRNA HIF1A, CAIX jako potenciálně použitelných pomocných markerů pro rozhodování o adjuvantní léčbě sunitinibem (renální nádory, spolupráce s projektem dr. Kocáka)
- 2) GLUT1 mRNA (glucose transporter 1), který reflektuje metabolickou aktivitu nádoru a má podobnou dynamiku jako stanovení aktivity 18FDG v pozitronové emisní tomografii
- 3) vybrané microRNA a s nimi asociované proteiny, které se uplatňují v regulacích genové exprese jako onkogeny, tumorové supresory, některé již jako prognostické faktory.

Výsledky byly prezentovány na ABI RNA Symposia 2006

Výzkum problematiky microRNA je veden ve spolupráci s European Molecular Biology Laboratory a University of Heidelberg. V rámci řešení projektu proběhly stáže ve Viennalab ve Vídni na téma stanovení mutací K-ras pomocí PNA clamp metody a v European Molecular Biology Laboratory v Heidelbergu na téma stanovení exprese microRNA čipovými technologiemi

Publikace :

Tichý B., Svoboda M., Mayer J., Pospíšilová Š. : Odběr a zpracování vzorků pro expresní DNA čipy. Klinická onkologie, Suppl. 2006 Čipové technologie v onkologickém výzkumu a praxi, s. 350-354

M. Svoboda, V. Beneš, L. Hollá, B. Tichý, M. Jurajda, Š. Pospíšilová, R. Blatný, O. Slabý, E. , Krejčí, R. Šefr, I. Kocáková, S. Babčanová: Expression of MicroRNAs in Colorectal Tumors. The RNA Symposia Series. Applied Biosystems, Praha 2006.

Patologie nádorů (projekt NS 5715)

Řešitel : MUDr. R.Nenutil, PhD

Banka biologického materiálu:

Tato nádorová tkáňová banka MOÚ je v současné době v České republice unikátem rozsahem i komplexností sběru kličkého materiálu zhoubných nádorů, homologních tkání a sér onkologických pacientů. Využitelnost banky zvyšuje přímá dostupnost všech údajů o všech provedených vyšetřeních, léčbě a klinickém průběhu onemocnění v návaznosti na jednotný informační systém GreyFox Masarykova onkologického ústavu.

Přehled počtu hluboce zamrazených vzorků uložených v bance

Rok	Primární nádor	Homologní nenádorová tkáň	Metastáza	Sérum
2005	532	350	158	530
2006	560	474	120	537

Vydáno bylo v roce 2005 317 a v roce 2006 343 alikvotů tkání nebo sér pro celkem 6 výzkumných projektů.

V době uzávěrky zprávy koncem roku 2006 probíhají stavební úpravy nových prostor banky včetně přidružené laboratoř, která bude určena k centralizované přípravě DNA, RNA a bílkovinných lyzátů, tak, aby mohly být nadále vydávány pouze alikvoty potřebné pro konkrétní výzkum. Provoz banky v nových podmínkách bude možný již od února 2007.

Laserová mikrodisekce

V roce 2006 byl zahájen testovací provoz s cílem etablovat metody použitelné pro izolaci minimálních potřebných množství tkáňových složek pro RT-PCR, sekvenaci DNA a proteomické studie v SELDI

Projekty histopatologie

P16 u intraepiteliálních neoplazií děložního hrdla (CIN)

Program p16 u CIN se byl rozšířen o detekci lidských papilomavirů (HPV), stanovení metylace HPV E6 promotoru a stanovení stresového proteinu Sep53 ve spolupráci s T. Huppem z laboratoří Cancer Research Campaign v Edinburghu. Byla také provedena komparace s s dlaždicobuněčnými karcinomy dutiny ústní.

Výsledky byly zatím prezentovány na celostátních konferencích:

Hublarova P., Rotterová P. et al.: Význam a detekce metylace v promotoru genu E6 lidského papillomaviru 16 u karcinomů a intraepiteliálních lézí děložního čípku (CIN)
II. Dny diagnostické a prediktivní onkologie, Olomouc 28.-30.11.2006

Rotterová P. Rotter L et al.: Sep53 - nový diferenciační marker dlaždicového epitelu. Expres v CIN a dlaždicobuněčném karcinomu děložního hrdla. Sborník abstrakt XIV. Vědecké konference slovenských a českých patologů, 2006.

Čáslava T., Rotterová P. et al.: Porucha exprese regulátorů buněčného cyklu jako prediktivní faktor u karcinomu jazyka a spodiny dutiny ústní
II. Dny diagnostické a prediktivní onkologie, Olomouc 28.-30.11.2006

Imunohistologický screening MMR u syndromu hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC)

Tento dílčí úkol souvisí s výše uvedeným projektem Oddělení genetiky a epidemiologie nádorů MOÚ jako jedna z podmínek pro komplexní diagnostiku hereditárních nádorových syndromů, kde přispívá k selekci případů vhodných pro genetické studie předchozími imunohistologickými technikami.

Detekce receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) jako prediktivního faktoru

V předchozích dvou letech bylo zavedeno a využíváno imunohistologické stanovení overexpresy EGFR se standardizovaným semikvantitativním vyhodnocením. U kolorektálních karcinomů se overexpres pohybuje kolem 25%. Další typy zhoubných nádorů byly vyšetřovány pilotně. Jako potenciálně zajímavé se z

hlediska exprese EGFR jeví karcinomy plicní, renální a pankreatobiliární. Celkem je vyšetřeno 120 zhoubných nádorů a nyní probíhá vyhodnocení dat s perspektivou klinických doporučení a publikace.

Byla také vytvořena testovací tissue array pro kolorektální a renální karcinomy. Rovněž je otestována amplifikace EFGR genu stanovovaná pomocí FISH, která je k dispozici pro rutinního bioptický i výzkumný provoz.

Cirkulující nádorové biomarkery a průtoková cytometrie (projekt NS 5716)

Řešitelé : Mgr. L. Dubská, PhD, MUDr. Dalibor Valík, RNDr. M.Šimíčková, CSc., MUDr. Tomáš Frgala

Detekce cirkulujících endoteliálních buněk

Byl metodologicky vyřešen způsob detekce cirkulujících endoteliálních buněk (CEC) a endoteliálních progenitorů (CEP) v periferní krvi jako potenciálních biomarkerů nádorové angiogeneze.

Bylo zahájeno prospektivní hodnocení CEC a CEP v souboru neonkologických dárců a dětských onkologických pacientů s nádory před primární chirurgickou léčbou. Dosavadní hodnocení svědčí pro statisticky významně vyšší počty cirkulujících endotelilů u onkologicky nemocných. Soubor obsahuje zatím asi 200 vyšetřených pacientů.

Byla také zahájen sběr materiálu pro hodnocení *solubilních angiogenních markerů*, které budou hodnoceny pomocí imunoarray-angiogeneze i z hlediska vybraných angiogenních faktorů.

Byly zavedeny *nové ukazatele stavu imunitního systému* pro sledování sekundárních imunodeficitů onkologických pacientů.

VEGF a další biomarkery jako potenciální prediktory efektu anti-angiogenní terapie

Cíl I. Testovat prediktivní význam vybraných biomarkerů v cirkulaci u nemocných s metastatickým kolorektálním karcinomem před aplikací bevacizumabu (preparát Avastin), protilátky proti VEGF. Přes jistý efekt terapie bevacizumabem i v neselektované populaci nemocných jsou intenzivně studovány možné markery,

kteře by tuto specifickou biologickou terapii charakterizovaly na úrovni objektivní vaskulární odpovědi (Nat.Rev.Cancer 2006,6,626-635).

Byly analyzovány sérové hladiny vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), jeho poměru k počtu trombocytů, koncentrace endostatínu, solubilní vaskulární cell-adhezivní molekuly (V-CAM1) a intercelulární adhezivní molekuly (ICAM-1) v souboru 23 nemocných s kolorektálním karcinómem, u nichž byla zahájena léčba v r.2005 (N=14) a v r. 2006 (N=9). Pro skupinu 14 nemocných jsme mohli zhodnotit vztah mezi testovanými parametry k odpovědi na léčbu vyjádřenou intervalem od zahájení léčby do progresu (TTP). Analýza předterapeutických hladin cirkulujícího VEGF v našem souboru z roku 2005 prokázala ve shodě s literaturou, že tento parametr nemá prediktivní hodnotu ve vztahu k nejlepší odpovědi ani k TTP

Od září 2005 došlo ke změně odběrových podmínek. Byl zaveden odběr sér bez separačního gelu, vedoucí zřejmě k neúplnému uvolnění VEGF z trombocytů ,a tedy nelze nadále sérum užívat pro kvantitativní stanovení VEGF. Pro prospektivní studii je třeba ověřit vliv typů vyšetřovaného materiálu (definovaná koagulace séra, plasma, plasma ochuzená o trombocyty).

Endostatin, experimentálně prokázaný inhibitor angiogeneze, vykazoval trend přímé korelace mezi jeho předterapeutickými koncentracemi a TTP.

Sérový *ICAM-1*, jehož exprese v endoteliálních buňkách je podle nových poznatků regulována VEGF, byl prokázán dosud jako jeden z mála sérových prediktorů při terapii bevacizumabem u metastatického nemalobuněčného karcinomu plic. V našem souboru jsme však vztah předterapeutické hladiny VCAM-1 k účinnosti terapie nepotvrdili. Stejně jsme neprokázali prediktivní charakter solubilní VCAM-1.

Cíl II: . Ověřit, zda zvýšená koncentrace VEGF v séru nemocných s karcinómem prsu se zvýšenou expresí HER2 před nasazením terapie trastuzumabem (preparát Herceptin) má vztah k účinnosti.léčby

Podle dosud publikovaných experimentálních studií i preklinických dat vede exprese VEGF k agresivnějšímu fenotypu nádorů. V našem souboru nemocných s karcinómem prsu léčených Herceptinem jsme vyšetřili retrospektivně hladiny sérového VEGF v souboru 15 nemocných (81 odběrů) a korelovali se známou hladinou sérového HER2. Předterapeutická koncentrace sérového HER2 nekoreluje

s hladinami VEGF. Koncentrace sérového VEGF se v průběhu terapie významně nemění. U 33% nemocných byly tyto hladiny zvýšeny. Hladiny VEGF u pacientek, u nichž došlo k progresi onemocnění do 6 měsíců od zahájení terapie, jsou však výrazně vyšší než u nemocných, kde stabilizující efekt terapie je delší než 6 měsíců.

Závěrem lze konstatovat, že z testovaných cirkulujících pro-angiogenních a anti-angiogenních faktorů se předběžně jeví být významným prediktorem úspěchu anti-angiogenní terapie kolorektálního karcinomu bevacizumabem endostatin. Definitivní potvrzení je však třeba provést na větším souboru nemocných. Monitorování cirkulujícího VEGF u nemocných léčených trastuzumabem může napomoci při ověření mechanismu rezistence na tuto léčbu.

Publikace :

Šimíčková M, Dubská L, Kocáková L, Nekulová M, Nenutil R, Demlová R, Valík D (2006): Angiogeneze a anti-angiogenní terapie u nádorových onemocnění se zaměřením na cirkulující vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Klinická onkologie 19: 212-216.

Dubská L, Bačíková L, Kalvodová J, Valík D.: Aktivované a klidové endoteliální buňky v cirkulaci: hledání jehly v kupce sena. XXX Brněnské onkologické dny 2006, Brno.

Šimíčková M., Petráková K., Svoboda M., Pecen L., Nekulová M., Frgala T., Kocáková I., Dubská L., Valík D.: Nové sérové nádorové markery při monitorování nemocných léčených specifickou protinádorovou imunoterapií (HER-2/neu, VEGF). XXVII. Imunoanalytické dny, Praha 26.-28.3.2006, Sborník abstrakt str.30.

Dubská L.: Nové poznatky v nádorové biologii. Mendel Forum 2006, Brno.

Proteomika - SELDI (projekt NS 5717)

Řešitelé : MUDr. D. Valík, PhD, RNDr.B.Vojtěšek,DrSc.

Analýza proteinových profilů karcinomu prsu metodou SELSI-TOF v vztahu k chemoresistenci

Bylo zpracováno 20 vzorků nádorové a zdravé tkáně pro porovnávání proteinových spekter nádorové a normální tkáně a hledání statisticky významných rozdílů.

Nádorová tkáň byla rozdělena podle předchozích MTT testů na *in vitro* rezistentní a senzitivní k testovaným cytostatikům a bylo provedeno srovnání proteinových spekter mezi rezistentní a nádorovou tkání.

Jsou vytipovány následující proteiny, které jsou statisticky významně zvýšeny v jedné z analyzovaných skupin. a uvedeny velikosti proteinů vybraných pro další identifikaci:

Proteiny zvýšené v:

normální tkáni	8965, 9617, 10638, 12510 Da
nádorové tkáni	4933, 20165 Da
senzitivní nádorové tkáni	28036, 28132 Da
rezistentní nádorové tkáni	3894, 9750 Da

2. Analýza proteinových profilů karcinomu prsu metodou SELSI-TOF ve vztahu histopatologickým parametrům

Bylo zpracováno 110 vzorků nádorové a homologní zdravé tkáně a provedena standardní histopatologická patologická klasifikace (histotyp, ER +/-, PR +/-, grade1, grade 3, Her2 +/-, Ki 67-1, Ki67-3, přítomnost uzlinových metastáz)

Byla porovnána proteinová spektra mezi skupinami a hledány statisticky významné rozdíly a stanoveny velikosti proteinů vybraných pro další identifikaci:

Zvýšené ve zdravé tkáni	7920, 15841 Da
Zvýšené v nádorové tkáni	5195, 6263, 8541 Da

3. Hledání biomarkerů časného metastazování do lymfatických uzlin u low grade karcinomů prsu.

Zatím bylo zpracováno 90 vzorků metastazujících a nemetastazujících low grade karcinomů prsu. Studie pokračuje dalším náborem případů.

Publikační činnost za rok 2006:

Pilny R, Bouchal P, Borilova S, Ceskova P, Zaloudik J, Vyzula R, Vojtesek B, Valik D. Surface-enhanced laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry reveals significant artifacts in serum obtained from clot activator-containing collection devices. Clin Chem. 2006 Nov;52(11):2115-6.

Impact Factor 7,17!

P. Češková, K. Brožková, L. Hernychová, J. Štěrba, D. Valík a B. Vojtěšek
Hmotnostní spektrometrie v kvantitativní a diagnostické proteomice: možnosti a limitace Chem. Listy 100, 974-979 (2006)

Impact factor 0,345

Postery:

Brožková K., Knoflíčková D., Bouchal P., Faitová J., Nenutil R., Vojtěšek B.:
Potenciální biomarkery karcinomu prsu detekované metodou CIPHERGEN
XXX. Brněnské onkologické dny 11-13. května 2006, edukační sborník str. 283

Přednášky:

Brožková K., Knoflíčková D., Bouchal P., Faitová J., Nenutil R., Vojtěšek B.:
Analýza proteinových profilů karcinomu prsu metodou SELSI-TOF MS
Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie 7.-9.12.2006, Olomouc,
edukační sborník str. 30

Brožková, K. Faitová, J., Valík, D., Vojtěšek B.:
Application of CIPHERGEN technology in clinical oncology. X. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů 2006,
Brno, 8.-9.2.2006, edukační sborník str. 21-22

Arrays (NS 5718)

Řešitel : Mgr. Hrstka

Cílem projektu je využít metodu "cDNA/oligo GEArray" k analýze exprese genů v přesně definovaném klinickém materiálu, který již byl zpracováván v rámci jiných studií prováděných na MOÚ. Samotný projekt nazvaný „Arrays“ sestává z několika dílčích projektů:

1) *Studium exprese p53 dependentních genů v naivních blastech u dětí trpících akutní lymfoblastickou leukémií.*

Při této diagnóze jsou lékem první volby antifoláty, především pak methotrexát (4-amino, 10-methylpterin). Celkem byly zpracovány lymfoblasty od 14 pacientů. Byly detekovány změny v expresi řady genů p53-signální dráhy u maligních blastů kultivovaných ex vivo s methotrexátem. Odlišné hladiny exprese genů potvrzují značnou heterogenitu dětských leukémií, projevující se v našem souboru v expresních profilech i ve způsobu buněčné odpovědi na přítomnost methotrexátu. Důsledkem může být různá míra citlivosti k aplikované látce a také různá odpověď pacienta na terapii (2 publikace v časopise Klinická onkologii).

2) Byla započata studie zaměřená na *sledování změn transkripčních expresních profilů po působení různých protinádorových platinových komplexů*. Jsou studovány mechanismy jejich působení a inovativní strategie chemoterapie V přípravě je publikace do zahraničního časopisu).

3) Byla zavedena *metodika pro analýzu nízkohustotních oligonukleotidových makročipů (oligo GEArrays) včetně analýzy obrazu*, normalizace dat (GEArray Expression Analysis Suite), statistického zpracování (TIGR MultiExperiment Viewer-Dana-Farber Cancer Institute) a validace metodou kvantitativní RT-PCR. Byl ověřen význam čistoty a integrity RNA pro vlastní čipovou analýzu metodou gelové kapilární elektroforézy (Agilent Bioanalyzer 2100) a minimální hodnota RIN (RNA Integrity Number) pro RNA vstupující do analýzy stanovena na 7.

Tato metodika byla za použití Tumor Metastasis Oligo GEArray, nesoucí sondy pro 128 genů potenciálně zapojených do procesu nádorové invazivity a diseminace, aplikována u souboru 24 nepředléčených pacientů s kolorektálním karcinomem II a III stádia, z nichž polovina měla dobrou prognózu (DFS>36 měsíců) a polovina

špatnou prognózu (DFS<36 měsíců). Pro studii byly použity bioptické vzorky uložené v tkáňové bance Masarykova onkologického ústavu. U všech vzorků byla ověřena kvalita RNA a použit zavedený protokol pro analýzu profilů genové exprese. Změny v expresi tří genů (KRAS, MYC, HGF) identifikovaných pomocí čipové analýzy byly následně úspěšně validovány metodou kvantitativní RT-PCR. Výsledky této práce byla přijaty redakcí Klinické onkologie k publikaci. V současné době zavádíme ve spolupráci s oddělením patologie metodiku na izolaci RNA z formalinem fixovaných parafinových bloků (FFPE) pro analýzy profilů genové exprese.

4) Úspěšně byly zavedeny microRNA arraye Exiqon. Podařilo se prokázat změny v expresních spektrech microRNA u buněčných linií po působení 5-fluorouracilem a probíhá další výzkum ve spolupráci s EMBL v Heidelbergu.

Publikace:

Hrstka R., Muller P., Vojtěšek B., Nenutil R., Štěrba J., Valík D. (2005): Analýza změn exprese p53-signálních genů v buňkách akutní lymfoblastické leukémie v závislosti na působení methotrexátu. *Klinická onkologie*, vol. 18, 64-68.

Brazda V, Muller P, Brozkova K, Vojtesek B. Restoring wild-type conformation and DNA-binding activity of mutant p53 is insufficient for restoration of transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 15;351(2):499-506. Epub 2006 Oct 19. PMID: 17070499.

Michalová, E., Hrstka R., Štěrba J., Mendelová D., Valík D., Babčanová S., Křivánková K., Vojtěšek B. Studium vlivu methotrexátu na expresi genů p53-signální dráhy v leukemických buňkách pomocí cDNA array. *Klinická onkologie*, (přijato do tisku).

Eva Michalová¹, Jaroslav Štěrba^{1,3}, Soňa Babčanová¹, Kateřina Křivánková¹, Dalibor Valík² a Bořivoj Vojtěšek¹: Analýza exprese p53-signálních genů u maligních blastů po působení methotrexátu. 6. Konference mladých chemiků, biochemiků a biologů. *Chemické listy*: s. 396, ISSN 0009-2770

Eva Michalová¹, Hrstka Roman¹, Jaroslav Štěrba^{1,3}, Soňa Babčanová¹, Kateřina Křivánková¹, Dalibor Valík² a Bořivoj Vojtěšek¹: Analýza exprese p53-signálních genů u naivních blastů izolovaných z kostní dřene pacientů s akutní leukémií. In Sborník příspěvků: X. pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, 8.-9.2.2006, Brno. Brno: Masarykova univerzita, 2006, s. 81. ISBN 80-210-3942-6.

Slabý O., Garajová I., Svoboda M., Svoboda M., Vyzula R. Molecular characterization of primary colorectal cancers with progressive metastatic phenotype by oligonucleotide microarrays. In sborník XX. BIOCHEMICKÝ ZJAZD. Piešťany : Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, člen IUMBM a FEBS, 2006,. s. 213-213. ISBN 80-969532-6-5.

Slabý O., Garajová I., Svoboda M., Fabian P., Šmerdová T., Vyzula R. Usage of low-density oligonucleotide microarrays for prognosis prediction of colorectal cancer patients. In Abstract CD of Advances in Microarray Technology 2006. Amsterdam, Netherlands : Select Biosciences, 2006,. s. 112-112.

Signální dráhy (projekt NS 5719)

Řešitelé : prof.RNDr.PhMr. J.Kovařík, DrSc, RNDr.Boudný,CSc., Dr.L.Adámková,
RNDr.L.Lauerová,CSc.

V kontextu se zaměřením projektu na studium mechanismů působení signálních a transkripčních proteinů rodiny STAT v buněčné homeostáze a na jejich molekulární či funkční poruchy v nádorech byly získány a zveřejněny tyto nové poznatky:

- 1) IFN gama na rozdíl od IFN alfa je výrazným induktorem SOCS 3 genu v buňkách maligního melanomu což může být jedním z mechanismů, které potlačují biologické účinky IFN gama v terapeutických aplikacích.
- 2) Byl prokázán výrazný rozdíl v expresi i v aktivaci SOCS3 proteinu mezi rezistentními, respektive citlivými buňkami maligního melanomu na účinky IFN gama. Na rozdíl od citlivých buněk má rezistentní populace konstitutivně exprimovaný SOCS3 protein, defekt v aktivaci SOCS 1-3 proteinů a krátké trvání aktivačního signálu, což ukazuje, že SOCS 3 se významně, ne-li dominantně podílí na evoluci rezistence melanomových buněk k IFN gama.
- 3) Analýza profilů STAT1/3 a SOCS3 proteinů a aktivace STAT1 po IFN signálu v normálních a maligních buňkách mamárního epitelu ukázala specifické rozdíly v obou populacích. Maligní buňky, na rozdíl od normálních, mají defektní fosforylaci STAT3 na Tyr705 a potlačenou expresi SOCS3 genu po IFN signálu. Nabízí se interpretace, že nádorové buňky derivované z epitelu mléčné žlázy, na rozdíl od maligního melanomu, mají defekt v regulaci STAT/SOCS signální dráhy a že leze v expresi genu SOCS3 může být specifickým markerem maligního fenotypu daného histogenetického typu nádoru.

Publikace:

Adámková L., Součková K., Kovařík J.: Transcription protein STAT1: biology and relation to cancer.

Folia Biol. 2006 – v tisku

Fojtová M., Boudný V., Kovařík A., Lauerová L., Adámková L., Jarkovský J., Kovařík J.: Development of IFN gamma resistance is associated with attenuation of SOCS genes induction and constitutive expression of SOCS3 in melanoma cells.

Br.J.Canc. 2006 – v recenzním řízení

Témata prací prezentovaných na zahraničních konferencích :

Adámková L., Součková K., Boudný V., Lauerová L., Kovařík J.: Analysis of interferon-induced STAT1 and SOCS3 status in malignant melanoma cells.

Lauerová L., Fojtová M., Kovařík A., Adámková L., Součková K., Boudný V., Jarkovský J., Kovařík J.: Inhibitory effect of interferon gamma on cell proliferation is correlated with prolonged induction of SOCS1 and SOCS3 genes in human melanoma lines.

Součková K., Adámková L., Lauerová L., Krejčí E., Kovařík A., Fojtová M., Matoušková E., Buršíková E., Kovařík J., Boudný V.: The effect of interferon treatment on STAT/SOCS status in normal and malignant human breast cells.

Radiologické zobrazovací metody (projekt NS 5720)

Řešitelé : MUDr. H. Bartoňková, MUDr. M. Schneiderová, MUDr. Opletal

1. Komparace standardní a digitální mammografie

Cílem bylo zhodnocení výsledků digitální mammografie (záchyt Ca) za dobu provozu asi tří let a zhodnocení přibližně 1 500 mamografií provedených klasickým postupem na film a současně digitální mamograf. Současně bude do projektu zařazeno vyhodnocení MG digitalizovaných pomocí CR.

Digitální MG je plně srovnatelná s filmovou MG u žen s involuční mléčnou žlázou. Digitální MG má ovšem větší výtěžnost u žen mladších 50let, bez ohledu na denzitu žlázy. a u žen s denzní žlázou, bez ohledu na věk.

Během roku 2007 bude publikováno a přednášeno konečné zhodnocení.

2. Magnetická resonance prsu v primární diagnostice

Magnetickou resonancí vyšetřeno 147 žen s vysokým rizikem karcinomem prsu.

Dispenzární program pro časnou detekci Ca prsu u žen s vysokým rizikem Ca prsu.

Míru rizika a zařazení určuje genetik.

První kolo MR + MG + UZ (+ DOBI). Druhé kolo a další MR + UZ (+ DOBI), MG bude u žen mladších 35 let doplněno při pozitivním MR nálezu.

Provedeno 200 vyšetření. Dvakrát záchyt invazivního karcinomu pouze z MR obrazu, přčemž MG a UZ byly negativní.

Přes nižší specifitu je MR pro svou vysokou sensitivitu indikována u mladých žen s vysokým rizikem karcinomu prsu jako metoda první volby. MG zde má výrazně sníženou výpovědní hodnotu (často denzní žláza), u BRCA1+ parenchymu MG také nevhodné pro vysokou pravděpodobnost vyšší sensitivity k ionizujícímu záření (indukované tumory).

3. MR prsu ve vztahu k hormonální dependenci a změnám enhancement prsu v průběhu menstruačního cyklu

Výskyt, kolísání a variabilita fyziologického enhancement byla sledována při dispenzárních vyšetřeních žen s vysokým rizikem karcinomu prsu ve velké věkové škále, včetně skupiny velmi mladých žen (20-25 let).

Výskyt fyziologického enhancement je častý a variabilní. Objevuje se především u denzní, adenomatoidní žlázy. Kolísá v průběhu menstruačního cyklu s maximem výskytu v 1. a ve 4. týdnu cyklu.

Obraz drobných enhancujících lézí do 5mm je nutné hodnotit velmi pečlivě a opatrně - při MR kontrolách v kratší době se sledováním v intervalech 3 - 6 měsíců. Léze často mizí nebo se objevuje v jiné lokalitě. Tyto léze nutno brát jako možný obraz nespecifického fyziologického enhancement, je indikován kratší follow up s MR vyšetřením za 3 - 6 měsíců, nikoli však přímý intervenční postup.

4. MR prsu – angiogeneze, multicentricita a multifokalita v rámci předoperačních vyšetření.

Bylo vyšetřeno asi 100 žen. Sensitivita MR pro detekci invazivního karcinomu byla téměř 100%. Primární diagnostika je však snižována nižší specifitou. Existuje variabilita v enhancement invazivního karcinomu a až 20% karcinomů může mít benigní rysy enhancement se středním a nízkým iniciálním enhancement, křivkami typu I. a s kontinuálním nárůstem. Variabilita enhancement se jeví větší u lobulárního karcinomu než u duktálního karcinomu. Častější je nižší iniciální enhancement a benigní tvar křivek. To může souviset s absencí desmoplastické reakce u lobulárního karcinomu. Velká variabilita v enhancement je patrná u DCIS, u

high grade DCIS j však enhancement přítomno téměř v 95-99% případů (vysoká sensitivita, nižší specificita).

Pro plošný screeningový program časného záchytu karcinomu prsu je ovšem vyšetření MR nevhodné. Význam však může mít jako součást předléčebných, respektive předoperačních algoritmů již diagnostikovaného karcinomu, a to pro: stanovení přesné velikosti diagnostikovaného primárního nádoru, pro nález či vyloučení multifokality, multicentricity a bilaterality u diagnózy lobulárního karcinomu a pro stanovení extenze DCIS (high grade).

Výše uvedená témata projektu (2. – 4.) spolu úzce souvisejí. Jednotčím cílem je komplexněji posoudit vyšetřování prsů metodou magnetické resonance. Sběr údajů je prováděn od srpna 2005 a v současné době má soubor kolem 320 vyšetřených magnetickou resonancí.

5. Značení nehmavných lézí v prsu a ROLL metoda.

Cílem studie je zhodnocení vhodnosti předoperačního označování nehmavných lézí prsu metodou ROLL. Byla dokončena jednání a získáno povolení pro nakládání s radionuklidy mimo oddělení nukleární medicíny na oddělení radiologie jako základní předpoklad klinické aplikace metody ROLL. Bylo provedeno značení ROLL technikou u prvních několika pacientek. Je použita první nejjednodušší technika s radionuklidem používaným zároveň pro sentinelovou axilární biopsii (SNOLL) Nanocol byl pod UZ kontrolou aplikován přísně intratumorálně. Podle prvních výsledků se jeví, že metoda bude použitelná jak pro samotnou ROLL se značení primárního tumoru pro snímání aktivity v místě primárního nádoru, tak i pro SNOLL se současným zobrazením sentinelové uzliny v axile. V další fázi bud sledován přesná míra aktivity v místě primárního nádoru a ROLL technika bude použita pro značení lézí stereotakticky pod mammografickou kontrolou.

6. Virtuální CT kolonoskopie

Cílem studie je především zobrazení tračníku orálně od místa maximálního průniku kolonoskopu u stenozujících tumorů a korelace s operační nálezem a. histologií
Je sledována také korelace CT kolonograficky zjištěných nálezů s následnou kolonoskopií či operační revizí. Dosud bylo CT kolonografií vyšetřeno 26 pacientů ve věku 17 - 75 let. Dosavadní výsledky se blíží k výsledkům udávaným v odborné literatuře se senzitivitou v detekci polypů větších než 10 mm mezi 80-90% a 60-80% senzitivitou v detekci polypů velikosti 6-9 mm při specificitě blíží se 90%.

7. Zhodnocení digitálního optického zobrazování prsu (DOBI)

Proběhla druhá klinická studie DOBI. Výsledky jsou podobné jako u první studie, senzitivita vyšetření se pohybuje mezi 60-70%, specificita je něco nižší (kolem 60%). Dále probíhá na DOBI vyšetřování specifické skupiny žen s hereditární zátěží, tedy nosiček mutace genu BRCA 1,2 nebo jiných závažných zvýšených rizik karcinomu prsu. Ke konci roku 2006 je vyšetřeno 35 žen této rizikové skupiny.

Publikace:

Schneiderová M., Bartoňková H. : Úloha magnetické rezonance v mamologické prevenci u žen s dědičným rizikem nádoru prsu.

Klinická onkologie 2006, Supplementum Hereditární syndromy v onkologii

Schneiderová M., Belanová R., Opletal P., Bartoňková H. : MR prsu - první zkušenosti. Klinická onkologie 4, 2006

Prezentace:

Schneiderová M., Belanová R., Opletal P., Bartoňková H. : MR prsu - první zkušenosti. Konference "Onkologie v gynekologii a mammologii", leden 2006

Schneiderová M., Bartoňková H., DCIS - diagnostický management. Mamologická konference, Olomouc, 7. 4. 2006

Schneiderová M., Bartoňková H. DCIS - diagnostický management, XXX. BOD Brno, 2006

Schneiderová M., Standara M., Fabian P., Bartoňková H. Lobulární karcinom prsu – úskalí časně a kompletní diagnostiky (optimální předoperační management).

XIII. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov, 19.-21.10. 2006

Detekce kardiomyopatií indukovaných onkologickou léčbou (projekt NS 5722)

Řešitelé : Umlauf J., Šimíčková M., Pecen L., Nekulová M.

Amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) a kardiotoxicita u pacientek s karcinomem prsu léčených herceptinem po předcházejícím podání antracyklinů

Cílem studie bylo posoudit přínos vyšetření NT-proBNP v časně detekci kardiotoxicity u rizikových pacientek s karcinomem prsu předléčených antracykliny dále léčených herceptinem pro návrat choroby. Současně byla zhodnocena korelace s echografickým vyšetřením ejekčních frakcí.

NT-proBNP v krvi bylo před léčbou a při ní v měsíčních intervalech vyšetřeno u 27 pacientek léčených pro karcinom prsu v předchozích letech chemoterapii obsahující antracykliny, nejčastěji kombinací FAC a v současné době léčeno pro progresi choroby herceptinem (trastuzumab). U nemocných bylo provedeno EKG a echokardiografické vyšetření a hodnoceny ejekční frakce před zahájením terapie a v měsíčních intervalech.

U 4 nemocných (z 27) se objevil v průběhu terapie výraznější pokles EF (pod 45%) spolu s klinickými příznaky možné kardiotoxicity. Hodnoty NT-proBNP těchto nemocných (skupina A) byly srovnány s hodnotami 23 nemocných, u kterých se kardiotoxicita neprojevila (B skupina). Byla prokázána korelace mezi proBNP a EFLK ve skupině A i B. Referenční hodnota 12,1pmol/l zajišťovala 94% senzitivitu s 57% specificitu při pozitivní prediktivní hodnotě (PPV) 89,26% a negativní prediktivní hodnotě (NPV) 71,7%. Tato referenční hodnota se jeví být optimální pro účely časně detekce kardiotoxicity.

Stanovení natriuretických peptidů nenahrazuje současné metody diagnostiky levostranné komorové dysfunkce a srdečního selhání, velmi výhodně je však může rozšiřovat, a to především jako filtr zbytečných požadavků na ECHO vyšetření při nezvýšené hladině. Naopak zvýšená hladina by představovala dostatečný důvod k dalšímu kardiologickému vyšetření a mohla by tak přispět i k časně detekci srdeční dysfunkce během a po podání chemoterapie s antracykliny nebo jinými kardiotoxickými léky, jak i naše práce dokumentuje.

..

Prezentace : Umlauf J, Pecen M, Šimíčková M, Nekulová M: cTn u nemocných po chemoterapii antracykliny Regionální konference Olomouc, 22.3.2006

II. Program informační podpory

Fúze a elektronická archivace obrazů (projekt NS 5731)

Řešitelé : Ing. Bartl, MUDr. K.Bolčák, MUDr. .Staníček, MUDr. T. Novotný,
V.Petláková, M.Havlíček

Elektronická archivace digitalizovaných nálezů zobrazovacích metod (PASC) a možnost fúze obrazů představuje pro moderní výzkumnou práci v onkologii jeden z hlavních metodických nástrojů. Zobrazovací metody jsou nejen diagnostickým, ale i verifikačním nástrojem pro hodnocení léčebných postupů a významu prediktorů, analyzovaných laboratorními metodami v tkáňových vzorcích. Potenciál zobrazovacích metod rozšiřuje možnost kombinací a fúzí obrazů.

Fúze obrazů NM s CT-MR-PT

Podmínkou fúze obrazů z různých vyšetřovacích metod je však vzájemná kompatibilita všech archivačních a analytických systémů, ovšem také odstranění procesních chyb z komerčně dodávaných systémů. Modifikací archivačního skriptu byl opraven nesmyslně měněný formát kalendářního měsíce (z 01 až 12 na 00) během exportu do formátu DICOM 3.0 při použití některých filtrů obrazu během akvizice nebo rekonstrukce tomografických dat na gama kameře PICKER PRISM 2000XP. Chyba znemožňovala napadená data uložit na PACS archiv. Modifikací archivačního skriptu byla odstraněna nežádoucí aktualizace data studie v nativním obrazovém formátu u vyhodnocení raw dat provedených v jiný den, než v den jejich akvizice. Jsou-li časy vyhodnocení studie a obsahu dřívější, než čas akvizice, opravují se přepisem.

Po spuštění DMWL (DICOM Modality Work List) serveru v MOÚ byl modifikován archivační skript pro generování jedinečného časově nezávislého identifikátoru DICOM UID z čísla elektronické žádanky v NIS, s kterým nedojde k nežádoucímu vícenásobnému výskytu téže studie na PACS při opakované archivaci, ať již nechtěné nebo záměrné či selže-li komunikace během archivace. Byla provedena změna metody činnosti archivačního skriptu k zajištění zpětné kompatibility archivovaných obrazových dat, pro případ jejich nového vyhodnocení na původní obrazové modalitě.

Byly odstraněny náhodně generované chyby během konverze nativního obrazového formátu do formátu DICOM 3.0, která mění, někdy až o několik řádů, hodnotu šířky a centra prohlížečícího okna. Dočasným řešením je automatické nastavení šířky a centra okna u prohlížeče Radworks nebo ruční změna nastavení jasu a kontrastu u obrazových dat uložených s touto chybou u prohlížeče TomoCon. Neřešitelná situace je u WEB prohlížeče (aktualizovaná verze 3.7 SW Amis PACS úpravou jasu a kontrastu již nedisponuje.)

Byla provedena úprava originální „klikací aplikace“ ke komunikaci s PACS archivem, v SW prostředí vyhodnocovací stanice Picker, pro zajištění správného postupu archivace.

Fúze PET s CT-MR pro radioterapii

Pro snadné dohledání fúzovaných obrazových dat na PACS (jednoznačné přiřazení ke konkrétnímu PET nebo NM vyšetření) byla navržena nová metoda tvorby vlastní fúze. Fúzovaná obrazová data typu „Secondary Capture Screen“ jsou modalitě NM. Nová metoda současně zabraňuje následné nedostupnosti zdrojových obrazových dat, pokud pochází z dlouhodobých PACS archivů.

Byl odstraněn neopodstatněný vzájemný posun souřadnic u nově generovaných sérií PET a CT/MR tomografických řezů z fúzovaného obrazu. Chybu způsobuje SW prostředí SIEMENS Esoft verze 4.x, určené pouze pro modalitu PET, (náhrada odzkoušeného řešení se SW Esoft@Leonardo verze 5.x pro stávající hybridní modalitu PET/CT).

Pro posouzení možnosti opravy výše uvedené chyby se testují nyní získaná zkušební obrazová data z hybridní modalitě PT/CT, a to jak v jejich původní podobě, tak i ve fúzované, z níž je k dispozici vyexportovaná ROI do této doby v nedostupném formátu u hybridních, natož samotných PET obrazových modalit, a to „DICOM RT“. Zkušební data jsou produktem SW prostředí Esoft nové verze řady 5, zatím dodávané pouze k nové hybridní modalitě Siemens TruePoint PET•CT. Pozn.: Nejlepším řešením uvedené problematiky „snad“ bude nová verze SW Esoft řady 5 určená i pro samotnou PET modalitu, která má nabízet i možnost exportu fúzované ROI přímo do požadovaného formátu „DICOM RT“, a to zejména proto, že

není jisté, zda zpřístupnění nového formátu nebude podléhat licenčnímu poplatku. Aktualizovaný SW však bude možné provozovat pouze u vyhodnocovacích stanic Esoft Turbo s dostatečným výpočetním výkonem.

Měření kvality PET systému

Byla zprovozněna intranetová aplikace DQC PET skeneru SIEMENS Ecat Accel s on-line generovaným grafem denních testů homogenity DQC (*daily quality control*). Kromě zobrazení výsledků z aktuálního měsíce je možné generovat jednotlivě průběhy i za všechna předchozí období.

Byl navržen a realizován DICOM Modality Worklist pro PET systém SIEMENS Ecat Accel v podobě intranetové aplikace spouštěné na akviziční konzole PET. Důvodem je nefunkčnost dodané implementace při použití lomítka v rodném čísle (PATIENT_ID), nebo mezery v příjmení některých pacientů a nutnost obsluhy DMWL pouze z vyhodnocovací stanice. Z pohledu výrobce náprava některých požadavků neopodstatněná, např. dle obecných zásad databázová data neobsahují optické oddělovače - lomítko v rodném čísle).

Dále se pracuje na převodech postupů pro zpracování dalších výsledků měření kvality PET systému k rychlejšímu vyhodnocení a zobrazení v intranetové aplikaci a bezchybném přenosu jedinečného identifikátoru studie v podobě „Accession Number“, generovaného z čísla elektronické žádanky v NIS, z nativního obrazového formátu ecat7 do formátu DICOM 3.0 k provázání NIS a PACS v MOÚ.

SUV (standardized uptake values) v PET – intranetová aplikace

Dual time exam je jednoduchá a neinvazivní metoda, pokus o zlepšení specificity 18F-FDG v rozlišení maligní a benigní etiologie zobrazené léze. Jejím principem je prokázaná skutečnost odlišného průběhu akumulace 18F-FDG v lézích maligního i benigního původu, tedy nádoru a zánětu infekčního i neinfekčního. Po aplikaci, v průběhu tzv. akumulační fáze vyšetření, dochází k zachytu 18F-FDG buňkami vyšetřované léze, kdy v 60. minutě je dosaženo optimálního poměru aktivity léze (pozadí zdravé tkáně nutného ke kvalitnímu zobrazení). V dalším průběhu se však dosud společný průběh akumulace maligními a benigními lézemi rozděluje. Maligní, v důsledku patologicky zvýšených nároků na glukózu jako energetický substrát pro proliferaci, vykazují další vzestup kumulované aktivity. Benigní, jejichž buňky v místě léze neproliferují, a tudíž energetické nároky jsou menší, vykazují buď setrvalou nebo

snižující se kumulaci FDG. Protože glukóza je energetickým substrátem pro buňky zhoubného i nezhooubného původu, není pomocí 18F-FDG možné spolehlivé rozlišení, při vysoké senzitivitě vyplývá z biochemické podstaty metody nízká specifická.

Dual time exam je pokus o takové rozlišení vycházející ze skutečnosti, že po 60-ti minutách společného průběhu míry kumulace 18F-FDG se křivky rozdělují. Díky biologické povaze neřízeného bujení kumulace nádorem dále roste a díky biologické povaze diferencované nezhooubné tkáně zánětu konzumpce 18F-FDG stagnuje nebo klesá. Metoda proto doporučuje provést vyšetření v 60. minutě a opakovat po dalších 30-ti minutách, tedy již v době odlišného průběhu křivek. Míru aktivity 18F-FDG akumulované v lézi kvantifikovat a porovnat. Přesně stanovit množství 18F-FDG ve vyšetřované lézi je však možno pouze náročnými postupy s opakovanými odběry krve, které jsou pro běžnou praxi nepoužitelné. Proto je běžně používán ukazatel semikvantitativní povahy označovaný SUV (*standardized uptake value*). Jeho hodnota je přímo úměrná počtu impulsů nad lézí, koeficientu aktivita/impulz a nepřímo úměrná aplikované aktivitě na kg hmotnosti a tělesné hmotnosti pacienta.

Na diagnosticky homogenním souboru 29 pacientek s karcinomem čípku, histologicky ověřeném, ve fázi před zahájením léčby, byl prokázán vzestup aktivity 18F-FDG kumulované tumorem o 9% při skenu opakovaném za 30 minut, ve srovnání s prvním skenem v 60. minutě. Na souboru 10 pacientek s lézí benigní etiologie, byl prokázán pokles aktivity 18F-FDG za stejných podmínek o 1%. Výsledky mohou být ovlivněny nedodrženými časy (60. a 90. minuta - při celotělových vyšetřeních).

Přesto nelze metodu doporučit jako spolehlivou k rozlišení benigního a maligního původu neznámé, histologicky nevyšetřené, léze. Důvodem je histologická variabilita nádorů, kdy zastoupení zánětlivých buněk v nádoru dosahuje různých hodnot, od několika málo procent až do desítek procent, s následnou možností falešně negativního *dual time exam* a různá míra proliferace nádorových buněk, i v rámci jedné diagnózy, s jejímž snižováním rovněž roste pravděpodobnost falešně negativního *dual time exam*, ba dokonce i PETu samotného. Přestože v rámci jedné diagnózy jsme ověřili správnost teoretického předpokladu, díky histologické variabilitě různých druhů nádorů a také v rámci jedné diagnózy nelze dosažený

výsledek generalizovat. Navíc je očekáváno brzké uvedení do klinické praxe nových PET farmak, mezi nimiž 18F-thymidin je proliferačním markerem a je tudíž schopen rozlišení benigní od maligní léze vysoce specificky na základě odlišné míry proliferace.

Využitím dual time exam bude spíše odhad agresivity růstu nádoru již známého, před zahájením léčby. Pro jednoduché a rychlé načtení hodnot SUV z dual time exam k vybrané diagnóze, ke statistickému zpracování a on-line zobrazení výsledků v intranetové aplikaci, k prokázání vzestupu nebo poklesu aktivity 18F-FDG, je nejvhodnější jejich zjištění přímo z nálezů v NIS.

K přístupu do konkrétní databáze je nutné použít příslušný ovladač ODBC (open database connector). Doporučený typ, licencovaný firmou OpenLink, pro databázi Progress se však zatím nepodařilo zprovoznit. Navzdory obecně komplikovanému přístupu do databáze Progress pokračuje hledání nejvhodnějšího řešení.

Prezentace :

Bartl, J : Jak na chyby ve formátu DICOM

Sborník XLIII. Dny nukleární medicíny - České Budějovice 1. - 3.11. 2006

Bartl,J : DICOM Modality Worklist for PET system SIEMENS Ecat Accel

Sborník EANM 2006 – Atény, Řecko 30.9. - 4.10. 2006

Bartl,J : DICOM Modality Worklist for PET system SIEMENS Ecat Accel

Sborník WFNMB 2006 – Seoul, Jižní Korea 22. - 27.10. 2006

Bartl,J : DICOM Modality Worklist for PET system SIEMENS Ecat Accel

Sborník XLIII. Dny nukleární medicíny - České Budějovice 1. - 3.11. 2006

Rozvoj PACS (provozní, výukový, komunikační) (projekt NS 5732)

Řešitel : MUDr.P.Andres

V rámci rozvoje PACS na MOÚ byl projekt v rámci FUNDIN – PIP navázán na další projekty s tematikou telemedicíny (1/projekt LF MU – vytváření výukových anonymizovaných atlasů PACS, 2/projekt AV ČR – komunikace mezi zdravotnickými zařízeními).

V rámci projektu došlo k další specifikaci jednotlivých modalit, které byly pilotně připojeny na archiv PACS na ÚVT, u kterých se bude realizovat elektronický podpis – první řešení v ČR, provoz s elektronickým podpisem vstoupil do rutinního provozu.

V návaznosti na projekt s LF MU byla vytvořena databáze cca 1000 archivovaných studií ze všech modalit radiodiagnostických a oblasti nukl.medicíny v PACS archivu určeného pro pre a post graduální výuku. Aplikacemi je postupně plněn samostatný výukový webový portál LF MU - viz www.portal.med.muni.cz.

O celém řešení bylo referováno na 3 tuzemských odborných sjezdech a 2 zahraničních sjezdech, k dispozici je písemná zpráva výroční konference RITM LF MU.

III. Program aplikovaných studií

Mammární karcinomy (projekt NS 5751)

Mammární kooperativní skupina MAKOS

Koordinátor : MUDr.K.Petráková

Do projektu MAKOS byly pro rok 2006 zařazeny čtyři dílčí úkoly

1. Vliv zavedení mammologického screeningu na skladbu operací prsu

Řešitelé : Fait, V., Chrenko, V., Sirotek, L.

Autoři zpracovali celkem soubor celkem 316 pacientek s nově diagnostikovaným karcinomem prsu z roku 2001, kdy ještě nebyl zaveden celostátní mammární screening a 341 pacientek z roku 2004, tedy již z doby zavedeného mammárního screeningu. Pacientky z roku 2001 měly výrazně více nově diagnostikovaných nádorů v časném stadiu pT1 (63% vs 48,7%), více prs šetřících parciálních mastectomií (30,2% vs 43,0%) a méně postižených axilárních uzlin. V exaktní první české studii tak byl ověřen teoretický předpoklad, že dobře zavedený mammární screening mění také strukturu léčby ve prospěch šetrnější terapie s dlouhodobě lepšími výsledky, což bude i dále monitorováno.

2. Exprese steroidních receptorů a amplifikace HER2 jako prediktor odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii u pacientek s karcinomem prsu - vlastní soubor MOU

Řešitelé : Obermannová R.,Palácová M.,Blažková S., Petráková K.

Autoři zpracovali retrospektivní soubor celkem 135 pacientek s karcinomem prsu léčených neoadjuvantní chemoterapií s následným chirurgickým zákrokem. V souboru bylo po neoadjuvanci dosaženo celkem 11,8 % kompletních patologických remisí. Pacientky s fenotypem ER-, PR-, HER2- dosáhly nejvíce kompletních patologických remisí, nejméně pacientky s fenotypem ER+ a/nebo PR+, HER2-. Pacientky s negativními steroidními receptory a dosažením kompletní patologické remise měly nejdelší celkové přežívání (OS < 0,002) a dobu do progresu (TTP < 0,002). Jde o klinicky pozoruhodný nález označující skupinu karcinomů s negativními steroidními receptory při negativitě HER2 za zjevně vhodnou pro neoadjuvantní chemoterapii.

3. Prediktivní faktory rezistence k tamoxifenu

Řešitelé : Petráková K, Nenutil R, Fabián P, Vyskočil J.

Autoři zpracovali ze souboru 80 pacientek léčených tamoxifenem u kterých došlo během léčby k histologicky verifikované lokální recidivě, druhostrannému karcinomu nebo diseminaci onemocnění 41 vzorků. U zbytku pacientek byl buď nedostatek materiálu nebo nesprávně stanovené SR metodou z cytosolu. Soubor byl srovnán se souborem konsekutivně sbíraných primárních karcinomů. Prediktivní hodnotu neměla velikost nádoru, postižení axilárních uzlin, grade ani exprese bcl2. Naopak, jako dobří prediktoři rezistence k tamoxifenu se ukazují být HER2 overexprese nebo amplifikace ($p=0,04$), PgR negativita nebo nízká pozitivita pod 50% ($p=0,02$) a cyklin D1 vyšetřený imunohistologicky nebo pomocí FISH ($p < 0,001$).

4. N-(amino) propeptid protokolagen 1 (P1NP) a kostní metastázy karcinomu prsu

Řešitelé : Nekulová M, Petráková K, Šimičková.

Autoři zpracovali 83 vzorků pacientek s karcinomem prsu s potvrzenou diseminací do skeletu a bez kostní diseminace. V séru stanovovali hladiny PN1P a beta-CRS (beta-Cross-Laps) a hodnotili parametry validity. Při referenční hodnotě P1NP 74ug/l jsme při specifitě 90,4%, 95%CI (84,5%, 96,4%) prokazovali přítomnost kostního rozsevu při senzitivitě 46,4%, 95%CI (33,4%, 59,5%), PV+:74,3, PV- :73,9 a RR:2,85, AUC 0,75912. Autoři uzavírají, že pro stanovení kostních metastáz u pacientek s karcinomem prsu není senzitivita PN1P dost vysoká, ale může být vhodná k monitorování léčebného efektu .

Prezentace :

Fait, V., Chrenko, V. Možnosti chirurgické terapie u pokročilého karcinomu prsu. 10. mammologické symposium. Praha, 1 prosince 2006, Abstrakt: Vybrané otázky z onkologie, Editor : J.Abrahánová, Galén, Praha, 2006, s. 131-132.

Chrenko, V., Fait, V. Změny ve spektru chirurgických operací po zavedení mamárního screeningu. Mammologický den, Plzeň 10.6.2006, Abstrakta, s.24

Chrenko, V., Fait, V.: Změny spektra operací pro časná stádia karcinomu prsu. Přednáška, 11. ročník odborného symposia na téma Onkologie v gynekologii a

mammologii. Brno, , 6.1-7.1.2006. Sborník přednášek s.47-50

Fait, V., Chrenko, V., Schneiderová, M., Sirotek, L.. Změny ve spektru operací prsu po zavedení mammologického screeningu. Klinická onkologie, přijato do tisku.

Palácová M, Obermannová R, Blažková S, Petráková K. Exprese steroidních receptorů a amplifikace HER2 jako prediktor odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii u pacientek s karcinomem prsu - vlastní soubor MOU, XIII. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov, Sborník přednášek str. 60-61.

Petráková K, Nenutil R, Fabián P, Vyskočil J . Progrese anebo disseminace mamárního karcinomu během adjuvantní léčby tamoxifenem, II. Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie, Olomouc 2006

Šimíčková M., Nekulová M., Petráková K., Pecen L.* , Staníček J., Frgala T., Pilný R., Dubská L., Valík D. Sérový N-terminální propeptid prokolagenu typu I (P1NP) a kostní metastázy karcinomu prsu. Český Krumlov 19.-21.10.06.

Sborník přednášek, abstrakt str. 114-115.

Zhoubné nádory trávicího traktu (projekt NS 5752)

Digestivní kooperativní skupina DIKOS

Koordinátor : doc. MUDr. R. Šefr, PhD

Řešitelé : doc. MUDr. I. Penka, CSc., MUDr. Z. Kaplan, MUDr. M. Šachlová, CSc., MUDr. R. Nenutil, PhD, MUDr. Fabian, MUDr. I. Kocáková, PhD, MUDr. P. Karásek, MUDr. K. Bolčák

Do projektu DIKOS byly pro rok 2006 zařazeny tři dílčí úkoly

1. Korelace PET/CT s peroperačním a histologickým nálezem pro dg. C 18-20, C 25

Korelace PET/CT s peroperačním a histologickým nálezem se pro jednotlivé diagnózy a lokality pohybuje v našem souboru rozmezí 69 až 100%, což odpovídá dosud publikovaným údajům. Přesné statistické zpracování výsledků probíhá ve spolupráci s Institutem biostatistiky a analýz MU Brno. Prezentace výsledků a publikační činnost (review pro Klinickou onkologii) v roce 2007.

2. Cirkulující nádorové buňky v periferní krvi a sentinelových mízních uzlinách

V roce 2006 probíhalo testování setů vhodných pro detekci případně kvantifikaci cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi. Celkem provedeno 5 kompletních vyšetření nutných ke kalibraci a kontroly funkčnosti setů (AdnaTest). Testovaný kit se jeví vhodný, ověříme v průběh roku 2007 na souboru minimálně 12 pacientů.

3. Chromogranin A u karcinoidu

Program je zaveden do rutinní praxe, hrazen zdravotní pojišťovnou. Vyhodnocení po rozšíření souboru včetně publikace plánováno na 2007.

Prezentace :

Šefr R, Penka I, Kaplan Z, Ondrák M, Silák J : Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in colon cancer. 4th Croatian Congress of Surgery with International Participation. May 24th - 27th, 2006, Zadar, Croatia

Gynekologické zhoubné nádory (projekt NS 5753)

Gynekologická kooperativní skupina GYKOS

Koordinátoři : MUDr. A.Dorr,CS., MUDr.M.Bláha (změna od XII.06),

Do projektu GYKOS bylo pro rok 2006 zařazeno pět dílčích úkolů

1. Nové prognostické faktory u C 53

Řešitelé : MUDr.Mouková, MUDr.R.Nenutil,PhD

Cílem úkolu bylo zhodnocení prognostických faktorů u karcinomu děložního čípku za účelem predikce šíření mimo jeho hranice a upřesnění rizika rekurence.

Byly vypracovány metodiky stanovení parametrů p21, cdk4, p53, p16, p27 a zvolena kritéria pro výběr pacientek. Do pokračující klinické studie bylo dosud zařazeno 20 pacientek.

2. Aplikace MTT testů chemoresistence in vitro u karcinomu vaječníků

Řešitelé : MUDr. Otevřel., MUDr. Novák

Cílem je zhodnocení možností provádění a využívání MTT testů chemoresistence u recidivujících ovariálních tumorů, predikce léčebné odpovědi a modifikace výběru II. a další linie chemoterapie.

Byla vypracována metodiky miniinvazivního odběru vzorku k MTT hodnocení. Byl zpracovány vzorky upravenou laboratorní metodikou za účelem zvýšení výtěžnosti metody Bylo provedeno retrospektivní zhodnocení 88 případů podle stanovených kritérií, je prováděna statistická analýza celého souboru.

Publikace, přednášky:

-

3. Diagnostika rekurence karcinomu vaječníků pomocí PET a sérových markerů

Řešitel : MUDr. M. Nekulová,CSc.

Byla vypracována metodika a zahájen sběr dat. Dosud bylo zařazeno 87 vzorků krve 78 nemocných současně vyšetřených pomocí PET a CA 125. Vzorky byly současně uloženy k další analýze kalikreinu.

4. Detekce sentinelových uzlin u karcinomu hrdla děložního

Řešitel : MUDr. A. Dörr, CSc.

Byly zhodnoceny výsledky u operovaných 98 pacientek značených radionuklidem Nannocol. Prokázání statisticky významného vztahu positivity sentinelových uzlin s hloubkou nádorové invaze, s invazí do lymfovaskulárního prostoru a s gradingem nádoru.

5. Sentinelové uzliny a jejich značení pomocí hysteroskopie u karcinomu endometria

Řešitel : MUDr. Feranec

Zkoumána možnost mapování lymfatik a biopsie sentinelové uzliny u pacientek s karcinomem endometria s využitím předoperační hysteroskopie k vizualizaci tumoru a subendometriální aplikaci radiokoloidu a Patent Blau.

Byla vypracována metodika a technické detaily postupu značení sentinelové uzliny. Projekt byl schválen etickou komisí. Dosud bylo zařazeno a vyšetřeno 6 pacientek splňujících vstupní kritéria projektu.

Publikace a přednášky:

Mouková, L., Holanová, E, Zatočil., P., Dörr, A.: Karcinom děložního hrdla – osud v rukou lékaře? In: Edukační sborník, XXIX Brněnské onkologické dny, 2006, s. 164-5 ISBN 80-86793-05-02

Dörr A., Bláha M., Mouková L., Holanová E., Sedlačková K., Kozák M., Pešová Z.: Záchyt karcinomu děložního hrdla je problém veřejný, Edukační sborník, XXX Brněnské onkologické dny, 2006,

Košťáková Š., Ondrová B., Novotný T., Doleželová H., Bolčák K., Mouková L.: Význam PET v predikci léčebné odpovědi karcinomu cervixu u pacientek léčených radioterapií, Edukační sborník, XXX Brněnské onkologické dny, 2006,

Dörr, A., Otevřel P., Staniček J., Mouková L., Feranec R., Bláha M.: Pelvic nodes detection - crucial importance for management of cervical cancer treatment and accuracy of surgical radicality .UICC World Cancer Congress on Cancer Detection and Treatment , Washington, DC., USA , 2006

Otevřel.P.: MTT test, možnosti využití v léčbě pokročilého ovariálního karcinomu. Regionální seminář gynekologů, Brno, 9.6.2005

Dörr, A.: Výsledky rozboru léčby cervikálního karcinomu podle celosvětové statistiky Annual Report, In: Postupy lege artis II, Sborník celostátní konference ČGPS ČLS JEP a SSG ČR, Hradec Králové 27-29.5. 2005, s. 162-169

Dörr, A., Bláha, M., Mouková, L., Holanová, E., Sedlačková, K., Kozák, M., Pešová, Z.: Záchyt karcinomu děložního čípku je problém veřejný. In: Edukační sborník, XXIX Brněnské onkologické dny, 2006, s. 164 ISBN 80-86793-05-0

Kozák, M., Dörr, A.: Kazuistika terapie karcinomu děložního hrdla ve 12. týdnu těhotenství In: Edukační sborník, XXIX Brněnské onkologické dny, 2006, s. 169 ISBN 80-86793-05-02

Dörr, A., Feranec, R., Kolářová, H., Otevřel, P., Sedlačková, K.: Sentinel node detection in early stage of cervical neoplasia In: Abstract books Human papillomavirus infection and global prevention of cervical cancer Eurogyn 2006, Paris, p.123

Dörr, A.: Výsledky rozboru léčby cervikálního karcinomu podle celosvětové statistiky Annual Report In: Moderní gynekologie a porodnictví, 15,1, 2006, s.162-169

Dörr, A., Otevřel, P., Staniček, J., Mouková, L., Feranec, R., Bláha, M.: Pelvic node detection – crucial importance for management of cervical cancer treatment and accuracy of surgical radicality In: Abstracts book of the UICC World Cancer Congress 2006, July 8-12, 2006, Washington, DC, p. 252

Dörr, A., Bláha, M., Kozák, M., Mouková, L., Holanová, E.: 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer.

Int J Gynecol Obstet, vol. 95, suppl. 1, 2006, 230 p., ISSN 0020-7292

Dörr, A., Bláha, M., Mouková, L., Feranec, R., Holanová, E. Radical hysterectomy and sentinel node detection after neoadjuvant (Iphosphamide, Carboplatin) chemotherapy of advanced cervical cancer. In: Abstract book No 1, XVIII FIGO World Congress of Gynecology and Obstetric, Kuala Lumpur, 2006, 132-133.

Dörr, A., Bartoňková, H, Staníček, J., Mouková, L., Feranec, R., Bláha, M., Brányik, K. Pelvic nodes detection crucial importance for management of cervical cancer treatment and accuracy of surgical radicality. (přijato do tisku – Medimond)

Feranec R., Otevřel P., Frgala T., Dörr A.: Mapování lymfatik a biopsie sentinelové uzliny u pacientek s karcinomem endometria. Review. Klinická onkologie – v tisku.

Urologické zhoubné nádory (projekt NS 5754)

Urologická kooperativní skupina UKOS

Koordinátor : MUDr. I Čapák

Do projektu UKOS byly pro rok 2006 zařazeny čtyři dílčí úkoly

1. Možnosti FDG-PET v diagnostice a léčbě testikulárních nádorů

Koordinátor: MUDr. Z. Řehák

Cílem úkolu je hodnocení viability residuálních postterapeutických infiltrátů tumoru varlete v retroperitoneu. Tyto infiltráty jsou podle literárních údajů ve 48% tvořeny fibrosou, 37% teratomem a jen v 15% viabilním tumorem. Může PET zpřesnit indikaci k náročnému a mnohdy mutilujícímu výkonu jakým je retroperitoneální lymfadenektomie?

V MOÚ bylo do 30.9.2006 evidováno 548 PET vyšetření u 496 pacientů s diagnózou zhoubného nádoru varlete. Do studie bylo zahrnuto 18 pacientů s residuálním retroperitoneálním infiltrátem po systémové chemoterapii (klinické stadium IIA-IIC) u nichž byl proveden předoperační CT a PET staging a retroperitoneální lymfadenektomie byla provedena do 90 dní po PET.

Ve 3 případech se jednalo o seminom , v 15 případech o histogeneticky jiný typ nádoru společně označovaný jako neseminom. PET pozitivní a PET negativní nálezy byly srovnány s histologickými nálezy. V infiltrátech pozitivních na PET byla zachycena viabilní residua seminomu i neseminomu, dále zánětlivá celulizace v retroperitoneální fibróze. PET negativní nálezy byly histologicky představovány mikrometastázami teratokarcinomu, zralým teratomem a fibrózou. PET negativita u non–seminomu nemůže být důvodem neprovedení retroperitoneální lymfadenektomie na rozdíl od seminomu, PET pozitivita u seminomu může být falešná, třeba může jít o inflamatorní retroperitoneální fibrózu.

Role 18FDG-PET jak při stagingu, tak při predikci viability reziduí po onkologické léčbě či follow up tím není definitivně stanovena. Soubor bude s narůstajícím počtem retroperitoneálních lymfadenektomií v MOÚ průběžně dále rozšiřován. Na zhodnocení čeká soubor 80 nemocných s komplexním PET/CT předléčebným stagingem (včetně CT plic), zde však není organický korelát nálezu v retroperitoneu (histologický nález). Stav by bylo možno změnit přehodnocením indikace retroperitoneální lymfadenektomie jako primárního výkonu, proti tomu však hovoří

relativně vysoká úspěšnost onkologické léčby. Hodnocení souboru 13 nemocných s podezřením na relaps (negativní konvenční diagnostika a vzestupná kinetika markerů) se týká role F-FDG-PET při follow up.

2/ Kostní markery v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prostaty

Řešitel : MUDr. M. Nekulová, CSc.

Kostní markery, zejména beta- cross laps (b-CTX) a N- terminální propeptid kolagenu typu I (P1NP) jsou novými doporučeními EGTM navrženy k hodnocení efektu léčby kostních metastáz, dále mohou poskytnout doplňkovou informaci v případě diagnostických rozpaků u suspekce na kostní metastatický proces.

Do souboru bylo zařazeno 55 nemocných s diagnózou ca prostaty a podezřením na kostní rozsev, bylo provedeno srovnání se souborem bez kostních metastáz, v úvahu vzata korelace se scintigrafií skeletu , RTG vyšetřeními a hladinou PSA. P1NP vykazuje vysokou specifitu pro osteoplastické i smíšené metastázy, je označován jako marker novotvorby kostí, při referenční hodnotě 62,6 ug/l a specifitě 90% byla senzitivita 66,7%. Beta-CTX je markerem kostní resorbce. Při referenční hodnotě 0,380 ug/l a specifitě 90% byla senzitivita 66,7%. Kostní markery prokázaly dostatečnou validitu k průkazu kostních metastáz karcinomu prostaty (vyšší u P1NP což souvisí s jejich častější osteoblastickou a smíšenou charakteristikou).

V souboru 26 pacientů s kostními metastázami karcinomu prostaty byla dále mimo výše uvedenou problematiku stanovena správná pozitivita telopetidu kolagenu typu I – ICTP (70% při referenční hodnotě 5,3 ug/l). Jedná se o vysoce specifický marker kostní degradace v metastázách , respektive patologické resorbce kostí za účasti metaloproteinázy 9.

3/ Karcinom ledviny a MTT test chemorezistence

Řešitel : MUDr. I. Čapák

Úkol si klade za cíl stanovit vlastnosti tkáňových kultur RCC a jeho subtypů vystavených účinku cytostatik in vitro, stanovení jejich chemorezistence a selekci

vhodných kultur pro klinický a základní výzkum v korelaci s dalšími biologickými parametry karcinomu ledviny. Bylo provedeno 78 MTT testů chemorezistence u RCC (primární nádor., lokální recidiva, metastáza). Ve 22,5% byla tkáňová kultura citlivá na 1 či více testovaných cytostatik, rezistence byla zjištěna v 36% , ve 41,5% bylo vyšetření nevytěžné pro uhynutí kultury, nevhodnost vzorku ke kultivaci či z jiné příčiny.

Změna laboratorní metodiky v polovině roku 2006 zvýšila počet úspěšných kultivací a výtěžnost vyšetření, do značné míry však komplikuje interpretaci a srovnání starších výsledků s novými. V současné době jsou výsledky MTT testů u RCC stratifikovány a kategorizovány ve vztahu ke gradingu, stagingu a histologickému typu tumoru. Soubor je v této podobě připraven k prezentaci, zatím bez klinického výstupu a jeho další osud je závislý na metodice laboratorního komplementu. Je zajímavé, že počet chemosenzitivních RCC zhruba koreluje s v literatuře publikovaným počtem léčebných odpovědí u disseminovaného RCC léčeného paliativní chemoterapií (např. Hrusheski et al.)

4/ Metalické termoexpandibilní stenty v léčbě striktury ureteru jako komplikace kolorektálního karcinomu a gynekologických malignit

J. Doležel

Striktura ureteru u onkologických onemocnění představuje poměrně častý, závažný medicinský a potažmo i ekonomický problém. Nově zařazený projekt je zaměřen na řešení funkčních komplikací především pánevních malignit . Klade si za cíl ověřit efektivitu metalických stentů ze slitiny niklu a titanu. Tyto stenty se vyznačují *tvarovou pamětí* reagující na teplotu okolí. Mezi jejich výhody patří dobrá tolerance ze strany nemocných , relativní jednoduchost zavedení, předpokládaná *životnost kolem 10 let*. Další indikací inzerce těchto stentů jsou subvezikální obstrukce (hypertrofie prostaty, striktura močové trubice). Výhoda je spatřována u onkologických nemocných s delší, leč nejistou prognózou a u těch, kteří jsou neschopni postoupit operační rekonstrukci pro vysoké riziko. Metalický stent může v řadě případů eliminovat nutnost zevní močové derivace (nefrostomie) a opakované instrumentace v močových cestách (JJ stenty).

V r. 2006 bylo na MOÚ Brno provedeno první zavedení stentu Memocath v České republice. Doposud byly zavedeny 4 stenty u 4 pacientů. Do června 2007 je počítáno

s nábořem asi 10-ti členného souboru. Je předpoklad, že poměrně vysoká pořizovací cena (1600 Euro), bude vyvážena dlouhodobou životností stentu s minimálními nebo žádnými komplikacemi.

Publikace a prezentace :

Nekulová M., Čapák I., Pecen L., Šimíčková M., Frgala T., Pilný R. Valík D. : Kostní markery v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prostaty.

Labor Aktuell 03/06, 2006, str. 14-16

Řehák Z., Kocák I., Fabián P., Lovas P., Čapák I., Bolčák K., Nižňanská V., Staníček J., Bartl J.: F-FDG-PET jako prediktor viability reziduálního retroperitoneálního infiltrátu po chemoterapii u nemocných s germinativním tumorem varlat. XLIII. Dny nukleární medicíny s mezinárodní účastí, České Budějovice, 1.-3. listopad 2006, sborník.

Nekulová M., Čapák I., Pecen L., Šimíčková M., Frgala T., Pilný R. Valík D. : Kostní markery v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prostaty.

XXX. Brněnské onkologické dny , 11-13. 5. 2006, Sborník

Nekulová M., Šimíčková M., Čapák I.: Metastatický karcinom prostaty a kostní markery, Krajský seminář Severomoravského kraje, Žermanice 13. 6. 2006

Nekulová M., Čapák I., Pecen L., Šimíčková M., Frgala T., Pilný R. Valík D. : Kostní markery v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prostaty. Sborník

II. Konference prediktivní a diagnostické onkologie , Olomouc 7.-9. 12. 2006

Maligní melanom (projekt NS 5755)

Melanomová kooperativní skupina MEKOS

Koordinátor : MUDr.V.Fait,CSc.

Do projektu MEKOS byly pro rok 2006 zařazeny tři dílčí úkoly

1. Analýza falešné negativity bioptovaných sentinelových uzlin

Řešitel : MUDr. V. Fait,CSc.

Cílem projektu je pomocí retrospektivní analýzy souboru pacientů se sentinelovou biopsií pro kožní maligní melanom zhodnotit prognostickou hodnotu sentinelové biopsie a její falešnou negativitu v našich podmínkách. Proběhla analýza souboru pacientů operovaných v letech 1994-2005. Soubor má 909 pacientů, představuje největší soubor v České republice a je dostatečně kompetitivní i v mezinárodním kontextu. Jeho podrobná statistická analýza potvrzuje s vysokou statistickou průkazností spolehlivou prognostickou roli výsledku sentinelové biopsie.

Falešná negativita na základě počtu regionálních relapsů činí 10,6% , respektive 2,4% (podle způsobu analýzy). Tato hodnota odpovídá nálezům z podobně koncipovaných studií. Probíhá histopatologické přehodnocení falešně negativních uzlin, které předběžně ukazuje, že zhruba v polovině případů původní uzlina obsahovala drobnou metastázu. Okamžitým konkrétním výstupem je změna způsobu patologického zpracování sentinelových uzlin. V přípravě je publikace pro zahraniční časopis.

2. Hledání markerů prognózy u pacientů s diseminovaným maligním melanomem a difference v expresi sérových proteinů u pacientů s chemosenzitivním a chemoresistentním onemocněním.

Řešitel : MUDr. R. Lakomý

Na základě zkušeností z klinické praxe je zřejmé, že prognóza pacientů s diseminovaným maligním melanomem je velmi vážná, onemocnění je obecně považováno za chemo a radioresistentní a i multimodální přístup zahrnující kombinovanou chemo(imuno)terapii, radioterapii a paliativní chirurgické výkony špatnou prognózu pacienta většinou významně neovlivní.

Přesto se mezi nemocnými s diseminovaným maligním melanomem objevují jedinci s relativně lepší prognózou, bez tendence k časně multiorgánové diseminaci, jejichž

nádor je relativně chemosenzitivní a u kterých může systémová terapie prodloužit bezpříznakové období i dobu celkového přežití. Na druhé straně jsou naopak jedinci s evidentně chemoresistentním onemocněním, progredující i přes intenzivní kombinovanou systémovou léčbu a umírající na rychlou progresi během několika měsíců.

Podle klinických průběhů onemocnění je evidentní, že podstata rozdílné odpovědi k systémové léčbě (chemoterapie, imunoterapie) nesouvisí s léčbou samotnou, nýbrž je podmíněna rozdílným biologickým chováním vlastního nádorového onemocnění a složitými vztahy mezi hostitelem a nádorem.

Cílem práce je jednak sledování známých prognostických faktorů, dále pokus o nalezení nových na základě vyšetření exprese sérových proteinů a nalezení diferencí ve skupinách s relativně dobrou a špatnou prognózou a kontrolou. Dále je sledována korelace mezi stupněm exprese vytipovaných proteinů s odpovědí na I. linii chemoterapie, tedy predikce léčebné odpovědi a vztah mezi stupněm exprese vytipovaných proteinů, dobou do progresu a celkovým přežitím.

U pacientů s nově diagnostikovaným diseminovaným maligním melanomem jsou sledovány následující prognostické faktory:

- 1) v době diagnostiky (pohlaví, věk, lokalizace, přítomnost ulcerace, Breslow, pozitivita SNB, podání adjuvantní imunoterapie INF alfa)
- 2) v době prokázané diseminace onemocnění - a) klinické faktory (PS, váhový úbytek, rozsah a lokalizace MTS), b) laboratorní parametry (FW, CRP, LD, flowcytometrie - CD4/CD8lymf., NK bb, protein S100B), c) hodnocení SELDI - exprese sérových proteinů s cílem zachycení diskrepance mezi pacienty s relativně příznivým průběhem onemocnění a naopak (např. protein S100B, survivin - antiapoptotický protein produkovaný ve fázi G2/M buněč. cyklu, 5-S-cysteinyldopa - prekurzor melaninu)
- 3) zhodnocení parametrů jako v bodě 2 po 3 sériích I.linie paliativní chemoterapie.

V současné době probíhá nábor pacientů a sběr vzorků k vyšetřením 20 pacientů s diseminovaným MM připraveno k vyšetření metodou SELDI ze séra, u 5 pak SELDI z metastáz. Soubor je také nově rozšiřován o případy zatím nediseminované, ale s vysokým rizikem relapsu pT4NXMO, pTXN1-3M0 a připravován pro proteomické vyšetření metodou SELDI TOF po operaci a při relapsu a nalezení možných diferencí

versus skupina bez relapsu. Proteomické vyšetřování metodou SELDI bude zahájeno v lednu 2007.

3. Příprava tumor infiltrujících lymfocytů u pacientů s metastázujícím melanomem.

Doc.MUDr.J. Michálek,CSc.

Cílem studie je využití protinádorového potenciálu expandovaných tumor infiltrujících lymfocytů (TIL) u pacientů s metastatickým melanomem. Účinnost adoptivního převodu T lymfocytů při léčbě nádorového onemocnění byla prokázána u laboratorních zvířat a v současné době také u pacientů s metastatickým melanomem.

Nejprve byla prospektivně validována expanze lymfocytů periferní krve pěti zdravých dárců a poté šesti pacientů s metastázujícím melanomem. Lymfocyty zdravých dárců byly in vitro stimulovány nádorovým antigenem. Stimulované aktivované klony T lymfocytů exprimují celou řadu aktivačních markerů, včetně interferonu gama a lze je tudíž separovat pomocí imunomagnetických interferon gama pozitivních kuliček. Takto separované aktivované T lymfocyty byly stimulovány vysokými dávkami IL-2 (1000U/ml) 2-3x týdně a jednorázově phytohemaglutininem (10ug/ml) in vitro za přítomnosti tzv. „feeder cells“. Na základě těchto úspěšných experimentů bylo přistoupeno k expanzi TIL u 7 pacientů s metastázujícím melanomem pomocí stejného postupu (6x lymfatická uzlina, 1x primární ložisko kožního melanomu).

Úvodní počet separovaných T buněk činil $0,56 \pm 0,13 \times 10^6$ a po 4-týdenní expanzi dosáhl počtu $214,00 \times 10^6 \pm 103,46 \times 10^6$. V případě šesti nádorem infiltrovaných uzlin pacientů s metastázujícím melanomem byla expanze TIL zahajována s počtem buněk $2,9 \times 10^6$ - $15,8 \times 10^6$ a po 5-7 týdenní kultivaci došlo k nárůstu na $27,0 \times 10^9$, $56,0 \times 10^9$, $3,4 \times 10^9$, 45×10^9 , 28×10^9 a 22×10^9 TIL buněk. Při kultivaci TIL z primárního ložiska nádoru došlo pouze k minimálnímu nárůstu z $2,2 \times 10^6$ na $12,1 \times 10^6$ TIL po 8-týdenní kultivaci.

Ve všech 7 případech byl proveden endotoxinový test a vyšetření sterility bezprostředně před hlubokým zmrazením přípravku TIL. U třech posledních pacientů byla provedena doplňující vyšetření. Jednalo se o rozšířené mikrobiologické vyšetření na přítomnost Mycoplasma sp., HBV, HCV, Parvoviru B19, HIV, mykobakterie. Pro sledování případných cytogenetických změn v průběhu kultivace

bylo provedeno cytogenetické vyšetření periferní krve pacientů před začátkem kultivace a onkocytogenetické vyšetření expandovaných TIL

Takto připravený preparát expandovaných TIL lze snadno připravit in vitro a je možno jej využít klinicky jako buněčná imunoterapie metastazujícího melanomu.

Expanze TIL je tedy v podmínkách správné výrobní praxe CBI možná

Expandované TIL uchovávají specifický cytotoxický potenciál vůči melanomovým buňkám

Testy jakosti i bezpečnosti byly splněny bez výhrad.

Studie byla schválena SÚKLeM 13.10.2006

Připravuje se klinická studie.

Publikace:

Horák, R., Dudová, S., Vidláková, P., Očadlíková, D., Hanák, L., Fait, V., Kocák, I., Žaloudík, J., Michálek, J.: Exaktní popis specifity individuálních klonů nádorově reaktivních T lymfocytů pomocí stanovení aminokyselinové sekvence beta řetězce T lymfocytárního receptoru u pacientů s maligním melanomem. XXX. Brněnské onkologické dny s XX. Konferencí pro sestry a laboranty, 11.-13 května 2006. Edukační sborník, s. 303-306.

Michálek, J., Smejkalová, J., Vidláková, P., Očadlíková, D., Kovářová, L., Hanák, L., Hájek, R., Penka, M., Oltová, A., Kocák, I., Fait, V., Žaloudík, J.: Využití tumor infiltrujících lymfocytů u pacientů s metastazujícím melanomem. XXX. Brněnské onkologické dny s XX. Konferencí pro sestry a laboranty, 11.-13 května 2006. Edukační sborník, s. 306-307

Michálek J., Matějková E., Smejkalová J., Vidláková P., Stejskalová A., Kocák I., Fait V. Využití tumor infiltrujících lymfocytů u pacientů s metastazujícím melanomem. Klinická onkologie, odesláno do redakce.

Odesláno v anglické verzi do časopisu Journal of Immunology

Sarkomy měkkých tkání (projekt NS 5756)

Sarkomová kooperativní skupina SAKOS

Koordinátor : prof. MUDr. J.Žaloudík,CSc.,

Řešitelé : MUDr.M.Ondrák, MUDr.M.Bláha, MUDr.R.Nenutil,PhD, doc. MUDr.

P.Šlampa, CSc., MUDr. Růžičková, MUDr.K.Bolčák, MUDr.H.Bartoňková

Do projektu SAKOS byly pro rok 2006 zařazeny čtyři dílčí úkoly

1. Organizace péče o nemocné se sarkomy - diagnostika funkčnosti systému péče

Z komparativních analýz provedených v roce 2005 s využitím populační databáze NOR v systému SVOD a databáze NIS MOÚ vyplynuly významně lepší léčebné výsledky u nemocných se sarkomy léčených na specializovaném pracovišti MOÚ ve srovnání s průměrem republiky a regionu.

Zabývali jsme se analýzou rozdílů v léčebných postupech mezi pracovištěm specializované péče a pracovišti se standardní péčí, kterou lze pro relativně nízkou frekvencí sarkomů mnohde nazvat i nahodilou. Pouze 15 nemocnic v České republice totiž vykazuje více než 2 léčené sarkomy měkkých tkání trupu a končetin (MKN C49) ročně, pouze 8 nemocnic více než 4 případy. Ještě horší je situace u sarkomů retroperitonea a dutiny peritoneální (MKN C48), kde jen 5 nemocnic vykazuje léčbu více než 1 případu ročně a pouze 2 zařízení mají ročně zkušenost s více než 2 těmito sarkomy . Tato nesmírná disperze péče a tedy i zkušenosti je navíc zesilována histogeeeticky velmi heterogenní povahou sarkomů s různým typem růstu a různým stupněm biologické agresivity.

Jakkoli jde o vzácnější onkologické diagnózy, činila podle údajů NOR absolutní incidence v České republice v roce 2003 243 nových případů sarkomů měkkých tkání trupu a končetin (C49) a 107 případů sarkomu retroperitonea a dutiny břišní (C48). Těchto celkem 350 případů představuje nemalý soubor nemocných, který by bylo možno v zájmu co nekvalitnější diagnostiké a léčebné rozložit do několika málo specializovaných pracovišť napříč republikou. Problém zlepšení péče o nemocné se sarkomy tedy nespočívá jen v hledání a ověřování nových diagnostických a léčebných postupů, nýbrž především ve změně organizace a koncentraci nemocných se sarkomy na připravená pracoviště. Teprve na nich má smysl rozpracovávat a vyhodnocovat postupy zlepšující výsledky. Nesporně k nim patří celé procesní schéma od adekvátní mininvazivní core cut biopsie, přes zdokonalování fenotypické kategorizace a stratifikace rizika recidiv a metastazování až po specifické léčebné

kombinace jako jsou předoperační intraarteriální chemoterapie u vodných typů sarkomů končetin, předoperační radioterapie u objemných nádorů retroperitonea nebo postresekční intersticiální brachyradioterapie v lůžku po odstranění nádoru.

Diskusi o komplexu organizačních, diagnostických i léčebných opatření jsme zahájili prezentacemi na zahraničních fórech, abychom konfrontovali své představy s vyspělými mezinárodními zkušenostmi dříve než budeme návrh systému péče publikovat v České republice, s čímž je počítáno během roku 2007, a především v kontextu s rozpoznáním role a strukturací onkochirurgie jako profilace chirurgických oborů. Poměrně zásadní byla z tohoto hlediska naše diskuse s prof. Valley Templem z Calgary na Světovém kongresu společností chirurgické onkologie konaném letos v Indii, kde jsme prezentovali druhý největší uceleně analyzovaný soubor nemocných se sarkomy.

2. Předoperační radioterapie objemných sarkomů retroperitonea a dutiny břišní

Jde o postup, který má umožnit či facilitovat náročný chirurgický výkon vlivem radioterapie nejen na samotné nádorové buňky, nýbrž také na endotelie novotvořených kapilár v nádoru a patrně i omezit krvácení z nádoru během operace. Tento postup je již ve světě prováděn za pomoci expandérů odtahujících střevní kličky po dobu ozařování. V roce 2006 jsme takto léčili a úspěšně operovali mezi jinými dva případy sarkomů vyrůstajících do dutiny břišní o váze resekátů 6 kg a 10,3 kg, které byly jinde označeny jako inoperabilní a inkurabilní. U takto objemných nádorů podle našeho názoru instalace expandéru nezbytná, neboť nádor sám svou expanzí střevní kličky odtlačí. Ověření významu tohoto postupu vyžaduje větší soubor nemocných, což souvisí s opatřeními uvedenými v úkolu 1.

3. Postresekční intersticiální brachyradioterapie u sarkomů měkkých tkání trupu a končetin.

Jde o postup aplikovaný již u více než dvou desítek nemocných, který má významně snížit riziko lokálních recidiv. Ve velké části případů jde ostatně již o řešení recidiv přicházejících z jiných pracovišť po primární operaci. Při rozšiřování souboru hledáme vhodné indikace také s ohledem na anatomické souvislosti. Nutno zdůraznit, že jsme dosud nezaznamenali výraznější komplikace, a to ani při umístění vodičů pro brachyterapii pod kožní laloky či dokonce koží štěp, pochopitelně s protekcí svalovou vstvou.

4. MTT testy chemoresistence u sarkomů měkkých tkání

Sarkomy jsou spolu s nádory vaječníků a ledvin v MOÚ jednou z hlavních testovaných skupin, zejména pro svou vysokou primární chemoresistenci. V roce 2006 jsme řešili metodické změny i novou organizaci provádění a interpretace MTT testů. V novém systému je během roku 2006 testováno kolem 20 vzorků, první interim analýzu s předběžnými závěry plánujeme při dosažení počtu 30 vzorků zhruba v závěru pololetí 2007. Již nyní je zřejmé, že výtěžnost testů je u sarkomů závislá na histotypu, liposarkomy budou z hodnocení patrně zcela vyloučeny jako biologicky, ostatně i indikačně pro testy chemoterapie nevhodné. Další řešenou otázkou je stabilita in vitro chemosenzitivity při hodnocení více vzorků jednoho případu v čase, tedy následných recidiv metastáz, což bude dosažitelné pouze u menší části případů.

Prezentace :

Zaloudik, J. : Improving the management of soft tissue sarcomas.

World Congress of WFSOS / IASO, Varanasi, India, 21.-24.9.2006

Zaloudik J.: Improving the management of sarcomas of trunk and extremities

I. Russian-Czech Medical Forum, Oncology Section,

Chelyabinsk, Russia, 21.-23.11.2006

Klinická genetika hereditárních nádorových syndromů (projekt NS 5757)

Řešitelé: MUDr.L.Foretová,PhD., MUDr. V.Vítová

Psychosociální aspekty genetického testování

Studie se zaměřila na výzkum žen testovaných pro dědičnou etiologii nádorů prsu nebo ovaria. 130 žen, pacientek i zdravých, bylo osloveno dotazníky zahrnujícími parametry jako deprese, obava z rakoviny, sociální podpora, motivace a postoje k testování, životní styl, preventivní péče, preventivní operace apod.

Dotazníky jsou nyní zpracovávány ve spolupráci se statistikem. Bude hodnocen pohled pacientek na význam testování, jejich nejčastější motivace k vyšetření a dále především vliv genetického testování na psychický stav vyšetřovaných žen. Velmi důležitou součástí je i hodnocení úrovně preventivní péče.

Publikace :

Foretova L, Petrakova K, Palacová M, Kalabova R, Navratilova M, Lukesova M, Vasickova P, Machackova E, Kleibl Z, Pohlreich P. Genetics and preventive services for hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic.

Hereditary Cancer in Clinical Practice 2006 4(1), p.3-6.

Petráková K, Palácová M, Foretová L, Kalábová R. Algoritmus preventivních vyšetření u geneticky podmíněných malignit.

Klinická onkologie 19, Supplement 2006. s.88-90

Foretová L, Navrátilová M, Petráková K, Palácová M, Kalábová R, Puchmajerová A, Novotná K, Sedláček Z. Kasuistiky Li-Fraumeni syndromu: diagnostické a preventivní možnosti. Klinická onkologie 19, Supplement 2006. s. 85- 87

Plevová P, Šilhánová E, Foretová L. Vzácné hereditární syndromy s vyšším rizikem vzniku nádorů. Klinická onkologie 19, Supplement 2006. s. 68-75.

Goetz P, Foretová L, Puchmajerová A. Hereditární etiologie nádorových onemocnění a význam genetického poradenství a testování v onkologii.

Klinická onkologie 19, Supplement 2006. s. 44- 47.