

Souhrnná roční zpráva o řešení

**Výzkumného záměru**

**Masarykova onkologického ústavu v Brně**

MZ 00020980501

v roce 2004

Předkládají :

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

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

## **I. Výsledky řešení v roce 2004 podle struktury 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 : Mikročipy pro onkologii*

*RII: Farmakogenetika cytostatik a cytotoxinů*

*RIII: Funkční zobrazování nádorů*

*RIV: Telemedicína v onkodiagnostice*

## **Program I : Primární a sekundární prevence nádorů**

Koordinátor : MUDr. Jiří Novák

### **1.1. Primární prevence a onkologická výchova veřejnosti**

Vedoucí projektu : PhDr.Zuzana Joukalová

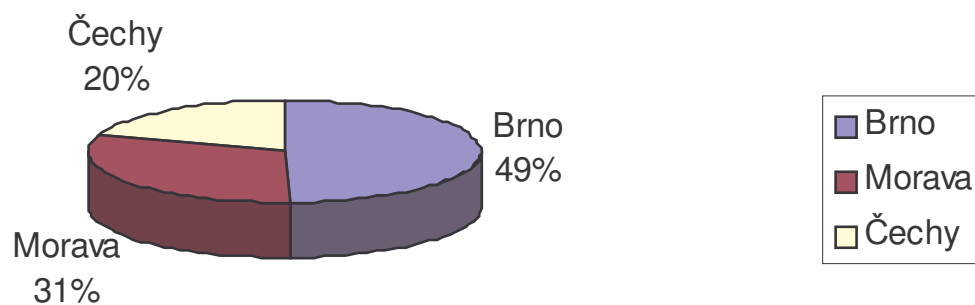
Masarykův onkologický ústav se v posledních letech se významnou měrou zaměřil na osvětovou činnost v řadách široké veřejnosti i na zvyšování informovanosti onkologických pacientů. 3. prosince 2004 to byly tři roky od založení Onkologického informačního centra (OIC), které má několik cílů:

- podávat základní informace o zhoubných onemocněních pacientům,
- pomáhat zvládat problémy s tímto onemocněním spojené rodinným příslušníkům a přátelům,
- zaměřit se na prevenci v řadách široké veřejnosti, protože pouze včasný záchyt nádorového onemocnění dává pacientům šanci na uzdravení a kvalitní život, a navíc léčba onkologického onemocnění v raném stadiu je daleko levnější.

*Cílem projektu bylo však nejen zavedení dosud ojedinělých informačních služeb, ale zejména průběžná analýza zájmu o jednotlivé kategorie informací, která má pomoci cílené přípravě materiálů a metod pro primární prevenci podle aktuální poptávky.*

OIC je bezplatně k dispozici každý pracovní den od 8.00 do 15.00. Pro ty, kteří bydlí ve vzdálenějších místech republiky byla současně s OIC zřízena také bezplatná nádorová telefonní linka 800 222 322. Linka jediná v ČR, která se zabývá nádorovými onemocněním obecně v celém spektru onkologické problematiky. Ostatní linky v ČR jsou zaměřeny na jednotlivá onemocnění, např. na rakovinu tlustého střeva nebo na rakovinu prsu. Tento široký záběr informací si můžeme dovolit díky komplexnosti služeb, které v MOÚ nabízíme. Bezplatné nádorové linky už využívají obyvatelé celé republiky – viz graf

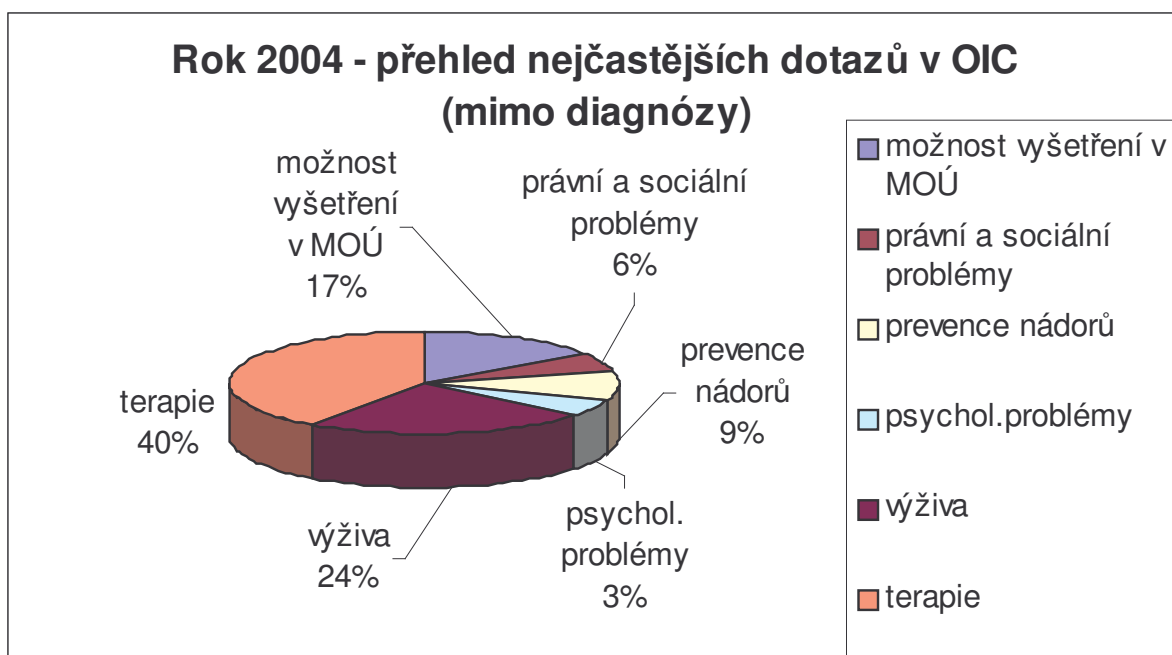
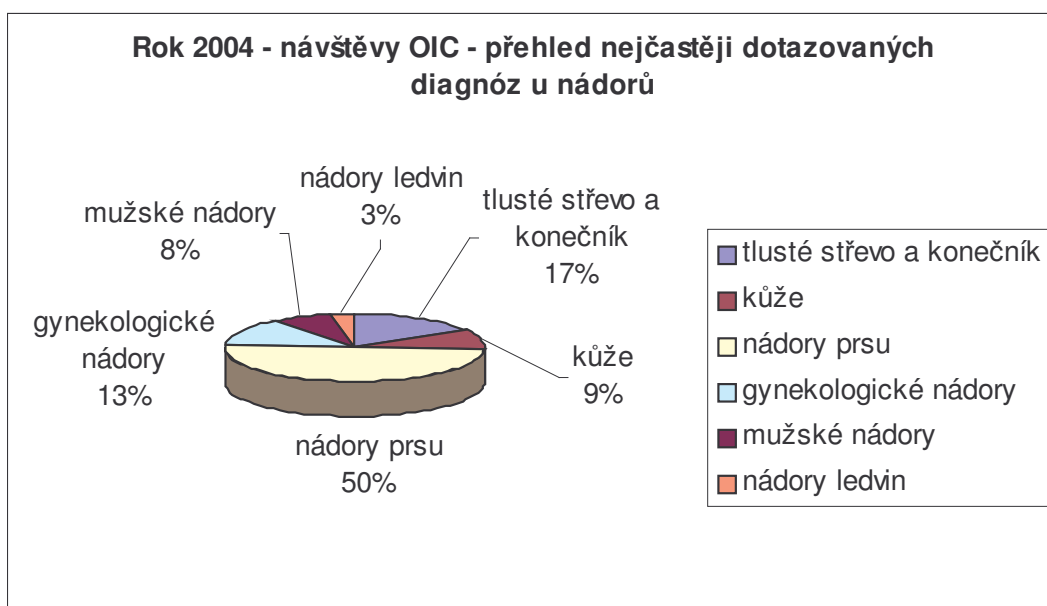
## Rok 2004 - přehled telefonátů v OIC podle bydliště



Tabulka jasně ukazuje, že zájem o služby OIC rok od roku roste. Navíc je zřejmé, že nabídka všech tří způsobů komunikace – osobní návštěva, méně kontaktní telefon a zcela anonymní Internet - je potřebná a dokáže oslovit celou populaci.

	2002	2003	2004
návštěvy OIC	1 173	1 577	2 116
telefonáty	573	751	1 131
dotazy Internet	0	159	576

Témata, o která se v dotazech lidé nejvíce zajímají, ilustrují následující grafy:



Na vyžádání jsou distribuovány brožury a letáky zásilkovou službou po celé republice. V roce 2004 byla takto z MOÚ cíleně rozdáno kolem 44 000 kusů tiskových materiálů s informacemi o základních onkologických diagnózách, léčebných metodách a diagnostických postupech. OIC disponuje přehledem o všech brožurách a písemných materiálech s onkologickou tématikou distribuovaných v ČR. Průběžně doplňujeme jen ty materiály, které dosud v nabídce chybí nebo je třeba je aktualizovat.

V posledních letech se stále více do popředí zájmu, především u mladší generace, dostává komunikace přes Internet. MOÚ instaloval a provozuje dvě domény: jednu zaměřenou na již vzniklá onkologická onemocnění, druhou na prevenci nádorů:

- [www.mou.cz](http://www.mou.cz),
- [www.prevencenadoru.cz](http://www.prevencenadoru.cz)

V obou je možnost využít on – line porady, kterou jsme zavedli od roku 2004. Do té doby byla možnost komunikovat s našimi odborníky prostřednictvím rubriky „napište nám“. Tímto krokem jsme několikanásobně zvýšili zájem o komunikaci s MOÚ. Na dotazy, které koordinuje Edukační centrum, jehož součástí je i OIC, odpovídáme v součinnosti s lékaři nejpozději den po doručení dotazu.

*Veškerý provoz OIC je pro zájemce zdarma, financován s institucionální podporou MOÚ, VZ a projektů Ministerstva zdravotnictví ČR.*

Publikace :

Joukalová Z, Puchříková H.: Edukační centrum MOÚ.

Edukační sborník XXVIII.Brněnských onkologických dnů 2004, 13, 40-41

ISBN 80-86793-01-X

V roce 2004 byly takto s podporou VZ a OCI MOÚ nově pro veřejnost zpracovány a vydány následující brožury :

Imunita a zhoubné nádory - Prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.

Co potřebujete vědět o nádorech jater – MUDr. Andrea Jurečková, MUDr. Ilona Kocáková,

Co potřebujete vědět o nádorech mozku – doc. MUDr. Pavel Šlampa, CSc.

Přednášky:

- Informovanost veřejnosti o onkologických onemocněních, prevence pro seniory – Mgr. Puchriková – Klub důchodců Brno- Lesná – 15.3.2004
  - Senioři a onkologická onemocnění – PhDr. Zuzana Joukalová – Seminář v MOÚ „Péče o seniory“ – ČAS – 19.10.2004
  - OIC a práce s veřejností – Mgr. Puchriková – dvoudenní konference pro sestry na téma „Kolorektální karcinom“ – 30.11. – 1. 12.2004 MOÚ
  - Výuka mediků v MOÚ – téma přednášky: Organizace práce s veřejností, osvětové materiály, dostupnost, odborné konzultantské služby lékařů přes e-mail
- 1x za 14 dnů ve školním roce jsou pořádány exkurze středních zdravotních škol

## **1.2. Parametrizace onkologických záznamů a ekonomika zdravotní onkologické péče**

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

Spolupráce : doc. Dr. Ladislav Dušek, PhD (CBA MU), MUDr. Pavel Andres, ing. Strašková, MUDr. Jiří Novák

Projekt, který v závěru roku 2004 vyústil v zadání finálního produktu "manažerský informační systém MOÚ jako model pro jednotné zpracování parametrických záznamů v onkologii " zpracoval a sjednotil několik systémů zpracování onkologických informací. Jednak je to dvanáct roků fungující a každoročně rozvíjený nemocniční informační systém GreyFox, v jehož rámci vznikl také unikátní modul pro chemoterapii nádorů.

Dále je to systém CORIS (comprehensive oncological registration and information system) vyvinutý Centrem biostatistiky a analýz Masarykovy univerzity v úzké součinnosti s MOÚ a testovaný již v praxi v dětské onkologii. Dalším zdrojem se systém ekonomických analýz nákladovosti onkologické diagnostiky a léčby prováděný v posledních dvou letech v MOÚ.

V roce 2004 byla také vypracovány a veřejně diskutovány cíle a metodika vyhodnocování datových zdrojů v rámci koncepce HTA (health technology assessment, hodnocení zdravotnických technologií). Toto téma je souborně zpracováno v suplementu Klinická onkologie 2004 (viz publikace) a bylo také předmětem jednání I. evropské konference o HTA v polském Krakově v červnu 2004 (viz publikace).

V závěru roku 2004 tedy projekt získal zázemí datových základů, informačních platform pro zpracování i jednotné metodiky registrace a hodnocení záznamů. Cíle byly redukovány na dva, a to průběžná kontrola kvality onkologické péče a hodnocení nákladovosti. V této fázi probíhá ve spolupráci s firmou Medicon implementace nových požadavků na manažerský systém do fungující platformy informačního systému MOÚ GreyFox.

Zdrojem sumarizovaných výstupů je také vklad MOÚ do Národního onkologického registru a komparativní analýza těchto dat porovnávající výsledky celorepublikové, krajské a MOÚ s pomocí software SVOD (systém vizualizace onkologických dat). MOÚ od roku 2004 prezentuje sebeevaluaci výsledků své onkologické péče u hlavních diagnóz v křivkách přežití nemocných s rozložením podle stádií na svých webových stránkách [www.mou.cz](http://www.mou.cz).

Publikace :

Žaloudík J, Dušek L, Vyzula R : Koncepce HTA pro onkologii. Klinická onkologie 2004, Supplement, 5-10

Dušek L, Žaloudík J, Koptíková J, Mužík J, Abrahámová J, Vyzula R, Vorlíček J : Datová základna pro hodnocení zdravotnických technologií v onkologii.

Klinická onkologie 2004, Supplement, 11-26

Kiss I, Skříčková J, Tomášek J, Vyzula R, Žaloudík J, Vorlíček J, Sedláčková Š : Parametrický záznam diagnostiky a léčby onkologického pacienta se solidním nádorem – potřeba a současné možnosti. Klinická onkologie 2004, Supplement, 57-60

Kiss I, Skříčková J, Vyzula R, Žaloudík J, Tomášek J, Sedláčková Š, Vorlíček J : Model parametrického hodnocení vývoje stavu onkologického pacienta v reálném klinickém provozu a čase – případová studie u karcinomu kolorekta.

Klinická onkologie 2004, Supplement, 64-67



Dušek L, Žaloudík J, Koptíková J, Mužík J, Abrahámová J, Vyzula R, Vorlíček J : Univerzální datový model pro hodnocení onkologické léčby a jejích výsledků. Edukační sborník XXVIII. Brněnských onkologických dnů 2004, ISBN 80-86793-01-X, 182, 309-310

Žaloudík J, Vyzula R, Dušek L, Pavliš P : Sebeevaluace Masarykova onkologického ústavu: analýza přežití nemocných. Edukační sborník XXVIII. Brněnských onkologických dnů 2004, ISBN 80-86793-01-X, 187, 319-321

Svobodník, A., Coufal, O., Švihálek, J., Šmíd, R., Dušek, L. Možnosti a limity využití dat randomizovaných klinických studií v projektech HTA. Klinická onkologie 2004, 17, Supplement, s. 101 - 104. ISSN 0862-495 X.

### **1.3. Analýza vícečetných malignit**

Vedoucí projektu : MUDr. H. Vítová

V průběhu roku 2004 jsme analyzovali soubor 2053 pacientů s vícečetnými malignitami (VM) z let 1976 – 2001. Cílem bylo vymezit v rámci tohoto nesourodého souboru podsoubory pacientů, které by byly charakterizovány určitými společnými rysy pro účely dalšího výzkumu, případně za účelem vytvoření určitých pravidel pro prevenci vzniku následných malignit. Prakticky jsme se zaměřili na zhodnocení vlivu rizikových faktorů životního stylu a protinádorové terapie. Samostatně byly analyzovány případy tří a vícečetných malignit. Byla provedena pilotní studie kvality života u souboru pacientů s VM : kolorekta, nemelanomových nádorů kůže, sekundárním lymfedémem.

U souboru pacientů s VM jde o polyetiologické onemocnění, u něhož může jít o genetické změny vrozené, získané nebo obojí. Proto byla vytvořena databáze cca 500 přežívajících pacientů s VM z let 1976 – 2001, kteří jsou pravidelně dispenzarizováni v Masarykově onkologickém ústavu, od nichž je možno získat vzorky krve pro výzkumné účely v oblasti genetiky, cytogenetiky, proteomiky, dále je možno získat data týkající se jejich životního stylu a data jimi vnímané nové kvality života, neboť i přežívající pacienti po úspěšné protinádorové léčbě se musí často vyrovnávat s trvalým zdravotním poškozením vzniklým v souvislosti s touto léčbou.

Výše zmíněná studie ukázala, že existuje řada nejasností při opětovném zařazování onkologických pacientů do pracovního procesu, při posuzování jejich invalidity, při případné rekvalifikaci. Nepočítá se s motivací k aktivní činnosti.

Asi u 1% pacientů jde o *VM asociované s kouřením* (smoking related cancers) s nejčastějšími nádorovými kombinacemi: plíce – hrtan, dutina ústní – plíce, u nichž bylo zjištěno ve 100 % kuřáctví.

Další skupinou jsou *hereditární formy VM*, kdy u 80 % geneticky testovaných pacientek v letech 1999 – 2003 s nádorovými kombinacemi : prs – prs, prs – ovarium byla zjištěna pozitivita *BRCA1*, nebo *BRCA2*. U mladých pacientů do 40 let s mnohočetnými zhoubnými nádory (ZN) kůže sehrává velmi nežádoucí úlohu sluneční záření (při profesní i mimo pracovní expozici), zejména pak u hereditárních syndromů jako je Gorlinův syndrom.

*Protinádorová chemo- a radioterapie zvýšila relativní riziko* vzniku následných nádorů v oblasti malé pánve. Zatímco zdravotní dokumentace nám poskytla velmi dobré údaje o aplikované protinádorové terapii, tak že bylo možno poměrně přesně určit její charakteristiky (vypočítat kumulativní dávky, místo aplikace atd), *informace o faktorech životního stylu*, rizikové profesi a rodinné zátěži jsou naprosto nedostačující.

Ze 70 nově léčených pacientů se sekundárním lymfedémem připadalo více než 10 % na VM, s významnou převahou bilaterálních ZN prsů. Z přístupu zdravotních pojišťoven vyplývá, že s touto situací vůbec nepočítají. Velmi stresujícím faktorem je nepochopení rodiny, opuštění partnerem v důsledku oboustranné totální mastektomie, nemožnost provádění běžných domácích prací v plném rozsahu, nutnost časového omezení zdánlivě vhodné práce s počítačem.

S ohledem na výše uvedené skutečnosti jsme navrhli pro praxi speciální dotazníky :

- 1) *dotazník životního stylu*, který je zaměřen na podrobnou rodinnou anamnesu, resp. přímo na sestavení rodokmenu se zaměřením na nádorovou zátěž, dále na podrobnou pracovní anamnesu zaměřenou na pracovní rizika a podrobné dotazy týkající se dynamiky změn životního stylu,
- 2) *dotazník kvality života* strukturovaný dle participujících ZN, využívajících popisu situace formou kvantitativních škál.

Snažili jsme se, aby dotazníkový materiál měl v určitém smyslu nadčasový charakter, aby bylo možno zapojit do analýz i data získaná od pacientů s VM nově diagnostikovaných v roce 2002 a později.

Od získání dotazníkových údajů očekáváme následující přínos :

- 1) možnost genetického poradenství a preventivního zásahu do rodin s výskytem hereditárních forem ZN (u VM : prs – prs, prs – ovarium, u mnohočetných malignit s participujícími ZN popisovanými u Lynchova syndromu, FAP a dalších),
- 2) získáme podrobnější informace, které bude možno využívat v pracovně lékařské oblasti při zařazování onkologických pacientů do pracovního procesu,
- 3) podaří se vybalancovat hranici, kdy má význam přesvědčovat onkologické pacienty k radikální změně životního stylu (například k nekuřáctví) jako prevenci následných malignit a kdy už jde o kontraproduktivní činnost, kterou vnímá pacient jako zhoršení kvality života, bez významného preventivního efektu,
- 4) získané informace pomohou v interpretaci výsledků genetického testování a proteomického vyšetření, zvláště pokud bude kvalitně proveden staging, grading, histologické vyšetření participujících ZN a zhodnocen vliv protinádorové terapie,
- 5) získáme zkušenosti, jak účinně motivovat onkologické pacienty k pracovní činnosti, bez rizika újmy na jejich zdraví, jak provádět jejich edukaci pro běžnou denní činnost, získáme zkušenosti pro psychologickou podporu jejich partnerů a ostatních členů rodiny.

Publikační činnost k tématu :

- 1) Vítová V., Vítová H., Jón Z., Navrátilová M., Foretová L.: Problematika vícečetných malignit v mammologii a gynekologii (poster), Onkologie v gynekologii a mammologii, 9. roč. symposia, Brno, leden 2004.
- 2) Vítová V., Vítová H., Jón Z., Navrátilová M., Foretová L.: Problematika vícečetných malignit v mammologii a gynekologii, Onkologie v gynekologii a mammologii, Sborník přednášek 9.roč. symposia, Brno, leden 2004, str. 169.
- 3) Vítová V., Vítová H., Jón Z., Navrátilová M., Foretová L. : Zvláštní případy vícečetných malignit (poster), XXVIII. Brněnské onkologické dny, Brno 26.–28. května 2004.
- 4) Vítová V., Vítová H., Jón Z., Navrátilová M., Foretová L. : Zvláštní případy vícečetných malignit. Edukační sborník XXVIII. Brněnských onkologických dní 26.–28. května 2004, ISBN 80-86793-01-X, str. 342 – 344.

- 5) Vítová V., Vítová H., Pecen L., Jón Z., Navrátilová M., Foretová L. : Mnohočetné malignity s nádorem žaludku a kolorekta (poster), XI. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov 14.–16.10.2004.
- 6) Vítová V., Vítová H., Pecen L., Jón Z., Navrátilová M., Foretová L. : Mnohočetné malignity s nádorem žaludku a kolorekta, XI. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov 14.–16.10.2004, Sborník přednášek, ISBN 80-239-3557-7, str. 79 – 81.

#### **1.4 : Helicobacter pylori v patogeneze karcinomu žaludku**

Vedoucí projektu : MUDr. M. Šachlová,CSc.

Na základě řady studií byl *Helicobacter pylori* uznán za kancerogen I.třídy. Vztah mezi HP a karcinomem je však zatížen mnoha problémy. Kmeny HP podle schopnosti produkovat cytotoxiny můžeme rozdělit na skupinu produkující vakuolizační toxin Vac A a protein vázaný na cytotoxin Cag A (souhrnně označeno jako kmeny I) a na skupinu neprodukující cytotoxiny (kmeny II). Jsou přesvědčivé doklady o tom, že kmeny typu I mají dominantní úlohu při rozvoji zánětu.

Vyšetřili jsme protilátky proti HP metodou Elisa a western blot v souboru 65 pacientů s karcinomem žaludku a u kontrolního souboru (35 osob). Prokázali jsme statisticky významně vyšší prevalenci protilátek proti invazivním kmenům HP u pacientů s karcinomem žaludku než u kontrolního souboru. Statisticky významný rozdíl v prevalenci protilátek proti agresivním kmenům HP ve vztahu k lokalizaci nádoru a k histologickému typu karcinomu se prokázat nepodařilo. Tento výsledek je pravděpodobně ovlivněn malým počtem pacientů v souboru. Přesto se zdá, že kmeny produkující cytotoxiny mají z hlediska patogeneze svůj význam. Pokud víme, v české odborné literatuře nebyl podobný soubor dosud publikován.

Vyšetřili jsme 12 rodin, ve kterých žije v trvalém kontaktu 22 příbuzných. V osmi rodinách jsme prokázali protilátky proti invazivním kmenům HP u 14 osob/oproti čtyřem rodinám (8 osob) s protilátkami negativními.

Publikace :

Šachlová M., Koukalová H., \*Kapičková \*M.,Štěpániková O. : Vliv *Helicobacter pylori* na žaludeční kancerogenezi. Klinická onkologie, 17, 2004, 4

## **Program II : Genetika nádorové predispozice**

Koordinátor programu : MUDr. Lenka Foretová

### **2.1. Genetické poradenství**

Řešitelé : MUDr. L. Foretová, MUDr. M. Navrátilová, D. Hanousková, B. Dvořáčková

Tento projekt zpracovává metodiku onkogenetické péče, která je modelově zavedena do praxe v Masarykově onkologickém ústavu a lze ji převzít kterýmkoli onkologicky profilovaným a vybaveným pracovištěm.

1. Projekt genetického poradenství se zabýval dalším prohloubením organizace poradenství, zkvalitněním služeb, rozšířením nabídky.
2. Dále se v rámci záměru výzkumu provádělo sledování psychosociálních změn u žen po genetickém testování, které byly diagnostikovány hereditární dispozicí ke karcinomu prsu/ovaria a byly preventivně sledovány v rizikové ambulanci MOU.
3. Další částí projektu bylo rozšíření registru hereditárních forem nádorů.
4. Byly vytvořeny a vydány osvětové preventivní brožury: *Poznejme nádorová rizika a Prevence nádorových onemocnění pro ženy po 40.*
5. U diagnózy kolorektálního karcinomu je zaveden imunohistochemický screening případů odpovídajících hereditární etiologii, tedy zejména HNPCC.
6. Program zvyšování kvality činnosti molekulárně genetických laboratoří

1. O genetickém testování byli informováni gynekologové a praktičtí lékaři v oblasti Jižní Moravy. Byly jim rozeslány informační materiály i osvětové brožury pro pacienty. Jejich zájem o možnosti genetického poradenství i testování u svých pacientů vzrostl.

Byla vytvořena hlubší spolupráce se všemi genetickými pracovišti v ČR. V důsledku toho většina molekulárně genetických vyšetření BRCA1/2 u rizikových pacientek v ČR byla prováděna v laboratoři OEGN MOÚ. Celkový objem testovaných osob s podezřením na dědičnou etiologii nádoru vzrostl na dvojnásobek.

2. Další částí bylo prohloubení role sestry v prevenci nádorů, v osvětě o genetickém vyšetření v rodině. V rámci organizace sekundární prevence v ambulanci onkologických rizik na MOÚ zajišťuje genetická sestra ve většině případů rizikových jedinců celý harmonogram sledování, zajišťuje jejich zvaní na kontroly, a při pravidelných kontrolách je osobně

kontaktuje a konzultuje jejich další problémy psychosociálního charakteru a navrhuje jejich možnosti řešení. Spolupracuje s dalšími odborníky našeho ústavu. Prohlubuje tím důvěru pacientů v dlouhodobou prevenci, kontroluje jejich psychický stav, sociální problémy. Pokud to pacient vyžaduje, umožní jim další konzultace s genetikem nebo jinými odborníky ústavu.

3. Registr hereditárních forem nádorů se dále rozšířil o nově testované rodiny. Součástí registru je klinická informace o pacientovi, testovaných příbuzných, výsledek genetického testování a podrobný rodokmen. *V současné době má registr hereditárních nádorů 625 rodin s různou diagnózou.* Tyto rodiny splňovaly kritéria ke genetickému testování. V rozvoji registru spolupracujeme s prof. Janem Lubinskim z Pomeranian Medical University ve Szczecine v Polsku.

4. V rámci osvěty OEGN úzce spolupracuje s nově vzniklým centrem Mamma Help v Brně a centrem v Praze. Dr. Foretová se stala garantem brněnského centra, kde proběhla osvětová přednáška na téma genetické riziko vzniku nádorů prsu. Byl vydán v časopise Mamma Help 11/04 článek „Kdy mohou být nádory prsu dědičné?“ Dále byly vytvořeny a vydány osvětové preventivní brožury: Poznejme nádorová rizika a Prevence nádorových onemocnění pro ženy po 40.

5. Pro diagnostiku Lynchova syndromu ( HNPCC- hereditární nepolyposní kolorektální karcinom) byla zajištěna imunohistochemická detekce (IHC) proteinů MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2. Tyto proteiny jsou produkty genů DNA reparačního systému, které u HNPCC mohou být poškozené zárodečnou mutací a v tumoru může dojít ke kompletní ztrátě proteinové exprese. Pokud se po vyhodnocení většího souboru tato primární detekce osvědčí, bude sloužit jako prescreeningový krok k rozpoznání suspektních dědičných forem nádoru kolorekta. Jako indikace k IHC vyšetření bude sloužit věk pacienta při výskytu karcinomu kolorekta nižší než 50 let. Pokud se bude jednat o pacienta s rodinnou anamnézou, bude indikovat toto vyšetření klinický genetik na základě analýzy rodokmenu.

6. Naše oddělení se účastnilo celostátních jednání o akreditacích genetických laboratoří a standardizacích laboratorních postupů. Byly aktualizovány „Standardní postupy pro diagnostiku BRCA1/2 mutací“. Tyto materiály jsou součástí webových stránek [www.uhkt.cz](http://www.uhkt.cz). V tomto roce se opět laboratoř OEGN účastnila mezinárodní kontroly kvality EMQN. Byla

vypracována kapitola „Multifaktoriální dědičnost“ pro Encyklopedii laboratorních metod zpracovávanou pro české laboratoře.

## 2.1. Optimalizace laboratorních metod genetického testování

Řešitelé: Mgr. M.Lukešová, Mgr. E. Macháčková PhD., MUDr. L. Foretová, H. Pavlů

V laboratoři OEGN provádíme kompletní screening kódujících oblastí a míst sestřihu (splice sites) jednotlivých exonů genů BRCA1 (22 kódujících exonů, mRNA = 5711 nt) a BRCA2 (26 kódujících exonů, mRNA = 10987 nt). Doposud jsme provedli vyšetření asi u 500 rodin a z výsledků vyšetření vyplývá, že v České republice 5 nejčastějších patogenních mutací odpovídá za více než 50 % mutací nalezených u pozitivně testovaných osob.

Mezi těchto 5 nejčastějších mutací patří:

*c.5385dupC (exon 20 BRCA1 genu),*

*c.3819\_3823delGTAAA (exon 11 BRCA1 genu),*

*c.300T>G (exon 5 BRCA1 genu),*

*c.8138\_8142delCCTTT (exon 17 BRCA2 genu) a*

*c.8765\_8766delAG (exon 20 BRCA2 genu).*

Díky těmto poznatkům jsme upravili strategii vyšetřovacích metod, což nám pomohlo zkrátit dobu vyšetření. V první fázi testování vyhledáváme za využití metody heteroduplex analýzy 5 nejčastějších mutací. Pokud je screening na těchto 5 mutací negativní, pokračujeme dále a metodami „protein truncation test“ (PTT) a heteroduplex analýza (HA) vyhledáváme mutace ve zbývajících úsecích obou genů. Fragменты s aberantní mobilitou detekované pomocí PTT nebo HA vždy sekvenujeme na ALFexpress™ DNA automatickém sekvenátoru (Pharmacia).

Pacientky z rizikových rodin, u kterých se nám nepodaří nalézt patogenní mutaci metodami založenými na PCR reakci jsou vhodnou skupinou pro vyšetření metodou MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification), což je nová metoda detekce intragenových přeskupení. V intronických sekvencích BRCA1 genu se vyskytují s nezvyklou četností Alu-repetitivní sekvence, které způsobují zvýšenou náchylnost k rozsáhlým intragenovým rekombinacím. O spektru a frekvenci intragenových přeskupení v BRCA1 genu u pacientů s dědičnou formou karcinomu prsu/ovaria v české populaci není doposud nic známo.

V naší laboratoři byla prováděna optimalizace metody MLPA. Separace amplifikačních produktů na ALF express II automatickém DNA sekvenátoru za využití softwaru fragmentační analýzy není ideální a při interpretaci výsledků vznikají nejasnosti. Proto se chystáme využít k analýze čtyřkapilárový automatický sekvenátor ABI 3100, který je umístěn na pracovišti ÚBLG FN Motol v Praze. Dosud jsme nezachytili pacientku s velkou přestavbou v genu BRCA1, ale ve vyšetřování pacientek se pokračuje.

### 2.3. Ověření významnosti vybraných mutací genů nádorové predispozice

Řešitelé: MUDr. L. Foretová, Mgr. E. Macháčková PhD., H. Pavlů, Mgr. M. Lukešová, MUDr. M. Navrátilová, B. Dvořáčková, D. Hanousková, V. Foltánová

Při molekulárně genetickém screeningu genů BRCA1 a 2 nacházíme kromě patogenních mutací také varianty neznámého významu (unknown variants), jejichž interpretace je problematická.

Tab.1: Varianty neznámého významu v BRCA1 genu

Exon	BIC nomenklatura	Aminokyselina	Výskyt ve vyšetřované skupině	Výskyt v kontr. skupině
2	c.172T>A	M18K	3 x	0x
IVS7	c.561-34T>C	intron	1 x	0x
8	c.655A>G	Y179C	1 x	0x
IVS14	c.4603+14A>G	intron	1 x	0x
15	c.4755G>A	D1546N	1 x	0x
16	c.4931A>G	Q1604Q	1 x	0x
16	c.5075G>A	M1652I	18 x	4x
IVS20	c.5396+48_5396+59dup12	intron	3 x	0x
IVS20	c.5396+78G>A	intron	1 x	0x



**Tab.2: Varianty neznámého významu v BRCA2 genu**

Exon	BIC nomenklatura	Aminokyselina	Výskyt ve vyšetřované skupině	Výskyt v kontr. skupině
5	c.703G>A	V159M	1 x	0x
10	c.1184A>C	N319T	1 x	0x
10	c.1206C>A	S326R	1 x	0x
15	c.7772C>T	T2515I	3 x	0x
18	c.8377G>T	A2717S	1 x	0x
21	c.8951T>G	V2908G	1 x	0x
IVS2	c.9485-16T>C	intron	2 x	1x
IVS4	c.9485-75G>C	intron	3 x	0x
25	c.9599A>T	N3124I	4 x	0x
27	c.10323delCins11	stop 3370 (frame shift)	2 x	1x
27	c.10462A>G	I3412V	2 x	0x

Publikace zahraniční :

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.

Human Mutation 2004. 23 (4), p 397-8

Plevova P., Krepelova A., Papezova M., Sedlakova E., Curik R., Foretova L., Navratilova M., Novotny J., Zapletalova J., Palas J., Nieslanik J., Horacek J., Dvorackova J., Kolar Z. Immunohistochemical detection of the hMLH1 and hMSH2 proteins in hereditary non-polyposis colon cancer and sporadic colon cancer.

Neoplasma 2004. 51(4): 275-8

Foretova L., Lukesova M., Navratilova M., Pavlu H., Machackova E. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in the Czech breast/ovarian cancer patients. Familial cancer.

Madrid 6.-7-5. 2004. Book of abstracts. p. 49.

Machackova E., Lukesova M., Damborsky J., Navratilova M., Pavlu H., Foretova L.: Missense mutations within RING finger domain of BRCA1 gene detected in high risk Czech patients with hereditary breast and ovarian cancer, European Human Genetics Conference 2004, Munich 12.-15.6.2004 European Journal of Human Genetics: June 2004, Vol. 12 , Suppl.1, p. 177

Publikace tuzemské :

Foretová L., Pohlreich P., Štekrová J., Bendlová B., Křepelová A., Krutílková V., Kratochvílová A., Šubrt I., Vrtěl R. Stav genetického testování hereditárních onkologických syndromů v ČR. XXVIII. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04. Edukační sborník s. 98-101

Lukesova M., Machackova E., Damborsky J., Navratilova M., Pavlu H., Foretova L. Three Germline Missense Mutations within Ring Finger Domain of BRCA1 Gene. 9<sup>th</sup> European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors. Book of abstracts. Brno 2004.p 67

Schneiderová M., Bartoňková H., Petráková K., Foretová L. Úskalí časně diagnostiky karcinomu mléčné žlázy u mladých rizikových žen. XXVIII. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04. Edukační sborník s. 140

Plevová P., Navrátilová M., Foretová L., Zapletalová J., Sedláková E., Čuřík R., Bluchová V., Palas Z., Šilhánová E., Zvolská J., Nieslanik J., Horáček J., Utíkal Z., Rosická P., Kolář Z. Imunofenotyp nádorů prsu vzniklých na podkladě zárodečné mutace genů BRCA1 a BRCA2 ve srovnání s nádory sporadickými. XXVIII. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04. Edukační sborník s. 106-7

Lukešová M., Navrátilová M., Pavlu H., Urbánková V., Foretová L.: Výsledky testování BRCA1 a BRCA2 genů u rizikových pacientek v molekulárně genetické laboratoři MOÚ, XXVIII. Brněnské onkologické dny, Brno 26.-28.5. 2004. Edukační sborník s. 104-5

Vítová V., Vítová H., Jón Z., Navrátilová M., Foretová L. Zvláštní případy vícečetných malignit. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04. Edukační sborník s. 342-344

Krutílková V., Šeneklová Z., Navrátilová M., Michal M., Kodet R., Čapková Š., Válková J., Hořínek A., Havlovicová M., Foretová L. Gorlinův-Goltzův syndrom (syndrom basocelulárního névu)-kasuistiky. XXVIII. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04. Edukační sborník s. 351

Foretová L., Goetz P. Familial Cancer Conference-Madrid 6.-7.5.2004.  
Klinická onkologie 2004. 17/5. S. 178-9

Foretová L. Kdy mohou být nádory prsu dědičné? Mamma Help. 2004, 11. s. 3-5

Dvořáčková B. Co potřebujete vědět o významu prevence v onkologii – So kampil tumenge te džanel pale onkolgija. Brožura v českém a romském jazyce MOÚ, UOC ve spolupráci s Muzeem romské kultury v Brně

Přednášky a postery zahraniční :

Foretova L., Lukesova M., Navratilova M., Pavlu H., Machackova E. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis in the Czech breast/ovarian cancer patients. Familial cancer. Madrid 6.-7-5. 2004. Poster.

Machackova E., Lukesova M., Damborsky J., Navratilova M., Pavlu H., Foretova L.: Missense mutations within RING finger domain of BRCA1 gene detected in high risk Czech patients with hereditary breast and ovarian cancer, European Human Genetics Conference 2004, Munich 12.-15.6.2004

Přednášky / postery tuzemské :

Foretová L., Navrátilová M., Hanousková D., Dvořáčková B.: Kdo má právo na genetické testování pro dědičnou formu ca prsu/ovaria-etický problém? Kaprasův den-Klinická genetika. Pracovní den Společnosti lékařské genetiky. Praha 24.3.04

Lukesova M., Machackova E., Damborsky J., Navratilova M., Pavlu H., Foretova L. Three Germline Missense Mutations within Ring Finger Domain of BRCA1 Gene. 9<sup>th</sup> European Workshop on Cytogenetics and Molecular Genetics of Human Solid Tumors. Brno 2004.

Foretová L. Novinky v onkogenetice ( Familial Cancer Conference Madrid). IX. Onkogenetický den s mezinárodní účastí. Praha 9.6.04

Plevová P., Navrátilová M., Foretová L., Zapletalová J., Sedláková E., Čuřík R., Bluchová V., Palas Z., Šilhánová E., Zvolská J., Nieslanik J., Horáček J., Utíkal Z., Rosická P., Kolář Z. Imunofenotyp nádorů prsu vzniklých na podkladě zárodečné mutace genů BRCA1 a BRCA2 ve srovnání s nádory sporadickými. Onkogenetický den s mezinárodní účastí. Praha 9.6.04

Foretová L., Pohlreich P., Štekrová J., Bendlová B., Křepelová A., Krutílková V., Kratochvílová A., Šubrt I., Vrtěl R. Stav genetického testování hereditárních onkologických syndromů v ČR. XXVIII. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04

Schneiderová M., Bartoňková H., Petráková K., Foretová L. Úskalí časné diagnostiky karcinomu mléčné žlázy u mladých rizikových žen. XXVIII. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04

Plevová P., Navrátilová M., Foretová L., Zapletalová J., Sedláková E., Čuřík R., Bluchová V., Palas Z., Šilhánová E., Zvolská J., Nieslanik J., Horáček J., Utíkal Z., Rosická P., Kolář Z. Imunofenotyp nádorů prsu vzniklých na podkladě zárodečné mutace genů BRCA1 a BRCA2 ve srovnání s nádory sporadickými. XXVIII. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04

Lukešová M., Navrátilová M., Pavlů H., Urbánková V., Foretová L.: Výsledky testování BRCA1 a BRCA2 genů u rizikových pacientek v molekulárně genetické laboratoři MOÚ, XXVIII. Brněnské onkologické dny, Brno 26.-28.5. 2004.

Vítová V., Vítová H., Jón Z., Navrátilová M., Foretová L. Zvláštní případy vícečetných malignit. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04.

Krutílková V., Šeneklová Z., Navrátilová M., Michal M., Kodet R., Čapková Š., Válková J., Hořínek A., Havlovicová M., Foretová L. Gorlinův-Goltzův syndrom (syndrom basocelulárního névu)-kasuistiky. Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04.

Dvořáčková B., Hanousková D., Navrátilová M., Foretová L. Preventivní péče o onkologicky nemocné a jejich příbuzné s hereditární dispozicí k nádorům - spolupráce klinického genetika, genetické sestry a preventivní rizikové ambulance v MOÚ Brněnské onkologické dny. Brno 26.-28.5.04.

Dvořáčková B., Hanousková D., Navrátilová M., Foretová L.

Preventivní péče o onkologicky nemocné a jejich příbuzné s hereditární dispozicí k nádorům.

Spolupráce klinického genetika, genetické sestry a preventivní rizikové ambulance MOÚ

Brno. Odborný seminář genetických laborantů a sester v Ostravě 3.6.2004

Navrátilová M., Křepelová A., Štekrová J., Hanousková D., Dvořáčková B., Foretová L.

Dědičné formy nádorů tlustého střeva, možnost genetického vyšetření a prevence. Jihočeské onkologické dny 14.-16.10.2004

Štěpánková H., Foretová L. Genetické poradenství u nemocných s kolorektálním

karcinomem. Jihočeské onkologické dny 14.-16.10.2004

Navrátilová M. : Dědičné formy kolorektálního karcinomu, možnosti genetického testování.

Vzdělávací program pro sestry. Téma: Kolorektální karcinom. MOÚ 30.11.-1.12.2004

### **Program III : Úloha antionkogenů v maligní přeměně buňky**

Program byl v rámci VZ ukončen rokem 2003 naplněním základních cílů a přechodem koordinátorky RNDr. J. Šmardové, CSc. na pracoviště Patologicko-anatomického ústavu FNB. Problematika antionkogenů je v Masarykově onkologickém ústavu dále řešena dále řešena v projektech podporovaných účelovými granty IGA MZ ČR a GA ČR pod vedením Dr. B.Vojtěška, DrSc. Problematika přešla také zčásti do rozvojového programu studia genomových a proteomových profilů R I rozvíjeného již na bázi pokročilejších technologií (viz dále část R I).

## **Program IV : Prediktivní onkologie**

Koordinátor : MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.

Plnění programu prediktivní onkologie ovlivnily v roce 2004 významné personální změny. Ve funkci koordinátora programu nahradil MUDr.V. Vagundu , PhD nový vedoucí oddělení patologie MOÚ MUDr. Rudolf Nenutil, PhD a program se plně orientoval jednak na výstupy pro klinickou praxi z dosažených výsledků, jednak na přípravu výzkumného záměru v letech 2005-11, kde dosažené výsledky prediktivní onkologie tvoří podstatný základ pro další výzkum tzv. funkčního ratingu zhoubných nádorů, což je nosným tématem nového VZ MOÚ. Z řešitelského kolektivu dále odešli MUDr. M. Vagundová a MUDr. Z.Pavlovský, nově se do řešení zapojil MUDr.P.Fabian.V roce 2004 přešel z ústavu na pracoviště v Los Angeles, USA Mgr. Michael Sheard,CSc. , který ukončil v MOÚ projekt studia mechanismů indukce apoptózy. Vedení projektu se poté ujala jeho spolupracovnic Mgr.L.Dubská.

### **4.1 Studium mechanismů indukce apoptózy**

Vedoucí projektu : Mgr. M. Sheard,CSc, Mgr.L Dubská

V rámci studia mechanismů indukce apoptózy jsme sledovali expresi a funkci death receptoru CD95/Fas na podkladě transkripčně aktivní a neaktivní konformace proteinu p53 u nádorových buněk exprimujících teplotně senzitivní mutantní p53<sup>285</sup>Lys. Naše výsledky ukázaly, že při teplotě 32°C konformační změny proteinu p53<sup>285</sup>Lys umožňují jeho funkční reaktivaci spojenou s obnovením exprese receptoru CD95, jehož následná interakce s agonistickou protilátkou nebo ligandem vede k indukci apoptózy. Transkripčně aktivní p53 je navíc stabilizován působením agens poškozujícím DNA, jmenovitě UV zářením, mitomycinem C a doxorubicinem, což vede k dalšímu zvýšení exprese CD95 a apoptotické odpovědi po indukci apoptózy ligací tohoto receptoru. Tyto výsledky rozšiřující poznatky o funkci proteinu p53 při regulaci apoptózy u nádorových buněk byly prezentovány jako plakátové sdělení na mezinárodní konferenci (2).

Dále byla dokončena práce týkající se interference anti-Her2 protilátky trastuzumabu (Herceptin<sup>®</sup>) s apoptotickou drahou indukovanou death ligandem TRAIL. Inhibice dráhy vedoucí od Her-2 trastuzumabem vede k potlačení. MAPK a Akt kinázové dráhy, nicméně naše výsledky ukazují, že za inhibiční efekt trastuzumabu na apoptózu indukovanou ligandem TRAIL odpovídá suprese PI3-K/Akt kinázové dráhy. Výsledkem inhibice Her-2/PI3-K/Akt kinázové dráhy je snížení exprese death receptorů TRAIL-R1 a TRAIL-R2, což je příčinou redukované senzitivity k apoptóze indukované ligandem TRAIL. Práce s výsledky demonstrujícími, že onkoprotein Her-2 může mít v určitém buněčném kontextu pro-apoptotickou funkci, byla předložena k publikaci v časopise International Journal of Cancer (3) a rozšířená metodika detekce receptoru Her-2 na buněčném povrchu pomocí průtokové cytometrie použitá v rámci tohoto projektu byla uveřejněna na BOD 2004 (1).

#### Publikace:

1. Dubská L., Valík D. Interakce Her2 receptor – trastuzumab: nástroj pro kvantitativní analýzu exprese membránového Her2 u nádorových buněk pomocí průtokové cytometrie. XXVIII. Brněnské onkologické dny, Brno 2004. (poster)
2. Dubska L, Muller P, Vojtesek B, Valik D, Sheard MA. Rescuing the Function of Temperature-sensitive Mutant p53<sup>285</sup>Lys restores CD95-Mediated Apoptosis. 5<sup>th</sup> Interdisciplinary Conference on Mechanisms of cell Death and Disease, Cascais, Portugal 2004. (poster)
3. Dubska L, Andera L, Sheard MA. Trastuzumab-mediated downregulation of Her-2 and suppression of the PI3-K/Akt kinase pathway protect breast cancer cells from TRAIL-induced apoptosis. Int J Cancer. (manuscript submitted)



## **4.2 Srovnání imunohistochemické a biochemické metody stanovení steroidních receptorů**

Vedoucí projektu: MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.

V důsledku zastavení výroby kitů pro biochemickou metodu nelze pokračovat v kvantitativních komparačních studiích. V rámci standardizace vyšetření receptorů je testováno a od 11/2004 pokusně zavedeno do všech nálezů semikvantitativní hodnocení imunohistochemického stanovení receptorů pomocí Histoscore, počítaného na digitálních mikroskopických snímcích pomocí poloautomatické obrazové analýzy RGBpick, která byla za tímto účelem vyvinuta. Celkem bylo takto vyšetřeno v roce 2004 114 mammárních karcinomů.

## **4.3. Prediktivní testy chemorezistence stanovením mRNA transkriptu genů enzymů metabolismu fuoropyrimidinů TS, TP a DPD**

Vedoucí projektu : RNDr.M.Svoboda

Pro stanovení TS, TP, DPD a TNFalfa mRNA jsme dosud izolovali RNA od 62 pacientů před zahájením léčby a v průběhu terapie, z kontrolní sliznice a z nádoru. Po vyloučení sad, v nichž byla RNA některého vzorku zdegradovaná, jsou k dispozici kompletní sady RNA vzorků od 48 pacientů. U všech 48 těchto kompletních sad RNA jsme po přepisu do cDNA pomocí Real Time RT PCR stanovili relativní hladiny mRNA výše uvedených markerů vůči mRNA housekeepingového genu GAPDH.

Před terapií jsou hladiny TS zvýšeny v nádorové tkáni oproti kontrolní sliznici (v souladu s literaturou). V průběhu terapie *dochází k indukci TS mRNA*, a to výrazně v kontrolní sliznici, avšak méně výrazně nebo vůbec v nádoru. Indukce TS vlivem terapie byla v literatuře popsána.

Relativní *hladiny TNF* jsou výrazně změněny jak v nádorové tkáni, tak v kontrolní nenádorové, neexistuje však vztah mezi odpovědí na léčbu a hladinami TNF mRNA. Relativní hladiny DPD mRNA jsou nižší v nádoru než v kontrolní tkáni, což je v souladu s literaturou. Relativní hladiny TP mRNA jsou vyšší v nádoru než v kontrolní tkáni. Zjistili jsme

nárůst hladin TP v průběhu léčby, což je opět v souladu s literaturou. Bohužel však není jednoznačný vztah mezi hladinami TS, TP, DPD mRNA a léčebnou odpovědí, na rozdíl od prezentací v dřívější literatuře.

Protože jsme používali jako *kontrolní housekeepingový gen* GAPDH, který je znám svojí indukovatelností hypoxickými stavy a některými léčivy, provedli jsme v minulém roce též porovnání hladin TS, TP, DPD vůči jiným housekeepingovým genům (B-actin, Macropain 26S, Calnexin). Statistické výsledky ukazují na nejednoznačnost vztahu relativních hladin mRNA TS, TP, DPD/housekeepingové geny vůči odpovědi na léčbu bez ohledu na použitý housekeepingový gen.

Proto jsme přešli na *sledování expresních profilů cDNA arrays* některých metabolických drah u vybraných pacientů, s cílem osvětlit metabolické změny, ke kterým dochází během terapie a nalézt markery rezistence. Existují významné, *větší než dvojnásobné změny v hladinách více než 10-ti genů ze sledované sady 200 genů* mezi nádory pacientů na léčbu odpovídajících a neodpovídajících. Ještě významnější jsou ovšem rozdíly mezi nádorem a homologní sliznicí nebo rozdíly před a v průběhu terapie u téže tkáně (tumor-tumor, sliznice-sliznice). Soubor je dosud malý pro finální statistické hodnocení. Výsledky stanovení mRNA TS, TP, DPD, TNFA jsou připraveny k publikaci v zahraničním časopise.

Publikace :

1. Kocáková I., Vyzula R , Šlampa P., Špelda S., Kocák I., Čoupek P., Šefr R., Svoboda M., Pacal M., Svobodník A. Předoperační chemoradioterapie s kapecitabinem u lokálně pokročilého karcinomu rekta – reálná cesta ke zvýšení R0 resekcí a záchovných operací konečnicku. Masarykův onkologický ústav, Brno, 26. – 28.5. BOD 2004, Edukační sborník, abstrakt č. 98, str. 177-178
2. Kocáková I, Kocák I, Špelda S, Šlampa P, Šefr R, Pacal M, Penka I, Svoboda M, Vetchá H, Vyzula R Předoperační radioterapie s capecitabinem u karcinomu rekta –vliv na downstaging a možnost sfinkter šetřících operací, dvouleté sledování Masarykův onkologický ústav, Brno, XI. Jihočeské onkologické dny 2004, sborník abstrakt , str. 34-3
3. Svoboda M., Slabý O., Individualizace farmakoterapie inhibitory tymidylát syntázy u nádorů GIT. Klinická farmakologie a farmacie, 50-53, 2004.

Publikace zahraniční :

1. P. Šlampa, I. Kocáková, R. Šefr, H. Horová, I. Kocák, P. Čoupek, V. Chrenko, S. Špelda. Neoadjuvant treatment for locally advanced rectal adenocarcinoma with concomitant radiotherapy and oral capecitabine, Journal of BUON 9: 33-40, 2004
2. Kocáková, M. Svoboda, K. Klocová, S. Špelda, I. Kocák, P. Šlampa, I. Penka, R. Šefr, R. Vyzula, Combined Therapy of Locally Advanced Rectal Adenocarcinoma with Capecitabine and Concurrent Radiotherapy, ASCO, 2004, Proceeding book, poster 3720, page 299
3. Kocakova I, Spelda S, Kocak I, Vetchá H., Šlampa P., Penka i., Šefr R., Vyzula R, Two years' follow up results of neoadjuvant capecitabine and radiotherapy in locally advanced rectal cancer, Sixth international congress: Perspective in colorectal cancer, Barcelona, (PICC 2004), Proceeding book, poster 38, page 216

#### **4.4 : Tkáňová banka**

Vedoucí: RNDr. M. Šimíčková CSc.

Spolupráce: MUDr. Rudolf Nenutil CSc., MUDr. Eva Krejčí, MUDr. P. Fabian, MUDr. V. Chrenko, CSc., MUDr. V. Fait, CSc., MUDr. R. Šefr, CSc., MUDr. I. Penka, CSc., prof. MUDr. J. Žaloudík, CSc., ing. E. Konečná

Bylo pokračováno ve sběru materiálu vybraných maligních lokalit– dosud bylo uloženo asi 1 500 tkání nádorů, event. metastáz či přilehlé normální tkáně. Celkové počty nádorů odebraných za tento rok, nárůst v meziročním srovnání i sumární stav jsou uvedeny v *tab. 1*. Souběžně s nádorovými tkáněmi pokračuje v tomto roce sběr sér odebraných před operací.

Tab.1. Počty tkání a předoperačních sér zamražených ve tkáňové bance MOÚ pro vybrané diagnózy v letech 2000-2004

Rok	Celkem tkání	Počet sér	Počet uložených tkání podle vybraných diagnóz											
			C16	C18	C19	C20	C43	C50	C56	C61	C62	C64	C77	C79
2000	50	0	0	4	0	4	0	18	0	0	1	1	4	0
2001	363	0	4	17	8	18	8	242	9	0	0	3	54	4
2002	276	0	0	17	8	11	2	217	1	0	0	1	30	0
2003	307	235	2	15	3	13	3	194	9	2	2	6	27	7
2004 <sup>a</sup>	546	447	8	37	10	29	6	252	33	0	2	19	48	17
Celkem	1542	682	14	90	29	75	19	923	52	2	5	30	163	28

<sup>a</sup> počty do 15.12.2004

Publikace :

1. 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 2003. Klinická onkologie 2/2004, 59-60.
2. M.Šimíčková, R.Nenutil, M.Vagundová, M.Svoboda, V.Chrenko, O.Coufal, J.Žaloudík: Tumor tissue bank and its role in molecular oncology. Cechtuma Praha 1.-3.10. 2004, Abstrakt in: Biomarkers and Environment, 2004 ;3,4; 67.

#### 4. 5 : Prediktivní testy chemorezistence in vitro

Vedoucí projektu : RNDr. L. Hanák

V Laboratoři chemorezistence MOÚ Brno byl cytotoxický test zaváděn a optimalizován v průběhu roku 2003 za účelem klinického využití. Plně rutinní podoby nabyl od počátku roku 2004, kdy také začal být zčásti hrazen zdravotními pojišťovnami. Pasportizaci testu chemoresistence nádorů v primokultuře pokládáme za dobrý příklad přímého výstupu

výzkumných výsledků do klinické praxe. Reprezentativnost vzorků zpětně verifikována pomocí imunohistochemické detekce proporce epiteliálních buněk v cytopsinu. Cytotoxickým testem chemorezistence je vyšetřována široká škála solidních tumorů, zejména kolorekta, ovarií, mammy, ledvin, maligního melanomu a sarkomů měkkých tkání.

V roce 2004 bylo vyšetřeno 324 vzorků pacientů na chemorezistenci, z toho 83 kultur bylo neúspěšných hlavně pro nedostatek buněk ve vzorku, vzácně pro uhynutí buněk během kultivace. Úspěšnost kultivace je tedy bez zohlednění histotypu 74,4%. Dalším sledovaným parametrem je výtěžnost, která podmiňuje počet cytostatik, která mohou být v řadě koncentrací na primokultivovaných nádorových buňkách testována. Přímo z MOÚ bylo vyšetřeno 282 případů, z jiných brněnských nemocnic 42 vzorků.

*Podle jednotlivých diagnóz je přehled počtů testovaných a úspěšnosti primokultivace následující :*

- 1) U *karcinomů trávicího traktu* (kolorektum, rectum, žaludek, jaterní nádory, pankreas) 118 vzorků pacientů, z toho 31 nevyhodnoceno (úspěšnost 73,8%). Na pacienta připadla průměrně 3 cytostatika z 5 zavedených do panelu jako nejčastěji používaných.
- 2) U *karcinomů prsu* 45 pacientek , z toho 16 nevyhodnoceno (úspěšnost 64,4%). Na pacienta připadla průměrně 3 cytostatika (z 5 až 6 používaných). Zde je nutno připomenout, že i přes vysoké počty pacientek léčených pro karcinom prsu v MOÚ se s ohledem na převažující časný záchyt, drobné nádory, potřebu uchování dostatku materiálu pro standardizované imunohistochemické analýzy i ustálené léčebné postupy , se k testu chemoresistence dostává jen zhruba každý desátý případ, a to z větších, porkočilejších a často již předléčených nádorů. Předchozí léčba , zejména byla-li částečně úspěšná, pak ovlivňuje i výtěžnost a úspěšnost primokultivace.
- 3) U *maligního melanomu* 18 pacientů, selhalo 5 kultur (úspěšnost 72,2%). Na pacienta připadlo průměrně 5 cytostatik ze 7 potenciálně používaných.
- 4) U *sarkomů měkkých tkání* 17 pacientů, selhalo 10 kultur (úspěšnost 41,2%). Na pacienta připadla průměrně 2 cytostatika ze 6 používaných.
- 5) U *ovariálních karcinomů* 54 pacientek, neúspěšných byla 10 (úspěšnost 81,5%). Na pacientku připadlo průměrně 5 cytostatik ze 6 používaných.

- 6) U *renálních karcinomů* z 30 kultivací jen 1 selhala (úspěšnost 96,7%). Analýza chemorezistence a potenciální chemosenzitivity in vitro zaslouží u tohoto typu nádoru po získání větších počtů testovaných zvláštní pozornost s ohledem na praktickou absenci účinné chemoterapie u renálního karcinomu v klinické praxi.
- 7) U ostatních *různých nádorových diagnóz* 42 pacientů, z toho 10 kultivací selhalo (úspěšnost 76,2%). Počet cytostatik zde byl stanoven individuálně podle aktuální potřeby a možností s ohledem na dosaženou výtěžnost primokultury

Obecně lze konstatovat, že na většinu cytostatik byly vzorky rezistentní, což je dáno jejich narůstající diverzitou pokročilejších nádorů a situacemi, kdy se jedná o chirurgicky odebrané metastázy po již provedené předchozí léčbě nebo recidivující nádory. I toto zjištění má však značný dopad do praxe a pouze podtrhuje význam testování chemoresistence, neboť bez této prediktivní diagnostiky je velká část pacientů léčena s nízkou účinností, i zbytečně, a je vystavena zbytečné toxicitě chemoterapie. Zanedbatelné nejsou ani náklady na tuto zbytečnou chemoterapii, které jsou o řád vyšší než náklady laboratorní diagnostiky chemorezistence. Pokud byly odebrány primární nádory před léčbou, byly obvykle na cytostatika citlivější, a to i při hodnocení u stejného pacienta.

Omezením metody může být ovlivnění výsledku přítomností vysokého procenta normálních buněk v kultuře, kdy výsledek se pak může jevit jako falešně rezistentní. Proto jsme zavedli, jak již bylo naznačeno, alespoň jako zpětnou kontrolu cytospinové barvení vzorků za účelem stanovení jejich reprezentativnosti. Z celkem 98 vzorků barvených v roce 2004 bylo vyhodnoceno jako velmi reprezentativních 56. U 57 % vzorků bylo tedy zastoupeno alespoň 60 % nádorových buněk. Z důvodu nepřiliš vysoké celkové reprezentativnosti a s tím spojené nižší výtěžnosti nádorových buněk ze vzorků danou metodikou bylo přistoupeno k paralelnímu srovnávání asi vybraných vzorků s Laboratoří experimentální medicíny FN Olomouc, používající obdobnou metodiku. Výsledky by měly být známy v první polovině roku 2005. Je nesporné, že tento benchmarking dále rozšiřuje důvěryhodnost metody a její širší aplikaci v praxi.

Metodika testování chemorezistence nádorů v primokultuře je dnes v MOÚ uvedena do rutinního provozu. Dále sledujeme její limitace a koreluje výsledky s účinky chemoterapie v praxi. V návaznosti na jiný projekt podporovaný IGA MZdČR je v současné době testována možnost odběrů nádorové tkáně vakuovou biopsií, což by v případě úspěšnosti rozšířilo aplikace testování chemorezistence i na pokročilé inoperabilní, leč vakuovou biopsií

dosažitelné nádory. Testy chemorezistence v primokultuře jsou také metodologickým základem pro sledování funkčního ratingu nádorů, což je obsahem VZ MOÚ v dalších letech.

#### **4.6: Detekce mikrometastáz a reziduální choroby stanovením mRNA transkriptů cytokeratinů.**

Řešitel : Mgr. Jiří Sedláček

Cílem projektu je kvantifikace hladin mRNA pro cytokeratin v mízních uzlinách a v periferní krvi, sledování případné korelace mezi úrovněmi mRNA cytokeratinu a stavem onemocnění.

Výsledky:

Převodili jsme nested PCR stanovení mRNA cytokeratinu 19, 20 na Real Time PCR kvantifikaci transkriptu. Na základě dosavadních výsledků byl marker CK 20 mRNA vyřazen ze studie, protože marker nevykazoval korelaci mezi počtem kontrolních nádorových buněk (HT 29) vnesených do krve kontrolní skupiny zdravých lidí a hladinou markerové mRNA.

Místo CK20 mRNA jsme začali používat jako marker CEA mRNA. Řešitel optimalizoval Real Time PCR, dosud však není otestován dostatečný počet vzorků aby bylo možné provést statistickou analýzu

Hladiny CK 19 mRNA dle Real Time PCR korelují s počtem vnesených kontrolních nádorových buněk (MCF7) do kontrolní krve zdravých lidí. Expresi CK 19 mRNA lze prokázat u 36,6 % pacientů s nádory prsu.

#### **4.7 : Detekce mikrometastáz a minimální reziduální choroby stanovením aktivity telomerázy**

Vedoucí projektu : RNDr. M.Šimíčková,CSc.

Spolupráce: RNDr. L. Lauerová, CSc.

Zkracování telomer (specifických struktur na koncích chromozomů) na určitou délku může dát somatické buňce signál k zastavení dělení s následnou buněčnou smrtí. Ribonukleoproteinový enzym telomeráza je klíčová složka, která je schopna za určitých

podmínek udržet délku telomer a tím zaručit buňkám nesmrtelnost. Aktivita telomerázy a zvýšené hladiny jejích dvou podjednotek, ribonukleové složky (hTR) a katalytického enzymu reverzní transkriptázy (hTERT) jsou asociovány s buněčnou proliferací. Přestože je zvýšená aktivita charakteristická především pro maligní tkáně, je možno ji nalézt v omezené míře v endometriální tkáni, v proliferační zóně intestinálních krypt, nebo v mitogenně stimulovaných lymfocytech.

Cílem naší práce bylo posoudit, zda semi-kvantitativní metoda stanovení aktivity telomerázy (na trhu jsou tři různé modifikace) je dostatečně senzitivní a reprodukovatelná pro detekci minimální reziduální choroby, tj. nádorových buněk uvolněných v průběhu maligního procesu do periferní krve. Pro tento účel byl již dříve zpracováváný soubor rozšířen o další nemocné s progresivním onemocněním karcinomu prsu a kontrolní skupinu zdravých osob.

Metody, soubor nemocných. Zájem o stanovení aktivity telomerázy jako diagnostický a prognostický marker vedl k tomu, že původní TRAP protokol (Telomerase Repeat Amplification Protocol), využívající PCR-amplifikaci a gelovou detekci produktu extenze telomer, byl modifikován pro detekci prostřednictvím imunostanovení. Pro všechny metody dostupné na trhu (Trapeze XL-Telomerase detection kit /Intergen/, Trapeze ELISA detection kit /Intergen/ a PCR ELISA plus /Roche/) byla testována analytická senzitivita a reprodukovatelnost stanovení.

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 obsahovat aktivní telomerázu. Záchyt epiteliálních buněk z izolovaných mononukleárních buněk krve byl prováděn na magnetických partikulích nesoucích protilátku proti epiteliálnímu membránovému antigenu BerEP4. Takto izolované a zakoncentrované epiteliální buňky byly podrobeny lýze a následnému stanovení aktivity telomerázy.

Náš soubor nemocných, společný jak pro hodnocení aktivity telomerázy, tak exprese mRNA pro CK 19, tvořilo 33 nemocných s metastatickým karcinomem prsu, u nichž nebyla obvykle v době odběru aplikována terapie. Zdravé osoby byli zaměstnanci MOÚ, jejichž krev byla získána v rámci preventivních prohlídek (N=21). Odběry pro oba analytické postupy byly provedeny současně.



Výsledky, diskuse. Přestože při testování metody imunomagnetické separace v kombinaci se stanovením aktivity telomerázy na materiálu experimentálních buněčných linií byly testované soupravy dostatečně senzitivní (detekční limit byl na úrovni 5 buněk buněčné linie MCF7), při přidavku těchto buněk do krve (v počtu pod 10 buněk na ml krve) se reprodukovatelnost výrazně zhoršovala. Podle předběžných studií se mohou počty cirkulujících nádorových buněk pohybovat v počtu méně než deset buněk na ml, ale mohou snad dosahovat řádově až desítek na ml krve. Pokusili jsme se tedy i přes toto omezení zhodnotit uvedené techniky na nemocných s metastatickým karcinomem prsu. Srovnáním uvedených tří postupů v předběžných experimentech s buněčnými liniemi jsme došli k závěru, že ELISA PCR (Roche) vykazuje nejlepší analytické parametry. Proto jsme provedli tímto postupem analýzu aktivity telomerázy v rozšířeném souboru kontrolních osob a v souboru nemocných s metastatickým karcinomem prsu.

Určíme-li diskriminační hranici relativní telomerázové aktivity zdravých osob jako 90 % percentil souboru zdravých osob (rozsah relativní telomerázové aktivity 0 – 1,96, medián 0,34), pak při této 90 % specificitě se zvýšená hodnota aktivity telomerázy u nemocných s progresí vyskytuje v našem souboru pouze u 21 % nemocných (rozsah 0 – 23,89, medián 0,52). Mezi souborem zdravých osob a pacientek s karcinomem prsu nebyla prokázána signifikantní diference. Nejvyšší hodnotu (téměř desetinásobek cut-off) vykazuje nemocná s progresí, u níž byl prokázán v době odběru ascites. S touto hodnotou koreluje i nejvyšší hodnota mRNA pro CK19, jinak korelace mezi oběma postupy (aktivita telomerázy a mRNA CK 19) není statisticky signifikantní. Další vysoce pozitivní hodnoty telomerázové aktivity vykazuje nemocná s nádorovou duplicitou (5násobek cut-off) nebo pacientky s multifokálním nádorem.

Stanovení senzitivity a specificity metody průkazu cirkulujících nádorových buněk nemocných s karcinomem prsu pomocí analýzy aktivity telomerázy nespĺnilo naše očekávání, že nemocné s progresí onemocnění budou vždy (nebo téměř vždy) vykazovat zvýšenou aktivitu telomerázy v buňkách izolovaných z periferní krve. Je zřejmé, že k podobným závěrům došli i další autoři hodnotící totožným metodickým přístupem soubor nemocných s kolorektálním karcinomem s metastázami v játrech (2). Jejich studie vykazuje porovnatelné výsledky - v případě analýzy telomerázové aktivity v buňkách izolovaných z periferní krvi našli autoři v souboru pacientek s metastázami pouze 26 % pozitivních případů, zatímco při analýze buněk odebraných z krve mezenterické vény byla pozitivita v 57 % případů (2).

Příčinu nízké senzitivity aktivity telomerázy zjištěné v našem souboru nemocných s metastatickým karcinomem prsu lze snad vysvětlit tím, že nádorové buňky cirkulující v periferní krvi nemusí mít vždy proliferující charakter, který je podmínkou pro užití

stanovení. Stejně lze diskutovat o vhodnosti záchytné protilátky proti epiteliálnímu antigenu (BerEP4) pro imunomagnetickou separaci epiteliálních buněk. Vazba může být ovlivněna heterogenitou populace nádorových buněk s ohledem na expresi BerEP4. Důvodem malého procenta pozitivních nemocných však může být i to, že metoda vykazuje nízkou specifitu (tj. falešnou pozitivitu kontrolního souboru), snad způsobenou již zmíněnou nízkou analytickou reprodukovatelností metody v oblasti detekčního limitu.

Závěry dosud zveřejněných prací užívajících k identifikaci cirkulujících nádorových buněk v krvi pacientek s karcinomem mammy metody založené na nukleových kyselinách nejsou dosud jednoznačné (review 1). Z vyšetřovaných parametrů (mRNA pro cytokeratin 19, dále pro MUC-1, EGFR,  $\beta$ hCG, c-erbB-2) se jeví nadějně mRNA pro mammoglobin. Všechny studie jsou většinou zatíženy problémem nespecifické positivity kontrolního souboru, která může být ovlivněna expresí studovaných parametrů i v normálních epiteliálních buňkách, uvolněných např. při odběru krve. Zcela předběžné jsou výsledky hodnotící expresi studovaných parametrů v časně fázi onemocnění, kdy by detekce těchto buněk mohla mít vliv na stratifikaci rizika při volbě adjuvantní terapie a na časnou detekci relapsu. Telomeráza se jeví být na rozdíl od uvedených postupů vysoce specifickým markerem pro hodnocení charakteru cirkulujících buněk uvolněných v průběhu maligního procesu díky své vazbě na proces proliferace.

Ke kvantitativnímu stanovení telomerázy se v současnosti nabízí metoda s pravděpodobně vyšší senzitivitou než uvedená semi-quantitativní end-point PCR-ELISA, a to RT-PCR analýza mRNA katalytické proteinové komponenty telomerázy (hTERT), o níž bylo prokázáno, že je limitující determinanta ve vztahu k aktivitě telomerázy. Rovněž stanovení plasmatické hTERT mRNA (v nebuněčné formě) se zdá být nadějně. Imunohistochemická detekce hTERT se zdá být rovněž postupem, který by (přes dosud nejasnou roli štěpných transkripčních variant genu) mohl hrát roli v detekci telomeráza-positivních buněk.

Závěr: Detekce minimální reziduální choroby je proces, který vyžaduje vysokou robustnost užitých detekčních systémů. Řešení problematiky standardizace odběrů, standardizace vlastní analýzy i kriterií pro definici pozitivního výsledku lze pravděpodobně očekávat od detekčních souprav, které se již objevily na trhu (firma VERIDEX, AdnaGen) (3).

Metoda stanovení aktivity telomerázy v cirkulujících nádorových buňkách uvedeným postupem nevykazuje dostatečnou senzitivitu a specifitu, zůstává však stále nadějným markerem jak v oblasti diagnostiky, tak i pro sledování specifické anti-telomerázové terapie.

Další metodický vývoj v oblasti stanovení telomerázy či jejích subjednotek je nutný k definitivnímu posouzení využitelnosti pro detekci minimální reziduální choroby.

Citovaná literatura.

1. Ring A., Smith I.E., Dowsett M: Circulating tumor cells in breast cancer. *Lancet Oncology*, 5, 2004, 79-88.

2. Nozawa H., Watanabe T., Ohnishi T., Tada T., Tsurita G., Sasaki S., Kitayama J., Natasa H.: Detection of cancer cells in mesenteric vein and peripheral vessels by measuring telomerase activity in patients with colorectal cancer. *Surgery* 134, 2003, 791-798).

3. Šimíčková M.: Zpráva z konference o nádorových markerech (Cehtuma) 2004. *Klinická onkologie*, 17, 2004, 213.

#### 4.7 : Imunohistochemická detekce mikrometastáz v sentinelových uzlinách

Vedoucí projektu : MUDr. E. Krejčí

Spolupráce: MUDr. R. Šefr, PhD., MUDr. V. Fait, CSc., MUDr. A. Dörr CSc.

V rutinním diagnostickém režimu již v roce 2004 běžela imunohistologická metodika vyšetřování v bioptovaných sentinelových uzlinách (SNB) u karcinomu prsu (cytokeratin 19) a melanomu (melan A) – viz program 5. Pokračoval projekt vyšetřování sentinelových uzlin u kolorektálního karcinomu s cílem doplnit počet vyšetření ke stanovení relevantních závěrů. Rozbíhá se pilotní studie vyšetřování SNB u gynekologických malignit (vulva, cervix, corpus, ovarium).

Přehled imunohistologických vyšetření SNB, 2004			
	pozitivní	negativní	Celkem
mamma	32	138	170
melanom	13	66	79
gynekologické	2	21	23
kolorektum	4	11	15

Publikace :

1. Fait V., Chrenko V., Bartoňková H., Krejčí E., Staníček J.: Sentinelová biopsie u karcinomu prsu. XXXVIII. Brněnské onkologické dny , 26. - 28. 5.2004  
Edukační sborník XXVIII.BOD 2004, 64, s.130 , ISBN 80-86793-01-X
2. Krejčí E., Fabian P., Fait V: Zpracování biopsii sentinelových lymfatických uzlin na oddělení patologie MOÚ. XXXVIII. Brněnské onkologické dny , 26. - 28. 5.2004  
Edukační sborník XXVIII.BOD 2004, 65, s.130 , ISBN 80-86793-01-X

#### **4.8 : Detekce terapeuticky relevantních cílových molekul v bioptickém materiálu**

Vedoucí projektu: MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.

Spolupráce: MUDr. P. Fabian

Byla zavedena metodika detekce amplifikace onkogenu *Her-2/neu* v parafinových řezech pomocí fluorescenční hybridizace in-situ (FISH), relevantní pro terapeutickou aplikaci Herceptinu. Probíhá optimalizace metodiky imunohistochemického screeningu overexprese *Her-2/neu* u karcinomů prsu pomocí kombinace tří protilátek. Počínaje červnem 2004 jsou všechny mammární karcinomy diagnostikované v MOÚ vyšetřeny jak imunohistochemicky, tak FISH (v případě negativní imunohistologie orientačně pomocí "tissue arrays" – viz níže) a probíhá sběr dat pro studii, která bude zahrnovat 500 primárních mammárních karcinomů.

*Tab : Přehled dosud provedených vyšetření Her-2 v rámci programu*

IHC screening		FISH – celé bloky (pozitivní z IHC screeningu)		FISH v tissue arrays	
Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní
219	42	11	31	88	0

Byla zavedena imunohistochemická detekce overexprese onkogenu *c-kit* (*CD117*), relevantní pro terapeutickou aplikaci imanitib mesylátu u gastrointestinálních stromálních sarkomů (GIST). I přes raritnost tohoto nádoru bylo již vyšetřeno celkem 15 případů. V 9 z nich byl potvrzen GIST s overexpresí *c-kit*, což zásadním způsobem rozhoduje o typu a taktice léčby. Ve fázi úvodního testování je metodika standardizované imunohistochemické detekce overexprese receptoru epidermálního růstového faktoru *EGFR*, relevantní pro terapeutickou aplikaci protilátky cetuximabu nebo nízkomolekulárního inhibitoru TK Iressy. Je srovnávána standardizovaná metodika detekce (*EGFR PharmDX kit DAKO*) s monoklonální protilátkou CellSignalling 15F8 s cílem zavést metodu, která by sloužila jako imunohistochemický screening. Spolehlivé stanovení zvýšené exprese *EGFR* je relevantní pro moderní cílenou léčbu řady karcinomů epiteliálního původu, především pocházejících z trávicího a aerodigestivního traktu.

#### **4.9 : Konstrukce a využití kombinovaných histologických parafinových bloků (tissue arrays)**

Vedoucí projektu: MUDr. P. Fabian

Spolupráce: MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.

Limitujícím faktorem řady histopatologických studií je omezené množství bioptického materiálu v parafinových blocích, pracnost a cena zhotovení velkého počtu (řádově stovek) preparátů. Tyto limity lze částečně překonat vytvářením kombinovaných bloků tvořených sestavou reprezentativních válečků, vyřezaných z více dárcovských bloků. Tímto způsobem lze vytvořit sestavy obsahující v jednom bloku několik desítek až stovek vzorků a tím redukovat pracnost i náklady, při záruce výrazně vyšší uniformity zpracování. Určitou nevýhodou je sice menší reprezentativnost materiálu, ale „tissue arrays“ jsou neocenitelné zejména při orientačním mapování exprese nově objevených markerů a stanovování korelací více markerů na objemných souborech a k přípravě standardů pro imunohistologická vyšetření.

V rámci projektu byl vyvinut a úspěšně otestován přípravek pro zhotovování kombinovaných bloků. Počínaje červnem 2004 jsou do „tissue arrays“ rutinně mapovány všechny použitelné mamární karcinomy. Ke konci roku 2004 bylo takto zpracováno 217 případů v 11 blocích, byly zkonstruovány dva testovací bloky kolorektálních karcinomů pro *EGFR*.

V roce 2005 se počítá s rozšířením spektra mapovaných případů, v návaznosti na program tkáňové banky a s konstrukcí testovacích a standardizačních bloků pro další metodiky (Her-

2, steroidní receptory, EGFR). Dále se počítá s vytvářením arrays pro soubory grantových a jiných studií. Byla tedy úspěšně zavedena nová technologie v histopatologii, která je nezbytná pro plnění úkolů plynoucích také z nového výzkumného záměru MOÚ přijatého na léta 2005-11.

## **Program V : Lokoregionální léčba nádorů**

Koordinátor: MUDr.V.Fait, CSc.

### **5.1. Detekce sentinelových uzlin v diagnostice a terapii nádorů**

Řešitelé : MUDr.V.Fait,CSc., MUDr.R.Šefr,PhD, MUDr.A.Dorr,CSc.

Technika sentinelové biopsie je metoda, která u solidních nádorů s dispoicí k lymfatickému metastazování nabízí možnost, jak s relativně malým poškozením pacienta zjistit stav regionálních uzlin a zaměřit úsilí patologa na uzlinu s relativně nejvyšší pravděpodobností metastatického postižení a tím zásadním způsobem zpřesnit staging časných nádorů. V Masarykově onkologickém ústavu je vypracována komplexní metodika indikace i provádění biopsie sentinelové uzliny. Její součástí je ultrazvukové vyšetření lymfatické oblasti, lokalizace spádové uzliny lymfoscintigrafií, peroperační detekce kombinující radionavigaci a lymfokolorografii, ovšem i pečlivá histopatologická diagnostika se sériovým prořezáním uzliny a doplněním imunohistochemií, není-li metastáza v uzlině diagnostikována standardním mikroskopickým vyšetřením. Pouze tento komplexní přístup zhodnotí biopsii sentinelové uzliny jako adekvátní metodu diagnostiky uzlinových metastáz, která je zcela rovnocenná dřívějším rozsáhlejšími operacím a v detekci mikrometastáz je patrně i převyšuje.

#### *Sentinelová biopsie u maligního melanomu :*

U maligního melanomu se jedná už o relativně uznávanou metodu, s hlavním záměrem zpřesněním stagingu a vytipování pacientů, kteří mohou mít profit z časně lymfadenektomie.

V roce bylo operováno 2004 celkem 143 pacientů, s úspěšností nálezu 100%, pozitivní nález u 23 pacientů, tedy v 16.1%. Falešnou negativitu aktuálně hodnotit nelze. Celý soubor, který je nejrozsáhlejší v ČR, čítal ke konci roku 2004 773 pacientů, celková úspěšnost nálezu je 94,7%. Promítá se zde však i iniciální nižší úspěšnost v době učení se metodě a používání pouze metody barvení lymfatických uzlin k vyhledávání. Podíl pozitivních nálezů je celkově

21,4%. Falešná negativita je sumárně 1,4%, toto číslo je ovšem nepřesné při kratším sledování části pacientů, při sledování nad 5 let se pohybuje kolem 2,7%.

V poslední době lze pozorovat určité zlepšení spektra pacientů ve prospěch časnějších forem melanomu, s čímž koresponduje také klesající podíl pozitivních sentinelových uzlin.

#### *Sentinelová biopsie u karcinomu prsu :*

U karcinomu prsu se jedná vzhledem k četosti výskytu karcinomu prsu o metodu s potenciálně největším ekonomickým a sociálním dopadem. U karcinomu prsu má tato metoda kromě jiného možnost snížit zastoupení kompletních axilárních lymfadenektomií typu exenterace či disekce axily u časných stádií, v současné době cca o 70%.

V roce 2004 bylo radionavigovanou biopsií sentinelové axilární uzliny operováno celkem 176 pacientek, úspěšnost vyhledávání byla 98,9%, pozitivní nález drobné metastázy či mikrometastázy v uzlině byl zjištěn u 32 pacientek, tedy v 18,3%.

Celý soubor ke konci roku 2004 čítal 496 pacientek, s celkovou úspěšností nálezu 98,8%, podíl pozitivních nálezů je celkově 24,5%.

Lze pozorovat snížení počtu pozitivních nálezů, což koresponduje s větším podílem velmi malých nádorů . Tento trend je pravděpodobně již důsledkem zlepšené časně diagnostiky mammárních karcinomů a zavedeného screeningů..

#### *Sentinelová biopsie u karcinomu tlustého střeva*

U karcinomu kolon tato metoda neznamená zmenšení rozsahu lymfadenektomie, ale dovoluje především zaměřit pozornost patologa na uzlinu s největší pravděpodobností metastázy, s cílem zpřesnit staging. Jde tedy o mapování uzlin s cílem lepšího zachytu uzlinových metastáz, které jsou indikačním kriteriem pro obligátní aplikaci adjuvantní chemoterapie. Stav detekce uzlinových metastáz je, ak vyplynulo z našich dřívějších analýz, mnohde velmi neuspokojivý a také údaje NOR svědčí o nedokonalé diagnostice uzlinového postižení, na čemž se podílejí edílnou měrou chirurgové i patologové.

V současné době je ve studii zahrnuto 49 pacientů, 47x byla použita metoda barvení, 1x zkoušena metoda s fluoresceinem, 1x kombinace radiokoloidu a barviva. K identifikaci bylo použito u 24 pacientů metody in vivo, následně byla již používána metoda modifikovaná (in vivo mapování + ex vivo identifikace) u 25 pacientů. Průměrný počet všech vyš. uzlin 16,3 (+- 8,5), medián 15, rozmezí 1-41. Přesnost sentinelové biopsie byla 77,1%, senzitivita:

54,2%, negativní prediktivní hodnota: 68,6. Falešná negativita při použití pouze in vivo identifikace byla až 72% , po zavedení modifikované technika se snížila na 23 %.

Ve studii, dosud v ČR ojedinělé, je nutné pokračovat . Zatím se metodou zvýšily počty vyšetřených uzlin, v modifikované metodě je jejich detekce spolehlivá. Upstaging z titulu aplikace metody je však zatím nízký.

Publikace:

Coufal, O., Svobodník, A., Žaloudík, J., Šefr, R., Fait, V., Dušek, L., Dorociak, F.: Vyšetřování mízních uzlin v resekátech karcinomů kolorekta. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laborantky, Brno, 26.-28.5.2004. Edukační sborník, s. 176.

Coufal, O., Svobodník, A., Žaloudík, J., Šefr, R., Fait, V., Dušek, L., Dorociak, F.: Faktory ovlivňující vyšetřování mízních uzlin v resekátech karcinomů kolon a rekta. Klinická onkologie, 17, 2004, č. 3, s. 96-100.

Coufal, O., Svobodník, A., Žaloudík, J., Šefr, R., Fait, V., Dušek, L., Dorociak, F. Vyšetřování mízních uzlin v resekátech karcinomů kolorekta. Brněnské onkologické dny, 26.-28.5., Brno 2004.



Fait, V, Chrenko, V.: XXXII Symposium in Südtirol. Biopsie sentinelových uzlin.  
Klinická onkologie, 17, 2004, č.6, s.213-214.

Fait, V., Chrenko, V., Bartoňková, H., Krejčí, E., Staníček, J.: Sentinelová biopsie u karcinomu prsu. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laborantky, Brno, 26.-28.5.2004. Edukační sborník, s. 130.

Fait, V., Chrenko, V., Staníček, J., Krejčí, E.: Sentinelová biopsie u maligního melanomu, zkušenost a výsledky po deseti letech. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laborantky, Brno, 26.-28.5.2004. Edukační sborník, s. 130.

Chrenko, V., Fait, V., Krejčí, E., Bartoňková H., Staníček, J.: Spolupráce chirurga a patologa při terapii karcinomu prsu z pohledu chirurga. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laborantky, Brno, 26.-28.5.2004. Edukační sborník, s. 126.

Fait, V.: Chirurgická léčba maligního melanomu.  
Onkologická péče, 8, 2004, 2, s. 5-12

Krejčí, E., Fabian, P., Fait, V.: Zpracování biopsií sentinelových lymfatických uzlin na oddělení patologie MOÚ. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laborantky, Brno, 26.-28.5.2004. Edukační sborník XXVIII.BOD 2004, 65, 130

Šefr R, Penka I, Kaplan Z, Coufal O, Fait V, Ondrak M, Fabian P. Metoda lymfatického mapování a sentinelové biopsie u karcinomu tračníku. Brněnské onkologické dny, 26.-28.5., Brno 2004. Edukační sborník XXVIII.BOD 2004,68, 133

Šefr R, Penka I, Kaplan Z, Coufal O, Fait V, Ondrak M, Fabian P.: Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in colon cancer. (POSTER) Kongres: ESSO (European Society of Surgical Oncology), Budapest 31 March - 3 April 2004. Název a autoři posteru uvedeni v: EJSO (European Journal of Surgical Oncology) 2004, Vol. 30, No. II, p. 115.

Šefr, R., Penka, I., Kaplan, Z., Coufal, O., Fait, V., Ondrák, M., Fabian, P.: Metoda lymfatického mapování a sentinelové biopsie u karcinomu tračníku. XXVIII. Brněnské onkologické dny a XVIII. Konference pro sestry a laborantky, Brno, 26.-28.5.2004. Edukační sborník, s. 133.

## 5.2. Experimentální a optimalizovaná radioterapie

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

### *Využití částic o vysokém LET v brachyradioterapii, hypoxie a experimentální radioterapie*

Práce na zprovoznění neutronových zdrojů byly v r. 2004 zastavena vzhledem k organizačním a legislativním překážkám. Firma Delong Instruments s.r.o. na základě firemní strategie vývoje a výroby, která mohla v oblasti automatizovaného afterloadingu pro neutronovou brachyterapii vycházet pouze ze zkušeností s uvedeným prototypem a nezamýšlela soupeřit s komerčně úspěšnou HDR-brachyterapií zahraničních firem, prohlásila v roce 2003, že nebude provádět nebo žádat o provedení klinické zkoušky přístroje DI med 252 C. Tímto rozhodnutím firmy Delong Instruments s.r.o. jako výrobce přístroje a jediného možného zadavatele klinického zkoušení se další proces zastavil a Masarykův onkologický ústav, jakkoli technologicky i kvalifikačně připraven, nemůže bez narušení zákonných ustanovení v aplikaci neutronové brachyterapie pokračovat.

### *Intraoperační brachyradioterapie u nádorů prsu, jícnu a žlučových cest*

Na oddělení radiační onkologie v průběhu r. 2004 bylo pokračováno v zavádění HDR technik brachyradioterapie do klinické praxe, zvláště v léčbě karcinomů mammy, jícnu a byla zavedena metoda ozařování stenozujících nádorů žlučových cest.

### *Postresekční brachyradioterapie po exstirpacích sarkomů měkkých tkání.*

Metoda přímého zajištění lůžka po resekci sarkomů měkkých tkání s vysokým gradingem a při nejistých okrajích je zavedena do klinické praxe v MOÚ jako na jediném pracovišti v ČR. Již dříve bylo zhodnoceno, že tento postup významně snižuje výskyt lokálních recidiv.

### *Konkomitantní chemoradioterapie*

V oblasti aplikace konkomitantní chemoradioterapie jsou hledány optimální kombinace obou metod protinádorové léčby v léčbě nádorů konečnicku, žaludku, nádorů hlavy a krku, anu a mozkových nádorů. Zkušenosti jsou shrnuty v odborné knize „Konkomitantní chemoradioterapie solidních nádorů (Šlampa P. a kol., Galén, 2005), která vyjde začátkem roku 2005.

### *Využití PET/CT v plánování radioterapie*

Objem nádoru v morfologické zobrazovací metodě jako je CT a ve funkčním zobrazení PET není totožný. To může mít význam pro exaktní plánování radioterapie a optimalizaci jejího účinku. V MOÚ byly v roce 2004 zahájeny srovnávací studie (viz publikace).

Publikace :

Šlampa, P. a kol. Radiační onkologie v praxi.  
monografie 2004, 216 s. (ISBN 80-86793-02-8)

Šlampa, P., Bolčák, K., Horová, H., Garčic, J. Fúze CT/PET při plánování radioterapie.  
Seminář SROBF, MOÚ, 2004

Šlampa, P., Horová, H., Kocáková, I. Konkomitantní chemoradioterapie v léčebné strategii nádoru konečníku. XI. Jihočeské onkologické dny, 2004, Sborník přednášek, s. 30-33

Šlampa, P., Horová, H., Kocáková, I. Konkomitantní chemoradioterapie v léčebné strategii nádoru konečníku. XI. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov, 2004

Horová, H., Hynková, L., Košťáková, Š., Staníček, J. Využití pozitronové emisní tomografie v radioterapii. Klinická onkologie, 17, 2004, 6, s. 201-202

Šlampa, P., Košťáková, Š. Konformní radioterapie v léčbě urogenitálních malignit. Urologické listy, 2, 2004, 3, s. 20-30

Tacev, T., Papirek, T., Kolarik, V. Remote afterloading for HDR neutron brachyradiotherapy with Californium-252. Radiother Oncol, 71, 2004, S2, p S77 - abstrakt

Tacev, T., Ptackova, B., Strnad, V. Comparison of twelve-year treatment results of advanced cervical carcinoma with Californium-252 vs. gamma radiation only in brachyradiotherapy. Radiother Oncol, 71, 2004, S2, p S8 - abstrakt

Tacev, T., Ptackova, B., Strnad, V. Comparison of twelve-year treatment results of advanced cervical carcinoma with Californium-252 vs. gamma radiation only in brachyradiotherapy. GEC-ESTRO Meeting, Barcelona, 2004

Tačev, T., Grigorov, G., Papírek, T., Kolařík, V. Remote afterloading for intracavitary and interstitial brachytherapy with californium-252. Nuclear Instruments and Methods in Physics. B 213 (2004), p 626-628

Tačev, T., Strnad, V., Ptáčková, B. Californium-252 versus conventional gamma radiation in the brachytherapy of advanced cervical carcinoma: comparative treatment results of a 10-year, randomized study. Nuclear Instruments and Methods in Physics. B 213 (2004), p 629-632

Tomková, D., Gregorčíková P., Fuchsová J., Šlampa P. Poresekční intersticiální brachyterapije u nádorů prsu. Brněnské onkologické dny 2004, Edukační sborník XXVIII.BOD , 2004, s. 281

### **5. 3 : Lokoregionální léčba pokročilého nádorového onemocnění**

Vedoucí projektu : MUDr. V. Chrenko, CSc

Spoluřešitel : MUDr. I. Penka, CSc, MUDr. Z.Kaplan, MUDr.H.Bartoňková

V tomto projektu jsou ověřovány dosud nestandardní metody , jimž lze posunout meze možností léčby lokálně pokročilých nebo i metastazujících nádorů za předpokladu omezení metastáz na jeden orgán nebo cévně definovanou oblast.

#### *Izolovaná hypertermická perfuze:*

Izolovaná hypertermická perfuze je speciální metodou pro terapii mnohočetného končetinového lokoregionálního relapsu maligního melanom, případně sarkomů. Indikace jsou poměrně řídké, nicméně v indikovaných případech se jedná o jedinou možnost účinné terapie. Tato metoda je zavedena v České republice pouze v MOÚ. V roce 2004 byla použita pouze u jednoho pacienta s efektem parciální remise.

Celkově byla dosud izolovaná hypertermická perfuze končetin v MOÚ použita u 10 případů, z toho 3x u jednoho pacienta. Jednou zůstala bez efektu, 2x s efektem kompletní regrese, 7x s efektem parciální regrese. Celkových 90% příznivé odpovědi a 20% kompletních remisí představuje v tomto malém souboru velmi dobrý výsledek i v mezinárodním srovnání a jasně ukazuje, že pro indikované případy by metoda měla zůstat nemocným k dispozici alespoň na jednom pracovišti. Metodu i výsledky však bude třeba více popularizovat, protože je nepochybné, že napříč republikou by se indikovaných případů našlo podstatně, možná několik desítek. Zatímco metoda je technicky řešitelským pracovištěm zvládnuta, zůstává

úkol seznamovat s nabídkou převzít indikované nemocné všechna větší onkologická a chirurgická pracoviště v ČR.

*Radiofrekvenční ablace (RFA) primárních a sekundárních nádorů jater.*

Technologie radiofrekvenční termoablace užívá generátoru vysokofrekvenčního elektrického proudu a speciální sondy s aktivní elektrodou, jejíž moderní konstrukce s ostrým koncem a rozdílnou expoziční délkou umožňuje aplikaci vysoké teploty po inzerci do ložiska v jaterní tkáni, které vedou k destrukci tkáně v okolí a v její přeměnu v koagulační nekrózu eliptického tvaru.

Od roku 2002 byla RFA začleněna do léčebných standardů MOÚ u indikovaných u pacientů s primárními i sekundárními nádory jater. Metoda RFA byla postupně standardizována stran předoperační přípravy pacientů, vlastního technického provedení otevřenou, laparoskopickou i perkutánní technikou pod CT navigací. Všichni pacienti léčení touto metodou jsou dispenzarizováni dle algoritmů zavedených v předchozím roce řešení. Naše zkušenosti a poznatky s metodikou RFA jsou postupně komplexně vyhodnocovány též v kontextu s prováděnou chemoterapií a zejména co do parametrů stabilizace onemocnění a celkové doby přežití nemocných ve srovnání s klasickými konzervativními postupy.

Na chirurgickém oddělení MOÚ bylo v předchozím roce touto technikou ošetřeno 37 pacientů, 26 peroperačním provedením RFA jaterních ložisek, radionavigovaně pak 11 pacientů - 6 pod CT a 5 pod ultrasonografem. U některých pacientů bylo RFA provedena pro více jaterních ložisek. Celkem bylo ošetřeno radiofrekvenční technikou 54 ložisek, přičemž některá z nich byla ošetřována opakovaně ve více sezeních. Počet samotných RFA výkonů je tedy několikanásobně vyšší.

V roce 2004 bylo v MOÚ ošetřeno celkem 29 pacientů z nichž 21 pacientů peroperačním provedením RFA jaterních ložisek, 7 pacientů pak radionavigovaně. Celkem tedy tento zákrok podstoupilo 29 pacientů z nichž některým byly ablována dvě i více ložisek - celkem bylo v tomto roce řešení ablováno 40 ložisek, 38 otevřeně a 10 radionavigovaně.

Celkem tedy byla v MOÚ provedena RFA u 66 pacientů, u kterých bylo tou metodou ošetřeno 94 jaterních ložisek

V našem souboru jsem nezaznamenali žádné úmrtí v souvislosti s provedenou RFA. Ve dvou případech byl pozorován nitrobřišní absces v subfrenické a v subhepatické krajině - v obou případech zvládnutý punkcí pod CT. Všeobecně přetrvávají subfebrilie i 2 týdny po výkonu, což souvisí s resorpcí koagulační nekrózy. Asymptomatický pleurální výpotek se

objevuje více vpravo. Laboratorní výsledky ukazují po RFA přechodné zvýšení jaterních testů. Během 2-4 dnů dochází k normalizaci těchto hodnot. V hemokoagulačních parametrech jsme po aplikaci metody nezaznamenali podstatné změny, které by ohrožovaly krvácením či trombózou.

K otázkám vlastní progrese ložiska po zákroku, eventuálně lokální recidivy, a přežívání je pro krátkou dobu užívání metody RFA je zatím předčasné se vyjádřit, protože je zapotřebí víceletého sledování. Podle předběžného hodnocení jsou naše výsledky vesměs srovnatelné s dosud publikovanými v zahraniční literatuře.

V současné době je naše pozornost zaměřena především na :

- zdokonalení peroperačního cílení a navigace s využitím peroperační sonografie
- úplnost destrukce vlastního ložiska, tedy účinnost metody v užším slova smyslu:
- hodnocení efektu sonograficky a počítačovou tomografií
- propracovávají jsou metody testu viability nádorových buněk a využití metody PET
- přínos doplnění RFA regionální pooperační chemoterapií cestou a. hepatica či v. portae

Publikace :

Kaplan Z. Ondrák M., Jelínek P.: Radiofrekvenční ablace jaterních malignit.

Klinická onkologie, 2004;17(5):151-156

Penka I, Šefr R, Kaplan Z, Ondrák M, Bartoňková H, Buřilová H.: Radiofrequency ablation of primary and metastatic hepatic tumors. Kongres ESSO (European Society of Surgical Oncology), Budapest 31 March - 3 April 2004. Název a autoři posteru uvedeni v: EJSO (European Journal of Surgical Oncology) 2004, Vol. 30, No. II.

Penka I., Šefr R., Kaplan Z., Ondrák M, Bartoňková H, Buřilová H.: Radiofrequency ablation of primary and metastatic hepatic tumors. Kongres ESSO (European Society of Surgical Oncology), Budapest 31 March - 3 April 2004.

Penka I., Šefr R., Kaplan Z., Buřilová H., Bartoňková H., Bolčák K.: Algoritmus léčby jaterních malignit z pohledu chirurga. Brněnské onkologické dny, 26.-28.5., Brno 2004. Edukační sborník XXVIII.BOD 2004, 95, 172

Kaplan Z., Penka I., Šefr R., Bartoňková H., Eber Z.: Využití metody radiofrekvenční ablace v terapii jaterních malignit – předběžné výsledky. Brněnské onkologické dny, 26.-28.5., Brno 2004. Edukační sborník XXVIII.BOD 2004, 160, 283

## Program VI : Optimalizace a monitorace systémové léčby nádorů

Koordinátor : MUDr. Ivo Kocák

### 6.1. Sledování dynamiky sérových nádorových markerů v odpovědi na chemoterapii

Vedoucí projektu: MUDr. M. Nekulová, CSc.,

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

#### *Testikulární nádory*

##### Výsledky

Pacienty reagující příznivě na terapii bylo možné rozpoznat již po prvních dvou aplikacích chemoterapie. Regresní analýza hCG a AFP koncentrací kategorizovala nemocné do dvou podskupin pro hCG a AFP. Při zhodnocení markerů AFP a hCG (hodnoty před a po terapii a jejich poměry byly hodnoceny jako spojitá čísla) dle Coxova modelu nebo testování vlivu spojitě proměnné na přežití zobecněným Wilcoxonovým testem, pak vychází nejlépe poměr hodnot AFP (hodnota po terapii dělená hodnotou před terapií). Následuje obdobný poměr hodnot hCG. Po kategorizaci dle mediánu, resp. 50 % poklesu, poměr AFP vychází jen s p-value blížící se hraniční signifikanci, zatímco hCG je statisticky významné. Nejlepší predikce efektu terapie je pro pokles hCG až na 5% hodnoty před terapií (ne 50% jako u jiných markerů).

Metoda je použitelná pouze u těch nemocných, kde byla při progresi choroby hodnota markeru v séru zvýšena nejméně na dvojnásobek referenční hodnoty. Jak uvádí Coxův model proporcionálních rizik, je bez kategorizace poměr AFP ještě lepší prediktor bezprogresového přežívání (DFI) než poměr hCG. Pro hCG je vzhledem k predikci dobrého efektu nutný velmi výrazný pokles (na 5% původní hodnoty), zatímco u AFP stačí pokles na 50% hodnoty před terapií. M2PK byl při progresi zvýšen u 30 nemocných (64% senzitivita při 90% specifičnosti), při úspěšné terapii tento marker klesl v 90% k normě. Pouze v 10% případů jsme zaznamenali falešnou pozitivitu, která bývala spojena se současně probíhající infekcí.

#### *Kolorektální karcinom*

Hodnotili jsme parametry validity - senzitivitu, specificitu i další (např. relativní riziko RR ), které vyjadřuje poměr pravděpodobnosti návratu choroby při zvýšené hodnotě markeru proti

normální hodnotě markeru, vše při 90% specifitě a odpovídající referenční hodnotě. Pro diagnostiku návratu choroby byly pro CEA dobré parametry validity (senzitivita 65,4%, RR=10,5 při referenční hodnotě 7ug/l, při 90% specifitě), podobně i pro CA 19-9 (senzitivita 64,2%, RR = 9,1 při referenční hodnotě 24 kU/l, tedy při 90% specifitě). Ve vybraném souboru 30 nemocných, u kterých byly před zahájením terapie vyšetřeny markery a měly zvýšenou hodnotu 2,5x a více nad referenční mez, byl benefit terapie (10x PR +15x stabilizace) zaznamenán u 83,3% nemocných, progrese pokračovala u 5 (16,7%). Pokles CEA významně koreloval s efektem terapie (Log-Rank test). Pro posouzení efektu terapie bylo CEA přínosnější než CA 19-9. Hodnota CA 19-9 v séru před terapií korelovala s prognózou nemocného, avšak pro sledování efektu terapie zřejmě není vhodným markerem vzhledem k časté falešné pozitivitě v důsledku toxicity terapie i nižší senzitivitě.

#### *Chromogranin u NET tumorů*

Chromogranin je kyselý glykoprotein s kalcium vazebnou kapacitou přítomný v neuroendokrinních tkáních. V buňce ovlivňuje ukládání a sekreci hormonů a peptidů.

Extracelulárně působí zřejmě jako prohormon, účastní se procesů spojených s buněčnou adhezí, reguluje vývoj neuroendokrinní tkáně. Imunochemicky byl prokázán v séru, plasmě i moči nemocných s neuroendokrinními malignitami, zejména těch, které neprodukují hormony, hlavně karcinoidů - senzitivitu pro karcinoid jsme v našem souboru získali asi 90%ní. V souboru 62 vyšetření nemocných s neuroendokrinními tumory byla nalezena správná pozitivita ve 31 vzorcích, správná negativita v 26 vzorcích, falešná negativita ve 4 vzorcích a falešná pozitivita u jednoho vzorku. Při cut-off 32,5 byla získána 90% specifita metody a senzitivita stanovení chromograninu v séru 89%, PV+: 91%, PV-: 86% při relativním riziku 6,4 a AUC (plocha pod křivkou) byla 0,902.

#### *Perspektivní nové markery kallikreiny*

Jde o skupinu 15 serinových proteáz působících na extracelulární matrix. Slibné jsou zejména -hK6, hK10+11. Riziko mortality je u nemocných s jejich zvýšenou hodnotou v séru před terapií 3x vyšší. Některé vykazují orgánovou specifitu pro ovarium. Další kallikreiny bývají zvýšené u jdg C61, C50. V souboru 100 nemocných s karcinomem vaječníku před a během terapie byly kallikreiny vyšetřovány ve spolupráci s prof. Diamandisem (Universita Toronto). Soubor 100 pacientek s karcinomem ovaria byl hodnocen v relaci k intervalu bez známek choroby (DFI) i celkového přežití (OS) a je připravován k publikaci v časopisu Clinical Chemistry.



Publikace :

Nekulová M, Kocák I, Šimíčková M, Pecen L, Valík D.: Monitorování efektu cytostatické terapie testikulárních nádorů pomocí dynamiky nádorových markerů.

Labor Aktuell 2, 2004, 12-14

Nekulova M, Pecen L, Kalabova R, Simickova M, Topolcan, Pikner, Vondracek, Valík D :

Predikce odpovědi k terapii pomocí algoritmu pro tumormarkery

abstrakt v Biomarkers and Envir., Suppl.1, 2004, s.100

Nekulova M<sup>1</sup>, Pecen L, Kocák I, Simickova M, Frgala T, Pilný R, Valík D<sup>1</sup>: Predicting response of testicular cancer to chemotherapy based on tumor marker trends.

CECHTUMA 2004: 30.9.04 poster - abstrakt in Biomarkers and Environment 3-4,8, 2004, 70

## **6.2 Markery karcinomu prsu, jejich prognostický a prediktivní význam (se zaměřením na HER-2/neu v séru)**

Vedoucí projektu: RNDr. M. Šimíčková, CSc.

U nemocných zařazených do souboru byly v pravidelných intervalech vyšetřovány hladiny HER-2/neu metodou enzymoimunostanovení (ELISA, Oncogene Science). Výsledky byly porovnávány s rutinně měřenými hladinami sérových markerů CEA a CA-15-3 a korelovány s optimální dosaženou terapeutickou odpovědí na Herceptin.

Odpověď na terapii Herceptinem se známou hladinou sérového HER-2/neu před i po prvních 3 měsících terapie bylo možno hodnotit celkem u 28 nemocných našeho souboru. U 14 nemocných (50 %) došlo k výrazné odpovědi (CR nebo PR), k progresi došlo u 5 nemocných (17,8 %). Koncentrace sérového HER-2/neu před terapií byla zvýšena celkem u 57,1 % (16/28) nemocných. Při restagingu (po obvykle 3 měsících terapie) u nemocných, u nichž bylo dosaženo CR či PR jako nejlepší dosažené odpovědi, byla koncentrace sérového HER-2/neu v normě (pod 15 µg/l) u 13 ze 14 nemocných. Ve skupině nemocných s progresí se však hladina HER-2/NEU ve všech případech stále pohybovala vysoko nad cut-off hodnotou. Rozdíl mezi respondery a non-respondery byl statisticky významný (p 0,005). Statistické

významnosti se přibližovaly rovněž rozdíly v předterapeutické hodnotě sérového HER-2/neu u těchto dvou skupin nemocných. Poměr poklesu hladin tohoto onkoproteinu v tomto období nebyl v našem souboru signifikantní, stejně jako sérové hodnoty CEA a CA15-3 nevykazovaly na začátku ani po 3 měsících terapie signifikantní diference mezi skupinou responderů a non-responderů.

Analýza krokovou procedurou Coxova regresního modelu proporcionálních rizik (počet hodnotitelných případů je 21) vykazuje nejlepší prediktivní hodnotu hladinu HER-2/neu v době po 3 měsících od začátku terapie. Prognostické významnosti dosahuje rovněž předterapeutická hodnota CEA a CA15-3.

Publikace :

1. M. Šimíčková, K. Petráková, M. Nekulová, L. Pecen, R. Nenutil: Sérový onkoprotein HER-2/neu jako prediktor úspěšnosti terapie u nemocných s karcinomem prsu. XXV. Imunoanalytické dny Poděbrady 25.-27.4.2004. Biomarkers and Environment, 2004; 3,4; 67. On line [www.imunoanalyza.cz/akce/prednasky/4-4.pdf](http://www.imunoanalyza.cz/akce/prednasky/4-4.pdf) (4.2004)

### **6.3 : Doxorubicinem indukovaná kardiomyopatie – stanovení markerů časného postižení myokardu a možnosti kardioprotekce v klinické praxi**

Úloha apoptózy kardiomyocytů v patogenenze kardiomyopatie indukované doxorubicinem a možnosti protekce myokardu v experimentálním modelu

Vedoucí projektu : MUDr. Josef Umlauf, PhD

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 jádru, jádře a cytoplasmě. Kládli jsme důraz na detekci translokace signálu z cytoplasmy do jádra buňky, což je klíčový moment při spuštění aktivní buněčné smrti. Krysí kardiomyocyty, izolované pomocí Langendorfova preparátu, byly krátkodobě kultivovány v médiu s vysokou koncentrací doxorubicinu (20 mikromol). Biochemická analýza jadérekových a jaderných preparátů kardiomyocytů prokázala rychlý nástup aktivní buněčné smrti u těchto buněk.

Výsledky :

- 1/ Pomocí fluorescenčního mikroskopu jsme prokázali akumulaci doxorubicinu v jádrech izolovaných kardiomyocytů a rozpad cytoskeletu
- 2/ Kapilární elektroforéza DNA kardiomyocytů odhalila fragmentaci po 5 hodinách tzn. nástup aktivní buněčné smrti
- 3/ Současně s fragmentací DNA jsme imunohistochemickými metodami prokázali segregaci obsahu jádru- proteolýzu proteinů a rozklad r RNA
- 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

#### **6.4. Vyšetření izoenzymu pyruvátkinázy a neuron-specifické enolázy u pacientů s karcinomem ledvin a seminomem**

Řešitelé projektu : MUDr.I.Kocák, MUDr.M.Nekulová,CSc., MUDr.M.Palácová, MUDr.D.Valík

Nádorová pyruvátkináza je jedním z nových parametrů, který má vztah ke zvýšené aerobní glykolýze nádorové tkáně. Tento izoenzym pyruvátkinázy je produkován nádorovými buňkami a je uvolňován do tělních tekutin při zvýšeném metabolickém obratu nádorových buněk, ev. při jejich nekróze. Jeho vyšetření má obzvlášť význam pro ty nádorové lokalizace, kde dosud nejsou k dispozici vhodné nádorové markery, tj. např. pro karcinomy ledvin a seminomy.

Tab.1. Nádorový izoenzym pyruvátkinázy a jeho význam pro monitorování nemocných se seminomy a karcinomy ledvin

Dg	N			aut-off	SN (%)	PV+ (%)	PV- (%)	RR	AUC
	celkem	CR	PD						
seminomy	563	440	49	35,5	61,2	40,5	95,4	8,8	0,805
ca ledvin	397	207	77	39	40	58,8	79,8	2,91	0,679
celkem	960	647	126						

N: celkový počet hodnocených událostí, SN: senzitivita, PV+, PV-: pozitivní a negativní prediktivní hodnota, RR: relativní riziko při 90 % specifitě. AUC: plocha pod ROC křivkou, CR: kompletní remise, PD: progresse

Publikace :

Nekulová M., Kocák I., Šimíčková M., Pecen L., Valík D.: Monitorování efektu cytostatické terapie testikulárních nádorů pomocí dynamiky nádorových markerů. Labor Aktuell 02/04, 12-14.

Roche Diagnostika, 2004.

### 6.5. Analýza prediktivních buněčných parametrů u souboru pacientek s karcinomem hrdla děložního v korelaci s dlouhodobými léčebnými výsledky

Vedoucí projektu: MUDr. R. Kalábová, PhD

Výsledky práce jsou součástí protokolu klinického sledování pacientek, provedeného v rámci postgraduálního studia na téma *Monitorovaná konkomitantní chemoradioterapie u pokročilého karcinomu čípku děložního*, které bylo úspěšně dokončeno obhajobou 16.9.2004.

Cílem laboratorní části práce bylo vyšetření cytogenetických a cytokinetických parametrů u omezeného počtu pacientek, konkrétně exprese proteinu p53 a kvantitativní profil DNA metodou FCM. Hodnocení bylo provedeno formou dvou nezávislých pilotních studií. Při analýze proteinu p53 bylo zjištěno, že daný protein lze stanovit s využitím nově zavedených imunochemických metodik využívajících peroxidázou přímo značené monoklonální protilátky.

Dále byla ověřena proveditelnost FCM DNA analýzy z minimálních biopsií. Bylo provedeno hodnocení DNA ploidity s kategorizací případů hodnocených před léčbou a v průběhu léčby ( D-D, D-A, A-D, A-A). Podrobnější studie zaměřené na vytipování léčby nejvhodnější pro jednotlivé ženy (prediktivní stratifikace) by mohla zahrnovat právě tyto čtyři kategorie, z nichž riziková z hlediska insuficience léčby může být AA, zvláště pak DA. Kategorie AD pak může být hypoteticky nadějnou skupinou pro léčebnou odpověď zvláště, pokud by byla zároveň zachována funkčnost p53. Sledování cytokerinických změn bylo zaměřeno na akumulaci buněk v radiosenzitivní G2 fázi. Takto možno dokumentovat kandidáty na přínos paclitaxelu, jako agens akumulujícího proliferující buňky v radiosenzitivní G2 fázi. Platí to teoreticky pro nádory p53 negativní, tedy s funkčním systémem p53. V ostatních případech bez zjevných změn v G2 fázi lze hodnotit spíše vliv léčby na redukci proliferace. Získané výsledky mohou být podkladem pro plánování studie zaměřené na tailoring léčby. Kromě medicínského a etického hlediska, je důležitý rovněž ekonomický aspekt léčby a zdůvodnitelnost dražší léčby, tam kde jsou předpoklady pro vyšší účinnost.

Publikace :

Kalábova R., Nekulová M., Neumannová R., Soumarová R., Koukalová H., Pecen L.: Concomitant Chemoradiotherapy with Paclitaxel versus Cisplatin in Patients with Advanced Cervical Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* , 2004, 14, Suppl.1, 93

Kalábová R, Neumannová R, Koukalová H : Taxol nebo cisplatina v konkomitantní chemoradioterapii karcinomu děložního čípku? *Klinická onkologie* 2004, 17, 5: 167-171  
funkčnosti p53 v nádorové tkáni. *Edukační sborník XXVIII. BOD 2004: 64-65*

Kalábova R., Nekulová M., Neumannová R., Soumarová R., Koukalová H., Pecen L.: Concomitant Chemoradiotherapy with Paclitaxel versus Cisplatin in Patients with Advanced Cervical Cancer.

*International Journal of Gynecological Cancer* 2004, September/October 14 suppl.1, 93

## **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.

Těžiště prací bylo zaměřeno na dvě hlavní oblasti: 1) charakterizace poruch v aktivaci STAT 1 signálního proteinu interferony u nemocných maligním melanomem v korelaci s průběhem onemocnění, 2) analýza souvislostí mezi interferony indukovanou aktivací STAT 1 transkripčního faktoru a expresí supresoru SOCS 3 proteinu na úrovni mRNA i proteinu v modelovém systému buněk maligního melanomu a normálních fibroblastů, respektive keratinocytů.

V souboru 44 nemocných s maligním melanomem jsme prokázali, že nemocní, jejichž maligní buňky nereagují na IFN- $\gamma$  signál fosforylací STAT 1 proteinu na Tyr 701 mají výrazně delší bezpříznakové období a celkové přežití ve srovnání se skupinou u nichž byl STAT 1 IFN- $\gamma$  aktivován. Vyloučili jsme možné ovlivnění těchto výsledků standartními prognostickými faktory maligního melanomu. Studie tedy ukázala, že porucha v aktivaci transkripčního faktoru STAT1 interferonem-gamma pozitivně koreluje s průběhem onemocnění maligním melanomem a může tak představovat nový nezávislý prognostický marker.

Publikace :

Boudný V., Lauerová L., Kocák I., Kovařík J.: Analysis of STAT 1 protein expression and its activation by interferons in human malignant melanoma. XXVI. mezinárodní konference společnosti ESGCP ( European Study Group for Cell Proliferation), Praha, 13. - 15. května 2004.

Abstrakt v: Cell Proliferation, 37, p. 114, 2004.

Kovařík J.: Intracelulární mechanismy přenosu cytokinových signálů.

Seminář ústavu patologie LF UP, Olomouc, 9. června 2004.

Boudný V., Adámková L., Lauerová L., Kocák I., Kovařík J.: Analysis of interferon-induced STAT 1 activation in melanoma patients and human malignant melanoma cell lines. The 18<sup>th</sup> Meeting of the European Association for Cancer Research, Innsbruck, 3. - 6. července 2004.

Boudný V., Adámková L., Kovařík A., Fojtová M., Lauerová L., Kocák I., Kovařík J.: STAT 1 phosphorylation induced by interferons in human malignant melanoma. 29<sup>th</sup> European Society for Medical Oncology, Vienna, 29 října - 2. listopadu 2004.

Boudný V., Dušek L., Adámková L., Kocák I., Fait V., Chumchalová J., Kovařík J.: Lack of STAT 1 phosphorylation at Tyr-701 by IFN-gamma correlates with disease outcome in melanoma patients. Neoplasma 2004 - přijato do tisku.

Kovařík A., Fojtová M., Boudný V., Adámková L., Lauerová L., Kovařík J.: Malignant melanoma cells exhibit reduced STAT 1 RNA levels but enhanced STAT 1 phosphorylation and SOCS 3 expression after interferon gamma. Melanoma Research 2004 - odesláno do tisku.

## **6.7 : Predikce odpovědi na chemoterapii u karcinomu pankreatu**

Vedoucí projektu: MUDr. P. Karásek,  
Spolupráce: MUDr. R. Nenutil, CSc.

Cíl projektu:

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 ca 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.

Výstupy :

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

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. V tomto roce bylo provedeno imunohistologické stanovení exprese p21/waf1 a MDM2 na celém souboru a byl vypracována metodika přesnějšího kvantifikovaného vyhodnocení imunohistochemických reakcí. Výsledky budou publikovány během roku 2005.



## **6.8 : Konkomitantní chemoradioterapie s využitím capecitabinu 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, MUDr. H. Vetchá, MUDr. I. Penka, CSc., MUDr. R. Šeřf CSc.,

Pro stanovení TS, TP, DPD a TNFalfa mRNA jsme dosud izolovali RNA od 62 pacientů před zahájením léčby a po operaci. Po vyloučení vzorků od pacientů, u nichž se nepovedlo izolovat kvalitní RNA před nebo po operaci z kontrolní sliznice nebo nádoru jsou k dispozici kompletní sady RNA vzorků od 48 pacientů. U těchto kompletních sad RNA jsme pomocí Real Time RT PCR stanovili relativní hladiny mRNA výše uvedených markerů vůči mRNA housekeepingových genů. Před terapií jsou hladiny TS zvýšeny v nádorové tkáni oproti kontrolní sliznici (v souladu s literaturou). V průběhu terapie dochází k indukci TS mRNA, výrazně v kontrolní sliznici, méně výrazně nebo vůbec ne v nádoru. Indukce TS vlivem terapie byla v literatuře popsána. Hladiny TNF jsou výrazně změněny jak v nádorové tkáni, tak v kontrolní nenádorové, neexistuje však vztah mezi odpovědí na léčbu a hladinami TNF mRNA. Hladiny DPD mRNA jsou nižší v nádoru než v kontrolní tkáni, v souladu s literaturou. Hladiny TP mRNA jsou vyšší v nádoru než v kontrolní tkáni. Došlo k nárůstu hladin TP v průběhu léčby, opět v souladu s literaturou. Bohužel však není jednoznačná korelace mezi hladinami TS, TP, DPD mRNA a léčebnou odpovědí, na rozdíl od prezentací v dřívější literatuře. Protože jsme v minulosti používali jako kontrolní housekeepingový gen GAPDH, který je znám svojí indukovatelností hypoxickými stavy a některými léčivy, provedli jsem v minulém roce porovnání hladin TS, TP, DPD vůči dalším housekeepingovým genům. Statistické výsledky ukazují na nejednoznačnost vztahu sledovaných markerů vůči odpovědi na léčbu. Proto jsme přešli na sledování expresních profilů cDNA arrays některých metabolických drah u vybraných pacientů, s cílem osvětlit metabolické změny, ke kterým dochází během terapie a nalézt markery rezistence.

Publikace :

Kocáková I., Vyzula R , Šlampa P., Špelda S., Kocák I., Čoupek P., Šefr R., Svoboda M., Pacal M., Svobodník A. : Předoperační chemoradioterapie s kapecitabinem u lokálně pokročilého karcinomu rekta – reálná cesta ke zvýšení R0 resekcí a záchovných operací konečnicku. Masarykův onkologický ústav, Brno, 26. – 28.5. BOD 2004, Edukační sborník, abstrakt č. 98, str. 177-178

Kocáková I., Horová H., Špelda S., Kocák I., Čoupek P., Šefr R., Penka I., Svoboda M., Svobodník A. , Pacal M., Vyzula R., Neoadjuvantní podání kapecitabinu jako radiosenzibilizátoru u lokálně pokročilého adenokarcinomu rekta – pilotní studie  
Radiční onkologie – v tisku

P. Šlampa, I. Kocáková, R. Šefr, H. Horová, I. Kocák, P. Čoupek, V. Chrenko, S. Špelda, Neoadjuvant treatment for locally advanced rectal adenocarcinoma with concomitant radiotherapy and oral capecitabine, Journal of BUON 9: 33-40, 2004

I. Kocáková, M. Svoboda, K. Klocová, S. Špelda, I. Kocák, P. Šlampa, I. Penka, R. Šefr, R. Vyzula, Combined Therapy of Locally Advanced Rectal Adenocarcinoma with Capecitabine and Concurrent Radiotherapy, ASCO, 2004, Proceeding book, poster 3720, page 299

Kocakova I, Spelda S, Kocak I, Vetchá H., Šlampa P., Penka i., Šefr R., Vyzula R, Two years' follow up results of neoadjuvant capecitabine and radiotherapy in locally advanced rectal cancer, Sixth international congress: Perspective in colorectal cancer, Barcelona, (PICC 2004), Proceeding Book, poster 38, page 216

## 6.9. Erytrocytární a sérový Mg<sup>2+</sup> před a po léčbě – role substituce solemi Mg<sup>2+</sup>

Vedoucí projektu: MUDr. J. Kleinová,

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

Publikačně dokončeno celkové shrnutí dosažených výsledků se závěry:

1. deficity minerálů – včetně hořčíku jsou jak ve zdravé populaci (23 žen, 70 mužů), tak populaci žen i mužů s vředovou chorobou gastroduodena (83 žen, 101 mužů) i onkologicky nemocných velmi časté,
2. nelze je vyloučit pouze na základě jejich stanovení v séru,
3. výsledky s nálezem vyššího výskytu atypických erytrocytů s odkazem na možný výskyt řady následných reologických komplikací v průběhu léčby onkologicky nemocných před onkologickou léčbou (17 žen s ovariálním karcinomen stupně II. a III), přijaty a publikovány v renomovaném zahraničním časopise.
4. Část klinických zkušeností využita ve druhém doplněném a rozšířeném vydání knihy Výživa v onkologii.
5. Dokončena příprava studie vliv chemoterapie na iontové změny nemocných a jejich odraz na funkci myokardu a to jak na úrovni experimentální (na potkanech), tak klinické u nemocných MOÚ.

Stále vysoké procento onkologicky nemocných s chemoterapií vykazuje nechuť podstupovat další sledování a tak si připomínat fakt, že jsou onkologicky nemocní a to i přesto, že řada z nemocných uvádí subjektivně zlepšení po substituci iontovými preparáty, obsahujících hořčík.

Publikace a přednášky :

- Wilhelm Z.: Význam makro a mikrominerálů v procesech neoplastické transformace XXVIII. Brněnských onkologických dnů a XVIII. Konference pro sestry a laboranty. Brno 26.- 28. 5. 2004.
- Wilhelm Z.: Stanovení potřeb energie u onkologicky nemocného Dni parenterální a enterální výživy, Banská Bystrica, 10. – 12. 11. 2004.
- Wilhelm Z.: Chemoprevence: 8. kongres nemocničních lékárníků. Hradec Králové. 12. – 14. 11. 2004.

- Wilhelm Z.: Perorální strava onkologicky nemocných 8. kongres nemocničních lékárníků. Hradec Králové 12. – 14. 11. 2004.
- Wilhelm Z., Sedláčková M., Kleinová J.: Morphology of Erythrocytes of Patients with Ovarian Cancer. Wiener klinische Wochenschrift - The Middle European Journal of Medicine. 2004; 116, 19.-20. 676-678. ISSN 0043-5325.
- Wilhelm Z., Hegyi P., Kleinová J., Kalábová R., Pechová A., Urbanová R.: Diagnostika deficitů hořčíku v organismu, vlastní zkušenosti. Vnitřní lékařství. 2004; 50, 4:291-299. ISSN 0042-773x.
- Wilhelm Z. et al: Výživa v onkologii. 2. přepracované a doplněné vydání, Brno, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2004, s. 260. ISBN 80-7013-410-0.
- Wilhelm Z.: Chemoprevence: In 8. kongres nemocničních lékárníků. Vyd. 1. Hradec Králové : NUCLEUS HK, 2004, s. 31-34. ISBN 80-86225-64-X.
- Wilhelm Z.: Perorální strava onkologicky nemocných In 8. kongres nemocničních lékárníků. Vyd. 1. Hradec Králové, NUCLEUS HK, 2004, s. 34-37. ISBN 80-86225-64-X.
- Wilhelm Z.: Stanovení potřeb energie u onkologicky nemocného. In Dni parenterální a enterální výživy. Vyd. 1. Banská Bystrica : Slovenská spoločnosť parenterální a enterální výživy, 2004. s. 40-47.
- Wilhelm Z.: Význam makro a mikromineralů v procesech neoplastické transformace Vyd. 1. Brno : Masarykův onkologický ústav v Brně - XXVIII. Brněnských onkologických dnů a XVIII. Konference pro sestry a laboranty v r 2004, 2004. 88-90 s. ISBN 80-86793-01-X.

## **Rozvojový projekt R I : Genomické a proteomové profily pro onkologii**

Vedoucí projektu : RNDr. B. Vojtěšek, DrSc.

Původní název projektu DNA mikročipy pro onkologii byl rozšířen tak, aby zahrnoval nejen DNA microarrays, nýbrž i přípravu expresních RNA profilů a zejména problematiku proteomiky a macroarrays. Byla tak nastavena strategie MOÚ pro další období orientovaná nejen na konjunkturální analýzy tisícovek genů v DNA s obtížnou interpretovatelností pro praktické aplikace, nýbrž sledována linie znaků nádorů v DNA, RNA a zejména v proteinových profilech, neboť ty jsou pak obvykle určující pro diagnostické závěry. Z prostředků mimo VZ se pak v roce 2004 podařilo výzkumný tým ústavu vybavit i unikátní technologií SELDI TOF (Ciphergen) a formulovat navazující VZ pro léta 2005-11 na téma *Funkční rating zhoubných nádorů*. Základem pro další postup prací jsou nejen výsledky VZ z let 1999-2004, nýbrž zejména dvouletá práce na přípravných projektech R I-R IV.

S ohledem na nově nastavovaný program i kompetitivní prostředí při soutěži o nový VZ v roce 2004 jsme u publikace na témata rozvoových projektů R I - R IV v roce 2004 neusilovali a omezili se pouze na informativní prezentace formou přednášek na vybraných odborných fórech.

### **R Ia: Genomické analýzy**

Cílem této části projektu bylo zavést metodu "macroarray, resp. cDNA GEArray" jako komplementární metodu k metodám založeným na analýze proteinů a jako metodu v budoucnu běžně používanou pro potřeby klinických a jiných studií prováděných v rámci MOÚ.

Na rozdíl od metody mikročipových arrays, pomocí kterých je možné analyzovat současně tisíce genů, jsou GEArray testy schopny sledovat expresi jen přibližně stovky genů, avšak jejich výraznou výhodou vzhledem k metodě „microarray“ je podstatně nižší finanční náročnost, jednodušší technické zázemí, dobrá reprodukovatelnost a snazší vyhodnocování. Další nezanedbatelnou výhodou tohoto metodologického přístupu je také možnost si pro vlastní analýzu vytipovat vhodnou skupinu genů, která se vztahuje přímo ke studované problematice. V našem provedení je tato metoda založena na principu přípravy cDNA prób značených biotinem, které jsou použity k hybridizaci se sondami umístěnými na

membránách, jež představují specifické sekvence jednotlivých genů. Po provedení hybridizace a příslušných promývacích krocích se na biotin váže streptavidin konjugovaný s alkalickou fosfatázou a následuje detekce založená na chemiluminiscenci.

Stanovení exprese genů pomocí této technologie bylo s úspěchem prováděno, u buněk lidských, myších a dále pak i u nádorů a to na poměrně širokém spektru genů. Citlivost této metody byla výrazně zvýšena pomocí tzv. „AmpoLabeling-LPR“ metody (specifická amplifikace cDNA značených prób), kdy pro kvalitní analýzu postačují výtěžky RNA od 0,5 µg. Pro zavádění metody jsme v první fázi využili (i) analýzu exprese genů řízených p53 u nádorové linie BT474 nesoucí teplotně senzitivní mutaci v genu pro p53, (ii) analýzu exprese vybrané skupiny genů v naivních blastech u dětí trpících akutní lymfoblastickou leukémií, kde jsme měli k dispozici dostatečné množství buněčného materiálu, (iii) analýzu genové exprese u buněk vystavených účinku amifostinu, (iv) analýzu genové exprese u buněčných linií jejichž růst byl ovlivněn inhibicí p63 (homologu p53) siRNA a (v) studium exprese genů vybraných signálních cest u myších makrofágů buněčné linie J774.2 po infekci *F. tularensis* LVS.

Dosavadní výsledky:

- (i) Protein p53 je nádorový supresor fungující jako transkripční faktor. Při genotoxickým stresu dochází v buňce k jeho aktivaci, váže se na DNA a spouští transkripci genů zodpovědných za zástavu buněčného cyklu i apoptozu. Inaktivace p53 bodovou mutací se tak stává zásadním krokem při maligní transformaci buňky. Velké procento bodových mutací v DNA vazebné doméně p53 vede k nestabilitě konformace proteinu. Tyto mutace jsou často teplotně senzitivní a stávají se tak vhodným cílem pro terapii založené na jejich reaktivaci. V předchozích pracích jsme prokázali teplotně senzitivní charakter mutovaného proteinu p53 285Lys v buňkách nádorové linie karcinomu prsu BT474. Prokázali jsme změnu konformace mutanta při přechodu do 32 °C a obnovení jeho DNA vazebné schopnosti. Rovněž jsme potvrdili obnovení exprese p53-regulovaných proteinů p21 a MDM2, která byla dále zvýšena při použití Cdk inhibitoru Roscovitinu. Cílem této práce bylo zjistit, zda reaktivace mutovaného p53 285Lys vede k obnovení transaktivace na všech promotorech genů regulovaných pomocí p53. Pro tento experiment byla vybrána macroarray analyzující hladinu mRNA genů, které buď regulují aktivitu p53 (upstream) a nebo jsou pomocí p53 exprimovány (downstream). Nádorová linie BT474 byla vystavena jednak teplotě 37 °C (kontrola), nebo 24 hodin teplotě 32 °C. Současně byly buňky ovlivněny 20 µM Roscovitinem silně stabilizujícím hladinu p53 v buňce. Z výsledků vyplývá, že mutovaný protein p53 reaktivovaný při teplotě 32 °C a stabilizovaný pomocí Cdk inhibitoru Roscovitinu je schopný mnohonásobně zvýšit expresi proteinů vedoucích k zástavě buněčného cyklu či

k reparaci DNA. Reaktivace však nevedla k dostatečnému zvýšení genů regulujících apoptózu. Pomocí této metody byla rovněž detekována nepřiměřeně vysoká exprese silně proapoptotického genu PUMA. Exprese tohoto genu v našem experimentu nevykazovala závislost na reaktivaci mutovaného p53 a proto může tento výsledek vést k podezření na defekt v tomto genu ve smyslu delece nebo translokace.

- (ii) Provedli jsem analýzu exprese p53 dependentních genů v naivních blastech u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií, kdy lékem první volby jsou antifoláty, především pak methotrexat (4-amino, 10-methylpterin). Ačkoli je o antifolátovém účinku methotrexátu známo mnoho, distální účinky folátových antagonistů na buněčné úrovni zůstávají víceméně nejasné. Účinky antifolátů pak byly srovnávány s roscovitinem, novým potenciálním protinádorovým cytostatikem z řady inhibitorů cyklin dependentních kináz. V rámci naší studie předpokládáme, že poškození DNA vznikající jako následek působení antifolika může vést podobně jako u řady dalších genotoxických vlivů k aktivaci nádorového supresoru p53. Z tohoto důvodu byla v primární studii monitorována exprese genů zahrnutých v p53 signálních drahách u 4 pacientů s diagnózou akutní lymfoblastická leukémie typu B (B-ALL) a jednoho pacienta s diagnózou akutní lymfoblastická leukémie typu T (T-ALL). U pacientů s diagnózou B-ALL jsme se zaměřili především na vytipování genů, jejichž exprese vykazuje společné rysy a mohly by tedy představovat kandidátní geny jako potencionální markery vhodné pro sledování odpovědi na terapii. Bylo nalezeno několik genů (*bbc3*, *rtp*, *jnk2* a *hipk2*) u nichž docházelo ke zvýšené expresi, která se po přidavku methotrexátu resp. roscovitinu neměnila, nebo jen nepatrně snižovala. Geny regulované p53 proteinem lze rozdělit do dvou hlavních skupin a to na geny regulující apoptózu a geny regulující buněčný cyklus. Z analyzovaných genů zahrnutých v apoptotických drahách nebyl s výjimkou overexprimovaného genu *bbc3* a genu *pidd* (Leucine-rich and death domain containing) nalezen žádný gen, jehož exprese by byla u všech pacientů obdobná či alespoň v jednotlivých případech nějakým způsobem významná. Oproti tomu se zdá, že geny buněčného cyklu by mohly hrát mnohem významnější roli. Prokazatelně u všech pacientů docházelo ke snížení exprese následujících genů *ado22* (TRAF and TNF receptor-associated protein), dále se pak exprimovaly *cdk1*, *p21<sup>WAF1</sup>*, *hif1A*, *pig8*, *relA* a *sp1*, *wig1* a *traf1*, 4, 5 po působení methotrexátu, případně roscovitinu. Zajímavé poznatky byly získány při sledování exprese genů, které se uplatňují při interakcích s p53, popřípadě ovlivňují jeho expresi a stabilitu. U dvou genů po přidavku methotrexátu docházelo k aktivaci a výraznému zvýšení exprese a to *Apex/Ref-1* a *p16ink4* (ARF). Naopak u genu *GAP* docházelo působením methotrexátu k utlumení exprese. Dále pak u genů *mdm2*, *NF-kappaB*, *CBP* a *p300* docházelo po působení

výše uvedených látek k variabilní expresi vzhledem k jednotlivým pacientům. Zbývající, neméně důležitou skupinou jsou geny, jejichž produkty mají schopnost modifikovat p53. Prokazatelně byla snižená exprese po treatmentu u genů ATM, CSNK1A1, CSNK2 a dále pak bylo možno zaznamenat změny v expresi u PKC a SIRT1. Získané výsledky byly prezentovány formou plakátového sdělení na mezinárodním sympoziu a jsou připravovány pro publikování.

- (iii) Amifostin se používá v klinické praxi jako cytoprotektivum pro zmírnění nežádoucích účinků radioterapie či cytostatik na nenádorovou tkáň. Doposud bylo obecně přijímáno, že amifostin díky své SH skupině působí jako antioxidant. Tuto teorii však částečně vyvrací několik recentních studií poukazujících na jeho cytoprotektivní účinky i při použití neregulárních cytostatik, například taxanů. V některých studiích byla ukázána i aktivace nádorového supresoru p53 amifostinem neznámou cestou. Cílem této části naší studie bylo zjistit mechanismus účinku amifostinu a mechanismus aktivace proteinu p53 při čemž jsme využili již zavedenou metodu macroarrays. Při srovnání indukci různých, na p53 závislých genů po ovlivnění buněk MCF-7 amifostinem a/nebo UV zářením se nám potvrdilo, že amifostin modifikuje spektrum genů indukovaných pomocí p53. Amifostin vede zejména ke zvýšení exprese proteinu p21<sup>WAF1</sup> zastavující buněčný cyklus v G1 fázi a k utlumení indukce apoptotických genů. Přestože je funkce proteinu p53 považována za jednu ze zásadních podmínek spuštění apoptózy, lze v případě aktivace p53 amifostinem hovořit o útlumu apoptotických procesů. Tento zdánlivý paradox lze vysvětlit preferenční indukcí proteinu p21<sup>WAF1</sup>. Protein p21<sup>WAF1</sup> je inhibítorem cyklin dependentních kináz zastavující buněčný cyklus v G1 fázi, přičemž zablokování buněčného cyklu může vést k zeslabení apoptotické odpovědi. Amifostinem vyvolaná změna spektra genů indukovaných pomocí p53 ve prospěch indukce p21<sup>WAF1</sup> se tedy jeví jako základní mechanismus cytoprotektivního účinku amifostinu.
- (iv) Technologie „macroarrays“ byla taktéž využita pro stanovení exprese p53 signálních genů u buněčných linií FaDu (karcinom hltnu) a SCC-25 (orální karcinom), po transfekci specifickými siRNA sloužícími k inaktivaci proteinu p63 homologu proteinu p53. Získané výsledky jsou analyzovány ve vztahu k růstovým vlastnostem buněčných linií s cílem ozřejmit úlohu proteinu p63 v procesu buněčného dělení. Daná studie vyžaduje další experimentální práci a bude dokončena ve spolupráci s laboratoří Dr. Karin Nylander (University Umea, Švédsko). V rámci dané experimentální práce jsme rovněž provedli analýzu několika nádorových tkání s cílem ověřit využití dané metody pro analýzu genové exprese v bioptickém materiálu. Získané výsledky ukázaly



využitelnost dané metodologie, v našem provedení, pro následnou analýzu genové exprese souboru 25 karcinomů prsu.

- (v) Jedním z příkladů využití zavedené GEArray technologie bylo studium exprese genů vybraných signálních cest u myších makrofágů buněčné linie J774.2 po infekci *F. tularensis* LVS, prováděné ve spolupráci s „Proteomovým Centrem v Hradci Králové“. Nejdříve byla analyzována exprese genů pomocí tzv. „Signal Transduction Pathway Finder GEArray“. Tato array zahrnuje většinu doposud popsaných významných signálních drah, respektive sondy vždy pro několik klíčových genů daných drah. Filosofii bylo zjistit, u kterých genů příslušných drah dochází ke zvýšení/aktivaci nebo naopak zeslabení exprese. V našem případě bylo prokázáno, že s výjimkou wnt signální dráhy, dochází u všech ostatních drah alespoň k mírnému k utlumení genové exprese. Významné změny byly detekovány u skupiny genů, které je možno nazvat jako inhibitory cdk. U neinfikovaných buněk byla prokazatelná mírná exprese cdk inhibitorů, po infekci pak dochází k zeslabení exprese těchto genů či úplnému zablokování (p21<sup>WAF1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18). Další skupinou genů, u kterých došlo k významnému zeslabení exprese, jsou tzv. interferon regulační faktory (IRF). IRF hrají nezastupitelnou roli např. při infekci *L. Donovanii*. Jedná se o rodinu DNA vazebných proteinů podílejících se na regulaci transkripce interferonů a některých IFN inducibilních genů (např. *inos*). V případě infekce *F. tularensis* LVS je exprese těchto genů naprosto zablokována včetně genu kódujícího iNOS a TNF-alfa. Infekcí pak byla také naprosto utlumena exprese genu kódujícího cyklooxygenázu (COX-2), známého také jako prostaglandin-endoperoxid syntáza. Což je zajímavé, neboť tento gen se silně exprimuje právě při zánětlivých procesech a je o něm známo, že jak LPS tak kyselina myristilová mají schopnost silně indukovat expresi tohoto genu. Po infekci bylo možno taktéž sledovat výrazné zeslabení exprese katepsinu D, tedy genu kódujícího jednu z proteináz v lysosomech. Obecně lze tedy uzavřít, že po infekci *F. tularensis* LVS dochází obecně k utlumení exprese genů u převážné většiny signálních drah, což koresponduje s výsledky dosaženými při studiu fenotypových znaků, kdy bylo zjištěno prokazatelné snížení imunoreaktivity makrofágů po infekci tímto mikrobem. Dále pak vzhledem k výsledkům dosažených při studiu typu buněčné smrti po infekci a analýze signálních drah s tím souvisejících byla blíže monitorována i exprese genů apoptotických a MAPK drah. Infekcí byla utlumena jak exprese pro-apoptotických genů bak, bax, tak i exprese genů anti-apoptotických. Jedná se o *Bfl-1* (člen rodiny *Bcl-2*); *Bcl-x*; geny kódující kaspázy 2 a 8, které se uplatňují při FAS/TNFR regulované apoptóze; gen pro IAP1, který má schopnost regulovat apoptózu pomocí interakcí s TRAF1 a TRAF2, vazbou a inhibicí příslušných kaspáz, případně pak kontrolou a

regulací hladiny proapoptotických stimulů (Smac/DIABLO). Naopak byla zaznamenána zvýšená exprese genů pro BIRC5, BIRC6 (inhibitory apoptózy) a indukce exprese genu *hrk*, jenž kóduje protein aktivující apoptózu (represe *bcl2* a *bclXL*). Podobně byla zvýšená exprese genu *tank* (I-TRAF), jehož produkt se váže s TRAF, a tím dochází k inhibici NF-kappaB. Na základě těchto dat lze předpokládat, že infekcí indukovaná apoptóza je založena především na snížení exprese anti-apoptotických genů a zvýšené expresi genů, jejichž produkty inhibují geny anti-apoptotické. Při studiu exprese genů MAPK drah byla prokázána zvýšená exprese především genu kódujícího cyklin D2, který je regulován Erk1/2 dráhou (exprese během G1). Dále pak byla zvýšená exprese genu pro Hsp25, který patří do skupiny polypeptidů - stresových proteinů, které jsou indukovány kombinací řady stimulů jako odpověď na environmentální podmínky. Obdobně se zvedla exprese genu pro MP1 (MEK partner-1), jenž se specificky váže na MEK1 a ERK1 čímž umožňuje jejich aktivaci. V neposlední řadě pak byla prokázána zvýšená exprese genů kódujících Erk1 a Erk2, což potvrzuje výsledky dosažené při studiu apoptózy a signálních drah hrajících důležitou roli při těchto procesech.

Na daném modelovém experimentu jsme ukázali potenciální využití námi zavedené technologie analýzy genové exprese pro studium exprese genů v biotickém materiálu používaném pro proteomickou analýzu.

Závěrem lze konstatovat, že metoda "macroarray, resp. cDNA GEArray" byla úspěšně zavedena a je k dispozici všem pracovištím MOÚ. Jsme schopni pomoci s výběrem membrán a provedením metody včetně vyhodnocení výsledků. Dokladem funkčnosti metody je rovněž několik společných projektů se zahraničím, kde provádíme "macroarray, resp. cDNA GEArray" na materiálu zahraničního pracoviště v naší laboratoři.

Informativní prezentace :

Muller P., Hrstka R., Strnad M., Vojtesek B.: Využití macroarray pro studium mutovaného proteinu p53. VIII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Brno 3.-4. 2. 2004.

## R Ib : Proteomové analýzy

Řešení projektu proteomiky na potřebné úrovni již v roce 2004 bylo umožněno zakoupením ProteinChip technologie firmy CIPHERGENE. Cílem projektu v rámci rozvojového programu VZ MOÚ bylo (i) seznámení se s novou technologií, (ii) zaškolení pracovníků, kteří danou technologii budou v budoucnu ovládat, (iii) provedení primárních experimentů sloužících k výběru vhodných čipů pro analýzu sér pacientů, (iv) ucelená analýza vybraného primárního souboru sér pacientů a zdravých dárců a (v) otestování potenciálních přístupů maximálně využívajících systém SELDI-MS.

Řešení dílčích úkolů:

1. Byla provedena orientační analýza sér pacientů se zvýšenými hodnotami známých nádorových markerů (PSA, Her-2, HCG, AFP) a sér zdravých žen a mužů. V rámci této analýzy bylo provedeno základní srovnání proteinových spekter na čipových maticích IMAC 30 a H 50, a to jak sér samotných pacientů, tak směsných sér. Na tomto experimentu byly ověřeny postupy přípravy vzorku a vlastních čipů, profilace spektra proteinů, které se za daných podmínek specificky váží na danou selektivní matici čipu, a získání a zpracování hmotnostního spektra vázaných proteinů, byla ověřena reprodukovatelnost metody. Bylo otestováno využití čipů s imobilizovanými specifickými protilátkami, které zvyšují specifitu a citlivost detekce proteinů z komplexní proteinové směsi.
2. V případě PSA pozitivních sér byla orientační analýza rozšířena na srovnání souboru sér 6 zdravých a 6 nemocných pacientů na čipu H 50 (hydrofobní povrch). Byly nalezeny rozdíly v proteinových spektrech, které mohou být způsobeny podstatou onemocnění indikovaného zvýšenou hodnotou známého markeru. Pro potvrzení těchto nově nalezených aberantně exprimovaných proteinů je nyní prováděna analýza na dalších krevních sérech pacientů se stejnou diagnózou. Dále jsou séra jednotlivých pacientů paralelně analyzována s použitím dalších specifických vazebných maticí a různých vazebných podmínek, aby byly případně nalezeny další možné difference v proteinovém spektru pacientů a zdravých jedinců.
3. Na základě výsledků se směsnými séry byl k další analýze vybrán soubor pacientek MUDr. K. Petrákové s diseminovaným karcinomem prsu. Tento soubor obsahuje 21 pacientek se známým statutem Her-2, na základě kterého může být rozdělen na dva podsoubory pacientek Her-2 pozitivních a pacientek Her-2 negativních. Jako srovnávací soubor byla použita skupina deseti pacientek s neonkologickou diagnózou v přibližně stejném věkovém profilu jako pacientky s diagnózou karcinomu prsu. Cílem bylo nalezení potenciální difference v proteinovém spektru mezi pacientkami s onkologickou a

neonkologickou diagnózou a případně mezi pacientkami s onkologickou diagnózou Her-2 pozitivními a Her-2 negativními. Byly použity čipy IMAC 30, které váží proteiny interagující s mědnatým kationtem. První výsledky ukazují, že mezi proteinovým profilem krevního séra onkologických pacientek Her-2 pozitivních a Her-2 negativních není statisticky významný rozdíl v hladině žádného z vázaných sérových proteinů. Významné rozdíly byly, ale zjištěny při porovnání proteinových spekter pacientek s neonkologickou a onkologickou diagnózou v hladinách pěti následujících proteinů (viz. tabulka).

m/z (Da)	p
3842	$9,1 \cdot 10^{-6}$
7972	$9,1 \cdot 10^{-6}$
8177	$9,1 \cdot 10^{-6}$
11604	0,014
13456	$1,4 \cdot 10^{-5}$

V současné době jsme získali další vzorky sér pacientek s diseminovaným karcinomem prsu a neonkologických pacientek, abychom doplnili soubory pacientek na statisticky významné, a potvrdili pozorované změny proteinového profilu krevního séra. V současné době rovněž pracujeme na purifikaci výše popisovaných proteinových markerů z krevního séra a jejich identifikace.

4. Ve spolupráci se skupinou prof. Palečka (Biofyzikální ústav AV ČR Brno) byla testována možnost studia kovalentních modifikací nádorového supresoru p53. V první fázi šlo o srovnání purifikovaného proteinu p53 s proteinem p53 modifikovaným komplexem oxidu  $\text{OsO}_4$  a 2,2'-bipyridinu. Ten se váže na molekulu proteinu přes tryptofanový aminokyselinový zbytek, cílem bylo zjistit kolik tryptofanových zbytků proteinu p53 je modifikováno osmie modifikováno. Za účelem zvýšení citlivosti metody bylo testováno několik různých protilátek následně vázaných v komplexu s p53 na čip obsahující G protein. Optimalizovaná SELDI-MS analýza naznačila možnost sledování kovalentní modifikace p53 osmiem, což se projevilo diferencí v hmotnosti modifikovaného a nemodifikovaného p53. Daná metoda nám rovněž umožní analýzu jiných forem posttranslačních modifikací proteinu p53.
5. K provádění studií SELDI-MS na archivním tkáňovém materiálu uchovávaném na Oddělení patologie MOÚ byla testována možnost získání proteinových spekter z archivních parafinových bločků. Podařilo se optimalizovat postup pro oddělení fixativa, lýzu tkáně a eliminaci vlivu zbytků fixativa na analýzu SELDI-MS. Lze konstatovat, že

metoda SELDI-MS bude v limitované míře využitelná rovněž k analýze proteinových spekter získaných z archivního materiálu fixovaného metacarnem.

6. Důležitým výsledkem při zavádění SELDI-MS bylo doplnění předcházejících studií o analýzu proteinových spekter buněčných lyzátů a purifikovaného proteinu p53 s využitím protilátkových čipů.

Informativní prezentace SELDI-MS metody :

- 1) Helánová Š., Vyzula R., Žaloudík J., Nenutil R., Müller P., Češková P., Valík D., Vojtěšek B. (2004): Technologie CIPHERGEN – nová perspektiva v proteomice nádorových onemocnění. *Klinická onkologie* 17(5), 157-161.
- 2) Roubalová E., Müller P., Vyzula R., Žaloudík J., Valík D., Nenutil R., Vojtěšek B. (2004): Proteomika: nové trendy a možnosti v onkologickém výzkumu a diagnostice. *Lékařské listy* 43, 24-25.

## **Rozvojový projekt R II : Farmakogenetika cytostatik a cytotoxinů**

Vedoucí projektu : MUDr. D. Valík

Spoluřešitelé: MUDr. R. Demlová, MUDr. M. Gálová

Farmakogenetické aspekty terapie fluoropyrimidiny

Fluoropyrimidiny patří k základním preparátům používaným řadu let v terapii řady maligních onemocnění. Jejich hlavními aktivními metabolity jsou 5-FdUMP, analog TMP, který je suicidálním inhibitorem thymidylátsynthasy, některé další se podílejí i na inhibici syntézy RNA. Klíčovým eliminačním enzymem fluoropyrimidinů je enzym dihydropyrimidindehydrogenáza (DHPD) , který je fyziologicky odpovědný za degradaci přirozených pyrimidinů. Po podání terapeutické dávky 5-FU dochází jednak k renální eliminaci a dále k metabolizaci 5-FU na 5-DHFU jaterní dihydropyrimidindehydrogenázou. Míra renální eliminace 5-FU a míra jeho enzymové redukce je tedy mírou expozice pacienta terapeutické látky.

Aktivita enzymu DHPD vykazuje individuální variabilitu. Jedinci homozygotní pro některé mutace genu se mohou klinicky projevit jako dědičná porucha metabolismu širokou příznakovou paletou od závažné a akutní neonatální patologie až po formy s minimálním

klinickým korelátem, heterozygoti v genu DHPD jsou zdraví. Klinicky zjevný projev kompletní nebo parciální deficience tohoto enzymu se ale může projevit po podání terapeutik metabolizujících se toutou metabolickou cestou. Expozice fluorovaným pyrimidinům může tedy vést k navození významné a někdy i fatální systémové toxicity dané nedostatečnou kapacitou DHPD metabolizovat podanou látku terapeutika – DHPD je tedy jeden z enzymů významných ve farmakogenetické slova smyslu.

Ke sledování farmakogenetického profilu pacientů plánovaných k terapii fluoropyrimidiny jsme připravili *Protokol o farmakogenetickém testování pacienta*. Analogický protokol jsme připravili i pro farmakogenetické sledování pacientů plánovaných k terapii merkaptopuriny zabývající se enzymem thiopurinmethyltransferasou – tento projekt realizujeme ve spolupráci s Doc. Štěrbou a Klinikou dětské onkologie FDN.

Protokol vyšetření DHPD má tři ramena;

i) prvním ramenem je stanovení eliminačního fenotypu pacienta po podání 5-FU jak v bolusovém tak kontinuálním schématu; toto stanovení provádíme na OLM MOÚ pomocí HPLC, kdy měříme plasmatické hladiny 5-FU v daném časovém schématu. Významnou součástí tohoto ramene bude sledování přirozeného metabolitu 5-DHFU v plasmě. Jelikož jde o látku, která není komerčně dostupná, požádali jsme o substanci 5-DHFU pro tento účel firmu Roche. Stanovení eliminačního farmakofenotypu je důležitou částí farmakogenetického vyšetřování, neboť nás informuje o „celotělové“ in vivo aktivitě DHPD, která je jako jaterní enzym nepřístupná přímému měření.

ii) druhým ramenem je stanovení preterapeutické exkrece přirozených pyrimidinů; existují literární údaje, preterapeutická exkrece pyrimidinů je u heterozygotů pro DHPD zvýšena. Za tímto účelem připravujeme a zkoušíme v laboratoři metabolických poruch v dětské nemocnici metodu stanovení thyminu pomocí plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií metodou stabilní izotopové diluce. součástí tohoto ramene je i stanovení tkáňové aktivity DHPD: tento subprojekt je zatím v iniciální fázi; zde je třeba ověřit, zda citlivost stanovení DHFU pomocí HPLC-PDA bude dostatečná, k tomuto měření lze teoreticky použít jakýkoli pyrimidinový analog, problém detekce jeho dihydroderivátu je ale obecný.

iii) třetím ramenem je genotypizace genu DHPD, materiál na toto stanovení je odebrán uložen, realizaci plánujeme ve spolupráci s laboratořemi v Novém Jičíně, pravděpodobně bude řadu vzorků, možná i všechny, třeba sekvenovat

Dosavadní výsledky.

V tomto roce jsme do studie zahrnuli 11 pacientů u nichž máme doposud změřený eliminační profil 5-FU, u některých jsme pokusně provedli i stanovení 5-DHFU, které není bez technických problémů (citlivost, interference). Metoda stanovení plasmatické koncentrace 5-FU se zdá být dostatečně stabilní a robustní. U těchto pacientů je také izolována DNA pro sekvenaci.

V návaznosti na dosažené výsledky plánujeme

- i) pokračovat v akvizici pacientů léčených 5-FU do farmakogenetické studie,
- ii) optimalizovat postup měření 5-DHFU v plasmě pomocí HPLC-PDA – zde je třeba konstatovat, že tato metoda není pro tento metabolit metodou optimální, vhodnější jsou metody na bázi LC-MS, postup ověříme ve spolupráci s laboratořemi v Novém Jičíně.
- iii) vyvinout postup GC/MS pro měření exkrece přirozených pyrimidinů – pokud tento postup splní očekávání, pak mohl být prediktorem možné toxicity
- iv) pracovat na metodě stanovení tkáňové aktivity DHPD pomocí metody HPLC-PDA

## **Rozvojový projekt R III : Funkční zobrazování nádorů**

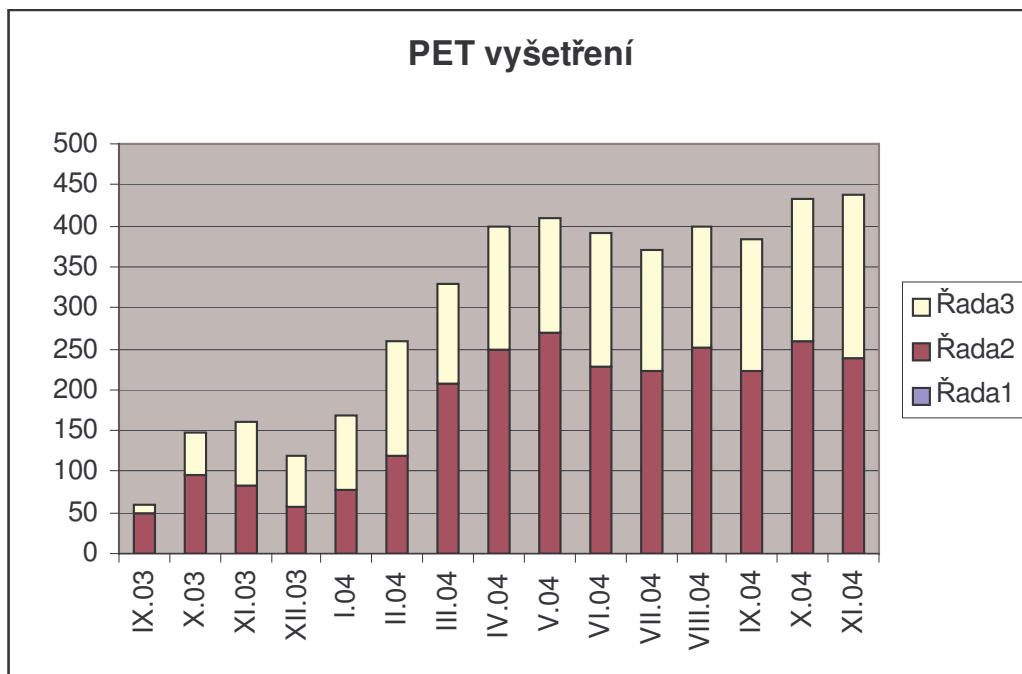
Vedoucí projektu : MUDr. K. Bolčák

### a) technická realizace PET

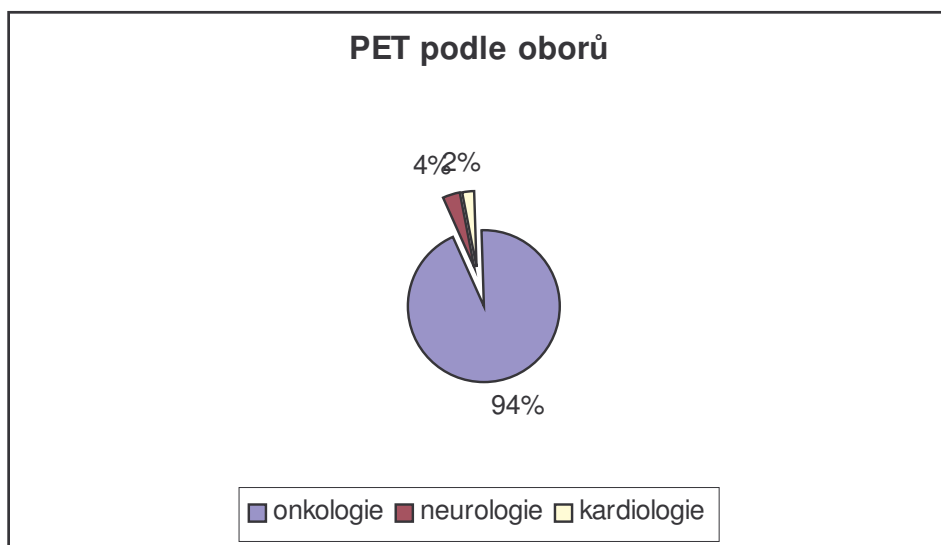
Pracoviště pozitronové emisní tomografie bylo uvedeno do provozu v MOÚ v září roku 2003 Instalována byla PET kamera Siemens E.CAT Accel s LSO krystaly. Pro vyšetření se používá zatím jen 18F-fluor-deoxy-glukóza. Příprava dodané aktivity probíhá za pomoci poloautomatického systému firmy Thema Sinergy, který umožnil významně redukovat radiační zátěž pracovníků radiofarmacie . Velikost aplikované aktivity se liší podle druhu studie. Celotělové vyšetření cca 350 MBq, vyšetření mozku a myokardu cca 200MBq 18F-FDG pro standardního 70 kg pacienta. Denně se z dodané aktivity realizuje v průměru 17-18 vyšetření. Od zahájení provozu do konce roku 2004 bylo realizováno 4881 vyšetření.

Obrazová dokumentace daných studií obsahující reprezentativní řezy – zpravidla koronální, soubor MIP –pseudotřírozměrné zobrazení otáčejícího se pacienta ( Maximum Intensity Projections), kvantifikaci lézi pomocí stanovení SUV ( Standardized Uptake Value), popřípadě fúzi obrazů PET s CT anebo MR se odesílá na PACS archiv, čímž je zpřístupněna pro klinickou prezentaci a další zpracování.

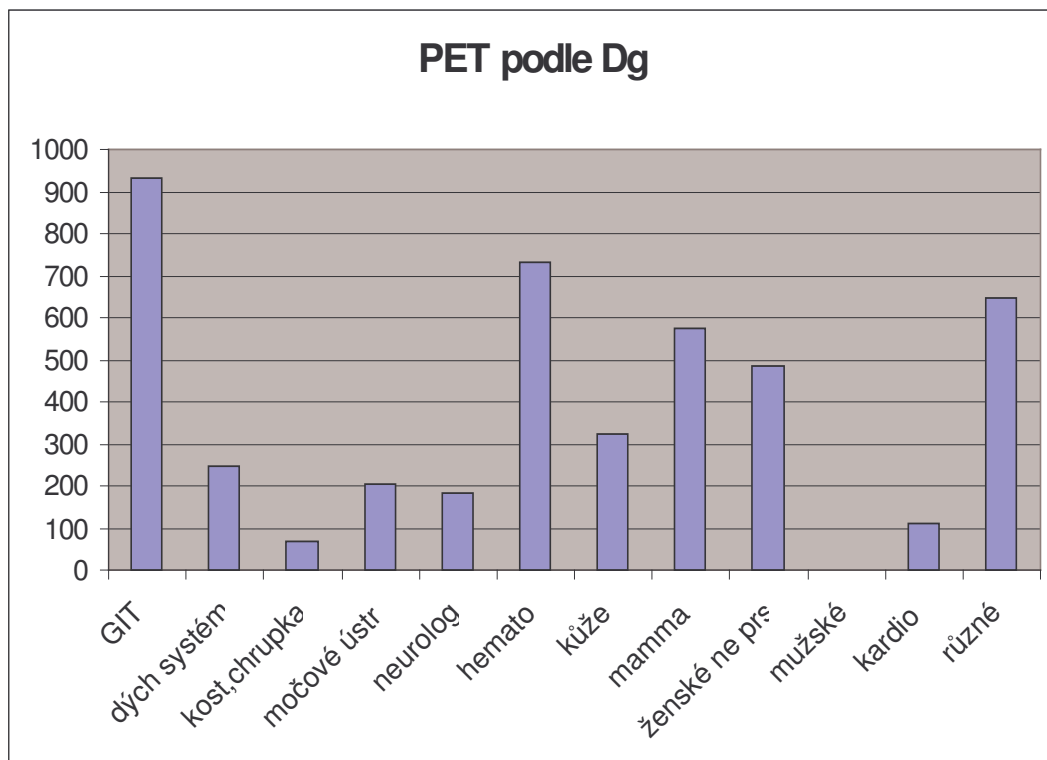
b) Vytváření souboru vyšetřených PET pro další korelační analýzy



Pozn : řada 2 : pacienti MOÚ ,řada 3 : externí pacienti







Pro praktické i analytické účely v korelačních studiích byl v MOÚ vytvořen a zaveden do NIS následující systém kategorizačních kritérií indikací k vyšetření PET u onkologicky nemocných :

D – diferenciální diagnostika ložiskových lézí nejisté povahy

S – staging lokoregionálně rozšířených nádorů s vysokým rizikem diseminace po ukončeném standardním adjuvantním režimu.

R – podrobné vyšetření před zamýšlenou radikální operací – rozšířené radikality, vysokého rizika nebo s důsledky významně snižujícími kvalitu života

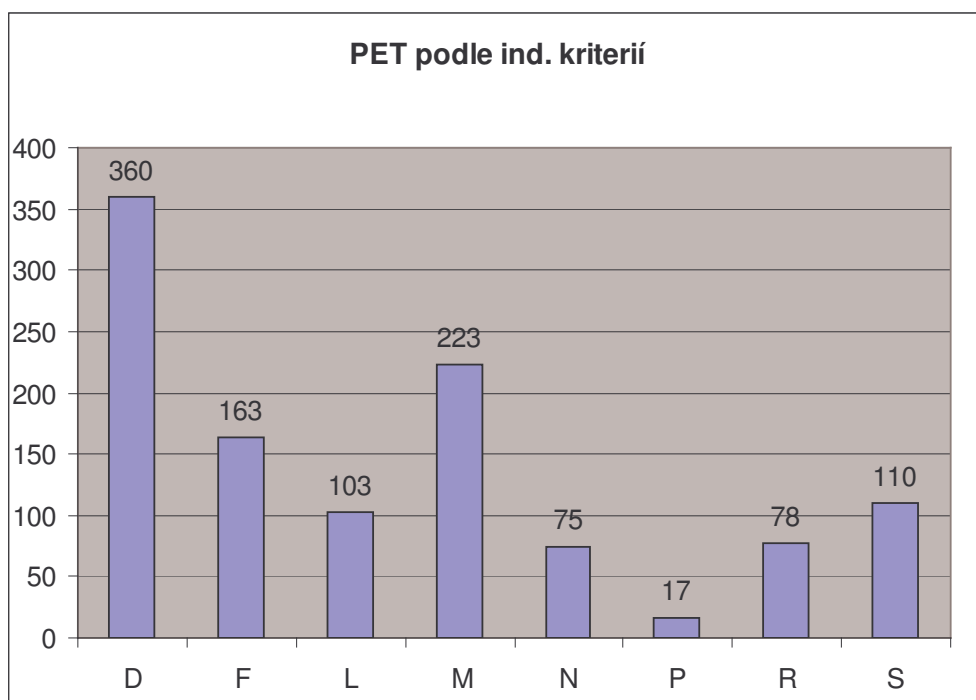
P – plánování radioterapie dle PET / CT

M – monitoring efektu léčby, především chemoterapie, zejména při existenci jiné léčebné alternativy nebo vysoké náročnosti léčby ( ekonomické, toxické zátěži a pod.)

F – roční vyšetření při sledování pacienta po léčbě s vysokým rizikem relapsu nebo relapsem již v minulosti prodělaným

L – vyšetření při patologických laboratorních hodnotách nádorových markerů s negativitou nebo neurčitým nálezem ze základních zobrazovacích metod

N – neonkologická indikace



c) Elektronická fúze obrazů

Od února 2004 se po instalaci SW pro fúzi obrazů se na pracovišti PET standardně provádí spojení informace metabolické s anatomicou v novou zobrazovací modalitu.

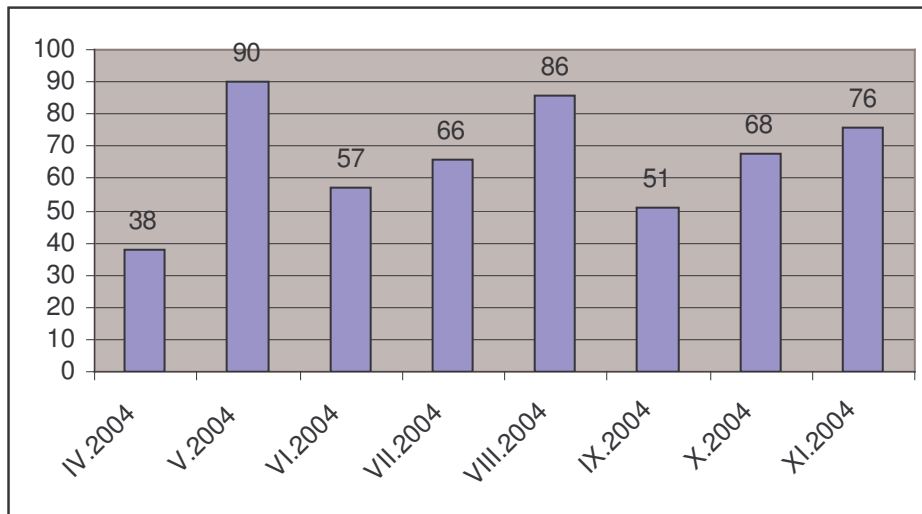
Data CT anebo MR v digitální podobě ve formátu DICOM 3.0 jsou pro fúzi dostupná přes PACS archiv nebo na CD-ROM dodaná z externích pracovišť nenapojených na PACS.

Význam fúzí spočívá v:

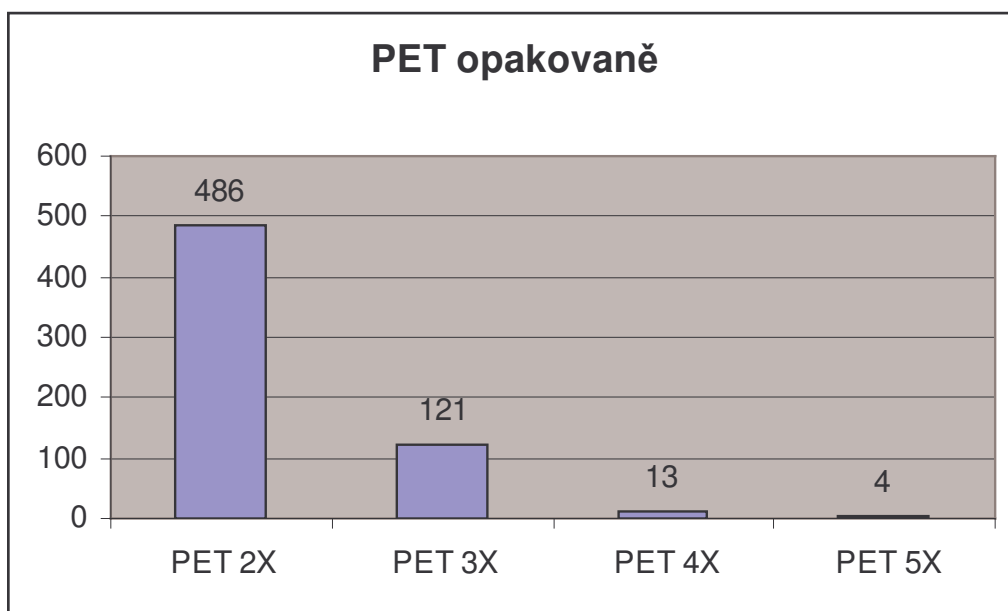
- zpřesnění lokalizace léze zobrazené PET ,
- stanovení lokalizace metabolicky aktivní tkáně v rozsahu léze a odlišení fibroticky změněné tkáně od částí léze obsahující viabilní buňky.

Přehled počtů fúzi obrazů PET / CT anebo PET / MR.

## Počty elektronických fúzí obrazů PET/CT a PET/MR



d) Za sledované období se vyšetření PET vykonaly opakovaně i vícekrát u stejného pacienta, přehled opakovaných vyšetření přináší graf. Je třeba zdůraznit, že zejména opakovaná vyšetření v průběhu nádorového onemocnění jsou základním zdrojem informací o významu funkčních vyšetření PET pro výzkum mechanismů nádorové progresie a jejího ovlivnění protinádorovou léčbou. Nový VZ zaměřený na funkční rating nádoru se bude věnovat zejména predikci a hodnocení efektu terapie.



e) Analýza PET v korelaci s nádorovými markery.

Ve spolupráci s oddělením laboratorních metod jsme analyzovali korelaci nálezů PET s hladinami relevantních nádorových sérových markerů u pacientů s opakovaným PET vyšetřením. Podle předběžných výsledků je vyšetření PET pozitivní dříve než elevace TM u 1/3 až 1/5 pacientů v závislosti na diagnóze. Další analýza a statistické zhodnocení dat v návaznosti na kliniku s upřesněním začlenění PET do algoritmu diagnostických metod budou provedeny v budoucnu.

Informativní prezentace :

Bolčák K. : Pozitronová emisní tomografie u maligního melanomu  
Onkologická péče 1, 2004

Bartl J., Bolčák K.,: Fúze obrazů PET / CT a PET MRI  
Konference PACS MOÚ Brno 2004

Bolčák K., Staníček J.,Řehák Z.,Papírková D.,Černochová I., Bartl J : Pozitronová emisní tomografie – zkušenosti ze zkušebního provozu. DNM Hradec nad Moravicí 7.10.2004

Řehák Z.,Bolčák K.,Staníček J.,Papírková D., Černochová I. : Naše zkušenosti s využitím FDG PET u germinativních tumorů varlat. DNM Hradec nad Moravicí 7.10.2004

Bartl J.,Černochová I.,Řehák Z., Bolčák K.  
Fúze PET / CT a PET / MRI. DNM Hradec nad Moravicí 7.10.2004

## **Rozvojový projekt IV : Telemedicína v onkologii**

Vedoucí projektu : MUDr. Pavel Andres

V rámci řešení telemedicínského projektu přešel MOÚ v roce 2004 plně na bezfilmové technologie v zobrazovacích metodách a úplné využití PACS (picture archiving and communication system) ve spolupráci s Ústavem výpočetní techniky Masarykovy univerzity. To také umožnilo již popsané elektronické fúze obrazů PET/CT a PET/MR.

Nálezy jsou v plně inkorporovány do NIS GreyFox MOÚ a slouží jako dokumentační a datová základna pro rutinní medicínskou práci i výzkumnou činnost. Projekt se dále technologicky rozvíjí a prezentuje na samostatných webových stránkách [www.telemedicina.brno.cz](http://www.telemedicina.brno.cz).