

Souhrnná roční zpráva o řešení
Výzkumného záměru
Masarykova onkologického ústavu v Brně

MZ 00020980501

v roce 2003

Předkládají :

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

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

1. Zadání a průběh řešení výzkumného záměru (VZ) v roce 2003 a další výhledy :

Institucionální VZ Masarykova onkologického ústavu, který pokrýval podle svého zadání **hlavní oblasti diagnostické, léčebné a preventivní onkologie** a zahrnoval již také **nové rozvojové projekty v přípravě na další období**, se dařilo v roce 2003 naplňovat novými poznatky i technologiemi. Tomu odpovídala široká publikační a přednášková činnost u nás i v zahraničí. V Masarykově onkologickém ústavu jsme programové cíle VZ dále směřovali pro užší **propojení s aktuálními potřebami onkologické praxe**.

Prostředky VZ představovaly cennou **podporu pro celoustavní inovační program TRANSIT** ((Translational Research And New Strategy Implementation Trust), který byl formulován již v roce 2002, je zaměřen na propojování vědy a praxe a postupné vytěžování výzkumných výsledků pro klinické aplikace. Tento program představuje v současnosti základní výzkumnou linii institucionálně podporovaných projektů v Masarykově onkologickém ústavu a znamená vytváření kooperativních týmů, v nichž jsou zastoupeny laboratoře i klinické provozy a které mají zajišťovat převádění výsledků výzkumu do praxe. Praktickým výstupem je také akceptace a pasportizace nové metody zdravotním pojišťovnami, neboť je zřejmé, že jejich financování nelze po uvedení do praxe dále hradit z výzkumných prostředků. Ovšem i v této fázi pokračuje jejich validace klinickou praxí, což je etapa, nezdědka výzkumnými projekty opomíjená. V této etapě je zvláště zhodnocena výhoda Masarykova onkologického ústavu jako zařízení komplexní onkologické péče, v němž lze potřebnou **provázanost experimentálních výsledků, klinického hodnocení a medicínské praxe** zajistit jedním managementem pod jednou střešou.

V roce 2003 byla nadále dodržována **struktura výzkumného záměru** o 6 programech, z nichž každý zahrnuje několik dílčích projektů, účastnících se na naplňování cíle programu a VZ jako celku. Programy mají své koordinátory, projekty své vedoucí. V roce 2003 byly v omezené míře zaváděny čtyři rozvojové projekty s perspektivou rozvinutí v dalších letech, tři z nich byly v omezené míře podpořeny také z prostředků VZ. Jde o projekty genomiky, farmakogenetiky, pozitronové emisní tomografie a telemedicíny, do nichž MOÚ investoval v míře přesahující o dva řády podporu VZ.

Hospodaření s prostředky VZ projektů je ve vnitroustavním účetnictví vedeno pod samostatnými nákladovými středisky pro každý dílčí projekt. Tento přehledný způsob byl

v roce dále podpořen speciálním softwarovým zajištěním grantového účetnictví v programu evidence grantů MOÚ EVIGRANT.

S ohledem na dosavadní úspěšnost výzkumného záměru MOÚ nejen po stránce získávání nových poznatků a publikační činnosti, ale především rozvoje technologií o nových metod jsme již požádali MZd ČR o prodloužení VZ MOÚ č. 00020980501 jak umožňuje usnesení vlády ČR z 18.11.2002. a **počítáme tedy s pokračováním výzkumného záměru také v roce 2004.**

1.1. Struktura VZ - dílčí odborné programy :

- I. Prevence nádorů a organizace onkologické péče
- II. Genetika nádorové predispozice
- III. Úloha antionkogenů a jejich homologů v maligní přeměně buňky
- IV. Prediktivní onkologie
- V. Lokoregionální léčba nádorů
- VI. Optimalizace a monitorace systémové léčby nádorů

Rozvojové projekty v přípravné fázi :

RI : DNA mikročipy pro onkologii

RII: Farmakogenetika cytostatik a cytotoxinů

RIII: Funkční zobrazování nádorů

RIV: Telemdicina v onkodiagnostice

Popis dosažených výsledků v dílčích projektech programů v roce 2003 :

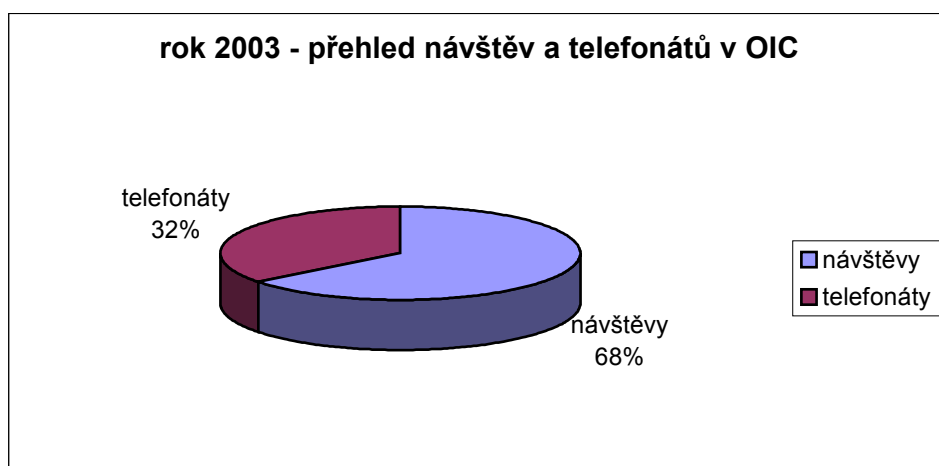
P 1 : Prevence nádorů a organizace onkologické péče

Koordinátor programu : MUDr. J. Novák

1.1. Primární prevence a onkologická výchova veřejnosti

Vedoucí projektu : Dr. Z. Joukalová

Masarykův onkologický ústav je jediné specializované zařízení komplexní onkologické péče v rámci celé České republiky . Jako jediné se výhradně a na jednom místě zabývá prevencí, diagnostikou a léčbou onkologických onemocnění, podílí se na vědě, výzkumu a vzdělávání. Proto také pokládá za svou povinnost systematicky se věnovat zdravotní výchově veřejnosti a průběžně vyhodnocovat poptávku veřejnosti po informacích o onkologické problematice. Z toho důvodu v MOÚ už dva roky (od 3. prosince 2001) pracuje Onkologické informační centrum, které je zaměřeno jak na prevenci, tak na léčbu rakoviny. V roce 2003 OIC osobně navštívilo 1 577 občanů, pacientů, jejich příbuzných, zájemců i klientů preventivní péče. Je to o celou třetinu více než v roce 2002. Bezplatnou telefonickou linku 800 222 322 využilo 751 tazatelů . Loni to bylo 573 telefonátů. Z přehledu návštěv i telefonických kontaktů je zřejmé, že veřejnost se o službě postupně dozvídá a učí se jí využívat.



Vzhledem k tomu, že také máme k dispozici materiály se základními onkologickými diagnózami, léčebnými postupy, preventivním programem, zavedli jsme zásilkovou službu. Za rok 2003 jsme rozeslali po celé republice – nejen jednotlivcům, ale také zdravotnickým zařízením a školám 47 100 brožur a letáků – to vše je hrazeno z režijních prostředků MOÚ.

V letošním roce jsme také využili služby ČTK – tzv. Protextu, ve kterém jsme si během roku předplatili 5 zpráv, které se týkaly činnosti MOÚ: preventivní prohlídky, týdenní kurz Balance, výročí OIC, činnost Oddělení genetiky a epidemiologie nádorů a Klinické studie.

Staráme se také o dvě internetové domény – www.prevencenadoru.cz a www.mou.cz. V obou adresách je možnost kontaktovat přímo OIC s jakýmkoliv dotazem. Od dubna 2003 (do té chvíle se neevidovaly) do konce roku 2003 jsme vyřizovali 150 dotazů, které se týkaly jednak konkrétních diagnóz a způsobu léčby a jednak preventivních prohlídek.

Funkční součástí je poradna pro odvykání kouření a poradna zdravé výživy.

Dvakrát do měsíce zajišťujeme exkurze středních a vyšších zdravotních škol z celé republiky.

Díky všem skutečnostem, které jsem uvedla výše, jsme se při řešení VVZ soustředili na prezentaci naší činnosti, která je pro všechny zájemce bezplatná, a na vydávání dalších materiálů:

Přednášky a postery :

Joukalová Z.: Zdravotnická zařízení a obecná informovanost veřejnosti.
XXVII. Brněnské onkologické dny, Brno, 22.-24.5. 2003.

Joukalová Z.: Informovanost široké veřejnosti. Veletrh MEFA Brno, 4. - 7. 11. 2003

Joukalová Z., Navrátilová D., Puchriková H.: Informovanost veřejnosti jako základ onkologické prevence. Seminář, Vyšší zdravotní škola Vsetín, 27.11.2003.

Joukalová Z., Puchriková H.: Onkologické informační centrum.
XXVII. Brněnské onkologické dny, Brno, 22. - 24. 5. 2003.

Dvořáčková B.: Nemocné dítě.
XXVII. Brněnské onkologické dny, Brno, 22. - 24. 5. 2003.

Nové brožury OIC MOÚ :

Co potřebujete vědět o nádorech slinivky břišní

Co potřebujete vědět o nádorech žlučníku

1.2. Parametrizace onkologických záznamů a ekonomika zdravotní onkologické péče

Vedoucí projektu : doc. MUDr.R. Vyzula, CSc.

Spolupráce : MUDr. J. Novák, prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.,

doc. Dr. L. Dušek, PhD (CBA MU)

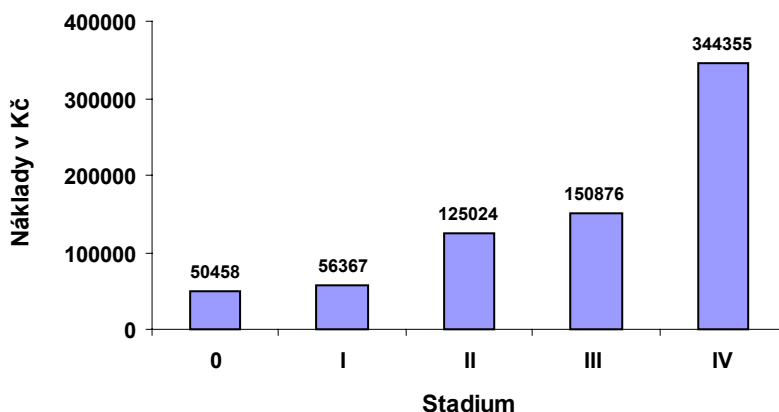
V roce bylo 2003 provedeno:

a) Zpracování nákladů péče primárního onemocnění u zbývajících čtených onkologických diagnóz – modelově, pomocí účelové softwarové aplikace (EZOP)

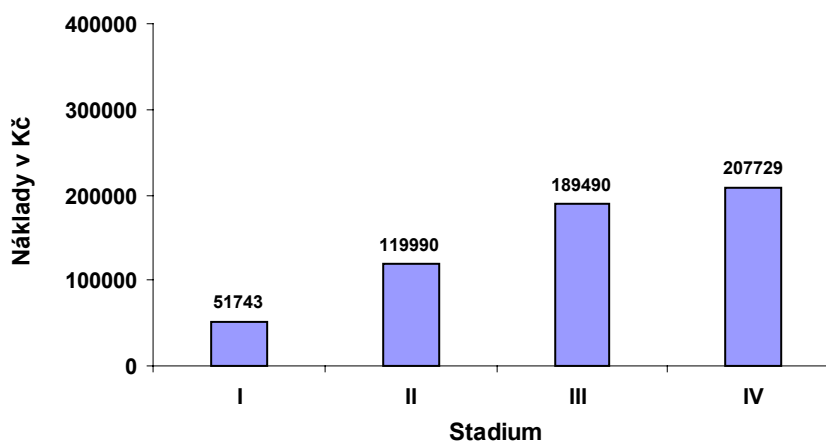
Náklady péče byly stanoveny modelově pro jednotlivá klinická stadia u diagnóz: C18-19-ZN kolon, C20-ZN rekta, C43-maligní melanom kůže a C61-ZN prostaty. V rámci dané diagnózy a stadia byla studie doplněna o analýzy jednotlivých součástí péče jako jsou diagnostika, jednotlivé léčebné modalita a dispenzarizace.

U všech studovaných diagnóz byl potvrzen proporcionalní růst nákladů na primární péči pacienty s nádorovým onemocněním se zvyšujícím se rozsahem, respektive klinickým stadiem zhoubného nádoru (viz příklady v grafech u ca rekta a ca prostaty). Tento tzv. onkologický paradox, kdy péče s lepšími výsledky stojí méně než nákladná péče se zhoršujícími se výsledky byl předmětem jednání MOÚ se zástupci VZP i MZd při přípravě způsobu plateb za zdravotní péči podle DRG. Stanovisko MOÚ o nutnosti zpracování klinického stadia nádorového onemocnění do klasifikačního systému DRG, vzešlé z výsledků analýz u nejčastějších diagnóz solidních zhoubných nádorů, bylo podpořeno výborem České onkologické společnosti a je akceptová MZd po další práci na DRG.

ZN konečníku - náklady péče u jednotlivých klinických stadií



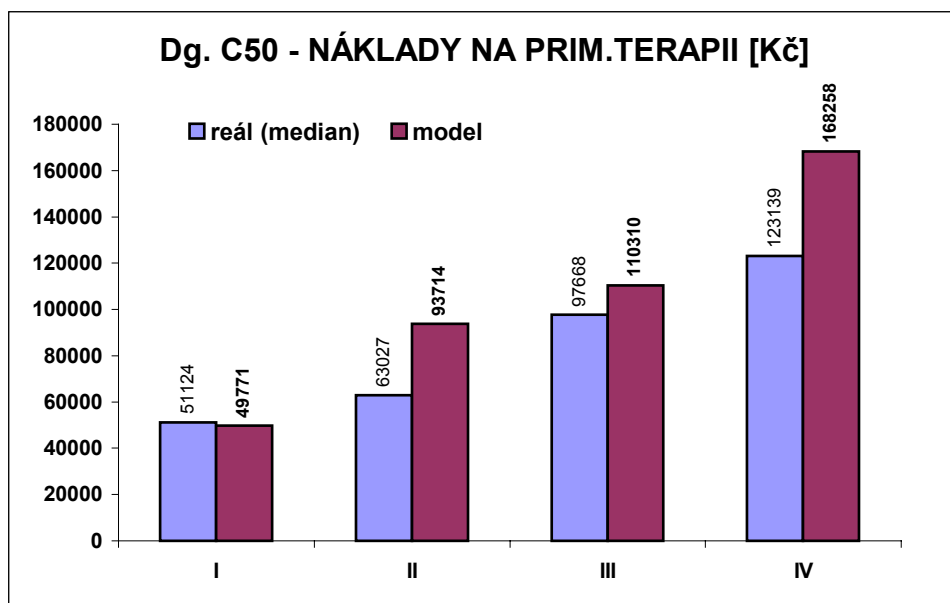
ZN prostaty - náklady péče u jednotlivých klinických stadií



b) Analýza nákladů péče u vybraného souboru 74 pacientek s karcinomem prsu

U dg. C50 -ZN prsu byla provedena studie nákladů péče na konkrétním souboru 74 pacientek. s onemocněním v jednotlivých klinických stadiích, jimž byla v MOÚ v období I/2000 až I/2002 poskytnuta kompletní péče. Pro jednotlivá klinická stadia byly stanoveny náklady celkové, náklady za sledovanou dobu péče, náklady za 12 měsíců péče a náklady na vlastní onkologickou léčbu a její jednotlivé součásti . Byly studovány vzájemné vazby mezi sledovanými ukazateli.

Porovnání nákladů na primární léčbu jednotlivých klinických stadií dg. C50 stanovených modelově a nákladů zjištěných u reálného souboru nemocných ilustruje graf.



Zjevný je 10-30% nárůst nákladů při modelovém hodnocení, což je nutno vzít v úvahu v přípravě všech paušalizujících systémů plateb, které pracují s modelovými předpoklady bez korekce reálnými soubory. Jinou interpretací ovšem může být skutečnost, že centra komplexní péče jakým je Masarykův onkologický ústav dosahují integrací činností a přímočarým vedením diagnosticko-léčebného algoritmu pod jednou střechou právě této 10-30%-ní úspory obecně kalkulovaných nákladů. To by statně bylo v souladu s mezinárodními zjištěními o ekonomické výhodnosti specializace.

Publikace :

Novák J., Koukalová H., Široký P. :Karcinom prsu žen - náklady péče u jednotlivých klinických stadií . Sborník Symposia Onkologie v gynekologii a mammologii, Brno 16.-17. 1. 2004

Žaloudík J : EZOP aneb ekonomika zdravotní onkologické péče.

Konference Farmacie 2003, Špindlerův Mlýn, 17.6.2003

c) Vývoj softwarového řešení pro hodnocení ceny a kvality péče na modelu C50 st II-III.

Vývoj a výzkum v předchozích etapách zajistil pro projekt funkční databázovou základnu pracující nad reálnými klinickými daty například na modelové diagnóze karcinom prsu. Byla provedena pilotní studie se záznamy 141 žen léčených na MOÚ s diagnózou C50 a od těchto pacientek byly retrospektivně pořízeny elektronické záznamy vývoje jejich nemocnění se zvláštním zaměřením na hodnocení neoadjuvantní terapie. Studie umožnila optimalizovat

datový model software tak, aby skutečně vyhovoval vývoji onemocnění onkologického pacienta a zahrnoval jasné oddělení zásadních fází léčby. Z hlediska analytického byla tato studie úspěšná a získaný soubor představuje i v mezinárodním měřítku významný odborný příspěvek ke studiu neoadjuvantní terapie a mechanismů její účinnosti. Vedle prognostického významu obsahu ER a PR receptorů byl hodnocen i prediktivní potenciál nádorových markerů C15-1 a CEA, včetně stanovení diagnosticky využitelných hraničních koncentrací. Z hlediska vývoje software však kritické vyhodnocení studie otevřelo významné otázky, které se staly hlavní náplní řešení v roce 2003, především:

- retrospektivní sběr takto rozsáhlých dat z chorobopisů je v podmínkách zařízení velikosti MOÚ nevládnutelný při počtech záznamů > 100
- retrospektivně dostupná data trpí řadou nedostatků, včetně chybějících hodnot a tento problém snižuje analyzovatelné velikosti vzorků

Jednoznačným závěrem tedy bylo konstatování, že má-li vyvíjený software skutečně sloužit reálné klinické praxi, pak musí být posíleny následující atributy:

- software musí plně komunikovat s nemocničním informačním systémem a předávání dat nesmí zatěžovat běžnou péči o pacienta,
- systém musí být nastaven pro průběžné sbírání klinických údajů, nikoli pouze pro retrospektivní sběr
- systém musí v maximální možné míře využívat dostupných datových zdrojů, které byly v dosavadním vývoji částečně opomíjeny, nicméně v průběžném sběru dat budou hrát velmi významnou roli
 - o data v nemocničním informačním systému (provedená vyšetření, jejich datumy, výsledky vyšetření, apod.)
 - o data z hlášení zdravotním pojišťovnám – velmi cenná databáze s daty „běžně“ dostupnými pro analýzy, tedy s daty, která jsou rutinně pořizována a lze je využít bez další zátěže pro personál
- systém musí být obohacen o relativně jednoduchý a přímočarý nástroj umožňující klinickému specialistovi interaktivní prohlížení záznamů, včetně analýz velmi významných pro onkologii (prognostické faktory a jejich sumární statistika, analýza přežití, apod.)

Vývoj v roce 2003 se na tyto atributy zaměřil a výsledkem je software BREAST, která je v současné podobě využitelný nejen pro časově náročné výzkumné studie, ale i pro průběžný sběr klinických dat přímo v nemocničním provozu.

i) Vývoj software: komunikační funkce

Software byl doplněn o rozsáhlé importní funkce umožňující přijímání dat z nemocničního informačního systému (parametricky dostupné výsledky laboratorních a jiných vyšetření, datумы kontrol, apod.). První dávka takto automatizovaných importů byla vyzkoušena již na pilotních datech ze studie o neoadjuvanci karcinomu prsu. Systém je nastaven pro automatizované přijímání těchto dat i ve velkém rozsahu. Importovaná data takto mohou být do SW BREAST získávána prakticky bez zásahu obsluhujícího personálu a jsou přímo začleněna do univerzálního datového modelu – tedy přes datумы vyšetření jednoznačně přiřazena určité fázi léčby. Importovaná data tak nabývají nové informační hodnoty a mohou být přes fáze léčby i agregována a analyzována (viz dále).

ii) Vývoj software: databázové nástroje

Elektronický záznam pacienta byl v plné podobě v SW vyvinut již v dřívějších etapách, v roce 2003 byly databázové nástroje zásadně rozšířeny z důvodu komunikace se záznamy z hlášení zdravotním pojišťovně. Byly doplněny potřebné číselníky výkonů a tyto dále překódovány tak, aby vyhovovaly potřebám hodnocení onkologické péče (viz blíže níže popsany modul nákladových analýz). SW BREAST je v současné verzi schopen plně pracovat i s hlášeními pro zdravotní pojišťovny a má pro tento účel vyvinut i samostatný modul analýz.

iii) Vývoj software: analytické nástroje

Vývoj analytických nástrojů software je v zásadě otevřený a reaguje i na požadavky vyplývající z konkrétních analýz. V roce 2003 byly v software vyvinuty následující nové a významné analytické nástroje:

- *Interaktivní prohlížeč pro klinická data.* Univerzální „data browser“ zpřístupňující každý parametr v databázi a respektující zásadní pravidla práce s onkologickými daty (hierarchie rizikových faktorů, rozlišení klinických stádií, histologické typy, apod.). Prohlížeč umožňuje sumární statistické analýzy pro spojitě i kategoriální parametry a tyto analýzy nabízí i agregovaně přes klinická stadia a jiné diagnosticky významné faktory. Z prohlížeče je možné přímo vstoupit do popisné i srovnávací analýzy přežití.
- *Modul prezentačních nástrojů a analytických služeb.* Tyto nástroje byly v roce 2003 rozšířeny především o možnost analýzy přežití všech pacientů v databázi nebo vybraného vzorku dle vstupních datových filtrů. Analýzu přežití je rovněž možné

stratifikovat podle diagnostických faktorů nebo jiných třídících kritérií. Byl připraven prezentační modul pro hodnocení kazuistiky pacienta a pro srovnání podstatných prvků v různých kazuistikách. Modul analytických nástrojů byl dále doplněn o analýzu léčebných odpovědí dosažených v různých fázích protinádorové terapie u vybrané skupiny pacientů a o sumární analýzu biomarkerů a rizikových faktorů.

- *Analyzátor záznamů pro zdravotní pojišťovny.* Zcela nová komponenta software BREAST vytvořená v roce 2003 představuje samostatný nástroj importující plné záznamy z hlášení na zdravotní pojišťovny. Tyto záznamy jsou v software dále překódovány dvěma zásadními cestami:
 - *Třídění dle fází diagnosticko – léčebného procesu* v podstatě představuje jednoznačné přiřazení záznamů o provedených výkonech a vyšetřeních k fázím vývoje pacienta. Bez tohoto kroku nemohou hlášení pro zdravotní pojišťovny poskytnout relevantní informace.
 - *Třídění dle typu provedených výkonů a vyšetření.* Za tímto účelem byly v roce 2003 překódovány všechny číselníkové položky výkonů pro zdravotní pojišťovny a byl jim přiřazen kód identifikující jejich postavení z hlediska onkologické péče (viz přiložená tabulka). Tím vznikla nová informační kvalita umožňující identifikovat nákladovost onkologické péče ve vztahu k strategii aplikované léčby a k fázi vývoje pacienta. Lze předpokládat, že tyto analýzy jsou v rámci ČR zcela pilotním pokusem o **propojení ceny a kvality onkologické péče**, tedy záznamů z hlášení plátcům zdravotní péče s klinickými daty ve formě vyhovující standardům onkologické péče. Software BREAST ve stávající verzi dokáže agregovat provedené výkony a vyšetření a sumarizovat jejich cenu i podle fází vývoje pacienta, případně tato data korelovat s významnými cílovými parametry léčby, například s přežitím.

1.3. Analýza vícečetných malignit

Vedoucí projektu : MUDr. H. Vítová

V roce 2003 byla původní databáze vícečetných malignit (VM) rozšířena o zhruba 100 nových pacientů z let 1996 - 2002. Data celého souboru byla aktualizována o přírůstek nových následných malignit a úmrtí a validována k 30.6.2003. Naše původní závěry jsme revidovali.

Výsledky celoplošné analýzy výskytu VM (ANOVA, Kaplan - Meierova metoda) jsou použitelné v sekundární a terciární prevenci v praxi. Z našeho hlediska je žádoucí i nadále zachovat registr onkologických onemocnění, a navíc získat možnost propojení s dětským registrem. Bude tak možno lépe sledovat vlivy prostředí na lidský genom.

Po validaci souboru nemocných s VM jsme zjistili, že pro další výzkum a klinické sledování je velmi vhodné neopomíjet histologii jednotlivých participujících nádorů, případně zjištěné genové mutace. Nejistili jsme významně zvýšené riziko následných nádorů v souvislosti s aplikací taxanů. U participujících kožních nádorů ze skupiny C44 (dle MKN 10) je v dalším vývoji choroby žádoucí brát v úvahu histologický nálezn, staging, lokalizaci na těle, zejména jejich vznik v mladším věku. Uvedené závěry budou podrobně uvedeny v tč. rozpracovaných publikacích Vítová a kol. : Multiple malignancies in the Czech Republic a Vícečetné malignity u pacientů MOÚ Brno.

Problematiku kvality života jsme zatím studovali z cca 100 chorobopisů pacientů s více než 2 přítomnými nádory. U přežívajících pacientů v remisi onkologického onemocnění jsou limitujícími faktory : anxieta, obavy o sociální zajištění, zvýšená únavnost, dušnost, tělesné mutilace – např. lymfedém, kolostomie - výpadové jevy, 2x suicidium . Formou řízeného pohovoru jsme dosud v rámci pilotní studie vyšetřili 10 pacientů s VM s participující hemoblastózou, 20 kontrol s jednou hemoblastózou a 20 zdravých osob pro srovnání životního stylu a probandy vnímané kvality života. Současně vedená zdravotnická dokumentace není a ani nemůže být z tohoto aspektu zdrojem vyčerpávajících informací. Předpokládáme, že po rozšíření této studie na další nejčastější nádorové kombinace (žije cca 500 pacientů s VM z našeho souboru) a statistickém vyhodnocení bude možno předat zkušenosti onkologické veřejnosti i terénním pracovníkům ke zkvalitnění přístupu k onkologicky nemocným.

Publikace a přednášky :

1. Vítová V., Vítová H., Navrátilová M., Pecen L. : Otázka kouření u pacientů s vícečetnými malignitami, VII. ostravské dny podpůrné terapie v onkologii, duben 2003, sborník str. 132.
2. Vítová V., Pecen L., Vítová H., Navrátilová M., Foretová L. : Vícečetné malignity – včasný záchyt následné malignity, Edukační sborník XXVII. brněnské onkologické dny, květen 2003, str. 44 - 46.
3. Vítová V.: Některé rizikové faktory u vícečetných malignit. Klinická onkologie 16., str. 9 1/2003.
4. Vítová V.: Genetické změny u některých mnohočetných malignit. Klinická onkologie 16, str 77, 2/2003.
5. Vítová V. : Úloha chemoterapie a radioterapie při vývoji vícečetných malignit. Klinická onkologie 16, str. 159 – 160, 3/2003.
6. Vítová V., Vítová H., Navrátilová M., Pecen L. : Otázka kouření u pacientů s vícečetnými malignitami, VII. ostravské dny podpůrné terapie v onkologii, duben 2003.
7. Vítová V., Pecen L., Vítová H., Navrátilová M., Foretová L. : Vícečetné malignity – včasný záchyt následné malignity. Edukační sborník XXVII. brněnské onkologické dny, květen 2003.

1.4. **Helicobacter pylori v patogeneze karcinomu žaludku.**

Vedoucí projektu : MUDr. M.Šachlová,CSc.

Z rozboru dat Národního onkologického registru ČR vyplývá, že karcinom žaludku poklesl za třicet let v incidenci na polovinu, v mortalitě skoro na třetinu. Kromě změn ve výživě se jako vysvětlení tohoto trendu nabízí také spoluúčast eradikace *Helicobacter pylori* jako promotora žaludeční karcinogeneze. Také proto je studium role *Helicobacter pylori* v patogeneze žaludečního karcinomu vysoce aktuální právě v podmínkách ČR, neboť primární onkoprevence skýtá kromě boje proti kouření jen málo oblastí skutečně efektivních zásahů.

Objev HP výrazně změnil dosavadní pohled na patogenezi vředové choroby, gastritidy a do značné míry i karcinomu a lymfomu žaludku. Na základě řady studií vyhlásila International Agency for Research on Cancer v roce 1994 *Helicobacter pylori* za karcergen 1. třídy. K narušení přirozených cytoprotektivních mechanismů vedou proteolytické enzymy, schopné degradovat žaludeční hlen. Kmeny HP podle schopnosti produkovat cytotoxiny můžeme rozdělit na skupinu produkující vakuolizační toxin Vac A a protein vázaný na cytotoxin Cag A, souhrnně označenou jako skupinu I a na skupinu neprodukující cytotoxiny jako kmeny II. Jsou přesvědčivé doklady o tom, že kmeny typu I mají dominantní úlohu při rozvoji zánětu. Bylo prokázáno, že až 70% všech kmenů HP je Cag A pozitivních .

Cílem práce je zjistit výskyt kmenů *Helicobacter pylori* (HP) a zvláště kmenů produkujících cytotoxiny u pacientů s karcinomem žaludku a u kontrolní skupiny zdravých a nepříbuzných jedinců v České republice. V souboru je zahrnuto 65 pacientů s karcinomem žaludku, z toho 34 mužů s věkovým průměrem 59 let (v rozmezí 39-74 let), 31 žen s věkovým průměrem 56 (v rozmezí 26-85 let). V souboru je 24 osob starších 60 let, proto jsme zvláště statisticky hodnotili celý soubor a zvláště jsme vybrali ze souboru mladší 60 let.

Inoperabilní nález byl u 9 pacientů. Výskyt karcinomu žaludku u dalších členů rodiny uvádělo 7 pacientů. V minulosti se 8 pacientů léčilo pro vředovou chorobu. Kontrolní skupina 35 osob je sestavena z 20 mužů a 15 žen. Jedná se o zcela zdravé osoby vyšetřované v rámci dárcovství krve a v rámci pravidelných preventivních prohlídek. Průměrný věk mužů je 42 let (v rozmezí 18-45 let), průměrný věk žen je 51 let (v rozmezí 18-55 let).

Pro serologické vyšetření jsme použili krevní sérum vyšetřovaných osob . Resekáty žaludku jsme znovu nehodnotili, ale pouze použili slovní popis histologického nálezu (pacienti byli operováni na různých pracovištích).

1. Stanovení protilátek proti H.pylori bylo provedeno metodou ELISA. Byla použita diagnostická souprava Anti –H.Pylori, IgA,IgG a IgM Microptate ELISA firmy MONOBIND /USA/ s biotinylovaným celobuněčným antigenem.

Souprava obsahuje 5 kalibrátorů s deklarovaným obsahem protilátek a umožňuje kvantitativní hodnocení výsledků v UI/ml.

2. Detekce invazivních antigenů 120 CagA a 87 Vac A H.pylori byla provedena metodou western-blot (WB)- Immunoblot H. pylori IgA,IgG firmy MIKROGEN (Německo). Metoda dovoluje stanovení jednotlivých antigenních determinant H.pylori.

3 .Helicobacter pylori nebyl hodnocen v resekátech žaludku s tumorem.

Fischerovým testem byl zhodnocen podíl pacientů s protilátkami proti cytotoxickým kmenům v příslušných srovnávaných skupinách. Na hladině významnosti $p < 0,001$ jsme prokázali statisticky **významný rozdíl ve výskytu cytotoxických kmenů H.P. u pacientů s karcinomem žaludku** oproti kontrolnímu souboru. Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl podle lokalizace nebo histologického typu nádoru.

U bezpříznakových příbuzných našich pacientů z 31 rodin žijících trvale s nimi kontaktu jsme zjistili invazivní kmeny u 56 osob oproti 20 osobám, kde agresivní cytotoxické kmeny nebyly zjištěny.

Prokázali jsme vyšší prevalenci protilátek proti invazivním kmenůmHP

- u pacientů s karcinomem žaludku než u kontrolního souboru

Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl

- u pacientů s lokalizací nádoru v distální části žaludku než v proximální
- u pacientů s intestinálním typem karcinomu než u difuzního.

Prokázali jsme převahu agresivních kmenů u bezpříznakových příbuzných žijících trvale v kontaktu s našimi pacienty. Náš soubor může být zatížen chybou malých čísel. Přesto se však zdá, že kmeny produkující cytotoxiny mají z hlediska patogeneze žaludečního karcinomu podstatný význam. V českém písemnictví, pokud víme, nebyl podobný soubor publikován.

Publikace a přednášky :

1. ŠACHLOVÁ, Milana, KAPIČKOVÁ, M. Výskyt agresivních kmenů H. pylori u pacientů s karcinomem a lymfomem žaludku. 9. Moravsko-západoslovenské mikrobiologické dny, Brno, 5. - 7. 6. 2000.
2. ŠACHLOVÁ, Milana, KAPIČKOVÁ, M. Výskyt Cag A a Vac A pozitivních kmenů Helicobacteria pylori u pacientů s karcinomem žaludku a u kontrolní skupiny. 24. Brněnské onkologické dny a 14. konference SZP, 24. - 26. 5. 2000. abstrakta, s. 210.
3. ŠACHLOVÁ, Milana, KAPIČKOVÁ, M. Výskyt Vac A a Cag A pozitivních kmenů Helicobacteria pylori u pacientů s karcinomem žaludku a v jejich rodinách. 25. Brněnské onkologické dny a 15. Konference SZP, 30. 5. - 1. 6. 2001, edukační sborník, s. 254.
4. KAPIČKOVÁ, M., ŠACHLOVÁ, Milana. Invazivní kmeny H. Pylori u onkologických pacientů a jejich rodinných příslušníků. 34. Dni klinickej mikrobiológie. Tatranská Lomnica, 3. - 5. 5. 2001, Správy klinickej mikrobiológie, s. 71
5. Šachlová M: Role kmenů HP v žaludeční kancerogenezi- Lékařské listy ,příloha Zdravotnických novin 2003

P 2 : Genetika nádorové predispozice

Koordinátorka programu : MUDr. L. Foretová

2.1. Genetické poradenství

Vedoucí projektu : MUDr. Lenka Foretová,

Spolpráce : MUDr. Marie Navrátilová, Dita Hanousková, Blanka Dvořáčková

Projekt se věnoval dalšímu zkvalitnění genetického poradenství pro hereditární formy nádorů, přípravou edukačních materiálů a vytvořením databáze klinických údajů u geneticky testovaných probandů.

V časopise Klinická onkologie č.1, 2003 byl **publikován souhrnný dokument** pracovního kolektivu odborníků „Doporučené zásady péče o nemocné s nádory prsu a vaječníků a zdravé osoby se zárodečnými mutacemi genů BRCA1 nebo BRCA2“, který je důležitým materiálem pro klinické pracovníky. Tento článek podává přehledně doporučení pro klinickou péči o vysoce rizikové pacienty s hereditární dispozicí ke karcinomu prsu a ovaria. Dokument vznikl na základě konsensu odborníků různých profesí, kterého bylo dosaženo po konzultačních jednáních.

Byla rozvinuta spolupráce s lékaři jiných zaměření. Hereditární problematika nádorů byla přednášena praktickým lékařům na vzdělávacích akcích IPVZ. Byla provedena **informační akce**. Všem praktickým lékařům na Moravě byly zaslány instrukce k vyhledávání hereditárních forem nádorů a odborné monografie popisující problematiku (Manuál prevence a časně detekce nádorových onemocnění).

Pro pacienty byla provedena reedice brožury „Dědičnost jako rizikový faktor pro vznik nádorů“ s revizí textu. Jedná se o důležitý **edukační materiál**, který poskytujeme dalším pracovištím.

Proběhla příprava materiálu **Standardní postupy pro diagnostiku BRCA1/2 mutací**. Tyto materiály byly vypracovány, jsou součástí webových stránek www.uhkt.cz. Byla vytvořena **databáze klinických dat**, která nám umožní hodnotit klinické údaje u pacientů s hereditární etiologií onemocnění.

2. 2. Optimalizace laboratorních metod genetického testování

Vedoucí projektu : Mgr. Miroslava Lukešová,

Spolupráce : Mgr. Eva Macháčková PhD., MUDr. Lenka Foretová, Hana Pavlů,

i) Detekce intragenových přestaveb

V intronických sekvencích BRCA1 genu se vyskytují s nezvyklou četností Alu-repetitivní sekvence, které způsobují zvýšenou náchylnost k rozsáhlým intragenovým rekombinacím. V Holandsku představují intragenová přeskupení BRCA1 genu 1/3 všech detekovaných patogenních mutací u rodin s dědičným syndromem nádoru prsu/ovaria. Předpokládá se, že v ostatních zemích zodpovídají BRCA1 delece a duplikace asi za 5-10% všech BRCA1 mutací. Zda jsou přítomny intragenové přeskupení BRCA1 genu také v české populaci a jaký je jejich podíl není doposud nic známo.

K detekci intragenových přeskupení využíváme metodu MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), což je nová metoda detekce neobvyklého počtu kopií jednotlivých exonů. Podstatou metody MLPA je multiplex PCR reakce, ve které je současně amplifikováno až 45 specifických sekvencí s využitím pouze jednoho páru PCR primerů. Separaci vzniklých amplifikačních produktů provádíme na ALF express II automatickém DNA sekvenátoru za využití software fragmentační analýzy. Relativní plocha vrcholů jednotlivých amplifikačních produktů nám po srovnání s výsledkem kontrolní reakce ukazuje relativní počet kopií cílové sekvence.

V současné době jsme začali metodou MLPA testovat první pacienty s dědičnou formou karcinomu prsu/ovaria, u kterých nebyla nalezena mutace v kódující sekvenci BRCA1 a BRCA2 genů po vyšetření screeningovými metodami vycházejícími z PCR reakce. Také jsme oslovili zahraniční výzkumná centra s žádostí o zaslání vzorků DNA s pozitivně potvrzeným nálezem intragenového přeskupení BRCA1 genu, které bychom chtěli použít jako pozitivní kontrolu. V roce 2004 budeme testovat všechny rodiny s hereditární formou ca prsu a ovaria, u kterých nebyla dosud nalezena mutace v genech BRCA1/2.

2.3 : **Ověření významnosti vybraných mutací genů nádorové predispozice**

Vedoucí projektu :MUDr. Lenka Foretová

Spolupráce : Mgr. Eva Macháčková PhD., Hana Pavlů, Mgr. Miroslava Lukešová, MUDr. Marie Navrátilová, Blanka Dvořáčková, Dita Hanousková, Veronika Foltánová

U mnoha testovaných žen nacházíme missense varianty v BRCA1/2 genech, které jsou označeny jako varianty neznámého významu (unknown variants). V BRCA1 genu jsme doposud detekovali 12 a v BRCA2 genu 11 variant neznámého významu. Ve většině případů se jedná o missense nukleotidové substituce, ve dvou případech potom o delecii a inzerci.

Naším úkolem je srovnat četnosti výskytu těchto variant ve skupině pacientů s předpokládanou genetickou predispozicí ke karcinomu prsu a ovaria, a její četnosti v běžné, onemocněním nezatížené, populaci.

Podařilo se nám kompletovat soubor padesáti žen starších 60-ti let, které tvoří naši kontrolní skupinu zdravých nepříbuzných jedinců bez výskytu sledovaného onemocnění v rodinné anamnéze. U těchto žen jsme prováděli odběr periferní krve, ze které jsme izolovali DNA. Doposud jsme vyšetřili polovinu žen z kontrolní skupiny na přítomnost všech 23 sekvenčních variant neznámého významu v genech BRCA1/2. Metodou heteroduplexní analýzy jsme detekovali fragmenty s aberantní mobilitou, které jsme následně sekvenovali na ALF express II automatickém DNA sekvenátoru.

Jednu variantu neznámého významu v BRCA1 genu se nám už podařilo detekovat také v kontrolní skupině. Pokud se zkoumaná varianta vyskytuje v kontrolní skupině se stejnou četností jako u pacientů s předpokládanou genetickou predispozicí, je velmi nepravděpodobné, že by mohla mít vliv na vznik onemocnění. Na tomto výzkumu spolupracuje VŠ studentka molekulární biologie Veronika Foltánková, která v současné době provádí heteroduplexní analýzu u vzorků DNA druhé poloviny kontrolní skupiny.

V roce 2004 dokončíme testování kontrolní skupiny a pokusíme se ji rozšířit o další zdravé ženy starší 60-ti let bez rodinné anamnézy a tím zpřesnit výsledky analýzy.

Publikace a přednášky :

1. Foretova L, Machackova E, Navratilova M, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. Submitted manuscript

2. Claes K, Poppe B, Machackova E, Coene I, Foretova L, De Paepe A and Messiaen L. 2003. Differentiating pathogenic mutations from polymorphic alterations in the splice sites of BRCA1 and BRCA2. *Genes Chromosomes Cancer* 37:314-320.

3. Trkova M., Foretova L., Kodet R., Hedvicakova P., Sedlacek P. A Li-Fraumeni syndrome family with retained heterozygosity for germline TP53 mutation in tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 145, 2003 p. 60-64.

4. Bartoňková H., Foretová L., Helmichová E a kol. Doporučené zásady péče o nemocné s nádory prsu a vaječníků a zdravé osoby se zárodečnými mutace genů BRCA1 nebo BRCA2. (The recommendation of care for patients with breast and ovarian cancer and healthy individuals with germline mutations in BRCA1/2 genes). "

Klinická onkologie, 2003, roč. 16, č. 1, s. 28-34

5. Svobodník A., Abrahámová J., Foretová L., Dušek L.: Rizikové faktory vzniku karcinomu prsu. In Abrahámová J., Dušek. L., a kol. Možnosti včasného zachytu rakoviny prsu. Grada 2003. S. 41-53. ISBN80-247-0499-4.

6. Foretová L., Navrátilová M., Hanousková D., Pavlů H., Lukešová M. Genetické vyšetření v prevenci nádorů. *Onkologie pro praktické lékaře*.

Postgraduální medicína, příloha. 6/2003, roč. 5. S. 4-9.

7. Navrátilová M., Hrubá M., Foretová L.: Dědičná forma nádorů vaječníků a prsu. Úloha genů BRCA1/2 a jejich klinické testování.

Gynekolog, č.3, 2003

8. Krutílková V., Trková M., Kodet R., Sumerauer D., Nekolná M., Seemanová E., Vodvářka P., Foretová L., Goetz P., Sedláček Z. Syndrom Li-Fraumeni.

Čs pediatrie 9/2003, roč. 58, s.552-555.

9. Foretova L., Navratilova M., Hanouskova D., Pavlu M., Lukesova M., Kalabova R., Petrakova D., Valik D. Hereditary Breast and Ovarian Cancer-Genetic Counseling and Testing Approach in the Czech Republic. XIX. International Genetics Congress. Melbourne. Australia 6.-11.7.03. Poster. Abstract book p. 287.
10. Foretová L., Navrátilová M., Hrubá M., Pavlů H., Lukešová M., Palácová M., Petráková K. Genetické testování a zásady péče o nosičky mutace v BRCA1/2 genech v ČR. 8. Celostátní pracovní konference SEKCAMA SOS SLS. Bratislava 25.4.03
11. Szabo C., Coutanson C., Durocher F., Barjhoux L., Foretova L., Lubinski J., Bressac de Paillerets B., Lasset C., Lenoir G., Couch F., Stoppa-Lyonnet D., Sinilnikova O., Simard J., Goldgar D., and Breast Cancer Linkage Consortium. Contribution of CHEK2 1100delC to familial breast cancer. BCLC conference. Madrid 2.-4.6.2003
12. P.Plevová, A. Křepelová, M.Papežová, E. Sedláková, R. Čuřík, L. Foretová, J. Palas, J. Novotný, J.Nieslanik, Z. Kolář. : Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary and sporadic colon cancer. ECCO 12 (the European Cancer Conference), 21.-25.9.2003 Copenhagen, Dánsko. European Journal of Cancer 2003;1(5) Suppl.:S88. ISSN 1359-6349. Abstrakt.
13. Foretová L., Navrátilová M., Pavlů H., Lukešová M., Hanousková D., Dvořáčková B., Petráková K., Bartoňková H. Pravděpodobnost nálezu patogenní mutace v genech BRCA1/2 dle typu rodinné anamnézy. 7. Mammologické symposium. Praha. 21.11.03
14. Foretová L. Genetické vyšetření v onkologii-jak poradí praktický lékař? Kurz onkologické prevence v ordinaci praktického lékaře. IPVZ Praha. 4.10.03
15. Foretová L. Význam testování genu BRCA1 a BRCA2 pro prevenci a časnou diagnostiku nádorů ovaria a prsu. Onkogynekologie, Brno. 2.10.03
16. Foretová L. Genetické poradenství v onkologii a jeho specifika. Sjezd lékařské genetiky. Plzeň, 16.-18.9.03
17. Foretová L. Neznámé varianty v genech BRCA1 a BRCA2 a ovařování jejich významnosti. Sjezd lékařské genetiky. Plzeň, 16.-18.9.03

18. Foretová L., Navrátilová M., Pavlů H., Hanousková D., Lukešová M. BRCA1/2 a další kandidátní geny v etiologii hereditárních forem nádorů prsu/ovaria. VIII. Onkogenetický den. Praha 11.6.03
19. Foretová L., Lukešová M., Macháčková E. Správná laboratorní praxe pro BRCA1/2 diagnostiku. 7. Celostátní konference DNA diagnostiky, buňečné a genové terapie. Praha 12.12.03
20. Navrátilová M., Hanousková D., Lukešová m., Pavlů H., Foretová L.: Péče o zdravé ženy a muže s potvrzenou mutací BRCA1/2. 7. Ostravské dny podpůrné léčby v onkologii.
21. Plevová P., Křepelová A., Papežová M., Sedláková E., Čuřík R., Foretová L., Navrátilová M., Palas J., Novotný, Nieslanik J., Vodvářka P., Horáček J., Kolář Z. Expres proteinů hMLH1 a hMSH2 v nádorech kolorekta a její klinický význam. 7. Ostravské dny podpůrné péče v onkologii. 25-26.4. 2003, Ostrava. Sborník abstrakt s. 67.
22. Plevová P., Křepelová A., Papežová M., Sedláková E., Čuřík R., Foretová L., Navrátilová M., Palas J., Novotný J., Zapletalová J., Nieslanik J., Dvořáčková J, Utíkal Z., Horáček J., Kolář Z. Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – význam imunohistochemické detekce proteinů hMLH1 a hMSH2 při jeho diagnóze. XXVII. Brněnské onkologické dny. 22.-24.5.2003, Brno. Edukační sborník s. 98-99.
23. Foretová L., Navrátilová M., Hanousková D., Křepelová A. Diagnostika hereditární formy nádoru kolorekta-význam pro terapii a prevenci. IX. Pařízkův den. Nový Jičín. 28.2.03
24. Foretová L. Genetické vyšetření v mammologii-diagnostika hereditárních forem nádorů prsu. Seminář. Hranice. 17.4.03
25. Foretová L. Dědičné formy nádoru prsu/ovaria. Klinická genetika-onkogenetika, IPVZ Praha. 16.4.03

P 3 : Úloha antionkogenů v maligní přeměně buňky

Koordinátorka programu : RNDr. J. Šmardová, CSc.

3.1. Funkční analýza nádorového supresoru p53

Vedoucí projektu : RNDr. J. Šmardová, CSc.

- A. Analýza p53 u dlaždicobuněčných nádorů hlavy a krku (HNSCC). Projekt je zcela dokončen, rukopis s výsledky byl přijat k publikaci v *Oncology Reports*. Akumulace proteinu p53 byla zjištěna u 66 % případů (33/50) imunohistochemicky a u 55,1 % případů (27/49) imunoblotingem. Přítomnost mutace byla funkčním testem detekována u 72 % případů (36/50). Šest ze 36 mutací p53 (16,7 %) zachycených metodou FASAY bylo teplotně senzitivních. Ve dvou případech byly jednoznačně detekovány dvě nezávislé bodové mutace. Nebyla nalezena korelace mezi aberacemi p53 a celkovým přežitím pacientů.
- B. Analýza p53 u nádorů pankreatu. Projekt byl dokončen, výsledky publikovány v *České a slovenské gastroenterologii a hepatologii*. Celkem bylo analyzováno 30 vzorků 22 pacientů, z toho 7 vzorků normální tkáně, 11 vzorků chronické pankreatitidy, 1 serózní cystadenom, 2 karcinomy ostrůvkových buněk pankreatu, 7 duktálních adenokarcinomů, jako vedlejší nález byl analyzován 1 intestinální adenokarcinom. Mutace p53 byla nalezena v jednom vzorku adenokarcinomu a ve vzorku intestinálního adenokarcinomu.
- C. Analýza teplotně senzitivních mutantů p53. Vytvořili jsme soubor celkem 17 ts p53 mutantů, z nichž 12 bylo sekvenováno; určením přesné sekvence DNA byl soubor zmenšen zatím na 15 různých ts mutantů p53. Byl analyzován jejich fenotyp (fenotyp kvasinkových kolonií exprimujících danou variantu p53) a byla určena přesná hodnota jejich teplotní závislosti. U tří mutantů byla testována jejich schopnost reaktivace amifostinem. Výsledky byla prezentovány jako součást publikací v *International Journal of Oncology*, *Oncology Reports* a samostatně formou plakátových sdělení.
- D. Funkční analýza p53 ve 150 vzorcích nádorové tkáně vybraných typů nádorů. Analýza všech vzorků byla dokončena. Analyzovali jsme celkem 16 případů nádoru děložního čípku (nebyla zachycena žádná mutace p53), 18 případů nádoru dělohy (zachyceny 2 mutace – 11,1 %), 58 případů nádoru prsu (24 mutací – 41,4 % - z toho 2 mutace byly teplotně senzitivní), 47 nádorů ovaria (32 mutací – 68,1 % - z toho 1 mutace

byla teplotně senzitivní), 3 případy nádoru vulvy (nebyla zachycena mutace), 1 případ karcinomu žaludku (mutace p53), 1 případ sarkomu těla (bez mutace) a 1 trofoblast (bez mutace p53). Výsledky byly zatím prezentovány formou přednášky, budou dále zpracovány a výhledově publikovány (dr. Vojtěšek, dr. Nenutil).

- E. Funkční analýza p53 u maligních melanomů a nádorů ovária. Byla dokončena analýza p53 u 22 buněčných linií odvozených z maligního melanomu. Nalezeno bylo 5 mutací p53, z toho 3 byly teplotně/chladově senzitivní. Tyto výsledky budou součástí publikace, která bude připravena v 1. polovině roku 2004 (prof. Kovařík, dr. Boudný). Dále bylo analyzováno 8 vzorků odebraných z normální tkáně dělohy (mutace p53 nebyla zachycena) a 4 případy maligního melanomu (mutace p53 nebyla nalezena).

Publikace a přednášky :

1. Šmardová J., Pavlová Š., Koukalová H.: Determination of optimal conditions for analysis of p53 status in leukemic cells using FASAY. Pathology Oncology Research 8, No.4, 245-251, 2002
2. Pavlová Š, Mayer J., Koukalová H., Šmardová J.: High frequency of temperature-sensitive mutations of p53 tumor suppressor in acute myeloid leukemia revealed by functional assay in yeast. Int.J.Oncol. 23, No. 1, 121-131, 2003
3. Szkanderová S., Vávrová J., Řezáčová M., Vokurková D., Pavlová Š., Šmardová J., Stulík J.: Gamma irradiation results in phosphorylation of p53 at serine-392 in human T-lymphocyte leukaemia cell line MOLT-4. Folia Biologica 49 (2003) 191-196
4. Vagunda V., Šmardová J., Vagundová M., Jandáková E., Žaloudík J., Koukalová H.: Correlations of breast carcinoma biomarkers and p53 tested by FASAY and Immunohistochemistry. Pathology Research and Practice 199 (2003) – *v tisku*
5. Šmardová J., Kšicová K., Binková H., Krpenský A., Pavlová Š., Rottenberg J., Koukalová H.: Analysis of tumor suppressor p53 status in head and neck squamous cell carcinoma. Oncology Reports – *přijato do tisku*

6. Šmardová J., Pavlová Š., Dítě P., Pazourková M., Růžička M., Kroupová I., Hermanová M., Vagundová M.: Funkční analýza nádorového supresoru p53 v normální a nádorové tkáni pankreatu a v tkáni postižené chronickou pankreatitidou. Čes. a Slov. Gastroent. a Hepatol. 57, No. 5, 175-183, 2003
7. Šmardová J.: Vůdčí gen p53. Klinická onkologie 16, No. 5, 238-239, 2003
8. Pavlová Š., Mayer J., Koukalová H., Šmardová J.: Funkční analýza nádorového supresoru p53 u akutní myeloidní leukémie. XXVII. Brněnské onkologické dny, 22.-24. května 2003, Brno
9. Binková H., Šmardová J., Kšicová K., Krpenský A., Rottenberg J.: Nádorový supresor p53 u nádorů hlavy a krku. XXVII. Brněnské onkologické dny, 22.-24. května 2003, Brno
10. Pavlová Š., Mayer J., Koukalová H., Šmardová J.: High frequency of temperature-sensitive mutations of p53 tumor suppressor in acute myeloid leukemia revealed by functional assay in yeast. Functional consequences of TP53 mutations: Characterization of common and rare p53 mutants and relevance to human cancer., IARC, Lyon, Francie 30.6.-3.7.2003
11. Pavlová Š., Kšicová K., Šmardová J.: Detection and analysis of temperature-sensitive mutants of tumor suppressor p53. XVII. Biologické dny, Brno, 19.-20.11.2003
12. Nenutil R., Pavlová Š., Šmardová J., Hanzelková Z., Vojtěšek B.: Možnosti imunohistochemické detekce funkčního stavu p53 v nádorech. 30. sjezd českých patologů, 23.-24.5.2003, Brno
13. Šmardová J.: Funkční analýza nádorového supresoru p53 u AML. Seminář katedry molekulární biologie JČU v Českých Budějovicích, 11.11.2003

3.2. Transkripční koaktivátory CBP a p300

Vedoucí projektu : RNDr.J.Šmardová, CSc.

- A. Analýza buněk BM2CBP. Byla dokončena, výsledky byly publikovány v *Journal of Hemotherapy and Stem Cell Research a CMLS*.
- B. Analýza buněk BM2p300. Byla dokončena kontrola exprese p300 v buňkách BM2, a to na úrovni RNA (dot bloty) a proteinů (imunobloting). Byly stanoveny růstové křivky a porovnány s růstovými křivkami buněk BM2 a BM2CBP. Byla provedena analýza buněčného cyklu buněk BM2p300, a to po působení TPA, TSA a bez induktorů; byl analyzován fenotyp buněk BM2p300, a to po indukci exprese p300 pomocí zinečnatých iontů a po působení TPA a TSA. Byla stanovena hladina proteinů Myb a Mim-1 a exprese a rozložení proteinu vimentin v buňkách BM2p300, a to po indukci diferenciaci pomocí TPA a TSA. Dílčí výsledky byly zatím publikovány formou plakátového sdělení.

Publikace a přednášky :

1. Nemajerová A., Šmarda J., Jurdic P., Kubala L., Souček K., Šmardová J.: Trichostatin A suppresses transformation by the v-myb oncogene in BM2 cells. *J.Hemotherapy and Stem Cell Res.* 12, No.2, 225-236, 2003
2. Zahrádková E., Ševčíková S., Souček K., Šmardová J., Šmarda J.: c-Fos but not v-Fos protein induces programmed cell death of v-myb-transformed monoblasts. *CMLS – v tisku*
3. Zahradníčková. E., Souček, K., Ševčíková, S., Šmardová, J., Šmarda, J. c-Fos but not v-Fos protein induces programmed cell death of v-myb-transformed monoblasts. The 11th Euroconference on Apoptosis, Ghent, Belgium, 25.10. - 28.10. 2003
4. Šmarda J., Zahradníčková E., Konečná H., Zdráhal Z., Šmardová J.: „Zrání monoblastů BM2 je doprovázeno zvýšenou expresí vimentinu“, VII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno, 29.1.2003

5. Nemajerová A., Šmarda J., Zatloukalová J., Šmardová J.: Differential effects of transcription coactivators CBP and p300 on v-mab transformed monoblasts. XVII. Biologické dny, Brno, 19.-20.11.2003

P 4 : Prediktivní onkologie

Koordinátor programu : MUDr. V. Vagunda

4.1 Studium mechanismů indukce apoptózy.

Vedoucí projektu : Mgr. M.A.Sheard,CSc.

Spolupráce: Mgr. L. Dubská.

Práce na projektu o mechanismu indukce apoptózy pokračovala v několika směrech.

1. Byla definována role proteinu p53 při regulaci exprese a funkce *death* receptoru CD95 jak konstitutivní tak indukované gama zářením u buněk karcinomu. Výsledky poskytly přímý důkaz toho, že protein p53 je klíčovým regulátorem exprese receptoru CD95 jeho funkce při zprostředkování apoptózy u buněk karcinomu. Z práce také vyplynulo, že funkční efekt zvýšené exprese CD95 indukované poškozením DNA je zásadně ovlivněn typem buňky. Práce byla zveřejněna v časopise *Cancer Research*. V rámci objasnění úlohy p53 při regulaci apoptózy zprostředkované death receptory pokračujeme studiem funkčního efektu poškození DNA chemoterapeutiky a gama zářením na indukci apoptózy prostřednictvím receptoru TRAILu.
2. V rámci projektu hodnocení sérových hladin fragmentů cytokeratinu 18 a 19 vznikajících během apoptózy epiteliálních buněk byl vypracován podrobný protokol reflektující kinetiku indukce apoptózy ve zvoleném modelovém systému celotělové expozice UV-záření a byl sestaven vzorek dobrovolníků vhodných pro studii. Práce bude pokračovat detekcí fragmentů cytokeratinu metodou M30 ELISA a korelací výsledků s již zavedenými metodami detekce TPS (fragmenty cytokeratinu 18) a CYFRA 21-1 (fragmenty cytokeratinu 19). Výsledky přispějí ke zjištění, zda je možné zachytit expozici UV-záření pomocí detekce apoptotických markerů v lidském séru, a k rozšíření poznatků o nádorových markerech TPS a CYFRA 21-1.

3. Dále jsme sledovali zda a jakým mechanismem ovlivňuje monoklonální protilátka Herceptin[®], používaná pro léčbu mammárních karcinomů se zvýšenou expresí povrchového receptoru Her-2, apoptózu indukovanou ligandem TRAIL. Přes původní očekávání vyplývající z obecně anti-apoptické funkce receptoru Her-2, získané výsledky jasně ukazují, že inhibice funkce tohoto receptoru pomocí Herceptinu[®] vede k potlačení schopnosti ligandu TRAIL indukovat apoptózu u některých buněk prsního karcinomu. Na základě těchto zjištění byl dále zkoumán mechanismus tohoto efektu prostřednictvím studia MAPK a Akt kinázových drah a detekce pro- a anti-apoptických proteinů u Herceptinem[®] ošetřených buněk. Dílčí výsledky týkající se tohoto projektu byly zatím zveřejněny ve formě plakátových sdělení.

Publikace a přednášky:

1. Sheard MA, Uldrijan S, Vojtesek B: Role of p53 in Regulating Constitutive and X-Radiation-Inducible CD95 Expression and Function in Carcinoma Cells. *Cancer Research* 63:7176-84, 2003.
2. Dubská L, Sheard MA: Apoptóza zprostředkovaná death receptory: Úloha FasL a TRAIL při smrti maligních buněk. *Klinická onkologie* 16:257-264, 2003.
3. Dubská L, Jamborová K., Sheard MA: Downregulation of Her-2 by Herceptin decreases TRAIL-induced apoptosis in breast cancer cells. *Journal of Applied Biomedicine* 1:S7, 2003. (*Abstrakt*)
4. Dubská L, Sheard MA: Reduced Akt Activity Correlates with Protection of Breast Cancer Cells from TRAIL-induced Apoptosis. Fourth International Conference on Mechanisms of Cell Death and Disease, Mexico, Nov 14-17, 2003. (*Poster*)
5. Dubská L: Apoptózy indukovaná receptory TRAILu. Seminář o buňkách a lidech, Bratislava, 7.10. 2003. (*Přednáška*)

4.2: Metody detekce a predikce apoptózy

Vedoucí projektu: MUDr.Václav Vagunda

1. Byla dokončena přehledná publikace o morfologických **metodách detekce apoptózy** (AP) a biomarkerech asociovaných s AP u maligních nádorů (odesláno do tisku v minulém roce – obsah práce viz.zpráva za r. 2002).

Publikace :

Pavlovský, Z., Vagunda, V.: Apoptóza - vybrané metody detekce apoptózy a asociovaných regulačních faktorů na tkáňových řezech z nádorového materiálu.

Čes.-slov. Patol., 39, 2003, s. 6-10.

2. Byla dopracována původní vědecká práce o **problematicke apoptózy u mamárního karcinomu** s komplexním vyhodnocením prognosticko-prediktivních faktorů s důrazem na p53, Bcl-2 a proliferaci (odesláno do tisku koncem minulého roku – obsah práce viz.zpráva za r. 2002).

Publikace :

Vagunda, V., Šmardová, J., Vagundová, M., Jandáková, E., Žaloudík, J., Koukalová, H.: Correlations of breast carcinoma biomarkers and p53 tested by FASAY and immunohistochemistry. Pathology Research and Practice, 2003, vol. 199, (v tisku)

3. Byla dokončena **retrospektivní studie na souboru B lymfomů** pro vyhodnocení prognosticko-prediktivního významu apoptózy a asociovaných biomarkerů, zejména s ohledem na p53 a Bcl-2. Kromě podrobného hodnocení p53 imunohistochemie s více protilátkami, bylo cílem provést detailní statistické vyhodnocení korelací i podrobnou multivariační prognostickou analýzu s doplněnými klinickými daty.

Protein p53 byl na souboru 54 lymfomů vyhodnocen protilátkami DO1 a DO11, následně DO7. Protilátky DO1 a DO11 prokázaly akumulaci proteinu p53 pouze v 15%

lymfomů. Naproti tomu protilátka DO7 (Biogenex) vykázala pozitivitu v 37% případů, při použití prahové hodnoty 20% pozitivních jader. DO7 má evidentně lepší sensitivitu a lze ji doporučit jako protilátku volby při hodnocení overexprese p53 v archivním materiálu. Akumulovaný protein je velmi pravděpodobně mutovaný. Statisticky nebyla nicméně pro p53 prokázána prognostická významnost, pouze asociace imunopozitivity s vyšším apoptotickým indexem v korelační analýze.

Při hodnocení souboru multivariační statistikou v analýze hlavních komponent vyniká významná role Bcl-2 v rámci gradu I. Bcl-2 je v protikladné pozici oproti vzájemně korelující apoptóze a mitóze. První hlavní komponenta reprezentuje tento klíčový kontrast a vyčerpává nad 60% variability. Ki-67 je slabě asociován s mitózou resp. apoptózou. Na druhé straně, v rámci gradu II je Bcl-2 v pozici zanedbatelného vlivu na apoptózu. Mitóza je nezávislá na apoptóze i Ki-67. První hlavní komponenta vyčerpává jen 43% variability. Diference v korelační struktuře odrážejí významné rozdíly v růstových a regulačních mechanismech, výrazně odlišné v obou gradech. Pozoruhodným fenoménem je nález snižování apoptotického indexu s růstem klinického stadia v rámci obou gradů. Index mitóza/apoptóza, který charakterizuje čistý nádorový růst jako podíl přírůstku a zániku buněk, je v gradu I tím větší, čím větší je stage, jeho absolutní hodnoty výrazně převyšují hodnoty pro grade II. V gradu II je pro vyšší stadia také zřetelný růst M/A indexu, ale nárůst není tak významný - apoptózy a mitózy jsou více navzájem vyvážené. Nález, že v rámci obou gradů je zvyšující se stage, chápaný jako relevantní indikátor historického vývoje nádoru, spojen se snižováním procenta apoptózy nicméně nelze jednoznačně interpretovat jako způsobený zvýšením exprese Bcl-2, jak ukazují centroidové profily. Tyto profily přehledně znázorňují nerovnoměrné snížení AP v rámci gradů pro jednotlivá klinická stadia v souvislosti s různě velkými diferencemi v Bcl-2.

Multivariační analýza vedla také k efektivnímu **použití AP/MI indexů** jako prognostických faktorů. Model pro časný relaps je postaven na gradu a M/A indexu. Vysoce riziková skupina pacientů - tj. časný relaps následovaný méně než 2-letým přežitím - byla jasně identifikována jen gradem v kombinaci s upraveným M/A indexem. Jak vyšší grade tak zvýšená hodnota M/A indexu zvyšují pravděpodobnost časného relapsu. K diskriminační hodnotě M/A indexu přispívá signifikantně jak procento mitóz tak apoptóz, nicméně mitózy jsou více relevantní pro pravděpodobnostní profil uvnitř gradu. V logistickém regresním modelu pro celkové přežití nad 24 měsíců je delší přežití basálně stanoveno klinickým stadiem v kombinaci s věkem. K minimálnímu modelu založenému na těchto dvou faktorech se dá vybrat několik dalších zpřesňujících interakcí, mj. grade anebo M/A index. Finální model byl

vybrán jako nejstabilnější kombinace věku, stadia a dichotomizované nádorové celularity.

Publikace :

Vagunda, V., Vagundová, M., Dušek, L., Petráková, K.: Apoptotic and mitotic indexes are effective prognostic factors in B lymphomas.

Odesláno k elektronické publikaci do BMC Cancer, 2003.

4.3: Srovnání imunohistochemické a biochemické metody stanovení receptorů steroidních hormonů

Vedoucí projektu: MUDr. Marcela Vagundová

Spolupráce: MUDr. Dalibor Valík

1. Byla dopracována původní vědecká práce o problematice **androgenového receptoru u karcinomu prostaty**, s cílem kvantifikace AR imunohistochemickou metodou (ICH) a zároveň biochemickou ligand saturační analýzou (LSA) a následným hodnocením korelace obou metod (odesláno do tisku koncem minulého roku – obsah práce viz.zpráva za 2002).

Publikace :

Vagundová M, Vagunda V, Vermousek I, Rovný A.: Androgen receptor in prostate carcinoma: immunohistochemical and ligand saturation analyses.

Neoplasma. 2003;50:287-90.

2. V druhé části práce jsme hodnotili **estrogenový (ER) a progesteronový receptor (PR) u 110 karcinomů prsu ve srovnání biochemické imunochemické analýzy a imunohistochemického (IHC) stanovení panelem protilátek v tkáňových řezech**. Cílem bylo srovnání i standardizace metod a analýza diskrepančních případů.

Soubor byl vyšetřen protilátkami DAKO N157530 a N163030 a protilátkami Biogenex ER88 a PR88 s EnVision detekčním kitem (DAKO). Pro hodnocení IHC byl použit práh 10% pozitivních jader s alespoň jednou protilátkou. Byly samostatně korelovány hodnoty pro estrogenový a progesteronový receptor v různých skupinách. V imunochemické analýze (dvojitá sendvičová metoda, kit Abbott) byla použita prahová hodnota 15 fmol/mg nádorového homogenátu. Skupina I: ER i PR biochemicky

negativní (tj. méně než 15 fmol/mg), zahrnovala 50 případů. Z nich IHC prokázala pozitivní ER v 4 případech a PR pozitivní ve 3 případech. *Konkordance metod pro ER je tedy 92%, pro PR 94%, falešná negativita u biochemické metody 8% u ER, resp. 6% pro PR*, což je pravděpodobně dáno malým množstvím nádorové tkáně v některém bločku. Protilátky DAKO a Biogenex zde měly navzájem konkordanci 98% při stejné sensitivitě (obě vykázaly jeden falešně negativní výsledek). Skupina II: ER a PR biochemicky pozitivní v rozsahu 15-29,9 fmol/mg, zahrnovala 30 případů. Pro ER byla konkordance biochemie a IHC 100%. Rovněž mezi protilátkami DAKO a Biogenex byla 100% shoda. Pro PR byla konkordance mezi protilátkou Biogenex a biochemickou metodou 87%, nicméně pro protilátku DAKO pouze 73%. Při srovnání protilátek mezi sebou, PR DAKO vykázala falešnou negativitu na úrovni 15%. Biochemická metoda zde vykazuje falešnou 13% pozitivitu, což je zřejmě dáno přítomností benigních epitelů pozitivních na PR v okolí nádorové tkáně. Skupina III: ER a PR biochemicky pozitivní v rozsahu 30-59,9 fmol/mg, zahrnovala 30 případů. Pro ER byla konkordance biochemie a IHC 100%. Opět mezi protilátkami DAKO a Biogenex byla 100% shoda. Pro PR byla konkordance mezi protilátkou Biogenex a biochemickou metodou 90%, ale pro protilátku DAKO opět pouze 73%. Při srovnání protilátek, PR DAKO vykázala falešnou negativitu na úrovni 18,5%. Biochemická metoda zde vykazuje falešnou 10% pozitivitu. Zjištěné úrovně falešných hodnot jsou ve skupinách II a III prakticky na stejné úrovni (bez statistického rozdílu).

V souhrnu lze tedy **doporučit IHC s protilátkami Biogenex jako metodu volby**. Průkaz ER je bezproblémový, zatímco v průkazu PR nutno počítat s možnou metodickou chybou. Protilátka Biogenex PR88 má nejmenší pozadí a absolutně největší sensitivitu pro PR z protilátek dosud zkoušených na našem pracovišti (DAKO, Novocastra, Immunotech). Metoda imunochemická se jeví jako důležitá metoda doplňková – umožňuje kvantifikaci receptorů (s možným využitím v terapeutickém protokolu) a je evidentně mnohem přesnější než dříve používaná ligand saturační analýza. Materiál pro biochemické vyšetření vyžaduje bioptickou kontrolu reprezentativnosti (metodou paralelních řezů).

Přednáška :

Vagundová M, Vagunda V, Valík D: Korelace vyšetření estrogenového a progesteronového receptoru panelem protilátek ve srovnání s imunochemickou analýzou na souboru mammárních karcinomů.

Regionální seminář patologů, MOÚ Brno 12.12. 2003.

4.4. Prediktivní testy chemoresistence stanovením mRNA transkriptů

Vedoucí projektu : RNDr. M.Svoboda

Cílem projektu bylo stanovení prediktivních hladin mRNA markerů rezistence na cytostatika používaná při léčbě kolorektálních nádorů. Dle plánu z předchozího roku jsme převedli vyšetření hladin exprese z stanovení pomocí SYBR Green I na TaqMan sondy s využitím Real Time PCR.

Za období roku 2003 jsme stanovili **hladiny mRNA pomocí Real Time PCR** u těchto genů:

thymidylát syntáza (TS) - u cca 80 pacientů,

thymidin fosforyláza (TP)-u 40 pacientů,

dihydropyrimidin dehydrogenáza (DPD) - u 40 pacientů,

jako pomocné markery pro sledování vývoje onemocnění po kombinované chemo a radioterapii používáme mRNA pro TNF alfa-vyšetřeno 25 pacientů.

Z dosavadních výsledků vyplývá, že hladiny TS jsou zvýšeny po radioterapii a že u neozářených pacientů bývá vyšší hladina mRNA v tumorech než v mukóze. TS může být jedním z prediktorů, ale v souladu s literaturou **vyšetření samotné TS mRNA není dostatečně informativní** a je třeba jej kombinovat se stanovením mRNA pro thymidin fosforylázu a DPD a dalšími prediktory.

Jsou již známy klinické odpovědi na léčbu u 43 pacientů s konkomitantní chemoradioterapií s capecitabinem. Z dosavadních výsledků vyplývá, že u 16 pacientů došlo k částečné nebo úplné remisi. U 13 pacientů s remisemi jsou nižší hladiny TS mRNA než je medián po ozáření. Přesto existují pacienti s vysokými hodnotami TS, TP, DPD mRNA a remisí nádoru. To je v rozporu s výsledky z literatury a ukazuje nutnost sledovat ještě další potenciální markery pro spolehlivou predikci.

Z tohoto hlediska se jeví zajímavými, kromě enzymů nukleotidového metabolismu, **ABC transportery** a jako prognostický marker **osteopontin**. Na oba

potenciální markery jsme navrhli **primery pro Real Time RT PCR**, primery pro osteopontin jsme již zoptimalizovali na několika vzorcích. Zavedli jsme ELISA stanovení pro DPD. Bohužel u pacientů s přecitlivělostí na FU byly dle ELISy nalezeny normální nebo jen mírně snížené hladiny DPD proteinu. To ukazuje na přítomnost neaktivního enzymu, pokud by byla přecitlivělost skutečně zapříčiněna DPD. Je proto nutné zavést **stanovení enzymové aktivity DPD pomocí metodiky HPLC**. Postup se zdá schůdný, zkoušeli jsme několik vzorků na Katedře biochemie Přírodovědecké fakultě MU.

Dále máme připraveny TaqMan sondu a primery pro topoisomerázu I (Topo I), což bylo odzkoušeno na několika vzorcích. Rovněž máme připraveny roztoky a pomůcky pro stanovení enzymatické aktivity Topo I. Enzymatická aktivita TopoI byla vyzkoušena na 2 vzorcích z tkání střeva.

Publikace :

1. Kocakova I, Spelda S, Brancikova D, Slampa P, Kovarova M, Vetcha H, Penka I, Sefr R, Svoboda M, Vyzula R. New Therapeutic Approach for Locally Advanced Rectal Adenocarcinoma with Oral Capecitabine and Concurrent Radiotherapy, Fourteenth international congress on anti-cancer treatment (ICACT) 2003, Proceeding book, poster, page 215
2. Kocakova I, Spelda S, Svoboda M, Vyzula R., Brancikova D, Slampa P, Vetcha H, Kovarova M, Penka I, Sefr R. Combined Therapy of Locally Advanced Rectal Adenocarcinoma with Oral Capecitabine and Concurrent Radiotherapy, Thirty-Ninth 2003 Annual Meeting ASCO, Proceeding book, poster 1295, page
3. Kocáková I., Špelda S., Kocák I., Svoboda M., et al. Předoperační chemoradioterapie s kapecitabinem v léčbě lokálně pokročilého adenokarcinomu rekta, Klinická onkologie 2/2003, s. 60-67
4. Kocáková I., Špelda S., Kocák I., Svoboda M., Šlampa P., Vetchá H., Gálová M., Penka I., Vyzula R.: Adjuvantní versus neoadjuvantní chemoradioterapie u pokročilého karcinomu rekta, pro a proti, edukační sborník, poster 112, XXVII. BOD, 22.5. 2003.

5. Svoboda M, Kocáková I, Žaloudík J, Vyzula R, Šimíčková M, Gálová I, Klocová K, Domanská O, Coufal O. Interpretace výsledků stanovení hladin DPD pomocí Real Time RT PCR, vztah k hladinám TS, TP mRNA, Staškův den, Praha, 22.3. 2003.

4.5 : Tkáňová banka

Vedoucí projektu. RNDr.M.Šimíčková, CSc.

Spolupráce: MUDr. Marcela Vagundová, MUDr. V.Chrenko, CSc., MUDr.R.Šefr,CSc., MUDr. I.Penka, CSc., MUDr. V.Fait, CSc.

Pokračoval sběr tkáňového materiálu do tkáňové banky, jediné svého druhu rutinně zavedené banky v klinickém zařízení v ČR. Dosud bylo uloženo asi 900 nádorů. Celkové počty nádorů odebraných za tento rok i sumárně jsou uvedeny v tabulce 1. Souběžně s nádorovými tkáněmi byl zahájen v tomto roce sběr sér odebraných těsně před operací.

Ve spolupráci s programátory nemocničního informačního systému byl do NIS Greyfox zaveden modul Tkáňová banka. Databáze uložených nádorů je tudíž dostupná pro prohlížení všem uživatelům NIS MOÚ Greyfox. Údaje o zamraženém nádorovém materiálu každého pacienta jsou napojeny na operační protokol, histologickou charakteristiku a kompletní dokumentaci. Program umožňuje vyhledávání materiálu podle různých třídících stanovisek (diagnóza, TNM klasifikace, období, typ tkáně, současně odebírané sérum apod.).

Tkáňová banka je v současnosti využívána především Laboratoří prediktivní onkologie. Pro účely hodnocení predikce odpovědi na terapii (především analýza thymidylátsyntázy) bylo letos vydáno 115 vzorků karcinomů kolorekta. Pro účely distribuce mimoústavním žadatelům (aktuálně především řešitelům grantů) byl vypracován formulář k upřesnění požadavků na nádorový materiál. Registrace požadavků bude prováděna oddělením klinických studií.

Tab.1. Počty tkání a předoperačních sér zamražených ve tkáňové bance MOÚ pro vybrané diagnózy v roce 2003.

Rok uložení	Celkem m tkání	Celkem maligních tkání	Celkem sér	Počet uložených tkání podle vybraných diagnóz										
				C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
				16	18	19	20	43	50	56	62	64	77	97

2000	50	35	0	0	4	0	4	0	18	0	1	1	4	0
2001	363	341	0	4	17	8	18	8	242	9	0	3	54	4
2002	276	261	0	0	17	8	11	2	217	1	0	1	30	0
2003	307	277	235	2	15	3	13	3	194	9	2	6	27	7
Celk	947	875	194	6	49	19	46	13	671	19	3	11	115	11

Publikace :

M.Šimíčková, M.Vagundová, E.Krejčí, L.Rašovská, M.Svoboda, V.Chrenko, O.Coufal, J.Žaloudík: Tkáňová nádorová banka a její role v molekulární onkologii: představy a fakta. Klinická onkologie, 2003 (v tisku)

4.6. Preditivní testy chemoresistence in vitro

Vedoucí projektu: Mgr. Arnošt Kostečka.

Spolupráce: MUDr. Marcela Vagundová,

Oddělení chirurgické onkologie a Klinika komplexní onkologické péče MOÚ

Záměrem bylo propracování a zavedení MTT testu chemorezistence MTT in vitro v primokulturách nádorových buněk do klinické praxe. Z tohoto důvodu se řešily zejména metodické problémy, jako je problematika izolace buněk z nádorové tkáně, jejich kultivace s cytostatiky a způsoby vyhodnocování výsledků.

Testem prošlo v roce 2003 143 pacientů s dobrou explantační účinností 88%. 17 vzorků bylo příliš malých, s nedostatečnou buněčností nebo kontaminovaných, tedy byly nevyhodnotitelné. Největší úspěšnost byla v izolování buněk z ovariálních karcinomů, nejmenší v izolacích ze sarkomů. Všechny izolace označené za úspěšné byly podle výtěžnosti testovány nejméně na jedno cytostatikum, běžný panel cytostatik pro danou diagnózu obsahuje ovšem 5-6 preparátů, s nimž lze aktuálně v chemoterapii počítat. Klinickým záměrem nebylo výsledky MTT testu nahrazovat standardní protokoly chemoterapie ověřené v klinických studiích, nýbrž využít jich tam,

kde průkazné klinické studie neexistují, jde o recidivující a polyrezistentní nádory po předchozí léčbě nebo případy, kde standardní léčebný režim je prokazatelně neúčinný. Zároveň jde také o srovnání výsledků *in vitro* a *in vivo* tam, kde je sice aplikován standardní režim, ale tento dosahuje efektu pouze u části případů, což je situace velmi častá, neboť účinnost moderní chemoterapie se pohybuje mezi 30-60%, nezdá se, že je nižší.

U jednotlivých nádorových diagnóz lze vyzorovat jen málo zákonitostí. Obecně lze konstatovat, že převažují rezistentní nádory nad citlivými, což je ale dáno charakterem vzorků, kterými jsou chirurgicky odebrané metastázy a recidivující nádory. Pokud byly odebrány primární nádory, byly obvykle na cytostatika citlivější a to i u stejného pacienta.

U **karcinomů trávicího traktu, především kolorekta** byla testována nejběžněji používaná cytostatika 5-fluorouracil, oxalilplatina nebo cisplatina a raltitrexed. Převažovaly vzorky rezistentní ke všem cytostatikům, nejčastějším účinným cytostatikem byl 5-fluorouracil, někdy i v kombinaci s platinoidy nebo ostatními cytostatiky. Vyskytly se však i případy, kdy byl vzorek citlivý na jiná cytostatika a rezistentní na 5-fluorouracil.

U druhé nejčastější diagnózy, u **karcinomů ovaria** byla izolace buněk velmi úspěšná. Nevyskytl se zde jediný případ, kdy by nebyl dostatek buněk pro testování nejméně jednoho cytostatika. Reakce vzorků byla velmi individuální, ale je možné říci, že není žádná souvislost mezi rezistencí nebo citlivostí na topotecan a reakcí na ostatní používaná cytostatika. Právě topotecan, ačkoliv není lékem první volby, vykazoval všude, kde se testoval dobrou nebo alespoň relativně dobrou odezvu. Také paklitaxel je poměrně účinným lékem.

Testování u **karcinomů prsu** bylo omezeno velikostí vzorku. Obvykle byl testován jen paklitaxel, doxorubicin a 5-fluorouracil, pouze pokud bylo dostatek buněk také docetaxel a navelbin. Někdy bylo testováno pouze jedno z prvních tří cytostatik. Nelze vysledovat žádné cytostatikum, které by účinkovalo lépe než ostatní, jde zde o zcela individuální záležitost.

Maligní melanom je čtvrtou v MOÚ nejčastěji testovanou diagnózou. Až na jediný mimořádně citlivý nádor na carmustin byly všechny vzorky vysoce rezistentní. U ostatních cytostatik nebyla pozorovatelná žádná vzájemná vazba, a to ani u vinca

alkaloidů. MTT testy potvrzují vysokou chemorezistenci maligního melanomu také in vitro a zdá se, že testování běžných cytostatik nebude představovat přínos proto, že i v širších panelech vskutku účinná cytostatika chybějí.

V cytopsinových preparátech připravených z primokultur nádorových buněk byly provedeny imunoreakce na cytokeratiny 7,8,18,19,20, EMA a vimentin pro hodnocení proporcí nádorových buněk a stromálních elementů. Cytokeratiny a EMA byly významně pozitivní ve všech kultivovaných karcinomech, vimentin v sarkomu a melanomu. Nicméně byla zaznamenána vysoká heterogenita intenzity epiteliálních markerů, poměrně často i úplné chybění barvení, a to v morfologicky identických nádorových buňkách. případně i v jednotlivých shlucích nádorových epitelií. Tato heterogenita znemožňuje imunohistochemickou kvantifikaci nádorového růstu. Nicméně v primokultivacích karcinomů prokázala imunoreakce na vimentin pozitivní stromální (nenádorové) buňky v malém procentu, typicky pod 5%, max. 10% - pouze jeden případ. Rovněž pouze v jednom případě byla zachycena i částečná pozitivita vimentinu v nádorových epiteliích (špatně diferencovaný ovariální karcinom). Nádorové epitelie v ostatních případech byly na vimentin negativní. Výsledky imunohistochemické fenotypizace prokazují, že primokultivace nádorových buněk pro MTT je úspěšná se zanedbatelnou příměsí stromálních elementů. Zároveň se ukazuje výrazná fenotypická divergence kultivovaných nádorových buněk se ztrátou diferenciačních znaků. MTT test je připraven pro praktické použití ve své laboratorní podobě, dále je zapotřebí podrobně analyzovat zejména korelace laboratorních výsledků s klinickou odpovědí na chemoterapii.

Přednáška:

Kostečka A.: Využití MTT testu ke stanovení rezistence na cytostatika.

Seminář MOÚ Brno, 15.11. 2003.

4.7. Imunohistochemická detekce mikrometastáz v sentinelových uzlinách

Vedoucí projektu : MUDr.M.Vagundová

Spolupráce : MUDr. R. Šefr, PhD.

Cílem projektu bylo zavést a vyhodnotit metodiku vyšetření mikrometastáz v sentinelových uzlinách u kolorektálního karcinomu. Ve studii je prozatím celkem 31 případů.

Sentinelové uzliny byly identifikovány pomocí patentblau, úspěšnost identifikace SN byla 100%. Průměrný počet identifikovaných SN 1,8 (0 – 5), medián 2. Celkový počet vyšetřených uzlin: 2 – 41, medián 15, průměr 16,7. Ve 46 % všech případů byly detekovány uzlinové metastázy, z toho 5x u tumorů pN1, 1x u tumoru pN2. Z toho ve 23 % byly postiženy pouze sentinelové uzliny, z čehož v 1/3 pouze v imunohistochemii. Podrobné imunohistochemické vyšetření sentinelových uzlin bylo provedeno v 79 uzlinových blocích. Byly použity protilátky proti cytokeratinu 20 a koktejl AE1/AE3. Positivity ve výše uvedeném rozsahu byly zachyceny stejně v cytokeratinu 20 i v cytoker. AE. Cytokeratin 20 nemá prakticky žádné pozadí- lze v další práci používat pouze tento samotný. Předběžné výsledky ukazují, že 7 % původně N-negativních případů lze pomocí imunohistochemie přeradit do pN+ kategorie.

Plných 31 % případů s postiženými uzlinami má postižené SN i ostatní uzliny. 46 % případů však má nepostiženou SN, ale postiženou alespoň jednu jinou uzlinu. V souladu s literárními poznatky se podíl případů s postiženými uzlinami zvyšoval se stádiem pT. Falešná negativita SN byla nalezena 6x (vše pT3), identifikovány 1 – 3 sentinelové uzliny. prům. 1,8 uzliny. Falešná negativita nezávisí na lokalizaci nádoru ani na operační technice, je zřejmě podmíněná biologickou povahou procesu. Relativně vysoké procento falešně negativních výsledků odpovídá vyšším stádiím, v nichž se nádory dostávají k chirurg. řešení (zejména pT3). Definitivně nelze soubor ještě hodnotit, ukazuje se však, že čím nižší pT, tím přesnější je identifikace SN. Plně dostačující se zatím jeví identifikace pomocí patentní modři, u objemnějších mesokolon (většina případů) preferujeme verifikaci „ex vivo“ v přísálí operačního traktu. Prokrájení uzliny a imunohistochemické hodnocení sériových řezů je nezbytné pro eliminaci falešných negativit.

Publikace a přednášky :

1. Šefr R, Penka I, Coufal O, Vagundová M, Fait V, Kaplan Z, Staníček J, Žaloudík J. Biopsie sentinelové uzliny u kolorektálního karcinomu – pilotní studie. Rozhl. Chir. 2003, 82: s. 486-91

2. Šefr R, Penka I, Coufal O, Fait V, Kaplan Z, Vagundová M, Žaloudík J.: Biopsie sentinelové uzliny v chirurgii kolorektálního karcinomu. (Přednáška). XXVII. Brněnské onkologické dny. Brno, 22-24.5.2003.

4.8. Detekce mikrometastáz a reziduální choroby stanovením mRNA transkriptů cytokeratinů.

Vedoucí projektu : RNDr.M.Svoboda

Spolupráce : Mgr.J.Sedláček

Cílem projektu je kvantifikace hladin mRNA pro cytokeratin v mízních uzlinách a krvi, jako markerů přítomnosti elementů epiteliálního původu, tedy pravděpodobných mikrometastáz nádorových buněk, a sledování případné korelace mezi úrovní mRNA cytokeratinu a stavem onemocnění. Problematika přítomnosti mikroresiduální choroby není totiž u solidních nádorů zdaleka dořešena a není dosud ani součástí klinické praxe, ač by byla velmi potřebná.

Převvedli jsme nested PCR stanovení mRNA cytokeratinu 20 na Real Time PCR kvantifikaci transkriptu pro sledování přítomnosti mikrometastáz v krvi a mízních uzlinách u kolorektálních nádorů. Zavedli jsme rovněž podobné vyšetření pro stanovení cytokeratinu 19 pro sledování přítomnosti mikrometastáz u nádorů prsu. Vzhledem k tomu, že cytokeratin 20 je exprimován též v granulocytech, je třeba alespoň v případě kolorektálních nádorů provádět odstranění granulocytů gradientovou centrifugací. Částečné kontaminaci granulocyty se nelze úplně vyhnout. To může být důvodem pro existenci sporných výsledků v literatuře. Z těchto důvodů

jsme museli úroveň exprese CK20 kvantifikovat pomocí Real Time RT PCR a dle možností určit podíl kontaminace granulocyty.

Kvantifikace hladin mRNA pro cytokeratiny je důležitá i z jiného hlediska: pravděpodobnost vzniku metastáz je mimo jiné ovlivněna frekvencí cirkulujících nádorových buněk v krvi - jen nepatrná část cirkulujících buněk se uchytí v jiných orgánech. Množství cytokeratinové mRNA odráží kvantitu cirkulujících nádorových buněk a tím do určité míry i pravděpodobnost vzniku metastáz. Citlivost metody Real Time RT PCR je cca 1000 buněk na 10ml krve, což je o cca 2 řády nižší citlivost než u klasické nested RT PCR. Na druhé straně je omezeno riziko falešně pozitivních výsledků způsobených kontaminací granulocyty.

Projekt detekce mRNA CK19, CK 20 z klinických vzorků je pro svou náročnost stále ve stadiu rozpracování a dosud jsme tedy nepublikovali žádné výsledky.

4.9. Využití stanovení telomerázy jako markeru mikrometastáz u karcinomu prsu

Vedoucí projektu : RNDr. M. Šimíčková, CSc.

Spolupráce: RNDr. L. Lauerová, CSc, prof. RNDr. J. Kovařík, DrSc.

Projekt si klade za cíl ověřit možnost využití (semi)kvantitativního hodnocení aktivity telomerázy (celulární reverzní transkriptázy exprimované v průběhu maligního procesu) pro detekci cirkulujících nádorových buněk v krvi u nemocných s karcinomem prsu. Průkaz volných nádorových buněk pomocí tohoto obecného markeru malignity by mohl přispět k výběru rizikových nemocných v časně fázi vývoje onemocnění a k jejich bezprostřední terapii. Byly propracovány následující dílčí úkoly při stanovení aktivity telomerázy v cirkulujících buňkách:

1) Metoda stanovení aktivity telomerázy pomocí fluorescenčního značení amplikonu (Telomerase XL, firma Intergen) sejevila z předchozího období dostatečně robustní, kalibrační řada standardů vykazovala pro toto stanovení výsledky s reprodukovatelností úměrnou možnostem metody. Byla prokázána linearita vztahu aktivity telomerázy v závislosti na počtu buněk experimentálních linií MCF7 a HeLa s vysokou expresí telomerázy, zatímco fibroblasty aktivitu telomerázy nevykazují.

2) Imunomagnetickou separaci cirkulujících epiteliálních buněk z krve bylo třeba zavést z důvodu oddělení potenciálních cirkulujících nádorových buněk od

aktivovaných lymfocytů, které v malé míře rovněž mohou exprimovat aktivní telomerázu. Záchyt epiteliálních buněk z krve byl prováděn na magnetických partikulích nesoucích protilátku proti epiteliálnímu membránovému antigenu podle firemního doporučení (Collection Epithelial Enrich, Dynal). Pro modelovou buněčnou linii byla dosažena linearita aktivity telomerázy v závislosti na počtu buněk podrobených magnetické separaci. Pro nízkou reprodukovatelnost metody Telomerase XL na úrovni detekčního limitu jsme byli nuceni přejít na soupravu Telomerase PCR ELISA Plus (Roche), která vykazuje dostatečnou senzitivitu i reprodukovatelnost i v nižších hladinách aktivity. Vyšetření je technicky i ekonomicky náročnější, je však reprodukovatelné i citlivější. Nádorový charakter izolovaných buněk byl testován imunofluorescenčním barvením a cytomorfológickou analýzou, a to jak vázané, tak i nenvázané složky tohoto procesu. Imunomagneticky izolované MCF7 buňky byly hodnoceny po vazbě na magnetické partikule (vytvářely se „rozety“) i po uvolnění z vazby podle firemního doporučení. Počet rozet i uvolněných MCF7 buněk vyšetřených a barvených protilátkami proti cytokeratinům zhruba odpovídal očekávaným hodnotám, i když pro použité množství (5 000 a 500 buněk) bylo prokázáno malé procento buněk nenvázaných. Důvodem může být pravděpodobně nasycení možné imunochemické vazby za přítomnosti nadbytku epiteliálních buněk (v krvi nemocných s diseminací nádorového onemocnění očekáváme podle předběžných studií řádově asi desítky cirkulujících nádorových buněk na mililitr).

3) Ověření recovery přídávku buněk MCF7 linie do krve zdravého dárce bylo provedeno původně opět s metodou Telomerase XL. Přestože přídavek vedl ke zvýšení naměřené aktivity telomerázy, nebylo jeho stanovení dostatečně reprodukovatelné. Proto byl celý experimentální postup ověřen i pro metodu Telomerase PCR ELISA Plus. Přídavek způsobil navýšení aktivity telomerázy v závislosti na množství přidaných MCF7 buněk do krve. Podle těchto výsledků lze očekávat, že senzitivita metody bude dostatečná pro průkaz řádově 10 buněk na 1 ml krve.

4) S použitím metody Telomerase ELISA PCR Plus jsem zhodnotili soubor nemocných s diseminovaným karcinomem prsu a u kontrolní skupiny zdravých osob. Diskriminační hranice aktivity telomerázy mezi zdravými osobami a pacientkami s karcinomem prsu odvozená ze souboru zdravých ($0,32 \pm 0,451$ pro $N=18$) vykazovala hladinu relativní aktivity telomerázy 1,2. Senzitivita pro soubor nemocných s aktivitou telomerázy $3,53 \pm 6,722$ (pro $N=15$, rozsah 0-23,89) se pohybovala na hladině 39% (specifická 93%). Přestože jsme neočekávali, že u všech pacientek ve stadiu progresu

onemocnění cirkulující buňky prokážeme, je senzitivita poměrně dost nízká pro možnost jejich průkazu v cirkulaci v časných stádiích onemocnění. Metoda vyžaduje zhodnocení jednak již vyšetřených nemocných, jednak rozšíření souboru. Je zajímavé, že ne vždy je nalezeny vysoká hodnota aktivity telomerázy v krvi tam, kde je vysoká koncentrace sérového CA15-3. Z dosavadních výsledků nelze jednoznačně uzavřít, zda může vybraná metoda stanovení aktivity telomerázy s dostatečnou senzitivitou rozlišit nemocné, u nichž již v časných fázích nádorového onemocnění dojde k tvorbě „mikrometastáz“, tj. k přechodu nádorových buněk do cirkulace. Přestože byla v našem souboru převážně diseminovaných nemocných aktivita telomerázy charakterizující nádorové buňky v cirkulaci nalezena v několika případech značně vysoká, senzitivita pro celý soubor byla jen 39% při 93% specificitě. Pro definitivní zhodnocení je třeba studii rozšířit i na nemocné v časně fázi onemocnění.

Publikace a přednášky:

1.M.Šimíčková, M.Nekulová, L.Pecen, M.Černoch, M.Vagundová, Z. Pačovský: Quantitative determination of telomerase activity in breast cancer and benign breast diseases. Neoplasma 48 (4), 2001, 267-273.

2. Šimíčková M., Nekulová M., Pecen L., Vagundová M., Maláska J., Obermannová R., Lauerová L., Kovařík J.: Telomerase activity in breast tumor tissues and its possible use for detection of circulating carcinoma cells. Biomarkers and Environment, 5, 2003, 98 (Abstrakt, poster). Konference: CECHTUMA 2003 (4th Central European Conference on Human Tumor Markers).13.-16.2. 2003, Karlovy Vary.

3. M.Simickova, L.Lauerova, M.Nekulova, L.Pecen*, M.Vagundova, J.Malaska, R.Obermannova, J.Kovarik: Telomerase activity in breast cancer tissue and circulating carcinoma cells. J.Tumor Marker Oncology 18, 2003, 202-203 (Abstrakt, poster). The 20th IATMO Conference (Tumor markers in cancer diagnosis and therapy), Siena, Itálie 21.-25.6.2003.

4. Šimíčková M.: Aktivita telomerázy a její význam pro onkologii (přednáška). 4th Central European Conference on Human Tumor Markers,, Karlovy Vary. 13.-16.2.2003

P 5 : Lokoregionální léčba nádorů

Koordinátor projektu : MUDr.V.Fait,CSc.

5.1. : Detekce sentinelových uzlin v diagnostice a terapii nádorů

Vedoucí projektu : MUDr. V. Fait, CSc.

Technika sentinelových biopsií byla ve větší míře zavedena v diagnostice a terapii maligního melanomu a karcinomu prsu, ve stavu zavádění je dále u kolorektálních tumorů – zde předmětem samostatného grantového projektu v programu P4.

U maligního melanomu je technika pravidelně užívána u nádorů s nodularitou nebo s tloušťkou dle Breslow nad 1mm. Technicky je užívána předoperační lymfoscitnigrafie v jednodenním schématu, s peroperační navigací scintilační sondou v kombinaci s vitálním barvivem. V patologickém zpracování je užíváno sériové prokrájení s barvením jednotlivých řezů HE, s následným doplnění imunohistochemie Melam A. Pozitivní nález je indikací k disekci regionální oblasti.

Parciálním cílem práce byla optimalizace morfometrického vyhodnocení metastáz

v sentinelových uzlinách u melanomu. Mikrometastatické fokusy se ukázaly relativně často tvarově nepravidelné a nepřesně ohraničené, často navíc s dispersně rozptýlenými melanomovými buňkami. Toto znemožňuje měření průměru max. metastatického fokusu, žádané pro zařazení do prognostické studie WHO Melanoma Programme.

Byla navržena metodika měření max. plochy metastatického postižení uzlin. Metodika byla odzkoušena na systému obrazové analýzy LUCIA. Imunohistochemicky pozitivní nádorové buňky a agregáty (Melan A +) se po kontrastním znázornění tmavě hnědou barvou DAB automaticky naprahují proti slabě modrému pozadí s použitím barevného prahování systému LUCIA. Naprahovaný obraz se převede do binárního módu. Poté jsou binární objekty systémem scanovány a měřeny. V měření lze vybrat řadu tvarových parametrů, k dispozici je také basální statistika. V řešené problematice vyhovuje parametr „total area“, což poměrně dobře reflektuje masu nádoru.

Pro maligní melanom byla technika sentinelové biopsie v roce 2002 použita u 160 nových pacientů, s úspěšností nálezu 98%. Pozitivní nález byl u 35 pacientů, tj 22%

U karcinomu prsu je technika v současné době užívána u pacientek s verifikovaným solitárním karcinomem prsu do velikosti 3 cm, s negativním sonografickým nálezem v stejnostranné axille. Použita je opět předoperační lymfoscintigrafie v jednodenním schématu, peroperačně je užita kombinace radionavigované chirurgie s mapováním lymfatických pomoci vitálního barviva. Patologické hodnocení je opět postaveno především na sériovém prokrájení s barvením HE a následným imunohistochemickým vyšetřením na cytokeratiny.

Positivní nález v sentinelové uzlině je indikací k disekci axilly a k systémové terapii.

V roce 2002 byla technika sentinelové biopsie použita u 161 pacientek, s úspěšností 99,5%. Pozitivní nález byl u 38 pacientek, tj. ve 24%.

Celkově lze říci, že zavedením a optimalizací metody detekce sentinelových uzlin u maligního melanomu a karcinomu prsu je 78% pacientů s maligním melanomem ve stadiu I a II a 76% pacientek s karcinomem prsu ve stadiu I a II A ušetřeno exenterace lymfatické oblasti, což má nesporně příznivý dopad na minimalizaci léčby, zvýšení komfortu léčebného postupu, snížení morbidit způsobené léčbou a patrně i na záchyt metastáz v časnější fázi než je tomu u rutinního a necíleného zpracování uzlinových vzorků. Právě tento aspekt, který se může projevit i na vyšší úspěšnosti onkologické léčby při snížení její morbidit bude dále

podrobněji analyzován. MOÚ disponuje nejčetnějším souborem pacientů s detekcí a exstirpací sentinelových uzlin v České republice a tento soubor je i dobrým základem pro longitudinální rozdíly v léčebných výsledcích mezi pracovišti a různým algoritmem léčebných postupů.

Publikace a přednášky:

1. Vagunda V: Evaluation of melanoma lymph node micrometastases by the LUCIA image analysis system. (Lecture.) XXXIII Review Meeting WHO Melanoma Programme +1st. Mediterranean Melanoma Meeting, Athens, Grece, 2-5 May, 2003

2. Fait, V., Chrenko, V., Coufal, O., Jandáková, E., Staníček, J.: Sentinelová biopsie u karcinomu prsu, krátkodobé výsledky. Přednáška. XXVII. Brněnské onkologické dny, 22.-24.května 2003, a Edukační sborník. XXVII. Brněnské onkologické dny, 22.-24.května 2003,, s. 180.

3. Chrenko, V., Fait, V., Šefr, R., Žaloudík, J., :Biopsie sentinelové uzliny v chirurgické léčbě nádorů. Sanquis, 2003, 26, s. 30

4. Fait, V., Chrenko, V., Stanicek, J.: Sentinel Node Biopsy in the Breast Cancer, Short Term Results , 7th Annual Meeting, European Society of Surgery, Prague, Nov 20-22 2003.

5.2. : Experimentální radioterapie

Vedoucí projektu : doc.MUDr. P.Šlampa,CSc.

1. *Využití částic o vysokém LET v brachyradioterapii, hypoxie, experimentální radioterapie*

V r. 2003 byl přístroj pro neutronovou intrakavitární radioterapii připraven pro klinické zkoušení v rámci studie, jejíž protokol byl schválen Etickou komisí MOÚ. Zahájení studie bylo zatím odloženo z důvodu vyhasínajícího zdroje california, neboť ozařovací čas by byl pro nemocné pacientky příliš dlouhý a zatěžující.

2. *Intraoperační brachyradioterapie u nádorů prsu, jícnu a žlučových cest*

Probíhá klinické ověřování účinnosti peroperační brachyradioterapie u sarkomů měkkých tkání a u nádorů prsu. Byly vytvořeny standardy pro brachyradioterapii karcinomu mammy a karcinomu jícnu a algoritmy léčebné strategie brachyradioterapie.

3. *Konkomitantní chemoradioterapie*

Metody konkomitantní chemoradioterapie, používající se v MOÚ, byly publikovány v řadě publikací, např. této problematice bylo věnováno celé jedno číslo (supplementum) Časopisu lékařů českých od autorů z našeho ústavu. Zvláště v neoadjuvantní konkomitantní chemoradioterapii nádorů konečníku jsou prezentovány výborné léčebné výsledky v českých i zahraničních odborných periodikách.

Řešitelský kolektiv vydal v roce 2003 ve spolupráci s redakcí Časopisu lékařů českých monotematické suplementum o radioterapii, kde jsou v řadě prací podrobně uvedeny poznatky získané řešením projektu VZ 5.2.

Publikace :

1. Šeneklová, Z., Soumarová, R. Moderní směry v léčbě nádorů zářením.
Sanquis, 2003, 26, s. 33-35
2. Soumarová, R., Perková, H., Čoupek, P. Kontroverzní otázky v pooperační radioterapii časných stádií nádorů prsu. Klinická onkologie, 2003, 16 (1), s. 4-9
3. Šlampa, P. Přehled konkomitantní chemoterapie solidních nádorů.
Časopis lékařů českých, 2003, 142, suppl.1, s. 4-8

5. Šeneklová, R., Horová, H., Soumarová, R. Konformní radioterapie. Časopis lékařů českých, 2003, 142, suppl. 1, s. 9-13
6. Soumarová, R., Horová, H., Ježková, B. Konkomitantní chemoradioterapie nádorů hlavy a krku. Časopis lékařů českých, 2003, 142, suppl. 1, s. 14-17
7. Soumarová, R., Horová, H., Šlampa, P., Šeneklová, Z. Využití konkomitantní chemoterapie u nazofaryngeálního karcinomu. Časopis lékařů českých, 2003, 142, suppl. 1, s. 18-21
8. Soumarová, R., Perková, H., Šeneklová, Z., Karásek, P. Konkomitantní chemoradioterapie u nádorů pankreatu. Časopis lékařů českých, 2003, 142, suppl. 1, s. 29-31
9. Čoupek, P., Šeneklová, Z., Perková, H., Kebedeová, D. Chemoradioterapie nemalobuněčného bronchogenního karcinomu. Časopis lékařů českých, 2003, 142, suppl. 1, s. 40-43
10. Soumarová, R., Kalábová, R., Perková, H. Konkomitantní chemoradioterapie v léčbě karcinomu vulvy. Časopis lékařů českých, 2003, 142, suppl. 1, s. 51-52
11. Horová, H., Soumarová, R., Šeneklová, Z., Růžičková, J. Nežádoucí účinky konkomitantní chemoradioterapie a možnosti jejich ovlivnění. Časopis lékařů českých, 2003, 142, suppl. 1, s. 53-56
12. Soumarová, R., Perková, H., Bartlová, R., Tichá, H., Šeneklová, Z. Konformní plánování intersticiální brachyterapie s využitím 3D plánovací konzoly. Klinická onkologie, 2003, 16 (4), s.168-170
13. Soumarová, R., Perková, H., Chrenko, V., Žaloudík, J., Fait, V., Šlampa, P. Samostatná poresekční intersticiální brachyterapie časných stádií karcinomu prsu s využitím HDR afterloadingu. Radiační onkologie, 2003, 3, (1), s. 11-16
14. Soumarová, R., Perková, H., Chrenko, V., Žaloudík, J., Fait, V., Šlampa, P. Principy poresekční brachyterapie solidních nádorů s využitím HDR afterloadingu. Rozhl. Chir., 2003, 82 (6), s. 301-306

15. Tačev, T., Ptáčková, B. Strnad, V. Californium-252 (²⁵²Cf) vs. conventional Gamma radiation in the brachytherapy of advanced cervical carcinoma. Long-term treatment results of a randomized study. *Strahlenther. Onkol.*, 2003, 179, s. 377-84
16. Soumarová, R., Perková, H., Šeneklová, Z., Horová, H., Budíková, M. Prognostic outcome of local recurrence after breast conserving surgery and mastectomy. *Radiol. Oncol.* , 2003, 37 (2), 79-82
17. Soumarová, R., Perková, H., Chrenko, V., Žaloudík, J., Šlampa, P., Fait, V., Bartlová, R. Peroperační intersticiální brachyterapie časných stádií karcinomu prsu s použitím HDR afterloadingu – metodologie. *Onkologie v gynekologii a mammologii*, 8. ročník, 2003, Sborník přednášek
18. Soumarová, R., Perková, H., Šeneklová, Z., Bártlová, R., Žaloudík, J., Chrenko, V., Šlampa, P., Fait, V. Poresekční brachyterapie solidních nádorů. *Radiační onkologie*, 2003, Sborník příspěvků, IV. roč. onkolog sympózia, Hradecké dny. ISBN 80 –238-9604-0, s. 41-44
19. Soumarová, R., Perková, H., Šlampa, P., Chrenko, V., Žaloudík, J., Fait, V., Bartlovám R., Tichá, H. Možnosti poresekční brachyterapie v léčbě solidních nádorů. *BOD 2003*, ISBN – 80-239.0175-3, Edukační sborník
20. Tačev, T., Grigorov, G., Papírek, T., Kolařík, V. Remote afterloading for intracavitary and interstitial brachytherapy with Californium-252. *Nucl. Instr. and Meth. Phys. Rers. B*, 2003
21. Tačev, T., Strnad, V., Ptáčková, B. Californium-252 vs. gamma radiation in the brachytherapy of advanced cervical carcinoma: comparative treatment results of ten-years, randomized study, *Nucl. Instr. and Meth. Phys. Rers. B*, 2003
22. Šlampa, P. Radiotherapy of Prostate Cancer in Masaryk Memorial Cancer Institute. *Worshop on molecular guided combined therapy for prostate Cancer*. Gliwice, 2003
23. Soumarová, R., Horová, H., Šeneklová, Z., Růžičková, J., Perková, H., Horová, I., Budíková, M. *Prognostic outcome of local recurrence after mastectomy. 2nd Congress of WSBH: (World Society for Breast Health), Budapest, 2003*

5.3. : Izolovaná hypertermická perfuze končetin

Vedoucí projektu : MUDr. V.Chrenko, CSc

Izolovaná hypertermická perfuze končetin je technicky náročná metoda terapie končetinových relapsů, především u maligního melanomu, kterou v ČR nabízí pouze Masarykův onkologický ústav ve spolupráci s CKTCH. Lze ji perspektivně využít i u jiných nádorů, především končetinových sarkomů. Indikace k tomuto výkonu jsou poměrně řídké, nicméně u pacientů s rozsáhlými končetinovými relapsy se jedná o metodu, která zásadním způsobem ovlivňuje jejich osud.

Metodicky v současné době používáme již zvládnutou metodu izolované perfuze dolní končetiny s přístupem cestou femorálních nebo ilických cév, dle výšky postižení končetiny s ohřevem končetiny na 39°C a perfusí Melphalanem v dávce 50mg/kg po dobu 1 hodiny.

V průběhu roku 2003 byla dále dopracovávána metodika pro naše účely, z důvodů potřeby speciálního technického vybavení jsou samotné výkony uskutečňovány ve spolupráci s Centrem kardiochirurgie a transplantační chirurgie ve FN U sv.Anny v Brně. V roce 2003 byla metoda provedena dalších u 3 pacientů s dosažením kompletní remise u všech takto léčených pacientů.

Pro zhodnocení metody je zapotřebí dalších klinických zkušeností a rozšiřování souboru, je však nesporné, že již v této fázi prostředky VZ přispěly k zavedení této unikátní, zprvu jen experimentální metody do klinické praxe a její dostupnosti pacientům v ČR.

Publikace a přednášky:

Chrenko, V., Fait, V., Penka, I., Slavík, J., Kocák, I., Černý, J.: Izolovaná hypertermická perfuze Melphalanem u končetinových lokoregionálních relapsů maligního melanomu. Přednáška. XXVII. Brněnské onkologické dny, 22.-24.května 2003,

Chrenko, V., Fait, V., Penka, I., Slavík, J., Kocák, I., Černý, J.: Izolovaná hypertermická perfuze Melphalanem u končetinových lokoregionálních relapsů maligního melanomu. Edukační sborník. XXVII. Brněnské onkologické dny, 22.-24.května 2003,, s. 174.

P 6 : Optimalizace a monitorace systémové léčby nádorů

Koordinátor programu : MUDr. I. Kocák

6.1. : Sledování dynamiky sérových nádorových markerů v odpověď na chemoterapii

Vedoucí projektu : MUDr. M. Nekulová, CSc.

Spolupráce : MUDr. D. Valík, RNDr. M. Šimíčková, CSc.

i) Hodnocení efektu terapie pomocí dynamiky sérových markerů u nádorů varlat (C62)

Pacientů léčených pro **nádor varlete** bylo zařazeno 66, z nich 24 při PD nemělo zvýšené markery. V hodnotitelných případech (42) byla odpověď zaznamenána 37x (CR a PR), zatímco PD trvala, tedy nebyl efekt prokázán u 5 nemocných. Byly vyšetřovány nádorové markery AFP, beta-hCG u všech nemocných. U některých navíc také IPK a NSE. Soubor je v současné době předán ke zhodnocení statistickému (DFI dle Wilcoxonova, tj. test pro krátkodobé přežívání a test pro dlouhodobé přežívání (Log-Rank). Práce bude prezentována v příštím roce (CECHTUMA 2004, Praha) a publikována.

Z předběžných výsledků lze uvést zhodnocení markerů AFP a hCG - hodnoty před-, po- a poměry hodnoceny jako spojitá čísla (tj. Coxův model nebo testování vlivu spojitě proměnné na přežití zobecněným Wilcoxonovým testem), tak vychází nejlépe **poměr AFP** (hodnota po- dělená hodnotou před-) a pak **poměr hCG**. Po kategorizaci - dle mediánu, resp. 50 %

pokles, poměr AFP vychází jen s p-value blížící se hraniční signifikanci 0.05, **hCG** je významné - ale nejlepší je pokles na 5% hodnoty před terapií (a ne 50%!). Pro hCG je nejlépe požadovat velmi výrazný pokles (na 5% původní hodnoty), zatímco u AFP je rozumné pracovat s poklesem na 50% hodnoty před terapií. Práce bude prezentována v příštím roce (CECHTUMA 2004, Praha) a publikována.

Coxův model proporcionálních rizik a kroková metoda výběru optimálních prediktorů pro DFI se vstupními parametry AFP_pred AFP_po AFP_ratio hCG_pred hCG_po hCG_ratio vybrala

Summary of Stepwise Selection

Step	Variable	Chi-Square	p-value
1	AFP_ratio	5.0903	0.0241
2	hCG_ratio	4.8627	0.0274

Bez kategorizace je tedy poměr AFP ještě lepší prediktor DFI než poměr hCG.

ii) Doplnění souboru karcinomů tlustého střeva (C18)

Nemocných s diagnózou **kolorektálního karcinomu** léčených pro návrat choroby - zatím bylo zařazeno 64 nemocných, avšak jen 30 mělo před terapií zvýšené hodnoty markerů. Z našeho hlediska je tedy nehodnotitelných 34 nemocných. Z prvních výsledků lze uvést, že CEA je významné vzhledem k odpovědi na terapii, zatímco CA 19-9 jen jako významný prognostický faktor před zahájením terapie - hodnoceno Coxovým modelem. Vhodné je doplnit soubor ještě dalšími pacienty.

iii) Zhodnocení validity markerů SCC a CYFRA 21-1 při posuzování léčebné odpovědi u spinocelulárního ca děložního hrdla děložního (C53)

U 120 nemocných léčených pro diagnózu **karcinom hrdla děložního** ve stadiu IIB – IIIB v MOÚ byly vyšetřovány sérové nádorové markery SCC, CYFRA 21-1, CEA, vzácně TPS během sledování průběhu choroby. CEA a CYFRA 21-1 byly stanovovány

chemoluminiscenční imunoanalýzou (ECLIA, Elecsys 2010, Roche), SCC enzymovou imunoanalýzou na mikročasticích (MEIA, IMX, Abbott). TPS bylo analyzováno enzymoimunoanalyticky (EIA, Cobas Core, IDL Biotech AB). Byla hodnocena senzitivita, specifita, pozitivní a negativní predikční hodnota pro jednotlivé parametry validity. Vzhledem k terapii byl soubor rozdělen do 2 skupin, vždy po 60 nemocných, které byly léčeny jen radioterapií (první skupina) versus konkomitantní chemoterapií (Taxol a Cisplatina) s radioterapií (druhá, prognosticky riziková skupina). Do druhé skupiny byly řazeny nemocné charakterizované jako horší prognostická skupina podle velikosti tumoru (bulky disease = objemné tumory nad 4 cm), gradingu (převážně G3), s agresivním růstem a angioinvasí. Radioterapie se řídila protokolem rozlišujícím skupiny dle stadia: skupina IIB nonbulky a skupina IIB bulky až III B. Nádorové markery byly stanoveny vždy před zahájením terapie a po jejím skončení.

Pro hodnocení nádorových markerů byly vytvořeny ROC křivky zobrazující závislost senzitivity a falešné pozitivity (1-specifita) a plochu pod křivkou (AUC). Relativní riziko (RR), které vyjadřuje poměr pravděpodobnosti návratu choroby při zvýšené hodnotě markeru proti normální hodnotě markeru spolu s dalšími parametry pro SCC a CYFRA 21-1 udává Tabulka 1.

Senzitivita pro SCC při 90% specifitě při progresi ve skupině nemocných dále léčených jen radioterapií (RT) byla 53% (31/60). Po skončení terapie trvale zvýšená hodnota tohoto markeru potvrzovala neúspěch terapie u 12 nemocných (v 16 případech nebylo dosaženo CR), zatímco pokles hodnoty SCC po terapii u 19 nemocných koreloval s delším bezprogresovým přežíváním. Cyfra 21-1 byla před terapií zvýšena u 21 nemocných (35% senzitivita), po terapii však nebyla zvýšena u žádné z nemocných, kde nebylo dosaženo efektu.

Ve skupině léčených konkomitantní chemoradioterapií (CHRT) byla senzitivita SCC 62% před terapií (37/60) při 90% specifitě. Po skončení terapie přetrvávala vysoká hodnota tohoto markeru u 4 nemocných a predikovala tak neúspěch terapie. CR nebylo dosaženo celkem u 8 nemocných této skupiny. CYFRA 21-1 před terapií byla zvýšena jen u 15 nemocných (25% senzitivita). Po terapii byla zvýšena jen 1 nemocné z 8, kde nebylo dosaženo efektu.

Při sledování efektu terapie v uvedené studii se také lépe osvědčil SCC. Pras E (2002) uvádí výsledky sledování markerů SCC a CYFRA 21-1 ve své studii 114 nemocných stadia IB – IV léčených podobným způsobem jako v naší studii (RT a CHRT konkomitantní). V CHT však bylo použito carboplatiny a 5 FU. Senzitivitu pro SCC získal 60% a pro CYFRA

21-1 = 46% . Zvýšené hodnoty markerů po skončení terapie indikovaly residuální tumor pro SCC s 92% pravděpodobností, pro marker CYFRA 21-1 se 70% pravděpodobností. T. Ohno (2003) hodnotil SCC jako prediktor odpovědi k radioterapii karcinomu čípku u 63 nemocných. U nemocných, kde při progresi byla hodnota SCC 5-30 ng/ml (senzitivita SCC v souboru byla 74,6%), tam při dosažené kompletní remisi poklesla hodnota SCC o více než 70% po 4 týdnech terapie. Bylo tak možno podle dynamiky SCC během terapie dobře odlišit responderky od málo reagujících nemocných. Výhodou je krátký biologický poločas tohoto markeru (20 min.). Proto již 1-2 dny po dosažení kompletní remise dochází k jeho normalizaci v krvi. V naší studii zvýšené hodnoty SCC indikovaly residuální tumor s 91% pravděpodobností, Cyfra 21-1 se 75% pravděpodobností. TPS a CEA pro malý počet indikovaných vyšetření nebylo možno statisticky věrohodně zhodnotit.

Naše studie potvrdila, že nejvalidnějším markerem této choroby je SCC. Celková senzitivita pro uvedený soubor nemocných před zahájením terapie byla 56,6% (68/120), tedy o něco lepší než jsme pro diagnózu karcinomu čípku získali během dlouhodobého sledování senzitivity SCC na našem pracovišti (Tab. 1). Marker CYFRA 21-1 prokázal horší celkovou senzitivitu – jen 30%ní (36/120). Také pro monitorování efektu terapie je SCC vhodnější. Při návratu choroby však u některých spinocelulárních karcinomů dochází ke zvýšení jen jednoho z referovaných markerů, proto nelze upustit od monitorování obou (SCC i CYFRA 21-1). Práce bude publikována v Labor Aktuell 4/03, str. 4-6 .

Tab.1 : Parametry validity pro SCC a CYFRA 21-1 u C53

Markery	N		AUC	cut-off (ug/l)	SP	SN	PV+	PV-	RR
	CR	PD							
SCC	965	167	0,755	1,2	90	51,5	46,5	91,4	5,7
CYFRA 21	977	174	0,527	3,3	90	44,3	15,9	97,0	5,3

CR = kompletní remise, PD = progrese onemocnění

Publikace a přednášky :

1. Nekulová M., Šimíčková M., Petráková K., Pecen L.¹, Valík D.: Assessing efficacy of therapy in breast cancer patients using serum CA 15-3, Cechtuma, Karlovy Vary 13-16.2.2003, Abstrakt in Biomarkers and Environment, Vol 5, No3-4, 2002, 82
2. Pecen L., Eben K., Vondráček J., Nekulová M., Šimíčková M. et al.: Mathematical basis of systems for help to interpret tumor marker measurements, Cechtuma, Karlovy Vary 13-16.2.2003, Abstrakt in Biomarkers and Environment, Vol 5, No3-4, 2002, 73
3. Nekulová M., Šimíčková M., Pecen L., Valík D.: Sérové markery v detekci nádorů a monitorování efektu léčby, Sanquis, 26/2003. 45-47
4. Nekulová M., Kalábová R., Šimíčková M., Pecen L., Neumannová R., Valík D.: Nádory děložního čípku, jejich terapie a vyšetření nádorových markerů. Labor Aktuell CZ, 4/03, str. 4-6
5. Nekulová M., Pecen L., Kalábová R., Šimíčková M., Valík D.: Predikce terapeutické odpovědi u nemocných s karcinomem vaječníku léčených chemoterapií pomocí dynamiky CA 125 v séru. XXIV. Imunoanalytické dny s mezinárodní účastí 27. – 29. duben 2003, Bechyně – abstrakt v čas. Biomarkers and Environment.)
6. Nekulová M., Petráková K., Šimíčková M., Pecen L., Kalábová R., Valík D.: Predikce efektu chemoterapie pomocí nádorových markerů. Krajský seminář imuno metod Brno, 15.5.03
7. Nekulová M., Šimíčková M., Petráková K., Pecen L., Valík D.: Predikce efektu cytostatické terapie podle dynamiky nádorových markerů, BOD, Brno 22-25.5.2003 - Abstrakt

8. Nekulová M.: Nové postupy při hodnocení nádorových markerů, Seminář OLM FN USA, 5.6.2003
9. Nekulová M., Šimíčková M., Kalábová R., Pecen L., Valík D.: Computer decision support system for therapeutical effect evaluation, Znojmo, Abbott dny 12-13.6.2003
10. Nekulová M.: Senzitivita a specificita biochemických metod, Centrum národního zdraví, Brno, 1.9.2003
11. Nekulová M., Šimíčková M., Kovářová M., Pecen L., Valík D.: Vyšetřování sérových nádorových markerů u maligního lymfogranulomu. X.JOD - Č.C.Krumlov- 12.říjen 2003 -poster
12. Nekulová M., Šimíčková M., Petráková K., Pecen L.¹, Valík D.: Prediction efficacy of chemotherapy using serum tumor markers. 4.CCMB (IFCC) Zadar, 23.- 26.9.2003 – přednáška v angličtině , abstrakt

6.2. Tkáňové markery karcinomu prsu, jejich prognostický a prediktivní význam se zaměřením na HER-2/neu v séru

Vedoucí projektu : RNDr. M. Šimíčková, CSc.

Biologická charakterizace karcinomu prsu, která byla zahájena již v 80.letech vyšetřováním hormonálních receptorů, přispívá v poslední době díky novým prediktivním faktorům výrazně k terapeutickým rozvahám nejenom v době diseminace onemocnění, ale již v časně fázi choroby. Nemocné s expresí receptorů růstových faktorů typu HER-2/neu jsou vhodnými kandidátkami pro terapii specifickou protilátkou proti tomuto onkoproteinu (trastuzumab, HERCEPTIN). Pacientky indikované k léčbě musí splňovat kritéria výrazné produkce tohoto onkoproteinu v primárním nádoru, jehož průkaz je stále předmětem diskuse (v úvahu připadá imunohistochemická, event. FISH technika). Možnost kvantitativního průkazu HER-2/neu v extraktu tkáně ELISA technikou je vázána na úschovu zamrazené nativní tkáně v nádorové bance.

Přechod solubilní extracelulární domény HER-2/neu do séra se zdá být podle dosavadních poznatků významný nejen pro potvrzení vhodnosti indikace, ale především pro monitorování efektu této léčby. Vzhledem k její možné toxicitě (včetně kardiotoxicity) je průkaz její neúčinnosti (a přerušení aplikace) přínosem především pro nemocného, pomineme-li složku ekonomickou. Obecně lze podle dosavadních výsledků očekávat, že většina nemocných, u nichž nedojde k poklesu původně zvýšených hodnot HER-2/neu po prvním cyklu, na terapii nereagují. Neméně významné se jeví být rovněž hodnocení dynamiky sérových hodnot tohoto onkoproteinu při dlouhodobé aplikaci HERCEPTINU, kde nárůst původně fyziologických hodnot HER-2/neu může znamenat neúspěšnost terapie.

Z našich výsledků za toto období je možno shrnout:

1. Byla ověřena **korelace hodnot HER-2/neu v extraktu nádorové tkáně pro 2 metody** jeho stanovení dostupné aktuálně u nás na trhu – **ELISA firmy Oncogene Science a Bender Medsystems**, lišících se možnostmi užití při aplikaci HERCEPTINU (pouze první metoda je vhodná) i cenou za jedno vyšetření. Byla prokázána korelace imunohistochemicky a kvantitativně (ELISA extraktu) vyšetřeného HER-2/neu i pro soubor rozšířený o další primární nádory.
2. Zavedli jsme aplikaci metody **stanovení HER-2/neu v séru** setem firmy Oncogene Science, umožňující vyšetřovat tento onkoprotein v séru během terapie Herceptinem. Byly upřesněny analytické otázky provedení metody: ověřen kontrolní systém, reprodukovatelnost a vliv ředění vzorku.
3. Byly vyšetřeny opakované odběry nemocných před zahájením i v celém průběhu terapie Herceptinem z odběrů uložených v sérové bance (séra těchto pacientek skladována od r. 2000) i v souboru dalších 12 pacientek z tohoto roku, které jsou v pravidelných (obvykle 3 týdenních) intervalech sledovány. Aktuálně vyšetřujeme 16 nemocných, u dalších tří byla terapie letos skončena.
4. Ve spolupráci s kliniky byla **zhodnocena odpověď na terapii** ve vztahu
 - a) k základním předterapeutickým sérovým koncentracím HER-2/neu,
 - b) k hodnotám poměru poklesu tohoto parametru v séru před terapií a po 3 měsících léčby (dosud zhodnoceno 15 nemocných).
5. Bylo zjištěno:
 - a) Pacientky **bez odpovědi na terapii** vykazovaly obvykle **zvýšené sérové koncentrace** v celém průběhu léčby.
 - b) U pacientek, kde bylo dosaženo **kompletní nebo parciální remise**, byl **poměr poklesu** předléčebných hodnot HER-2/neu k hodnotám naměřeným při odběru 3

měsíce od zahájení terapie **vyšší než 1,5 u 86% nemocných** (6/7). Diference v tomto parametru je pro uvedené skupiny (kompletní a parciální remise versus progrese) statisticky významná.

Doplněním vyšetření sérového HER-2/neu o hodnoty nově zařazených nemocných budou výsledky připraveny k publikování. K podobným závěrům dospělo aktuálně i několik dalších světových pracovišť (1-3). Zhodnocení významu nárůstu sérového HER-2/neu po dlouhodobé úspěšné léčbě Herceptinem je třeba provést na větším souboru – projevuje se pravděpodobně jeho „lead time“ před klinickým průkazem další progrese onemocnění, kdy je třeba zvážit vysazení terapie.

6. Kvantitativní metoda stanovení sérové extracelulární domény HER-2/neu je dále významným indikátorem nejen k posouzení účinnosti hormonální léčby u nemocných s pozitivními steroidními receptory, ale i účinnosti specifické terapie vybranými cytostatiky, např. antracykliny apod. Význam vyšetření tohoto parametru v séru pravděpodobně ještě dále poroste.
7. Terapie Herceptinem založená na specifickém působení protilátky proti proteinovému produktu onkogenu HER-2/neu patří k jedné z prvních specificky zaměřených léčebných modalit. Lze očekávat, že sérový HER-2/neu bude patřit k nádorovým markerům druhé generace, tj. k specifickým indikátorům této léčby, umožňujícím časné zhodnocení její úspěšnosti.

Citovaná literatura potvrzující aktuálně získané výsledky :

1. Hoopman M., Neuman R., Tanasale T., Schondorf T.: *Her-2/neu determination in blood plasma of patients with HER-2/neu overexpressing metastazing breast cancer: a longitudinal study. Anticancer Res. 22, 2002, 1031-1034.*
2. Esteva F., Valero V., Booser D. et al.: *Phase II study of weekly Docetaxel and Trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. J.Clin.Oncol. 20, 2002, 1800-1808.*
3. Burstein H., Harris L.N., Marcom P.K. et al.: *Trastuzumab and Vinorelbine as a first-line therapy for HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. Multicentric phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predicitive factors, and cardiac surveillance algorithm. J.Clin.Oncol. 21, 2003, 2889-2895.*

Publikace a přednášky :

1. M.Šimíčková, M.Nekulová, L.Pecen, M.Vagundová, E.Jandáková, K. Petráková: Soluble HER-2/neu in tissue extracts and serum of patients with breast cancer. *Biomarkers and Environment*, 5 (3,4), 2002, 97 (Abstrakt poster). Konání konference: 4th Central European Conference on Human Tumor Markers.13.-16. 2.2003, Karlovy Vary.
2. M.Simickova, M.Nekulova, L.Pecen*, M.Vagundova, E.Jandakova, K. Petrakova: Soluble HER-2/neu levels in breast tumor tissue and serum of patients during Herceptin therapy . *J.Tumor Marker Oncology* 18, 2003, 202 (Abstrakt poster). Konání konference: 21.-25.6.2003 Siena, Itálie.
3. M.Šimíčková: Zpráva z 20.Mezinárodní konference o lidských nádorových markerech 2003. *Klinická onkologie*, 16, 2003,196-197.
4. M.Šimíčková , M.Nekulová, L.Pecen: Sérové nádorové markery a jejich význam v éře rozvoje molekulárně-biologických technik. *LA Czech*, 4, 2003, 7-9.
5. M.Šimíčková, M.Nekulová, L.Pecen, M.Vagundová, E.Jandáková, K.Petráková: HER-2/neu onkoprotein – nádorový marker 2.generace u nemocných s karcinomem prsu? (Pouze abstrakt). *Pokroky v klinické biochemii. VI.celostátní sjezd české společnosti klinické biochemie*. Konání konference: 6.-8.10.2003, Hradec Králové.
- 6.3. : **Doxorubicinem indukovaná kardiomyopathie – stanovení markerů časného postižení myokardu a možnosti kardioprotekce v klinické praxi**
Úloha apoptózy kardiomyocytů v patogeneze kardiomyopathie indukované doxorubicinem a možnosti protekce myokardu v experimentálním modelu

Vedoucí projektu: MUDr. J. Umlauf, PhD

Spolupráce : MUDr. M. Horký

Aktivní buněčná smrt hraje důležitou úlohu při rozvoji patogeneze celé řady onemocnění srdce. Existuje celá řada mechanismů ,které se podílejí na aktivaci apoptózy kardiomyocytů: ischémie, inhibice syntézy nukleových kyselin a proteinů, alterace transkripčních mechanismů, přetížením vápníkem, hyperlipidémie a vznik kyslíkových radikálů.

Vznik doxorubicinem – indukované kardiomyopathie spojené se vznikem srdečního selhání se vysvětluje postupným zánikem kardiomyocytů. Doxorubicin moduluje genovou expresi kardiomyocytů a způsobuje inhibici syntézy celé řady proteinů, např. troponiny. Tyto změny vedou k aktivaci buněčné smrti.

Vzhledem k přímému účinku doxorubicinu na transkripční aktivitu kardiomyocytu jsme použili panel biochemických a imunohistochemických metod k průkazu akutních změn v jadérku, jádře a cytoplasmě. Kladli jsme důraz na detekci translokace signálu z cytoplasmy do jádra buňky, což je klíčový moment při spuštění aktivní buněčné smrti.

Kryší kardiomyocyty, izolované pomocí Langendorfova preparátu, byly krátkodobě kultivovány v médiu s vysokou koncentrací doxorubicinu (20 mikromol). Biochemická analýza jadérových a jaderných preparátů kardiomyocytů prokázala rychlý nástup aktivní buněčné smrti u těchto buněk.

1/ Pomocí fluorescenčního mikroskopu jsme prokázali akumulaci doxorubicinu v jádrech izolovaných kardiomyocytů

2/ Kapilární elektroforéza DNA kardiomyocytů odhalila fragmentaci po 5 hodinách

3/ Současně s fragmentací DNA jsme imunohistochemickými metodami prokázali segregaci obsahu jadérka

4/ Aktivace PARPu a kaspázy 3 proběhla také do 5 hodin

5/ Progrese proteolytických změn jaderných proteinů pokračovala po 15 hodinách a byla doprovázena zánikem jaderných laminů

Publikace a přednášky :

1. Horký M., Umlauf J., , Rapid onset of nucleolar segregation precedes the TUNEL positivity in the cardiac myocytes after coronary ligation in rat heart, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, odesláno k publikaci

2. Umlauf J., Horký M., , Pathogenesis of doxorubicin-induced cardiomyopathy-review, Austral-Asian Journal of Cancer, odesláno k publikaci

3 Klepárník K.,Horký M., Detection of DNA fragmentation in a single apoptotic cardiomyocyte by electrophoresis on a microfluidic device, Electrophoresis 2003, 24,

4. Horký M., Umlauf J., Úloha apoptózy v patogeneze doxorubicinem indukované kardiomyopatie, přednáška, Komise experimentální kardiologie, Pavlov 15.- 17. 10. 2003

6.4 : Vyšetření nádorového izoenzymu pyruvátkinázy u pacientů s karcinomy ledvin a seminomem.

Vedoucí projektu : MUDr. I. Kocák,

Spolupráce : RNDr. M. Šimíčková, CSc., MUDr. M. Nekulová, CSc., MUDr. M. Palácová,
MUDr. D. Valík

Ve srovnání s jinými nádorovými diagnózami nebyly pro karcinomy ledvin a seminomy dosud nalezeny vhodné sérové nádorové markery k monitorování těchto onemocnění. Jedním z nových parametrů, který se objevil v posledním období, je nádorový izoenzym pyruvátkináza (IPK). Tvorba nádoru je obecně vázána se zvýšenou aerobní glykolýzou, která je iniciována různými mechanismy. Jedním z kroků podmiňujících tyto změny je reakce katalyzovaná enzymem metabolismu sacharidů, pyruvátkinázou. Nádorový izoenzym pyruvátkinázy je produkován nádorovými buňkami a je uvolňován do tělních tekutin při zvýšeném metabolickém obratu nádorových buněk, ev. při jejich nekróze.

V roce 2003 jsme pokračovali v hodnocení souboru nemocných s karcinomy ledvin a seminomy. Z našich dosavadních výsledků lze uzavřít:

1. Soubor odběrů, u nichž byl v době odběru definován klinický stav, je k současnému datu tvořen 155 seminomy a 108 karcinomy ledvin, stanovení vykazuje senzitivitu 70% (seminomy) a 56% (ca ledvin) při specifitě 90%. Relativní riziko pro seminomy dosahuje hodnoty 13,6. Pyruvátkináza je tedy vhodným parametrem obzvláště pro germinativní testikulární nádory, kde hladiny AFP a hCG nejsou obvykle při progresi onemocnění zvýšeny.
2. Falešná pozitivita, která se může při vyšetření projevit, může být způsobena např. bakteriální a virovou infekcí, autoimunními poruchami, renálním poškozením apod.
3. Analytické parametry soupravy se v tomto období zlepšily (předpokládáme, že k tomu přispěla i naše rozsáhlá komunikace s výrobcem).

Dosud publikované práce prokazují, že nádorový izoenzym pyruvátkinázy je vhodným parametrem pro monitorování nádorového procesu (1,2). Podle našich zkušeností lze s dostatečnou senzitivitou užívat tento parametr pro monitorování u těch nádorových lokalizací, kde dosud vhodné markery chybějí, zde především u seminomů.

Citovaná literatura

1. Schneider J., Neu K., Velclovsky H.G., Eigenbrodt E.: *Tumor M2-pyruvate kinase in the follow-up of inoperable lung cancer patients: a pilot study. Cancer lett. 10, 2003, 91-98.*
2. Hoopman M., Warm M., Mallman P., Thomas A., Gohring U.J., Schondorf T.: *Tumor M2 pyruvate kinase – determination in breast cancer patients receiving trastuzumab therapy. Cancer Lett. 10, 2002, 223-228.*

Publikace :

M.Šimíčková , M.Nekulová, L.Pecen: Sérové nádorové markery a jejich význam v éře rozvoje molekulárně-biologických technik. LA Czech, 4, 2003, 7-9.

6.5. : Monitorování chemoterapie a radioterapie gynekologických nádorů.

Vedoucí projektu : MUDr. R. Kalábová

Analýza prediktivních buněčných parametrů u souboru pacientek s Ca cervicis uteri v korelaci s dlouhodobými léčebnými výsledky

Práce bude součástí protokolu klinického sledování pacientek, prováděného v rámci postgraduálního studia *Monitorovaná konkomitantní chemoradioterapie u pokročilého karcinomu čípku děložního .*

Celkově byl proveden odběr nádorového materiálu u 28 pacientek před zahájením léčby (č.1) , dále po aplikaci chemoterapie do 48 hodin (č.2) a po odstranění zdroje BRT (č.3).

Z tohoto počtu vybráno 10 vzorků vhodných pro FCM zpracování po předchozím zhodnocení kvality materiálu patologem. Zpracovány byly vzorky č. 1 a 2, žádný ze vzorků č. 3 již nebyl vhodný k FCM hodnocení vlivem působení brachyradioterapie.

Konečné zhodnocení léčebných výsledků bude v roce 2004 součástí závěrečné práce na uvedené téma společně s vyhodnocením korelací s FCM DNA profilem a s dalšími sledovanými parametry TM a p53 proteinem

6.6. : Transdukce cytokinových signálů rodiny STAT a jejich inhibitorů SOCS. Charakterizace hladin a aktivity STAT1 proteinu v nádorové tkáni.

Vedoucí projektu : Prof. RNDr. PhMr. J. Kovařík, DrSc.,

Spolupráce : RNDr. V. Boudný, MUDr. I. Kocák, MUDr. V. Fait, CSc.

Výzkum této problematiky, v dlouhodobém horizontu, je zaměřen na studium molekulárních mechanismů intracelulárního přenosu cytokinových signálů z membrány do jádra a na analýzu předpokládaných patologických změn těchto mechanismů v nádorové buňce, které mohou být příčinou buněčné deregulace, maligní transformace, ale i rezistence nádoru na imunomodulační léčbu.

Na melanomových buněčných liniích a v primokulturách ustavených z metastáz maligního melanomu jsme prokázali, že u významného počtu vyšetřených vzorků (77 %) mají **melanomové buňky defektní, interferonem-alfa a gama indukovanou aktivaci**

transdukčního a transkripčního proteinu STAT1. Nedochozí k fosforylaci na serinu 727, nebo tyrosinu 701 v molekule STAT1 což může být **příčinou poruchy v odpovědi nádorové buňky na biologické účinky interferonů.** Pomocí nově zavedené metodiky Northern hybridizací jsme na buněčných liniích melanomu ukázali, že funkční defekt STAT1 signální dráhy je prokazatelný i sníženou hladinou STAT1 mRNA a že abnormality v mRNA korelují s alteracemi STAT1 proteinu. V klinicky zaměřené studii byly změny v hladinách mRNA vyšetřeny dosud v nádorech 6 nemocných. Další rozšíření souboru je plánováno na rok 2004. Výsledky analýz **defektní fosforylace STAT1 proteinu v nádorech** nemocných jsme korelovali s průběhem onemocnění a s přežitím. Popsali jsme zajímavé rozdíly mezi alteracemi fosforylace STAT1 proteinu na tyrosinu 701 a serinu 727, avšak předběžně jsme neprokázali souvislost těchto změn s délkou bezpříznakového období ani s celkovým přežitím nemocných. Jednalo se však o malý soubor s krátkou dobou sledování. Studie není dosud ukončena i když předběžné výsledky byly již publikovány.

Připravili jsme a charakterizovali **novou unikátní monoklonální protilátku proti proteinu SOCS3,** jako jednoho z intracelulárních inhibitorů exprese a aktivace transkripčního faktoru STAT1. Poněvadž komplexy STAT-SOCS se významně podílí na schopnosti buněk reagovat na řadu extracelulárních signálů včetně interferonů, analyzovali jsme na melanomových buněčných liniích expresi SOCS3 proteinu v korelaci s aktivací STAT1 proteinu. Výsledky naznačují, že **exprese SOCS3 proteinu není regulována fosforylací STAT1 molekuly.** Ve druhé polovině letošního roku jsme zahájili práce s cílem korelovat expresi a účinek SOCS3 proteinu v normální a nádorové buňce.

Publikace a přednášky :

1. Kovarik J., Boudny V., Kocak I., Lauerova L., Fait V. and Vagundova M. (2003): Malignant melanoma associates with deficient IFN-induced STAT1 phosphorylation.

Int. J. Mol. Med. 12: 335-340.

2. Boudný V., Kocák I., Lauerová L., Kovařík J. (2003): Interferon inducibility of STAT 1 activation and its prognostic significance in melanoma patients.

Folia Biologica (Praha) 49, 142-146.

3. Boudný V., Kovařík J., Kocák I., Lauerová L. and Fait V.: Alterations in IFN signaling in cancer and their potential clinical impact. Int. J. Mol. Med. 2003, 12, Suppl. 1., 40.

4. Boudný V., Lauerová L., Kocák I., Fait V., Kovařík J.: Interferon-induced STAT 1 activation in melanoma cells and tumor tissues.

Eur. J. Cancer Supplements 2003, 1, 252.

5. Boudný V., Lauerová L., Kocák I., Kovařík J.: Assessment of STAT 1 phosphorylation induced by interferons in human malignant melanoma. Journal of Applied Biomedicine, Volume 1, Supplement 1, p. S4, 2003.

6. Kocák I., Boudný V., Kovařík J., Poruchy v intracelulární transdukci cytokinových signálů u maligního melanomu, edukační sborník, abstrakt 59, XXVII BOD, 22.5. 2003

7. Kocák I., Léčba pokročilého melanomu. Pražský melanomový den. Radioterapeuticko – onkologické oddělení FN Motol, sborník přednášek, str. 13, 6.11. 2003.

8. Kocák I., Boudný V., Kovařík J., Predikce účinku interferonu na bázi signální dráhy JAK/STAT, Praktická prediktivní onkologie, Staškův den, Praha, 22.3. 2003.

6.7.: Predikce odpovědi na chemoterapii u karcinomu pankreatu

Vedoucí projektu : MUDr. P. Karásek

Spolpráce : MUDr. R. Nenutil, CSc.

Cílem práce je otestovat, zda níže uvedené markery mohou být použity jako prediktivní faktory a mohou identifikovat ty pacienty, kteří by mohli mít benefit z paliativní chemoterapie a předejít podávání neefektivní léčby ostatním nemocným s karcinomem pankreatu. Na základě předběžných výsledků byla sestava dále ještě rozšířena o několik pacientů s paliativní chemoterapií a zejména o 40 pacientů s radikální nebo paliativní operací pro karcinom pankreatu, kteří nebyli chemoterapií dále léčeni. Imunohistologie byla rozšířena o p21 a MDM2.

Metodické postupy:

1. Vyhodnocení objektivní odpovědi a přežití u pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu, léčených paliativní chemoterapií dle jednotného protokolu gemcitabinem v monoterapii.
2. Imunohistochemická analýza markerů které se ukázaly jako nadějně v předchozích studiích (p53, Ki 67), dále přidány MDM2, p21/waf1 k analýze downstreamu p53, a jejich korelace s přežitím pacientů, léčených chemoterapií, skupina bez chemoterapie použita ke srovnání.
3. Analýza "vzorů exprese" p53 a jeho downstreamových proteinů p21/waf1 a MDM2 s cílem odhadnout transkripční aktivitu p53 v nádoru. Používá se kvantifikace pomocí počítání intenzity barvení jader na několika úrovních na snímcích z CCD kamery.

Výsledky :

1. Klinická část práce, tj. vyhodnocení objektivní odpovědi a přežití u pacientů s pokročilým karcinomem pankreatu, léčených paliativní chemoterapií podle jednotného protokolu gemcitabinem v monoterapii byla publikována v zahraničním časopise, část výsledků imunohistochemické analýzy byla prezentována ve formě přednášky na domácím kongresu.

Výsledky semikvantitativního vyhodnocení exprese p53 prozatím potvrdily možnost že pacienti s nádory s potenciálně zachovanou funkcí p53 přežívají při chemoterapii relativně déle na rozdíl od skupiny bez chemoterapie kde žádný rozdíl v přežívání podle p53 není.

Bylo provedeno imunohistologické stanovení exprese p21/waf1 a MDM2 na celém souboru a pracuje se na lépe kvantifikovaném vyhodnocení imunohistochemických reakcí. Výsledky budou publikovány během roku 2004. Pokud se výsledky potvrdí, bude ještě provedena verifikace stavu p53 analýzou DNA z parafinových bloků.

Publikace a přednášky :

1. Karasek, P., Skacel, T., Kocakova, I., Bednarik, O., Petruzelka, L., Melichar, B., Bustova, I., Spurny, V., Trason, T. : Gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: a prospective observational study. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2003, vol.4, no.4, p.581-586

2. Karásek, P., Nenutil, R., Vojtíšek, B. : Expres p53 a proliferační index v predikci odpovědi na chemoterapii u pokročilého karcinomu pankreatu : edukační sborník. VIII.dny profesora Vladimíra Staška, Praha, 21.a 22.3.2003-09-23

6.8. : Konkomitantní chemoradioterapie s využitím kapecitabinu a standardní předoperační radioterapie u pacientů s rektálním karcinomem s monitorováním biomarkerů – TNF, TP, TS, DPD

Vedoucí projektu : MUDr. I. Kocáková

Spolupráce : RNDr. M.Svoboda, doc. MUDr. R. Vyzula, CSc, MUDr. S. Špelda, doc. MUDr. P. Šlampa, CSc., MUDr. H. Vetchá, MUDr. I. Penka, CSc., MUDr.R. Šefr CSc.

Do protokolu konkomitantní chemoradioterapie bylo dosud v MOÚ zařazeno 47 pacientů, u 43 pacientů byly zatím provedeny odběry na biomarkery-hladiny TS, TP, DPD a TNFalfa mRNA před, v průběhu léčby, event. po operaci pomocí Real Time RT PCR.

Cíle klinického hodnocení

Primárním cílem studie je vyhodnocení míry kombinovaným léčebným režimem navozených patologických kompletních remisí (pCR).

Sekundární cíle sledují vyhodnocení efektivity režimu (objektivní odpovědi), vyhodnocení toxicity konkomitantní léčby, stanovení počtu sfinkter šetřících operací, vyhodnocení frekvence lokálních recidiv během dvouletého a pětiletého období sledování, vyhodnocení doby do progrese, celkového přežití , monitorování biomarkerů fluoropyrimidinového metabolismu (exprese enzymů TP, DPD, TS) a TNF alfa ve tkáni primárního nádoru a v makroskopicky nepostižené sliznici rekta, sledování vlivu neoadjuvantní léčby na změny těchto parametrů a souvislost zjištěných hodnot těchto parametrů s odpovědí na neoadjuvantní léčbu a prognózu onemocnění.

Režim prokázal **příznivý bezpečnostní profil**. U všech pacientů byla makroskopicky zaznamenána **výrazná regrese tumoru**, která umožňovala provedení kurativního resekčního výkonu, ve velkém procentu bez nutnosti provedení amputace rekta. Pouze v jednom případě byla provedena pouze z důvodu interkurencí pacientky jen excize tumoru, jeden pacient s dosaženou bioticky ověřenou kompletní remisí nepodstoupil následný chirurgický zákrok. Předoperační kombinovanou léčbou bylo dosaženo přibližně **36% patologických kompletních remisí nebo detekce jen mikroskopického rezidua tumoru**. Při mediánu sledování 16 měsíců jsme zaznamenali **jen 2 lokální recidivy** a u jedné pacientky průkaz vzdálené diseminace. Jednalo se pacienty se zvýšeným rizikem relapsu. Lokální recidiva byla zaznamenána u pacientky s provedenou lokální excizí tumoru a u pacienta s histologicky pozitivním resekčním okrajem, vzdálená diseminace byla diagnostikována u pacientky s iniciálně výrazně elevovanou hodnotou CEA, u které tato

hodnota přetrvávala i po radikálním odstranění tumoru. Jaterní metastázy byly detekovatelné na zobrazovacích metodách asi s 6-ti měsíčním zpoždění.

Byly zjištěny zvýšené hladiny TS v nádorové tkáni i v mukóze po ozáření. U pacientů s dobrou klinickou odpovědí však byly indukované hladiny TS nižší než u pacientů bez klinické odpovědi. Hladiny TNF jsou výrazně změněny jak v nádorové tkáni, tak v kontrolní nenádorové. Převedli jsme Real Time RT PCR pro dihydropyrimidin dehydrogenázu a thymidin fosforylázu z detekce pomocí Sybr Green i na sondy typu TaqMan. Pro hodnocení přítomnosti mikrometastáz používáme jako pomocný marker mRNA CK 20. Přítomnost mRNA pro CK 20 sledujeme pomocí Real Time RT PCR sondami typu TaqMan R.

Studii pokládáme za velmi úspěšnou s bezprostředním dopadem na zlepšení léčebných výsledků a dále v ní pokračujeme.

Dosavadní výsledky se v roce 2003 podařilo prezentovat na významných mezinárodních kongresech ICACT a ASCO.

Publikace a přednášky :

1. Kocakova I, Spelda S, Brancikova D, Slampa P, Kovarova M, Vetcha H, Penka I, Sefr R, Svoboda M, Vyzula R. : New Therapeutic Approach for Locally Advanced Rectal Adenocarcinoma with Oral Capecitabine and Concurrent Radiotherapy, Fourteenth international congress on anti-cancer treatment (ICACT), Proceeding book, poster, page 215

2. Kocakova I, Spelda S, Svoboda M, Vyzula R., Brancikova D, Slampa P, Vetcha H, Kovarova M, Penka I, Sefr R : Combined Therapy of Locally Advanced Rectal Adenocarcinoma with Oral Capecitabine and Concurrent Radiotherapy, Thirty-Ninth 2003 Annual Meeting ASCO, Proceeding book, poster 1295, page

3. Kocáková I., Špelda S., Kocák I.¹, Svoboda M.², et all. Předoperační chemoradioterapie s kapecitabinem v léčbě lokálně pokročilého adenokarcinomu rekta, Klinická onkologie 2/2003, s. 60-67

4. Kocáková I., Růžičková J., Kocák I., Vyzula R. Postavení konkomitantní chemoradioterapie v léčebném algoritmu u rektálního karcinomu Časopis lékařů českých, 142, 2003, supplementum 1, s.32-35

5. Kocáková I., Vyzula R, Penka I., Šlampa P., Špelda S., Kocák I., Vetchá H :
Význam konkomitantní chemo a radioterapie u karcinomu rekta. IX. Pařízkův den, Nový Jičín,
28.2.2003, Kolorektální karcinom v komplexní péči regionálního charakteru, sborník abstrakt

6. Kocáková I., Špelda S., Kocák I., Svoboda M., Šlampa P., Vetchá H., Gálová M., Penka
I., Vyzula R.: Adjuvantní versus neoadjuvantní chemoradioterapie u pokročilého karcinomu
rekta, pro a proti, edukační sborník, poster 112, XXVII. BOD, 22.5. 2003.

7. Svoboda M, Kocáková I, Žaloudík J, Vyzula R, Šimíčková M, Gálová I, Klocová K,
Domanská O, Coufal O. Interpretace výsledků stanovení hladin DPD pomocí Real Time RT
PCR, vztah k hladinám TS, TP mRNA, Staškův den, Praha, 22.3. 2003.

6.9. : Erytrocytární a sérový Mg²⁺ před a po léčbě – role substituce solemi Mg²⁺

Vedoucí projektu : MUDr. J. Kleinová

Spolupráce : MUDr. Z. Wilhelm, CSc. (Fyziologický ústav LF MU)

Onkologicky nemocné ženy s karcinomem ovaria II. a III stupně (n = 17, věk 53 ± 16) ve srovnání se skupinou zdravých žen (n = 20, věk 42 ± 2) mají před léčbou **deficit hořčíku** a vyšší **výskyt atypických erytrocytů** (p < 0,01). Vyšší výskyt atypických erytrocytů může být potencujícím faktorem řady dalších **reologických komplikací v průběhu léčby** onkologicky nemocných.

Skupina zdravých žen vykázala překvapivě také vysoké procento deficitu celkového hořčíku. Dotazníkem byl zjištěn nedostatečný denní příjem minerálů, i energetických substrátů, včetně jejich nárazového příjmu. Po 3-měsíční substituci dochází u zdravých kontrol k výraznému zlepšení, některé mladé ženy uvádějí vymizení všeobecných potíží (únavnost, snížení premenstruální tenze, vyšší vnitřní vyrovnanost při duševní zátěži).

Na základě získaných výsledků byl stanoven algoritmus určování deficitů hořčíku u zdravých i nemocných pro klinickou praxi.

Nepodařilo se však zatím získat do této studie dostatečný počet onkologicky nemocných léčených chemoterapií pro statistické vyhodnocení významu dlouhodobé substituce hořčíkem vůči skupině chemoterapií léčené bez substituce. Přestože nemocné uváděly subjektivně zlepšení po současné substituci hořčíkem, uváděly současně nechuť podstupovat vyšetření a zátěžový test a tak si připomínat fakt, že jsou nemocné.

Publikace a přednášky :

1. Wilhelm Z., Sedláčková M., Kleinová J.: Changes in erythrocyte morphology in cancer patients. In Program a sborník abstraktů 79. fyziologické dny. Vyd. 1. Lékařská fakulta UK v Plzni : Česká fyziologická společnost, Slovenská fyziologická společnost a LF UK v Plzni, 2003. s. 56-56.
2. Wilhelm Z., Sedláčková M., Kleinová J.: Změna tvaru erytrocytu jako možná příčina poruch mikrocirkulace u onkologicky nemocných. In: Anděl M., Sobotka L., Těšínský P., Zadák Z.: Vliv výživy a intenzivní metabolické péče na orgánové funkce a pooperační stavy. Hradec Králové, Nukleus 2003, s. 50 –51, ISBN 8-86225-35-6.

3. Wilhelm Z.: Klinický význam hořčiku. Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa. 2003, vol.6, no. 2, 2003, s. 97-103. ISSN 1211-9326.
4. Wilhelm Z.: Algoritmy vyšetření deficitů hořčiku v organismu Diabetologie Metabolismus Endokrinologie Výživa. vol. 6, no. 2, 2003, s. 104-108. ISSN 1211-9326
5. Wilhelm Z., Sedláčková M., Kleinová J.: Ovlivňuje hořčík vznik atypických erytrocytů onkologicky nemocných? ?. Edukační sborník. Brno, Masarykův onkologický ústav v Brně, 2003., s. 109-111. ISBN 80-239-0175-3.
6. Wilhelm Z., Hegyi P., Pechová A.: Gastroduodenal peptic disease and low concentration of Mg²⁺ in erythrocytes In Halberg F., Kenner T.Siegelová J.: Chronobiological analysis in pathophysiology of cardiovascular system. Brno, Faculty of Medicine. Masaryk University 2003, s. 179-184. ISBN 80-7013-394-5.
7. Wilhelm Z.: Temíny, vztahující se k výživě a metabolismu. In: Jabor A., Zámečník M. (ed): Encyklopedie laboratorní medicíny 3. Vychází v prosinci 2003.
8. Wilhelm Z., Hegyi P., Kleinová J., Kalábová R., Pechová A., Urbanová R.: Diagnostika deficitů hořčiku v organismu, vlastní zkušenosti. Přijato redakcí časopisu Vnitřní lékařství, vyjde na jaře 2004
9. Wilhelm Z., Sedláčková M., Kleinová J.: Changes in erythrocyte morphology in cancer patients. 79 Fyziologické dny, Plzeň, únor 2003.
10. Wilhelm Z., Sedláčková M., Kleinová J.: Změna tvaru erytrocytu jako možná příčina poruch mikrocirkulace u onkologicky nemocných.XIX. Kongres SKVIMP, Hradec Králové, březen 2003
11. Wilhelm Z., Sedláčková M., Kleinová J.: Ovlivňuje hořčík vznik atypických erytrocytů onkologicky nemocných? 27. Brněnské onkologické dny, Brno, květen 2003.
12. Wilhelm Z.: Makro- a mikrominerály v onkologii. 12. Dni parenterální a enterální výživy. Banská Bystrica, listopad 2003.

Rozvojové projekty VZ R I-IV

Rozvojové projekty jsme v roce 2003 zařadili do výzkumného záměru s cílem pomoci rozvoji nových technologií a metod, které vytvoří podmínky pro přijímání kvalitativně nových projektů v příštích letech, nepochybně také pro aplikaci o výzkumný záměr pro léta 2005-2009. Na rozvojové projekty, jejichž cílem nebyly v roce 2003 v žádném případě publikační výstupy, jsme spotřebovali méně než 7% prostředků výzkumného záměru, přičemž vlastní investice z hospodaření MOÚ a jiné dotační zdroje do těchto projektů a technologií byly o dva řády vyšší. Pro rozvojové projekty jsou zároveň vytvářeny nové výzkumné týmy, včetně získávání nových kvalifikovaných pracovníků. Jde tedy o investici do budoucího výzkumu MOÚ, který by nebyl dostatečně kompetitivní bez této 1-2 leté přípravy.

Protože pilotní výsledky a originální obsah těchto nových projektů ponecháváme z pochopitelných důvodů až pro aplikaci o nový výzkumný záměr, který je v současné době rovněž zpracováván, omezíme se v této zprávě pouze na technologický popis inovací .

R I : DNA mikročipy pro onkologii (vedoucí projektu RNDr.B.Vojtěšek,DrSc)

V MOÚ byla v roce 2003 **zvládnuta technogie DNA microarrays**. MOÚ se zúčastnil iniciativy brněnských akademických pracovišť, jejímž cílem je úzká spolupráce v moderních metodách genomiky. V MOÚ proběhla celá řada jednání o strategii využití jak DNA microarrays, ovšem také se zohledněním praktických investičních kroků v rozvoji proteomiky. Orientace na poměrně rychlou aplikovatelnost výzkumných výsledků nás nutí vímat molekulární onkologii také a možná především z úhlu pohledu exprese stávajících i kandidátních genů, které jsou klíčové v patogeneze solidních zhoubných nádorů. Rozvojový projekt se tedy programově posunul spíše k názvu Mikročipy pro onkologii v obecnější rovině.

RII : Farmakogenetika cytostatik a cytotoxinů (vedoucí projektu MUDr.D. Valík)

Vazba genetické výbavy jedince na jeho citlivost ke genotoxickým a jiným látkám, ať již jde o potenciální kancerogeny nebo naopak cystostatika s léčebným protinádorovým účinkem, bude předmětem zájmu onkologie , individualizovaných a cílených přístupů, v dalších letech. MOÚ buduje tým pro tuto práci. V závěru roku 2003 jsme z jiných dotačních zdrojů získali možnost doplnit laboratorní vybavení nezbytným **spektrofotometrem**. Ve spolupráci s Farmakologickým ústavem a Ústavem preventivního lékařství LF MU se rozběhla studie acetylačního polymorfismu. Recentně jsou však pojmenovávána témata a postupy, které budou znamenat přínos farmakogenetiky především v chemoterapii nádorů, v první fázi především pro zvýšení její bezpečnosti, perspektivně pak i k podpoře účinnosti.

R III : Funkční zobrazování nádorů (vedoucí projektu MUDr. K. Bolčák)

V MOÚ byla v září 2003 uvedena do provozu pozitronová emisní tomografie (**PET**), která představuje kvalitativní změnu v zobrazování nádorů a hodnocení jejich funkčních charakteristik, především pak citlivosti k léčbě. Do konce roku bylo v MOÚ provedeno 474 vyšetření PET, z toho pouze 49 pro jiné než onkologické diagnózy. Asi 22% představují vyšetření PET pro hematologická onemocnění, ze solidních nádorů dominují 12% nádory trávicího traktu všech lokalizací a podobně 12% karcinomy prsu, následují maligní melanomy 5%, bronchogenní karcinomy 3% a sarkomy ve 2%. Potenciál klinických případů pro podrobná hodnocení funkčních změn v nádorech během léčby je tedy značný, přestože pouze 60% vyšetřených je trvale léčeno v MOÚ a tedy pouze u této podskupiny budou k dispozici veškerá klinicko-patologická data pro korelace nálezů PET. V současné době je ještě zkvalitňována technologie přípravy radiofarmak moderní automatizací s ohledem na potřebnou vyšší bezpečnost práce. Paralelně jsou v rámci projektu funkčního zobrazování monitorovány i zcela nové metodiky jako **DOBI**, které jsou připravovány pro budoucí preklinická i klinická hodnocení. V širším kontextu patří do funkčního zobrazování také **mapování metastatického šíření** nádorů isotopovými i chirurgickými metodami.

R IV : Telemedicína v onkodiagnostice (vedoucí projektu MUDr.P. Andres)

MOÚ vybudoval v uplynulých dvou letech ve spolupráci s ÚVT MU plně **funkční systém elektronické archivace a komunikace nálezů zobrazovacích metod** a přechází tak většinou svých zobrazovacích vyšetření na **bezfilmové technologie**. MOÚ disponuje také jediným digitálním mammografem v ČR, který poskytuje digitalizované obrazy přímo. Telemedicínská technologie má však především přispět k **integraci nálezů** více vyšetření jak hlediska spektra metod a pohledů, tak i v čase. Tato rychle přístupná integrace výsledků vyšetření na jedné obrazovce významně přispěje zejména k monitorování průběhu onemocnění a v plném souladu s koncepcí podpory individualizované a cílené onkoterapie v MOÚ. Poměrně optimální **vysokapacitní optická síť** pro přenos těchto medicínských dat, již jsou město Brno a jeho akademická pracoviště vybaveny, umožní úzkou spolupráci specialistů MOÚ a fakultních nemocnic, což je zvláště potřebné v prostředí již ustaveného Univerzitního onkologického centra. Nepochybný bude také význam telemedicíny pro vzdělávání, včetně onkologického. Kvalitativně se telemedicínskými technologiemi změní také **dokumentační stránka grantových projektů**, včetně výzkumných záměrů. MOÚ je svým rozvojovým projektem R IV na tyto proměny technologicky připraven a rok 2004 věnuje dalšímu zdokonalení integrujících funkcí elektronické archivace a sdílení onkologických obrazových dat.