BRNĚNSKÉ ONKOLOGICKÉ DNY
BOD
MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV

EDUKAČNÍ SBORNÍK

XXXI. Brněnské onkologické dny

s

XXI. Konferencí pro sestry a laboranty

Brno

2007

Edukační sborník

Vydal *Masarykův onkologický ústav v Brně při příležitosti konání XXXI. Brněnských onkologických dnů s XXI. Konferencí pro sestry a laboranty v roce 2007*

Editor *prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.*
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.

Tisk *Dataprint Brno*

Copyright © *Masarykův onkologický ústav, 2007*

ISBN *978-9780-86793-09-2*

SLOVO ÚVODEM

Vážení návštěvníci a příznivci Brněnských onkologických dnů,

dlouhodobou strategií i ambicí organizátorů naší každoroční celostátní onkologické konference, letos již jednatřicáté, byla a je otevřenost všem a všemu a má již z definice umožňovat mnoho pohledů. Onkologie otevřenost potřebuje. Je mnohooborová a její základní princip multidisciplinární součinnosti je třeba stále připomínat. Už proto, že mediální obraz onkologie občas inklinuje k omezenosti. Otevřeností pohledů na onkologii nehýří ani plátci onkologické péče. Nová pravidla pro specializační vzdělávání v tomto oboru rovněž zatím nabízejí jen velmi omezené možnosti. I v komerční sféře sloužící onkologickým potřebám je zajišťování otevřenosti tématem stále živým. Strategie otevřenosti zkrátka je a bude aktuální.

Otevřenosti se mají otevřít nové příležitosti. Například pro své předsednictví v Evropské unii v roce 2009 hledá svou strategii i celá Česká republika. Nosným tématem české angažovanosti v této historické šanci má být podle vládních stratégů „odstraňování bariér“. Je určitě nejvyšší čas pracovat na odstraňování bariér také v onkologii. Někdy nemusí jít přímo o bariéry, ale jen o různé příkopy, plůtky, zbytečně hluboké brázdy či nerovnosti v terénu, které komplikují schůdnost.

Tradičně umožňujeme na Brněnských onkologických dnech prezentaci všem, kteří chtějí a mají k dosti volně nadhozeným onkologickým tématům co říci. Letos jsme k účasti vyzvali také zástupce pacientských organizací. Dialog pacientů s lékaři je nutný a prospívá oběma stranám. Stále větší prostor dáváme i zahraničním partnerům, neboť mezinárodní komparace jsou již nezbytností. Ze zřetele nepouštíme, jako již minulých letech, ani informatiku ve službách onkologie. Zařadili jsme také téma Vzdělávání v onkologii. Trvale hledáme vyrovnanost proporcí diagnostické, interní, radiační a chirurgické onkologie, včetně všech souvisejících podoborů. Zájem o nové protinádorové léky je již tradičně uspokojován také bohatou nabídkou sympozií farmaceutických firem. Jsme-li však přesvědčeni, že kromě léku, záření či operace léčí také synergie a algoritmy. Proto jsou velmi důležitými tématy kombinovaná léčba, dispenzární péče i multifaktoriální hodnocení výsledků. Otevřenost po léta demonstruje i pojetí konference jako společného odborného jednání lékařů, sester, laborantů, ovšem také přírodovědců, techniků , informatiků a biostatistiků.

V době převládajícího utilitárního pragmatismu a koncentrace výzkumu do ekonomicky nejsilnějších zemí či nadnárodních korporací je třeba vážit si každého tuzemského výsledku
v základním onkologickém výzkumu a každé lokální snahy o metodickou inovaci. Proto nijak nefiltrujeme ani experimentální práce. Bylo by přepychem nebo nedostatkem pokory organizátorů konference stavět se do role odborných oponentů originálních prací a prezentací. Oponenty nechť jsou sami účastníci konference, posluchači, diskutující a čtenáři Edukačního sborníku XXXI. Brněnských onkologických dnů.

Na sborníku prací z konference nám velmi záleží jako na každoročním průřezu českou onkologií, protože psané trvá a lze se k němu vracet pro poučení i srovnání. Zůstáváme proto nadále otevřeni všem formám textových příspěvků, ať již mají strukturu abstrakta, přednášky, jakéhokoli věcného sdělení nebo propracovaného článku ve formě vyžadované v odborných časopisech. Vyřazujeme pouze ty poněkud odbyté, formální, málovětné anotace nemnohých autorů, v nichž se nám informaci či poučení nepodařilo v textu samotném odhalit.

Každoročně při sestavování programu i sborníku konference hledáme, kombinujeme, řadíme i srovnáváme. A každoročně se těšíme. Zájem o konferenci je vysoký, prací stále přibývá. Přestože nás letos k naší velké lítosti objektivní okolnosti donutily Brněnské onkologické dny posunout již na duben namísto obvyklého května, věříme, že odborná kvalita setkání tím neutrpěla.

Děkujeme všem, kteří svou účastí, přízní či pomocí Brněnské onkologické dny a rozvoj českomoravskoslezské onkologie podporují.

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

prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.
za organizační výbor XXXI. BOD 2007

OBSAH

I. Součinnost onkologů s pacienty

1. Pacientské organizace a informovanost veřejnosti... 22
Rašková I. (Praha)

2. S kým a jak mohou pacientské organizace při šíření informací spolupracovat? 23
Drexlerová J. (Praha)

3. Partnerství nemocného a lékaře – příklad spolupráce Klubu nemocných s mnohočetným myelomem a České myelomové skupiny 24
Toufarová Z., Hájek R. (Brno)

4. Organizace stomiků 24
Kreml P. (Ostrava)

5. Vliv klubu na psychiku onkologických pacientek a jejich aktivity 26
Křížková Z., Chalupová M., Řehořová J., Gajová B. (Olomouc)

6. Jsou pacienti léčení paliativní chemoterapií správně informováni o cílech své léčby? 26
Sláma O., Bartlová M., Cvečková J., Světlák M., Vyzula R. (Brno)

7. Psychoterapie pro onkologicky nemocné..... 27
Kunertová O. (Praha)

8. Pozitivní prostředí péče – cesta k bezpečí pacientů i sester jako téma ICN pro rok 2007 28
Heřmanová J., Zvoníčková M. (Praha)

9. Identifikace pacienta, cesta k bezpečné péči 28
Kocourková J., Vorlíčková H. (Brno)

10. Projekt sledování pádů pacientů 29
Vorlíčková H., Kocourková J., Konečná E., Komínek J. (Brno)

II. Vzdělávání v onkologii

11. Adekvátní pregraduální edukace a orientace v onkologii – imperativ moderní medicíny..... 32
Macháček J. (Olomouc)

12. Potřeba strukturovaného a otevřeného specializačního vzdělávání v onkologii 34
Žaloudík J. (Brno)

13. Chirurgové a jejich vzdělávání v onkologii u nás a v zahraničí 36
Duda M. (Olomouc)

14. Postgraduální vzdělávání v radiační onkologii v České republice a zahraničí 38
Petera J. (Hradec Králové)

15. Variabilita onkologickej starostlivosti – aký je prínos edukácie v onkológii pre „state of the art treatment“..... 39
Jurga Ľ. (Trnava)

16. Klinická praxe studentů ošetřovatelství a „bezpečná péče“ 43
Zvoníčková M., Heřmanová J. (Praha)

17. Nevedomosť zdravotníkov – bariéra v prevencii nádorových ochorení? 44
Schmidtová Z., Kvasnicová Z., Poledníková Ľ. (Nitra, Trenčín)

III. Organizace onkologické péče

18. Národní onkologický program ČR on-line a webová mapa onkologických center..... 46
Šnajdrová L., Zemánek P., Schwarz D., Brabec P., Dušek L., Vorlíček J. (Brno)

19. Organizace péče o pacienty zařazené do klinických hodnocení v MOÚ..... 47
Demlová R., Horová R., Hanáková M., Haičmanová J., Bártová E., Smílková S., Hofmanová Ž. (Brno)

IV. Informatika v onkologii

20. Možnosti využití dat z informačního systému nemocnice – zkušenosti Masarykova onkologického ústavu 50
Brabec P., Andres P., Komínek J., Šebesta R., Klimeš D., Vyzula R., Žaloudík J., Dušek L. (Brno)

21. Parametrický záznam onkologického pacienta jako součást nemocničního informačního systému..... 53
Vydra J., Šubrt D., Aschermannová A., Šmakal M. (Praha, Pleš, Plzeň)

22. Koncepce manažerského informačního systému na MOÚ 56
Šebesta R., Komínek J., Andres P., Novák J. (Brno)

23. ICT a řešení digitální knihovny chemoterapeutických režimů 56
Klimeš D., Dušek L., Vyzula R., Kubásek M., Schwarz D., Sošková R., Koptíková J., Brabec P., Ráček J., Andres P. (Brno)

24. Hematoonkologie v telehematologii: ICT řešení webového archivu 58
Schwarz D., Penka M., Dušek L. (Brno)

25. PACS v gynekologii 60
Račanská E., Petrenko M., Ventruba P., Dostál O., Javorník M. (Brno)

26. Zkušenosti s robotickým monitorovacím systémem RP-7 v praxi..... 62
Jelínek P., Buřilová H. (Brno)

V. Monitorování a predikce v onkologii

27. Paradigma predikce odpovědi na inhibitory HER rodiny u nádorových onemocnění různého histogenetického původu: více indikací, více léčiv, ale téměř shodné prediktory..... 64
Hajdúch M., Berkovcová J., Trojanec R., Dziechciarková M., Radová L., Janošťáková A., Mlčochová S., Wiecek S., Staňková M., Grygárková Y., Kolek V., Cwiertka K., Kiss I., Radzioch D., Kolář Z., Škarda J., Minárik M., Mihál V. (Olomouc, Praha, Brno, Kanada)

28. Cytotoxický MTT test – boj za kvalitnější data a vyšší úspěšnost metody..... 64
Michalová E., Němečková I., Valík D., Nenutil, R., Vojtěšek B. (Brno)

OBSAH

29. Predikce odpovědi na terapii trastuzumabem u pacientů se vzdáleně metastazovaným karcinomem prsu. Příčiny selhání léčby a jejich možné řešení 65
Grell P., Svoboda M., Šimíčková M., Fabián P., Palácová M., Petráková K., Macková D., Nenutil R., Hajdúch M., Cwiertka K., Vyzula R. (Brno, Olomouc)

30. C-Telopeptid kolagenu typu I (ICTP) v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prsu 66
Nekulová M., Petráková K., Šimíčková M., Pecen L., Pilný R., Dubská L., Valík D. (Brno, Praha)

31. Prognostické faktory u ovariálního karcinomu – možnosti imunohistochemické detekce 67
Tomšová M., Melichar B., Šteiner I., Sedláková I. (Hradec Králové)

32. Vztah sérových koncentrací selenu k tyreoidálním laboratorním parametrům a prognóze u žen s karcinomem prsu 68
Jiskra J., Antošová M., Límanová Z., Vinglerová M., Barkmanová J. (Praha)

33. Korelace sérových hladin CEA a CA 19-9 s expresí CEA a klinickopatologickými charakteristikami nemoci u kolorektálního karcinomu 70
Srovnal J., Kesselová M., Kořínková G., Vysloužil K., Duda M., Skalický P., Cwiertka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M. (Olomouc)

34. Role sérové hladiny inhibitoru urokinase-typ plazminogen aktivátoru (PAI 1), jeho genového polymorfismu a současně inhibitoru urokinase-typ plazminogen aktivátoru (PAI 1) a receptoru urokinase-typ plazminogen aktivátoru (uPAR) v nádorové tkáni u pacientů s kolorektálním karcinomem 71
Halámková J., Tomášek J., Čech Z., Pavlovský Z., Moulis M., Svobodník A., Hanáková L., Tuček Š., Vodáková P., Kiss I., Penka M. (Brno)

35. Změny biologické aktivity nádoru v souvislosti s chirurgickou léčbou maligních onemocnění 71
Topolčan O., Holubec L. jr., Třeška V., Fínek J., Svobodová Š., Sutnar A., Šafránek J., Rupert K., Liška V., Špišáková M., Pražáková M. (Plzeň, Praha)

36. Solubilní cytokeratinové markery a jejich význam pro prognózu chirurgického řešení jaterních metastáz..... 72
Holubec L. jr., Třeška V., Topolčan O., Sutnar A., Liška V., Svobodová Š., Špišáková M., Pražáková M., Časová M., Roušarová M., Fínek J. (Plzeň, Praha)

37. EGFR a CEA jako markery minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu 73
Kesselová M., Srovnal J., Kořínková G., Vysloužil K., Duda M., Skalický P., Cwiertka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M. (Olomouc)

38. Komplexní farmakogenetické sledování pacientů léčených protinádorovou chemoterapií s 5-fluorouracilem zaměřené na deficienci dihydropyrimidin dehydrogenázy..... 74
Demlová R., Bednaříková M., Riedlová P., Fišer J., Meijer J., Kuilenburg A., Valík D. (Brno, Nový Jičín, Nizozemsko)

39. Význam genotypizace jednonukleotidových polymorfismů genů ERCC1, ERCC2, XRCC1, XRCC3, CCND1 a MDR1 pro předpověď léčebné odpovědi a hematologické toxicity chemoterapie nemalobuněčného karcinomu plic 76
Pešek M., Brůha F., Bittenglová R., Krákorová G., Benešová L., Slováčková R., Šampalík J., Šefrna, F., Minárik M. (Plzeň, Praha)

40. Prognostický a prediktivní význam immunohistochemické exprese hMLH1, hMSH2 a hMLH6 u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic 77
Škarda J., Plevová P., Fridman E., Hajdúch M., Kolek V., Kolář Z. (Olomouc, Izrael)

41. Thyreoid transcription factor 1 u karcinomu plic: Diagnostický marker minimální residuální choroby... 77
Srovnal J., Kesselová M., Kořínková G., Kolek V., Grygárková I., Cwiertka K., Švébišová H., Gajová B., Hajdúch M. (Olomouc)

42. Predikce účinnosti terapie inhibitory tyrosinkináz a odhad prognózy nemalobuněčného karcinomu plic na základě kombinovaného vyšetření somatických mutací onkogenů K-RAS a EGFR (ERBB1) 78
Benešová L., Pešek M., Hajdúch M., Skřičková J., Minárik M. (Praha, Plzeň, Olomouc, Brno)

43. Sledování hladiny angiogeninu, PDGF a MCP-1 u nemocných s renálním karcinomem 78
Lukešová Š., Kopecký O., Vroblová V., Andrýs C., Morávek P., Šafránek H. (Hradec Králové, Náchod)

44. Sledování hladin angiogeninu, EAN-78, GRO, IL-8 v séru nemocných s renálním karcinomem v průběhu léčby 81
Kopecký O., Lukešová Š., Vroblová V., Andrýs C., Morávek P., Podhola M., Vokurková D., Šafránek H. (Hradec Králové, Náchod)

45. Individual immunodominant CD8+ T cell clones monitoring in patients with metastatic melanoma ... 83
Michálek J., Fait V., Kocák I.,Vidláková P., Kovářová L., Žaloudík J., Hájek R., Vitetta E.S. (Brno, Dallas)

46. Snížení počtu kopií a změny exprese genu N-myc u chemorezistentních neuroblastomových linií..... 84
Procházka P., Hraběta J., Vícha A., Poljaková J., Eckschlager T. (Praha)

47. Komplexní sledování kardiotoxicity onkologické léčby 85
Horáček J.M., Jebavý L., Pudil R., Tichý M., Slováček L. (Hradec Králové)

48. Vliv paclitaxelu na změnu obsahu minerálů ve tkáních při současném příjmu $Mg2^{+}$..... 86
Wilhelm Z., Sedláčková M., Pechová A., Kleinová J. (Brno)

VI. Hodnocení efektu onkologické léčby

49. Kvantifikace přínosu časné diagnostiky a chirurgické léčby u preventabilních zhoubných nádorů v České republice 90
Žaloudík J., & SVOD NOR (Brno)

OBSAH

50. Analýza přežití v hodnocení výsledků onkologické péče: možnosti a limity 95
Dušek L., Pavlík T., Koptíková J., Mužík J., Gelnarová E., Vyzula R., Žaloudík J. (Brno)

51. Kvalita života onkologických nemocných: vybrané koncepční modely, možnosti hodnocení ... 101
Slováček L., Slováčková B., Jebavý L., Blažek M. (Hradec Králové)

52. Sexualita jako jeden z aspektů ošetřovatelské péče u nemocných s onkologickým onemocněním..... 103
Burkertová H. (České Budějovice)

53. Pohlavní život žen po léčbě maligních onemocnění malé pánve a prsu..... 104
Müllerová J., Neumanová R., Nováková R., Knéslová A., Beňová V., Farná K. (Brno)

VII. Dispenzární onkologická péče

54. Dispenzarizace osob s hereditárním rizikem malignit – Onkogenetická pracovní skupina ČOS a SLG..... 108
Foretová L., Eckschlager T., Hajdúch M., Kleibl Z., Křepelová A., Minárik M., Novotný J., Plevová P., Pohlreich P. (Brno, Olomouc, Ostrava)

55. Dispenzarizace pacientů s vícečetnými malignitami 108
Vítová V., Vítová H., Navrátilová M., Foretová L. (Brno)

56. Vícečetné malignity – jeden z důvodů trvalé dispenzarizace onkologicky nemocných 111
Novák J., Bednaříková M. (Brno)

57. Užití nádorových markerů ve follow-up po radikální operaci pro kolorektální karcinom 112
Levý M., Lipská L., Visokai V., Topolčan O., Kormunda S. (Praha, Plzeň)

58. Dispenzární model maligního melanomu na základě prognostických faktorů včetně stavu sentinelové uzliny 115
Fait V., Kocák I., Chrenko V., Krejčí E. (Brno)

59. Vybrané aspekty dispenzární péče pacientů s tumory varlat po kurativní terapii 116
Tomášek J., Kiss I., Řehák Z., Halámková J., Mechl M., Andrašina T. (Brno)

VIII. Podpůrná a ošetřovatelská péče

60. Užití G-CSF na základě doporučení EORTC z roku 2006 120
Richter I. (Liberec)

61. Možnosti ambulantního podávání kontinuálních infuzí cytostatik a analgetik..... 120
Mrkvičková P., Moravcová D. (Praha)

62. Monitorování žilních vstupů 121
Sýkorová Z., Kocourková J. (Brno)

63. Implantabilní infuzní pumpy v léčbě onkologické bolesti..... 122
Houdek M., Gabryš M. (Olomouc)

64. Naše zkušenosti s audity ošetřovatelské péče..... 122
Navrátilová D., Vorlíčková H., Kocourková J., Zálešáková P., Šebesta R. (Brno)

IX. Terminální péče

65. Tělesný diskomfort umírajících a možnosti jeho mírnění..... 124
Sláma O. (Brno)

66. Komfort při umírání „víme o čem mluvíme?“ 125
Drdová M., Čížkovská L., Petráková L. (Pleš)

67. Péče o pacienta v terminálním stavu..... 126
Lustyková E., Fukarová P. (Svitavy)

68. Důstojná smrt pouze pro vyvolené?..... 127
Macková J. (Šumperk)

69. Umírání – poslední týdny a dny 128
Ryšánková V., Polášková M. (Brno)

70. Jak hodnotit a jak mírnit psychický diskomfort umírajícího pacienta..... 128
Kabelka L., Sláma O., Prokop J. (Rajhrad)

71. Praktické tipy pro komunikaci s rodinou umírajícího 129
Mišoňová A. (Praha)

72. Komfort pri umieraní – hospicová starostlivosť..... 131
Prandlová S., Mišániová R. (Banská Bystrica)

73. Diskomfort umírajících a možnosti duchovní služby..... 135
Prokop J. (Praha)

74. Lze standardizovat postupy v péči o umírajícího pacienta?..... 136
Beránková B., Beděrková I., Vaňásek J. (Pardubice)

75. Spisovatel Jan Zábrana – z deníku onkologického pacienta 137
Holub N., Přikrylová M. (Brno)

X. Onkologická rizika

76. Potencionální riziko vzniku nádoru – radiační zátěž při diagnostickém ozařování v ČR..... 140
Válek V., Borek P. (Brno)

77. Riziko vzniku sekundárních malignit u pacientů léčených pro Hodgkinu nemoc 141
Petráková K., Vyskočil J., Komolíková L., Novák J., Vyzula R. (Brno)

78. Zhoubné nádory ledvin v souvislosti s životním stylem a pracovním prostředím 142
Navrátilová M., Vítová V., Vítová H., Marečková J., Babičová V., Boris P., Jarkovský J.,Pavlík I., Foretová L. (Brno)

79. Nespecifické záněty střevní jsou významnou a podceňovanou prekancerózou..... 143
Šerclová Z., Antoš F. (Praha)

OBSAH

80. Význam identifikace rizikových pacientů v oblasti výživy 143
Hrbková D., Hamrová M., Krčmová L., Hanušová M., Andrášková V., Zatloukalová H., Urbancová H., Anteková J., Tomíška M. (Brno)

81. Zhoubné nádory – součást metabolického syndromu 144
Patera J., Dvořák K., Patera J. jr. (Brno)

XI. Dětská onkologie

82. Poruchy imunity jako pozdní následky protinádorové léčby u dětí 148
Eckschlager T., Radvanská J., Hladíková M., Jašinská J., Moravcová L., Saudská A., Průša R., Radvanský J. (Praha)

83. Vliv chemoterapie na kognitivní funkce u dětí a dospívajících – srovnání výsledků po prvním roce od zahájení chemoterapie 149
Pavelková K., Vlčková I., Pilát M., Bajčiová V., Kepák T., Štěrba J., Dembická, D. (Brno)

84. Polymorfismus genu pro apolipoprotein E u dětských nádorových onemocnění. Výsledky u pacientů Kliniky dětské onkologie Brno 150
Kepák T., Mazánek P., Pilát M., Vlčková I., Kozák L., Jarkovský J. (Brno)

85. Kvalita života dětí s nádorovým onemocněním: vývojový přístup. Výsledky pilotní studie projektu QOLOP 151
Kepák T., Blatný M., Vlčková I., Pilát M., Mazánek P., Kárová Š., Jelínek M., Múdry P., Hrstková H., Štěrba J. (Brno)

86. Dlouhodobé trendy (1991-2006) diagnostiky a léčby akutní lymfoblastické leukemie u dětí z pohledu olomouckého hematoonkologického centra 152
Mihál V., Pospíšilová D., Novák Z., Stejskalová I., Jarošová M., Holzerová M., Radová L., Hajdúch M. (Olomouc)

87. Výsledky léčby dětí s de novo ALL na KDO FN Brno v letech 2001-2004, hodnocení léčebné odpovědi s minimálně dvouletým odstupem po ukončení léčby 153
Mendelová D., Růžičková P., Gregorová V., Mentzlová D., Hrušák O., Štěrba J. (Brno)

88. Časná odpověď na indukční léčbu jako nejvýznamnější prognostický faktor dětské akutní lymfoblastické leukemie 153
Mihál V., Pospíšilová D., Novák Z., Jarošová M., Holzerová M., Hajdúch M., prac. skup. pro dětskou hematologii ČR (Olomouc)

89. Akutní lymfoblastická leukemie u dívky s kompletní delecí SHOX genu 155
Mihál V., Zapletalová J. (Olomouc)

90. Sledování farmakodynamických ukazatelů terapie asparaginasou u dětí s akutní lymfoblastickou leukemií a s non-Hodgkinskými lymfomy 155
Růžičková P., Mendelová D., Valík D., Mikušková A., Štěrba J. (Brno)

91. Výsledky léčby dospívajících a mladých dospělých s nehodgkinskými lymfomy na Klinice dětské hematologie a onkologie v Praze 156
Kabíčková E., Sumerauer D., Drahokoupilová E., Gajdoš P., Čumlivská E., Kodetová D., Kalinová M., Kodet R., Starý J. (Praha)

92. Burkittův lymfom 158
Weinreb M. (Brno)

93. Detekce prognosticky významných cytogenetických markerů u meduloblastomu s využitím metod CGH a I-FISH 158
Nečesalová E., Zitterbart K., Žežulková D., Filková H., Pavlík T., Zavřelová I., Lentvorská L., Vranová V., Slámová I., Pavelka Z., Štěrba J., Kuglík P., Veselská R. (Brno)

94. Exprese izoforem proteinu p73 u meduloblastomu a její prognostický význam 161
Zitterbart K., Zavřelová I., Kadlecová J., Pavlík T., Kratochvílová A., Spěšná R., Štěrba J. (Brno)

95. Komplexní terapie meduloblastomu u dětí a dospívajících – naše zkušenosti 164
Perníková I., Cháňová M., Tichý M., Holub M., Zámečník J. (Praha)

96. Léčba dětí s neuroblastomem na Klinice dětské onkologie v letech 1998 – 2007 164
Mazánek P., Štěrba J., Bajčiová V., Kuglík P., Múdry P. (Brno)

97. Výsledky léčby nádorů mozku mladistvých protokoly CCG A 9961 a SJMB 3/97 na klinice Dětské hematologie a onkologie v Praze 165
Cháňová M., Kabíčková E., Perníková I., Tichý M., Malinová B., Gajdoš P., Starý J. (Praha)

98. Výsledky léčby gliomů nízkého stupně malignity u dětí na KDO FN Brno 166
Pavelka Z., Zitterbart K., Pavlík T., Šlampa P., Ventruba J., Brichtová E., Paleček T., Jakubec J., Houdek M., Křen L., Skotáková J., Ošlejšková H., Turbová T., Štěrba J. (Brno, Ostrava, Hradec Králové, Olomouc)

99. Molekulární diagnostika Rb1 genu u dětí s retinoblastomem: od DNA k RNA diagnostice 167
Kepák T., Kratochvílová A., Valášková I., Zajíčková V., Autrata R., Gaillyová R., Štěrba J. (Brno)

100. Vliv onkologické léčby na endokrinní systém u dětí s nádory v oblasti hlavy a mozku 168
Magnová O., Hřivňacká J., Zitterbart K. (Brno)

101. Nádorová onemocnění čelistí u dětí 169
Machálka M., Bronišová D., Pavlovský Z. (Brno)

102. Nasofaryngeální karcinom u dospívajících – zkušenosti s léčbou na Klinice dětské hematologie a onkologie FN Motol, Praha 170
Nekolná M., Drahokoupilová E., Starý J. (Praha)

103. Sarkomy měkkých tkání u adolescentů 171
Bajčiová V., Múdry P., Oltová A., Štěrba J. (Brno)

104. Terapie osteosarkomu a Ewingova sarkomu u dospívajících a mladých dospělých 173
Mottl H., Kruseová J., Starý J., Mráček J., Kodet R., Schovanec J., Šmelhaus V. (Praha)

OBSAH

105. Léčba relapsů a progredujících maligních mezenchymálních nádorů a Ewingova sarkomu dospívajících 173
Drahokoupilová E., Kabíčková E., Starý J. (Praha)

106. Molekulární charakteristika tří dětských feochromocytomů 174
Vicha A., Sumerauer D., Procházka P., Stejskalová E., Jarosová M., Holzerová M., Puchmajerová A., Křepelová A., Krutílková V., Hraběta J., Figová K., Eckschlager T. (Olomouc)

107. Adultný nádor obličky u 16 ročnej pacientky – kazuistika..... 176
Puškáčová J., Džatková M., Polák V., Wassermann O., Siman J., Breza J., Haviar D., Skubák M., Kaldarárová M., Makaiová I., Kováčová S., Belan S., Plank L., Hes O., Arpášová M., Mardiak J., Šefránek V. (Bratislava, Martin, Plzeň)

XII. Hematoonkologie

108. Využití DNA microarrays v diagnostice lymfocytárních leukemií..... 180
Pospíšilová Š., Tichý B., Kotašková J., Mendelová D., Štěrba J., Mayer J. (Brno)

109. Mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK) v modelu diferenciace leukemických buněk HL-60 180
Procházková J., Hofmanová J., Netíková J., Souček K., Kozubík A. (Brno)

110. Srovnání metod CD34+ and Lin- selekce buněk ze štěpu periferních kmenových buněk pacientů s lymfomy a vyhodnocení jejich ex vivo diferenciace pomocí cDNA microarrays 182
Klabusay M., Hrabčáková V., Koutná I., Krontorád P., Svoboda Z., Kozubek M, Mayer J. (Brno)

111. Sledování exprese genu pro cyklin D1 v korelaci s proliferační aktivitou u pacientů s lymfomem z buněk pláště 184
Břízová H., Mrhalová M., Kodet R. (Praha)

112. Angiogeneze u chronické lymfocytární leukemie 185
Smolej L., Andrýs C., Benešová P., Hrudková M., Krejsek J., Malý J. (Hradec Králové)

113. Plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and soluble endoglin (sCD105) in patients with chronic myeloid leukemia: impact of treatment with imatinib mesylate 185
Smolej L., Voglová J., Andrýs C. (Hradec Králové)

114. Hodnocení aktivátorů a inhibitorů angiogeneze u pacientů s mnohočetným myelomem v průběhu choroby 186
Pour L., Penka M., Adam Z., Kovářová L., Kyjovská D., Vidláková P., Michálek J., Vorlíček J., Hájek R. (Brno)

115. Vakcinace pacientů s mnohočetným myelomem dendritickými buňkami loadovanými monoklonálním imunoglobulinem: preklinické a první klinické výsledky klinické studie fáze II. 187
Očadlíková D., Zahradová L., Kovářová L., Smejkalová J., Vidláková P., Kyjovská D., Novotná H., Jelínková I., Penka M., Michálek J., Hájek R. (Brno)

116. Sexualita a transplantace krvetvorných buněk: soudobé poznatky z vybraných zahraničních studií 187
Slováček L., Slováčková B., Jebavý L., Horáček J. M. (Hradec Králové)

XIII. Radiologická a klinická diagnostika nádorů prsu

117. Screening nádorů prsů v České republice. Role zdravotních sester ve výchově veřejnosti k prevenci 192
Skovajsová M., Svobodník A. (Praha, Brno)

118. Mamografický screening..... 194
Fráňová J., Högerová M. (Brno)

119. Audit mamografického screeningu 195
Pokorná Š. (Praha)

120. Diagnostika včasných stádií karcinomu mléčné žlázy ve FN Brno z období září 2002 – prosinec 2006.... 196
Dvořák K., Marečková R., Kuzárová M., Pačovský Z., Jandáková R., Neumanová R. (Brno)

121. Detailní lokalizace nádoru v prsu jako kvalifikovaný základ spolupráce radiologa, chirurga, chemoterapeuta a patologa..... 199
Skovajsová M. (Praha)

122. Postupy detekce nehmatných lézí prsu 201
Retková L., Vrabcová A., Hoferka P., Sečkařová D. (Praha)

123. Úloha magnetické rezonance v diagnostice mikrokalcifikací prsní žlázy dle BI-RADS 4 a 5 202
Houserková D., Švach I., Kučerová L., Dušková M., Bučil J., Šišola I., Zlámalová N., Švébišová H. (Olomouc)

124. Využití MRI v časné diagnostice ca prsu – kazuistiky..... 203
Nechvátal, Červinka, Šťastný, Havlíček, Jiříčková (Pardubice)

125. Dispenzarizace benigních lézí prsu..... 204
Macková D., Palácová M., Schneiderová M. (Brno)

XIV. Laboratorní diagnostika nádorů prsu

126. Klinický pohled na molekulární taxonomii karcinomu prsu 208
Svoboda M., Grell P., Fabián P., Palácová M., Foretová L., Hrstka R., Petráková K., Nenutil R., Hajdúch M., Vyzula R. (Brno, Olomouc)

127. Endoteliální dysfunkce u karcinomu prsu..... 209
Tesařová P., Barkmanová J., Pazdrová G., Dlouhá Z., Mestek O., Soukupová J., Kalousová M., Zima T., Petruželka L. (Praha)

128. Nestin pozitivní progenitorové buňky v karcinomech prsu: korelace s expresí ER, PR a c-erbB-2 211
Kolář Z., Turashvili G., Ehrmann J. jr., Škarda J., Chmelová J., Mokrý J. (Olomouc, Ostrava, Hradec Králové)

129. Tpl2/Cot jako nový prognostický a prediktivní znak u karcinomů mléčné žlázy?..... 211
Krčová Z., Ehrmann J., Eliopoulos A., Turashvili G., Klein J., Škarda J., Fridman E., Krejčí V., Zapletalová J., Kolář Z. (Olomouc, Řecko, Izrael)

OBSAH

130. Význam nových proteinů asociovaných s extracelulární matrix u invazivních karcinomů prsu 212
Bouchal J., Turashvili G., Baumforth K., Wei W., Dziechciarková M., Škarda J., Ehrmann J., Hajdúch M., Kolář Z. (Olomouc)

131. Amplifikace Her-2/neu a/nebo cyklinu D1, případně negativita progesteronového receptoru, definují pacientky s vysokým rizikem relapsu mammárního karcinomu při adjuvantní léčbě tamoxifenem 213
Petráková K., Vyskočil J., Palácová M., Fabian P., Knoflíčková D., Hanzelková Z., Nenutil R. (Brno)

132. Intratumorální T lymfocyty u karcinomu prsu léčeného neoadjuvantní chemoterapií 213
Hornychová H., Melichar B., Tomšová M., Ryška A. (Hradec Králové)

XV. Léčba karcinomu prsu

133. Chirurgická terapie multifokálního a multicentrického karcinomu prsu 218
Julínek S., Winkler L., Sečkařová D. (Praha)

134. Stanovení cílových objemů pro ozařování axilární oblast u karcinomu prsu 218
Dolečková M., Haloun K., Chromý M., Kutová J., Kučera P., Studynková A., Malecha P. (České Budějovice)

135. Bio-hormonoterapie jako nová možnost pro zvýšení účinnosti hormonální léčby karcinomu prsu 221
Petruželka L., Konopásek B., Přibylová O., Tesařová P. (Praha)

136. Adjuvantní trastuzumab po roce – snášelivost, kvalita života, náklady 222
Tesařová P., Barkmanová J., Tomancová V., Konopásek B., Novotný J., Přibylová O.,Petruželka L. (Praha)

137. Srovnání efektivity a toxicity I. a II. linie léčby metastatického karcinomu prsu orální chemoterapií vinorelbin + kapecitabin 223
Fínek J., Holubec L. jr., Šefrhansová L., Svoboda T., Salvét J., Šedivá M., Filip S., Koževnikovová R. (Plzeň, Hradec Králové, Praha)

138. Terapie metastického karcinomu prsu fulvestrantem 224
Ostřížková L., Pospíšková M., Kohoutek M. (Zlín)

139. Sledování pacientek po léčbě pro karcinom prsu... 224
Petráková K., Palácová M. (Brno)

XVI. Kolorektální karcinom

140. The early detection of anal dysplasia and anal cancer by screening cytology..... 228
Karaitianos I. G., Archondakis S. K., Maragoudakis E. (Greece)

141. Význam 3D endosonografie při stagingu tumorů rekta 228
Zbořil P., Neoral Č., Vysloužil K., Starý L., Klementa I. (Olomouc)

142. UZ v diagnostice ložiskových procesů jater – CEUS 229
Válek V., Bohatá Š., Mechl M. (Brno)

143. Peroperační laparoskopická ultrasonografie jater – standardní součást stagingu kolorektálního karcinomu..... 230
Bartoš J., Škrovina M., Čech B., Czudek S., Adamčík L., Velkoborský M., Soumarová R. (Nový Jičín)

144. The malignant polyp – when to operate and where to watch?..... 231
Pfeifer J. (Austria)

145. Lokální terapie karcinomu rekta..... 232
Starý L., Vysloužil K., Klementa I., Zbořil P., Neoral Č. (Olomouc)

146. Long term results of local excision alone in patients with early rectal cancer 232
Federico M. (Italy)

147. Surgery of rectal cancer after neoadjuant radiochemotherapy 233
Hoch J., Škapa P., Jech Z., Umlaufová D., Prausová J. (Praha)

148. The use of radiotherapy in early rectal cancer 234
Pählman L. (Sweden)

149. Avastin v první linii kolorektálního karcinomu a bezpečnost léčby v podmínkách široké české onkologické praxe..... 235
Šafanda M., Abrahámová J., Bartoš J., Cwiertka K., Fínek J., Kiss I., Kůta M., Melichar B., Petruželka L., Prausová J., Soumarová R., Spurný V., Stáhalová V., Šiffnerová H., Vodvářka P., Vyzula R. (Praha, Liberec, Olomouc, Plzeň, Brno, Chomutov, Hradec Králové, Nový Jičín, České Budějovice, Ostrava)

150. The role of radiotherapy in rectal cancer treatment in 2007 235
Pählman L. (Sweden)

151. Bevacizumab, irinotekan a kapecitabin – léčebná odpověď, čas do progrese a jednoleté přežití u pacientů s nepředléčeným metastatickým kolorektálním karcinomem, retrospektivní analýza 240
Kocáková I., Kocák I., Špelda S., Holánek M., Poprach A., Vyzula R. (Brno)

152. Cetuximab a irinotekan v léčbě metastazujícího chemorezistentního kolorektálního karcinomu, zkušenosti z MOÚ..... 243
Kocáková I., Kocák I., Nenutil R., Špelda S., Garajová I., Vyzula R. (Brno)

153. Vztah mezi výskytem nežádoucích účinků bevacizumabu v kombinaci s chemoterapií a komorbiditou u pacientů s karcinomem kolorekta 245
Bustová I., Šiffnerová H., Bělehradová M. (České Budějovice)

154. Dispenzarizace po komplexní léčbě kolorektálního karcinomu 246
Cwiertka K., Vysloužil K., Klementa I., Kapustová M., Šrámek V., Skalický P., Starý L., Beneš P., Krejčí E. (Olomouc)

155. Včasná detekce recidivy kolorektálního karcinomu – využití nádorových markerů a pozitronové emisní tomografie 248
Lipská L., Visokai V., Štrupová L., Levý M. (Praha)

OBSAH

156. Lze podstatně ovlivnit tvorbu maligního ascitu?..... 251
Antoš F., Šerclová Z., Marvan J., Vitek P., Skála M. (Praha)

157. Dočasný uzávěr odtoku krve z jater zvyšuje efektivitu radiofrekvenční ablace. Experimentální studie 252
Šubrt Z., Ferko A., Ryska M., Hoffmann P., Tyčová V. (Brno, Hradec Králové, Praha)

XVII. Karcinom pankreatu

158. Přínos PET-CT v předoperační diagnostice karcinomu pankreatu 254
Havlík R., Loveček M., Buriánková E., Klos D., Neoral Č. (Olomouc)

159. Zpřesnění diagnostiky karcinomu pankreatu na základě detekce bodových mutací genů k-ras, p16 a p53 a alelických delecí 9p a 18q 254
Šálek C., Fantová L., Benešová L., Zavoral M., Minárik M. (Praha)

160. Resekce pro časný karcinom hlavy pankreatu 255
Ryska M., Bělina F., Strnad R:, Zavoral M. (Praha)

161. Možnosti laparoskopie v léčbě malignit pankreatu..... 257
Loveček M., Havlík R., Klos D., Neoral Č. (Olomouc)

162. Je indikována resekce horní mezenterické a portální žíly u karcinomu hlavy pankreatu? 258
Gürlich R., Oliverius M., Lipár S., Špičák J., Novotný J., Štirand P. (Praha)

XVIII. Bronchogenní karcinom

163. Léčba karcinomu plic 260
Skřičková J. (Brno)

164. Chirurgie a radioterapie u bronchogenního karcinomu..... 263
Čapov I., Jedlička V., Peštál A., Doležel J., Veselý M. (Brno)

165. Fluidothorax po resekci plic pro nádor 264
Mitáš L., Vomela J., Hanke I., Ivičič J., Horváth T. (Brno)

166. Postavení radioterapie v léčbě nemalobuněčného bronchogenního karcinomu 266
Malinová B., Stankušová H., Pajdlhauser R. (Praha)

167. Radioterapie nemalobuněčného bronchogenního karcinomu – léčebné postupy v MOÚ..... 268
Čoupek P., Šlampa P., Čoupková I., Komínek L., Pospíšil P. (Brno)

168. Paliativní radioterapie bronchogenního karcinomu..... 268
Macháňová M. (Liberec)

169. Cesty ke zlepšení výsledků radioterapie u nemalobuněčného karcinomu plic 270
Feltl D. (Ostrava)

170. Porovnání dozimetrické a biologické predikce akutní toxicity při léčbě lokálně pokročilého NSCLC chemoradioterapií s eskalací dávky záření 272
Stejskal J., Dvořáková D., Vaňásek J., Ulrych V., Kudelka K., Kheck M., Svoboda V. (Pardubice, Jihlava, Hradec Králové)

171. Reiradiace lokoregionálních recidiv bronchogenního karcinomu 275
Cwiertka K., Kolek V., Zatloukal J., Čecháček M., Václavík A., Přidal I. (Olomouc)

172. Prognostické faktory ovlivňující přežití při chemoradioterapii inoperabilního nemalobuněčného karcinomu plic..... 277
Zemanová M., Petruželka L., Zatloukal P., Judas L., Marel M., Tomancová V. (Praha)

173. Mají nádorové markery prognostický význam u nemocných radikálně operovaných pro nemalobuněčný plicní karcinom?..... 279
Šafránek J., Holubec L., Topolčan O., Klečka J., Špindlen V., Vodička J., Šimánek V., Fínek J., Časová M., Pešek M. (Plzeň)

XIX. Nádory hlavy a krku

174. Karcinom rtu 282
Peřina V., Liberda O., Machálka M., Bulik O. (Brno)

175. Záchovný protokol u karcinomů laryngu a hypofaryngu – výzva pro cílenou biologickou terapii 282
Neuwirthová J., Mechl Z. (Brno)

176. Intersticiální brachyterapie nádorů hlavy a krku 283
Nováková R., Neumanová R., Knéslová A., Müllerová A., Farná K., Beňová V. (Brno)

177. Radioterapie v oblasti CNS a krku – vedlejší účinky 284
Bobková L. (Liberec)

178. Verifikace ozáření při radioterapii CNS – hlavy a krku..... 284
Drozenová M., Bobková L. (Liberec)

179. Nežádoucí účinky radioterapie hlavy a krku 284
Linhartová H., Opluštilová P. (Praha)

180. Množství, aktivita a genetický polymorfizmus Pro197Leu glutation peroxidázy u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku – předběžné výsledky..... 287
Salzman R., Pácal L., Kaňková K., Tomandl J., Horáková Z., Kostřica R. (Brno)

181. Analýza obsahu metalothioneinu v tumoru a zdravé tkáni pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku..... 288
Tóthová E., Horáková Z., Salzman R., Binková H., Slabotínská D., Wágnerová D., Adam V., Kizek R. (Brno)

XX. Nádory centrálního nervového systému

182. Možnosti neuroendoskopie v léčbě tumorů oblasti III. mozkové komory 290
Novák Z., Chrastina J., Feitová V., Jančálek R., Lžičařová E., Říha I. (Brno)

183. Low grade gliómy – indikácie a úskalia rádioterapie 293
Bolješíková E., Chorváth M., Belan V., Ondrušová M. (Bratislava)

OBSAH

184. Ozáření kránia pro metastázy do mozku při karcinomu plic – zhodnocení přežití 293
Hlávka A., Vaňásek J., Ulrych V., Klimešová M. (Pardubice)

185. Autokrinný a parakrinný mechanizmus účinku VEGF u astrogliálnych nádorov 294
Knížetová P., Hlobilková A., Ehrmann J., Krejčí V., Kolář Z. (Olomouc)

XXI. Sarkomy

186. Léčba skupiny extraoseálních nádorů Ewingova sarkomu a PNET (periferní neuroektodermový tumor) dle protokolu EURO-E.W.I.N.G 99 u dospělých nemocných 298
Kubáčková K., Prausová J., Linke Z., Malinová B., Pipková R., Bělohlávek M., Kodet R., Campr V., Kozák T. (Praha)

187. Imatinib mesylate a sunitinib malate – efektivní bioterapie GIST 298
Kocáková I., Kocák I., Špelda S., Opletal P., Vyzula R. (Brno)

188. Maligní schwannom retroperitonea 301
Louda M., Pacovský J., Holub L., Broďák M., Baker K. (Hradec Králové)

XXII. Nádory ledvin

189. Indikace radikální nefrektomie pro adenokarcinom ledviny klinických stadií III. a IV. 304
Pernička J. (Olomouc)

190. Radiologie v paliativní léčbě tumorů ledvin..... 304
Válek V., Boudný J., Kiss I., Kala Z., Čermák A. (Brno)

191. Biologická léčba renálního karcinomu..... 305
Kocák I., Kocáková I., Lakomý R., Špelda S., Horová R. (Brno)

192. Efekt sorafenibu v druhé linii biologické léčby u metastazujícícho světlobuněčného karcinomu ledviny – kasuistika 306
Matějů M., Zemanová M., Vondráčková M. (Praha)

193. Primitivní neuroektodermální tumor ledviny..... 308
Ürge T., Hora M., Eret V., Hes O., Votavová M., Bulka J. (Plzeň)

XXIII. Nádory močového měchýře

194. Trendy výskytu mortality nádorov močového mechúra v SR a vývoj ich histologických klasifikačných systémov..... 310
Ondruš D., Ondrušová M., Galbavý Š., Horňák M. (Bratislava)

195. Faktory ovlivňující vznik karcinomu močového měchýře..... 312
Katolická J., Rovný A., Filipenský P. (Brno)

196. Význam stanovení hladiny survivinu v moči pro neinvazivní diagnostiku tumorů močového měchýře..... 313
Pešl M., Babjuk M., Soukup V., Houšková L., Dušková J., Dvořáček J. (Praha)

197. Prognostický význam exprese fascinu A T1 subtypizace u T1 nádorů močového měchýře 315
Soukup V., Babjuk B., Dušková J., Pešl M., Szakázcová M., Dvořáček J. (Praha)

198. Povrchové nádory močového měchýře (PNMM). Současné názory na diagnostiku léčbu i sledování (overview)..... 316
Hanuš M. (Praha)

199. Lokální chemoprofylaxe a imunoprofylaxe u nádorů povrchových nádorů močového měchýře 316
Matoušková M., Hanuš M. (Praha)

200. Epirubicin – druhá linie chemoprofylaxe u HR povrchových nádorů močového měchýře 317
Matoušková M., Hanuš M. (Praha)

201. Radikální cystektomie v léčbě nádorů močového měchýře..... 317
Babjuk M., Hanuš T., Šafařík L., Pavlík I., Dvořáček J. (Praha)

202. Jaká je nezbytnost a rozsah lymfadenektomie u cystektomie pro karcinom močového měchýře?..... 318
Čapák I., Doležel J., Miklánek D., Macík D. (Brno)

203. Derivace moči po cystektomii: soubor sledovaných pacientů 320
Doležel J., Miklánek D., Čapák I., Macík D., Sutorý M., Navrátil P. (Brno, Hradec Králové)

204. Vyhodnocení radikálních cystektomií na Urologické klinice LF UP a FN Olomouc 321
Lamla A., Fiala R., Študent V., Hrabec M., Vidlář A. (Olomouc)

205. Radioterapie nádorů močového měchýře 321
Čoupková I., Šlampa P., Čoupek P., Princ D., Gombošová J. (Brno)

206. Adjuvantní nebo neoadjuvantní chemoterapie u invazivních nádorů močového měchýře? 323
Katolická J., Rovný A., Filipenský P. (Brno)

XXIV. Nádory prostaty

207. Je PSA nad šedou zónou indikací k opakovaným biopsiím?..... 326
Hanuš M., Matoušková M., Dudková V. (Praha)

208. Existuje rozdíl v Gleasonově skóre získaným z jehlové biopsie a definitivním preparátu získaným z radikální prostatektomie?..... 326
Študent V., Soukeníková D., Král M., Hrabec M., Grepl M., Vidlák A., Pernička J. (Olomouc)

209. Časné odhalení rizika karcinomu prostaty na základě vyšetření polymorfismů a specifických haplotypů v genu pro steroidní 5-alfa-reduktázu (SRD5A2)..... 327
Minárik M., Fantová L., Heráček J., Urban M., Loukola A., Sachová J., Benešová L. (Praha, Helsinky)

210. Účinek působení inhibitorů histonových deacetyláz, NaB a TSA u na androgenech závislých a nezávislých prostatických nádorových linií..... 327
Trtková K., Bouchal J., Kolář Z. (Olomouc)

211. Výsledky a závěry vyhledávací studie karcinomu prostaty 1999-2004 u 5744 mužů. Výsledky spolupráce s praktickými lékaři. 328
Hanuš M., Matoušková M. (Praha)

OBSAH

212. Včasný záchyt karcinomu prostaty (KAPROS II.) v Olomouckém regionu – první výsledky 329
Študent V., Grepl M., Král M., Hrabec M., Vidlář A., Pernička J. (Olomouc)

213. Korelují vlastní klinické zkušenosti s léčbou lokálně pokročilého karcinomu prostaty s výsledky studie Early Prostate Cancer?..... 329
Pacík D., Vít V., Šlampa P. (Brno)

XXV. Pozitronová emisní tomografie v diagnostice nádorů

214. Nová radiofarmaka pro pozitronovou emisní tomografii a jejich zavedení do praxe..... 334
Bolčák K., Staníček J. (Brno)

215. Přínos PET CT k algoritmu léčby karcinomu jícnu ... 336
Vrba R., Neoral Č., Aujeský R., Cincibuch J. (Olomouc)

216. Význam 18-FDG PET v diagnostice a sledování efektu terapie u pacientů s hepatocelulárním karcinomem 336
Bencsiková B., Nižňanská V. (Brno)

217. Význam 18F-FDG PET/CT v diferenciální diagnostice tumorózně zvětšených nadledvin u onkologických pacientů 337
Nižňanská V., Řehák Z., Bolčák K., Staníček J., Stupalová J. (Brno)

218. PET v diagnostice rakoviny děložního čípku 338
Mojžišová J., Havířová H., Bolčák K. (Brno)

219. Reziduální retroperitoneální infiltrát u nemocných s germinativním tumorem varlat – lze určit jeho viabilitu pomocí 18F-FDG PET? 338
Řehák Z., Kocák I., Fabián P., Penka I., Pacal M., Čapák I., Lakomý R., Bolčák K., Nižňanská V., Staníček J., Stupalová J., Bartl J., Tomášek J. (Brno)

XXVI. Onkopatologie

220. Úloha banky biologického materiálu v onkologii. Změna archivace vzorků v Masarykově onkologickém ústavu 342
Knoflíčková D., Šimíčková M., Šmerdová T., Nenutil R., Žaloudík J. (Brno)

221. Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz..... 343
Dziechciarková M., Berkovcová J., Trojanec R., Srovnal P., Bouchalová K., Hajdúch M. (Olomouc)

222. Chromogranin A pro tumory měkkých tkání? 343
Kapustová M., Vočková J., Schneiderka P., Beneš P., Cwiertka K. (Olomouc)

XXVII. Nádorová imunologie

223. NK-T cells are expanded in cancer patients 346
Dubská L., Frgala T., Valík D. (Brno)

224. Souběžná kvantifikace 10 Th1/Th2 cytokinů pomocí průtokové cytometrie: onkologický náhled a technická zpráva..... 346
Dubská L., Bačíková L., Valík D. (Brno)

225. Regulační T-lymfocyty u pacientů s kolorektálním karcinomem a maligním melanomem: nová strategie detekce..... 347
Dubská L., Pospíšilová E., Valík D. (Brno)

XXVIII. Genomika a proteomika

226. Cytogenetické aberace u primárních nádorů centrálního nervového systému a jejich význam pro další diagnostickoléčebnou rozvahu 350
Trojanec R., Kalita O., Ehrmann J., Braunerová B., Kolář Z., Mlčochová S., Hajdúch M. (Olomouc)

227. Rozsáhlé intragenové přestavby v genech BRCA1 a CHEK2 způsobující genetickou predispozici ke vzniku nádoru prsu v České republice 350
Macháčková E., Vašíčková P., Lukešová M., Navrátilová M., Pavlů H., Kosinová V., Kuklová J., Foretová L. (Brno)

228. „CELL ARRAYS“ – Velkoobjemový screening proteinů v buněčných liniích karcinomu prsu 352
Hublarová P., Knoflíčková D., Fabian P., Babčanová S., Baturko Y., Nenutil R., Vojtěšek B. (Brno)

229. Analýza teplotně závislých mutantů p53 v kvasinkových a lidských buňkách..... 353
Vaňková J., Grochová D., Šmardová J. (Brno)

230. DNA analýza buněk uroteliálního nádoru..... 355
Louda M., Vokurková D., Loudová M., Pacovský J., Holub L., Broďák M., Baker K. (Hradec Králové)

231. Jednoduché posouzení hladiny transkriptomu za využití elektrochemické detekce 355
Húska D., Křížková S., Adam V., Trnková L., Masařík M., Kizek R. (Brno)

232. Zapojení vybraných mikroRNA do patogeneze kolorektálního karcinomu a jejich korelace s klinickopatologickými charakteristikami 358
Slabý O., Svoboda M., Garajová I., Vyzula R. (Brno)

233. Příprava biologického materiálu pro metodu SELDI TOF MS 360
Pilný R., Michalová E., Brožková K., Greplová K., Vojtěšek B., Valík D. (Brno)

234. Sledování strukturní změny proteinů pomocí jednoduché elektrochemické detekce..... 361
Zítka O., Horna A., Adam V., Kizek R. (Brno, Pardubice)

235. Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE), technika pro studium proteomu mnohočetného myelomu 363
Zelená J., Konečná H., Zdráhal Z., Šedo O., Moravcová J., Rycová M., Kyjovská D., Hájek R. (Brno)

236. Vybrané analytické metody pro studium peptidů a proteinů 364
Adam V., Křížková S., Fabrik I., Šobrová P., Stejskal K., Trnková L., Kizek R. (Brno)

OBSAH

XXIX. Signální mechanismy v patofyziologii nádorů

237. Indukce buněčné smrti a změn adhezívních vlastností u neadherentně kultivovaných epiteliálních buněčných linií 368
Kočí L., Hýžďalová M., Hofmanová J., Kozubík A. (Brno)

238. Úloha transkripčního faktoru NF-B v mechanismu interakce TNF-α a butyrátu u epiteliálních buněk tlustého střeva 369
Hýžďalová M., Hofmanová J., Kozubík A. (Brno)

239. Lidský nádorový supresor p53 zastavuje růst a indukuje diferenciaci ptačích monoblastů 371
Navrátilová J., Horváth V., Kozubík A., Šmarda J. (Brno)

240. Úloha MAPK v regulaci exprese Mcl-1 a indukované monocytární diferenciace u lidských leukemických buněk HL-60 373
Stixová L., Procházková J., Souček K., Hofmanová J., Kozubík A. (Brno)

241. Poruchy v intracelulární transdukci interferonových signálů u stabilizovaných linií maligního melanomu a karcinomu mléčné žlázy 373
Součková K., Boudný V., Adámková L., Lauerová L., Hošková A., Poláková H., Sekaninová R., Kovařík J. (Brno)

242. Sledování exprese STAT 1 a STAT 3 u kožních maligních melanomů 375
Brychtová S., Fiurášková M., Hlobilková A., Tichý M. jr., Beneš P., Zapletalová J. (Olomouc)

243. Hladiny proteinů STAT 1 a SOCS 3 po indukci interferony v buňkách maligního melanomu 376
Adámková L., Boudný V., Součková K., Lauerová L., Sekaninová R., Hošková A., Poláková H., Kovařík J. (Brno)

XXX. Experimentální onkoterapie

244. Využití buněk vybraných typů nádorů při vývoji protinádorových imunoterapeutických přípravků v autologních a alogenních podmínkách 380
Hanák L., Lauerová L., Matějková E., Smejkalová J., Vidláková P., Kyjovská D., Stejskalová A., Němečková I., Hošková A., Sekaninová R., Nenutil R., Křen L., Kocák I., Fait V., Oltová A., Žaloudík J., Hájek R., Michálek J. (Brno)

245. První klinické zkušenosti s polymerními cytostatiky s imunoprotektivním a imunomodulačním efektem 382
Kubáčková K., Strohalm J., Prausová J., Jelínková M., Rozprimová L., Šírová M., Mrkvan T., Plocová D., Etrych T., Šubr V., Ulbrich K., Říhová B. (Praha)

246. Inhibice aktivity receptorů rodiny c-erbB trastuzumabem a cetuximabem 383
Überall I., Lukáš V., Bláha O., Bouchal J., Kolář Z. (Olomouc)

247. 4-Arylazo-3,5-diamino-1H pyrazolové CDK Inhibitory: analýza in vitro a in vivo protinádorové aktivity 383
Džubák P., Kryštof V., Cankař P., Fryšová I., Slouka J., Kontopidis G., Vydra D., Srovnal J., Azevedo W. F., Orság M., Paprskářová M., Rolčík J., Látr A., Fischer P., Strnad M., Hajdúch M. (Olomouc, U.K., Brazilie)

248. Efekt brassinosteroidů na buněčné línie odvozené od karcinomu mléčné žlázy a prostaty 384
Malíková J., Swaczynová J., Kolář Z., Strnad M. (Olomouc)

249. Reovírus ako protinádorový liek?..... 385
Figová K., Hraběta J., Sobotková E., Dušková M., Vonka V., Eckschlager T. (Praha)

XXXI. Varia

250. Biosenzory v nádorové diagnostice..... 388
Kizek R., Adam V., Křížková S., Fabrik I., Šobrová P., Stejskal K., Masařík M., Stiborová M. (Brno, Praha)

251. Význam sledování indukce cytochromu p450 flavonoidními sloučeninami 390
Hanuštiak P., Kratochvílová P., Mareš P., Adam V., Šupálková V., Beklová M., Zehnálek J., Zeman L., Hodek P., Stiborová M., Kizek R. (Brno, Praha)

252. Thioly a nádorová onemocnění, vidíme veškeré souvislosti?..... 392
Adam V., Křížková S., Fabrik I., Šobrová P., Stejskal K., Zítka O., Hraběta J., Eckschlager T., Kukačka J., Průša R., Horáková Z., Binková H., Horna A., Kizek R. (Brno, Praha, Pardubice)

253. Sledování interakce protinádorových léčiv s látkami obsahujícími thiolovou skupinu..... 395
Adam V., Zítka O., Húska D., Křížková S., Horna A., Beklová M., Trnková L., Kizek R. (Brno, Pardubice)

254. Studium obsahu metalothioneinu v buňkách zhoubných nádorů 399
Fabrik I., Húska D., Adam V., Binková H., Horáková Z., Thotová E., Salzman R., Eckschlager T., Kizek R. (Brno, Praha)

255. Hladina metalothioneinu v melanomech 401
Šobrová P., Adam V., Fabrik I., Křížková S., Kukačka J., Průša R., Strnádel J., Horák V., Kizek R. (Brno, Liběchov, Praha)

256. Elektroanalytické stanovení obsahu metalothioneinu v krvi u pacientů s karcinomy hlavy a krku 404
Horáková Z., Tóthová E., Salzman R., Binková H., Adam V., Fabrik I., Šmerdová P., Křičková J. (Brno)

257. Použití polyklonálních slepičích protilátek pro imunochemickou detekci metalothioneinu 406
Křížková S., Bláhová P., Šobrová P., Adam V., Hodek P., Stiborová M., Binková H., Kizek R. (Brno, Praha)

258. Obsah metalothioneinu v buňkách neuroblastomu ve vztahu k rezistenci vůči platinovým cytostatikům..... 409
Hraběta J., Figová K., Eckschlager T., Průša R., Baštík O., Křížková S., Adam V., Cinatl J., Michaelis M., Kizek R. (Praha, Brno, Frankfurt)

JMENNÝ REJSTŘÍK

A

Abrahámová J. 149
Adam V. 181, 231, 234, 236, 250-258
Adamčík L. 143
Adámková L. 241, 243
Andrašina T. 59
Andrášková V. 80
Andres P. 20, 22, 23
Andrýs C. 43, 44, 112, 113
Anteková J. 80
Antoš F. 79, 156
Antošová M. 32
Archondakis S. K. 140
Arpášová M. 107
Aschermannová A. 21
Aujeský R. 215
Autrata R. 99
Azevedo W. F. 247

B

Babčanová S. 228
Babičová V. 78
Babjuk B. 196
Babjuk M. 197, 201
Bačíková L. 224
Bajčiová V. 83, 96, 103
Baker K. 188, 230
Barkmanová J. 21, 127, 136
Bartl J. 219
Bartlová M. 6
Bartoš J. 143, 149
Baštík O. 258
Baturko Y. 228
Bártová E. 19
Baumforth K. 130
Bedĕrková I. 74
Bednaříková M. 38, 56
Beklová M. 251, 253
Belan S. 107
Belan V. 183
Bencsiková B. 216
Beneš P. 154, 222, 242
Benešová L. 39, 42, 159, 209
Benešová P. 112
Beňová V. 53, 176
Beránková B. 74
Berkovcová J. 27, 221
Bělehradová M. 153
Bělina F. 160
Bělohlávek M. 186
Binková H. 181, 252, 254, 256, 257
Bittenglová R. 39
Blatný M. 85
Blažek M. 51
Bláha O. 246
Bláhová P. 257
Bobková L. 177, 178
Bohatá Š. 142
Bolčák K. 214, 217, 218, 219
Bolješíková E. 183
Borek P. 76
Boris P. 78
Boudný J. 190,
Boudný V. 241, 243
Bouchal J. 130, 210, 246
Bouchalová K. 221
Brabec P. 18, 20, 23
Braunerová B. 226
Breza J. 107
Brichtová E. 98
Broďák M. 188, 230
Bronišová D. 101
Brožková K. 233
Brůha F. 39
Brychtová S. 242
Břízová H. 111
Bučil J. 123
Bulik O. 174
Bulka J. 193
Buriánková E. 158
Burkertová H. 52
Buřilová H. 26
Bustová I. 153

C

Campr V. 183
Cankař P. 247
Cinatl J. 258
Cincibuch J. 215
Cvečková J. 6
Cwiertka K. 27, 29, 33, 37, 41, 149, 154, 171, 222
Czudek S. 143

Č

Čapák I. 202, 203, 219
Čapov 164
Čásová M. 36
Čech B. 143
Čech Z. 34
Čecháček M. 171
Čermák A. 190
Červinka 124
Čížkovská L. 66
Čoupek P. 167, 205
Čoupková I. 168, 205
Čumlivská E. 91

D

Dembická D. 83
Demlová R. 19, 38
Dlouhá Z. 127
Dolečková M. 134
Doležel J. 164, 202, 203
Dostál O. 23
Drahokoupilová E. 92, 102, 150
Drdová M. 66
Drexlerová J. 2
Drozenová M. 178
Dubská L. 30, 223, 224, 225
Duda M. 13, 33, 37
Dudková V. 207
Dušek L. 18, 20, 23, 24, 50
Dušková J. 196, 197
Dušková M. 123, 249
Dvořáček J. 196, 197, 201
Dvořák K. 81, 120
Dvořáková D. 170
Dziechciarková M. 27, 130, 221
Džatková M. 107
Džubák P. 247

E

Eckschlager T. 46, 54, 82, 106, 249, 252, 254, 258
Ehrmann J. 129, 130, 185, 226
Ehrmann J. jr. 128
Eliopoulos A. 129
Eret V. 193
Etrych T. 245

F

Fabián P. 29, 126, 131, 219, 228
Fabrik I. 236, 250, 252, 254-256
Fait V. 45, 58, 244
Fantová L. 159, 209
Farná K. 53, 176
Federico M. 146
Feitová V. 182
Feltl D. 169
Ferko A. 157
Fiala R. 204
Figová K. 106, 249, 258

JMENNÝ REJSTŘÍK

Filip S. 137
Filipenský P. 195, 206
Filková H. 93
Fischer P. 247
Fišer J. 38
Fínek. J. 35, 36, 137, 149, 173
Fiurášková M. 242
Foretová L.54, 55, 78, 94, 126, 227
Fráňová J. 118
Frgala T. 223
Fridman E. 40, 129
Fryšová I. 247
Fukarová P. 67

G

Gabryš M. 63
Gaillyová R. 99
Gajdoš P. 91, 97
Gajová B. 5, 33, 37, 41
Galbavý Š. 194
Garajová I. 152, 232
Gelnarová E. 50
Gombošová J. 205
Gregorová V. 87
Grell P. 29, 129
Grepl M. 208, 212
Greplová K. 233
Grochová D. 229
Grygárková I. 41
Grygárková Y. 27
Gürlich R. 162

H

Haičmanová J. 19
Hajdúch M 27, 29, 33, 37, 40, 41, 42, 54, 86, 88, 126, 130, 221, 226, 247
Hájek R. 3, 45, 114, 115, 235, 244
Halámková J. 34, 59
Haloun K. 134
Hamrová M. 80
Hanák L. 244
Hanáková L. 34
Hanáková M. 19
Hanke I. 165
Hanuš M. 198, 199, 200, 207, 211
Hanuš T. 201
Hanušová M. 80
Hanuštiak P. 251
Hanzelková Z. 131
Haviar D. 107
Havířová H. 218
Havlíček 124
Havlík R. 158, 161
Heráček J. 209
Heřmanová J. 8, 16
Hes O. 107, 193
Hladíková M. 82
Hlávka A. 184
Hlobilková A. 185
Hodek P. 242
Hoferka P. 122
Hoffmann P. 157
Hofmanová J. 109, 237, 238, 240
Hofmanová Ž. 19
Hoch J. 147
Holánek M. 151
Holub L. 188, 230
Holub M. 95
Holub N. 75
Holubec L. 173
Holubec L. jr. 35, 36, 137
Holzerová M. 86, 88, 106
Hora M. 193
Horáček J.M. 47, 116
Horák V. 25
Horáková Z. 180, 181, 252, 254, 256
Horna A. 234, 252, 253
Horňák M. 194
Hornychová H. 132
Horová R. 19, 191
Horváth T. 165
Horváth V. 239
Hošková A. 241, 243, 244
Houdek M. 63, 98
Houserková D. 123
Houšková L. 196
Högerová M. 118
Hrabčáková V. 110
Hrabec M. 204, 208, 212
Hraběta J. 46, 106, 249, 252, 258
Hrbková D. 80
Hrstka R. 126
Hrstková H. 86
Hrudková M. 112
Hrušák O. 87
Hřivňacká J. 100
Hublarová P. 228
Húska D. 231, 253, 234
Hýžďalová M. 237, 238

Ch

Chalupová M. 5
Cháňová M. 95, 97
Chmelová J. 12
Chorváth M. 183
Chrastina J. 182
Chrenko V. 58
Chromý M. 134

I

Ivičič J. 165

J

Jakubec J. 98
Jančálek R. 182
Jandáková R. 120
Janošťáková A. 27
Jarkovský J. 78, 84
Jarošová M. 86, 88, 106
Jašinská J. 82
Javorník M. 25
Jebavý L. 47, 51, 116
Jedlička V. 164
Jech Z. 147
Jelínek M. 85
Jelínek P. 26
Jelínková I. 115
Jelínková M. 245
Jiříčková 124
Jiskra J. 32
Judas L. 172
Julínek S. 133
Jurga Ľ. 15

K

Kabelka L. 70
Kabíčková E. 91, 97, 105
Kadlecová J. 94
Kala Z. 190
Kaldarárová M. 107
Kalinová M. 91
Kalita O. 226
Kalousová M. 127
Kaňková K. 180
Kapustová M. 154, 222
Karaitianos I. G: 140
Kárová Š. 85
Katolická J. 195, 206
Kepák T. 83, 84, 85, 99
Kesselová M. 33, 37, 41
Kheck M. 170

JMENNÝ REJSTŘÍK

Kiss I. 27, 34, 59, 149, 190
Kizek R. 181, 231, 234, 236, 250-255, 257, 258
Klabusay M. 110
Klečka J. 173
Kleibl Z. 54
Klein J. 129
Kleinová J. 48
Klementa I. 141, 154, 154
Klimeš D. 20, 23
Klimešová M. 184
Klos D. 158, 161
Knéslová A. 53, 176
Knížetová P. 185
Knoflíčková D. 131, 220, 228
Kocák I. 45, 58, 151, 152, 187, 191, 219, 244
Kocáková I. 151, 152, 187, 191
Kocourková J. 9, 10, 62, 64
Kočí L. 237
Kodet R. 91, 104, 111, 186
Kodetová D. 91
Kohoutek M. 138
Kolář Z. 27, 40, 128, 129, 130, 185, 210, 226, 246, 248
Kolek V. 27, 40, 41, 171
Komínek J. 10, 20, 22
Komínek L. 167
Komolíková L. 77
Konečná H. 10, 235
Konopásek B 135, 136
Kontopidis G. 247
Kopecký O. 43, 44
Koptíková J. 23, 50
Kormunda S. 57
Kořínková G. 33, 37, 41
Kosinová V. 227
Kostřica R. 180
Kotašková J. 108
Koutná I. 110
Kováčová S. 107
Kovařík J. 241, 243
Kovářová L. 45, 114, 115
Kozák L. 84
Kozák T. 186
Kozubek M 110
Kozubík A. 109, 237, 238, 239, 240
Koževnikovová R. 137
Kratochvílová A. 94, 99
Kratochvílová P. 251
Krákorová G. 39
Král M. 208, 212
Krčmová L. 90
Krčová Z. 129
Krejčí E. 58, 154
Krejčí V. 129, 185
Krejsek J. 112
Kreml P. 4
Krontorád P. 110
Kruseová J. 104
Krutílková V. 160
Kryštof V. 247
Křen L. 98
Křepelová A. 244
Křičková J. 256
Křížková S. 231, 236, 250, 252, 253, 255, 257, 258
Křížková Z. 5
Kubáčková K. 186, 245
Kubásek M. 23
Kučera P. 134
Kučerová L. 123
Kudelka K. 170
Kuglík P. 93, 96
Kuilenburg A. 38
Kukačka J. 252, 255
Kuklová J. 227
Kunertová O. 7
Kutová J. 134
Kuzárová M. 120
Kůta M. 149
Kvasnicová Z. 17
Kyjovská D. 114, 115, 235, 244

L

Lakomý R. 191, 219
Lamla A. 204
Lauerová L. 241, 243, 244
Látr A. 247
Lentvorská L. 93
Levý M. 57, 155
Liberda O. 174
Linhartová H. 179
Linke Z. 186
Lipár S. 162
Lipská L. 57, 155
Liška V. 35, 36
Límanová Z. 32
Louda M. 188, 230
Loudová M. 230
Loukola A. 209
Loveček M. 158, 161
Lukáš V. 246
Lukešová M. 227
Lukešová Š. 43, 44
Lustyková E. 67
Lžičařová E. 182

M

Macík D. 202, 203
Macková D. 29, 125
Macková J. 68
Magnová O. 100
Macháček J. 11
Macháčková E. 227
Machálka M. 101
Macháňová M. 168, 174
Makaiová I. 107
Malecha P. 134
Malíková J. 248
Malinová B. 97, 166, 186
Malý J. 112
Maragoudakis E. 140
Mardiak J. 107
Marečková J. 78
Marečková R. 120
Marel M. 172
Mareš P. 251
Marvan J. 156
Masařík M. 231, 250
Matějková E. 244
Matějů M. 192
Matoušková M. 199, 200, 207, 211
Mayer J. 108, 110
Mazánek P. 84, 85, 96
Mechl M. 59, 142
Mechl Z. 175
Meijer J. 38
Melichar B. 31, 132, 149
Mendelová D. 87, 90, 108
Mentzlová D. 87
Mestek O. 127
Mihál V. 27, 86, 88, 89
Michaelis M. 258
Michálek J. 45, 114, 115, 244
Michalová E. 28, 233
Miklánek D. 202, 203
Mikušková A. 90
Minárik M. 27, 39, 42, 54, 159, 209
Mišániová R. 72
Mišoňová A. 71
Mitáš L 165
Mlčochová S. 27, 226

Mojžišová J. 218
Mokrý J. 128
Moravcová D. 61
Moravcová J. 235
Moravcová L. 82
Morávek P. 43, 44
Mottl H. 104
Moulis M. 34
Mráček J. 104
Mrhalová M. 111
Mrkvan T. 245
Mrkvičková P. 61
Mužík J. 50
Múdry P. 85, 96, 103
Müllerová A. 176
Müllerová J. 53

N

Navrátil P. 203
Navrátilová D. 64
Navrátilová J. 239
Navrátilová M. 55, 78, 227
Nečesalová E. 93
Nechvátal 124
Nekolná M. 102
Nekulová M. 30
Nenutil R. 28, 29, 126, 131, 152, 220, 228, 244
Neoral Č. 141, 145, 158, 161, 215
Netíková J. 109
Neumanová R. 53, 120, 176
Neuwirthová J. 175
Němečková I. 28, 244
Nižňanská V. 216, 217, 219
Novák Z. 86, 88, 182
Novák J. 22, 56, 77
Nováková R. 53, 176
Novotná H. 115
Novotný J. 54, 136, 162

O

Očadlíková D. 115
Oliverius M. 162
Oltová A. 103, 244
Ondruš D. 194
Ondrušová M. 183, 194
Opletal P. 187
Opluštilová P. 179
Orság M. 247
Ostřížková L. 138
Ošlejšková H. 98

P

Pacal M. 219
Pacík D. 213
Pacovský J. 188, 230
Pačovský Z. 120
Pajdlhauser R. 166
Palácová M. 29, 125, 126, 131, 139
Paleček T. 98
Paprskářová M. 247
Patera J. 81
Patera J. jr. 81
Pavelka Z. 93, 98
Pavelková K. 83
Pavlík I. 78, 201
Pavlík T. 50, 93, 94, 98
Pavlovský Z. 31, 101
Pavlů H. 227
Pazdrová G. 127
Pácal L. 180
Pählman L. 148, 150
Pecen L. 30
Pechová A. 48
Penka I. 219
Penka M. 24, 34, 114, 115
Pernička J. 189, 208, 212
Perníková I. 95, 97
Peřina V. 174
Pešek M. 39, 42, 173
Pešl M. 196, 197
Peštál A. 164
Petera J. 14
Petráková K. 29, 30, 77, 126, 131, 139
Petráková L. 66
Petrenko M. 25
Petruželka L. 127, 135, 136, 149, 172
Pfeifer J. 144
Pilát M. 83, 84, 85
Pilný R. 30, 233
Pipková R. 186
Plank L. 107
Plevová P. 40, 54
Plocová D. 245
Podhola M. 44
Pohlreich P. 54
Pokorná Š. 119
Polák V. 107
Poláková H. 241, 243
Polášková M. 69
Poledníková Ľ. 17
Poljaková J. 46
Poprach A. 151
Pospíšil P. 167
Pospíšilová D. 86, 88
Pospíšilová E. 225
Pospíšilová Š. 108
Pospíšková M. 138
Pour L. 114
Prandlová S. 72
Prausová J. 147, 149, 186, 245
Pražáková M. 35, 36
Princ D. 205
Procházka P. 45, 106
Procházková J. 109, 240
Prokop J. 70, 73
Průša R. 82, 252, 255, 258
Přibylová O. 235, 136
Přidal I. 171
Přikrylová M. 75
Pudil R. 47
Puchmajerová A. 106
Puškáčová J. 107

R

Račanská E. 25
Ráček J. 23
Radová L. 27, 86
Radvanská J. 82
Radvanský J. 82
Radzioch D. 27
Rašková I. 1
Retková L. 122
Riedlová P. 38
Richter I. 60
Rolčík J. 247
Roušarová M. 36
Rovný A. 195, 206
Rozprimová L. 245
Rupert K. 35
Růžičková P. 90
Rycová M. 235
Ryska M. 157, 160
Ryšánková V. 69
Ryška A. 132

Ř

Řehák Z. 59, 217, 219
Řehořová J. 5
Říha I. 182
Říhová B. 245

S

Sachová J. 209
Salvét J. 137
Salzman R. 180, 181, 254, 256
Saudská A. 82
Sečkařová D. 122, 133
Sedláčková M. 48
Sedláková I. 31
Sekaninová R. 241, 243, 244
Schmidtová Z. 17
Schneiderka P. 222
Schneiderová M. 125
Schovanec J. 104
Schwarz D. 18, 23, 24
Siman J. 107
Skála M. 156
Skalický P. 33, 37, 154
Skotáková J. 98
Skovajsová M. 117, 121
Skřičková J. 42, 163
Skubák M. 107
Slabotínská D. 181
Slabý O. 232
Sláma O. 6, 65, 70
Slámová I. 93
Slouka J. 247
Slováček L. 47, 51, 116
Slováčková B. 51, 116
Slováčková R. 39
Smejkalová J. 115, 244
Smílková S. 19
Smolej L. 112, 113
Sobotková E. 249
Sošková R. 23
Souček K. 109, 240
Součková K. 241, 243
Soukeníková D. 208
Soukup V. 196, 197
Soukupová J. 129
Soumarová R. 143, 149
Spěšná R. 94
Spurný V. 149
Srovnal J. 33, 37, 41, 247
Srovnal P. 221
Stáhalová V. 149
Staníček J. 214, 217, 219
Staňková M. 27
Stankušová H. 166
Starý J. 91, 97, 102, 104, 105
Starý L. 141, 145, 154
Stejskal J. 170
Stejskal K. 236, 250, 252
Stejskalová A. 244
Stejskalová E. 106
Stejskalová I. 86
Stiborová M. 250, 251, 257
Stixová L. 240
Strnad M. 247, 248
Strnad R. 160
Strnádel J. 255
Strohalm J. 245
Studynková A. 134
Stupalová J. 217, 219
Sumerauer D. 91, 106
Sutnar A. 35, 36
Sutorý M. 203
Světlák M. 6
Svoboda M. 29, 126, 232
Svoboda T. 137
Svoboda V. 170
Svoboda Z. 110
Svobodník A. 34, 117
Svobodová Š. 35, 36
Swaczynová J. 248
Sýkorová Z. 62
Szakázcová M. 197

Š

Šafanda M. 149
Šafařík L. 201
Šafránek H. 43, 44
Šafránek J. 35, 173
Šampalík J. 39
Šálek C. 159
Šebesta R. 20, 22, 64
Šedivá M. 137
Šedo O. 235
Šefránek V. 107
Šefrhansová L. 137
Šefrna F. 39
Šerclová Z. 79, 156
Šiffnerová H. 149, 153
Šimánek V. 173
Šimíčková M. 29, 30, 220
Šišola I. 123
Šírová M. 245
Škapa P. 147
Škarda J. 27, 40, 128, 129, 130
Škrovina M. 143
Šlampa P. 98, 167, 205, 213
Šmakal M. 21
Šmarda J. 239
Šmardová J. 229
Šmelhaus V. 104
Šmerdová P. 256
Šmerdová T. 220
Šnajdrová L. 18
Šobrová P. 236
Špelda S. 151, 152, 187, 191
Špičák J. 162
Špindlen V. 173
Špišáková M. 35, 36
Šrámek V. 154
Šťastný 124
Šteiner I. 31
Štěrba J. 83, 85, 87, 90, 93, 94, 96, 98, 99, 103, 108
Štirand P. 162
Štrupová L. 155
Študent V. 204, 208, 212
Šubr V. 245
Šubrt D. 21
Šubrt Z. 157
Šupálková V. 251
Švach I. 123
Švébišová H. 33, 37, 41, 123

T

Tesařová P. 127, 135, 136
Thotová E. 254
Tichý B. 108
Tichý M. 47, 95, 97
Tichý M. jr. 242
Tomancová V. 137, 172
Tomandl J. 180
Tomášek J. 34, 59, 219
Tomíška M. 80
Tomšová M. 31, 132
Topolčan O. 35, 36, 57, 173
Toufarová Z. 3
Tóthová E. 181, 256
Trnková L. 231, 236, 253
Trojanec R. 27, 221, 226
Trtková K. 210
Třeška V. 35, 36
Tuček Š. 34
Turashvili G. 128, 129, 130
Turbová T. 98
Tyčová V. 157

JMENNÝ REJSTŘÍK

U

Ulbrich K. 245
Ulrych V. 170, 184
Umlaufová D. 147
Urban M. 209
Urbancová H. 80
Überall I. 246
Ürge T. 193

V

Valášková I. 99
Valík D. 28, 30, 38, 90, 223, 224, 225, 233
Vaňásek J. 74, 170, 184
Vaňková J. 229
Vašíčková P. 227
Václavík A. 171
Válek V. 76, 142, 190
Velkoborský M. 143
Ventruba J. 98
Ventruba P 25
Veselská R. 93
Veselý M. 164
Vidlák A. 208
Vidláková P. 45, 114, 115, 244
Vidlář A. 204, 212
Vinglerová M. 32
Visokai V. 57, 155
Vícha A. 46
Vít V. 213
Vitek P. 156
Vitetta E.S. 45
Vítová H. 55, 78
Vítová V. 55, 78
Vlčková I. 83, 84, 85
Vočková J. 222
Vodáková P. 34
Vodička J. 173
Vodvářka P. 149
Voglová J. 113
Vojtěšek B. 28, 228, 233
Vokurková D. 44, 230
Vomela J. 165
Vondráčková M. 192
Vonka V. 249
Vorlíček J. 18, 114
Vorlíčková H. 9, 10, 64
Votavová M. 193
Vrabcová A. 122
Vranová V. 93
Vrba R. 215
Vroblová V. 43, 44
Vydra D. 247
Vydra J. 21
Vyskočil J. 77, 131
Vysloužil K. 33, 37, 141, 145, 154
Vyzula R. 187, 232

W

Wassermann O. 107
Wágnerová D. 181
Wei W. 130
Weinreb M. 92
Wiecek S. 27
Wilhelm Z. 48
Winkler L. 133

Z

Zahradová L. 155
Zajíčková V. 99
Zapletalová J. 89, 129, 242
Zatloukal J. 171
Zatloukal P. 172
Zatloukalová H. 80
Zavoral M. 159, 160
Zavřelová I. 93, 94
Zálešáková P. 64
Zámečník J. 95
Zbořil P. 141, 145
Zdráhal Z. 235
Zehnálek J. 251
Zelená J. 235
Zeman L. 251
Zemanová M. 172, 192
Zemánek P. 18
Zima T. 127
Zítka O. 234, 252, 253
Zitterbart K. 93, 94, 98, 100
Zlámalová N. 123
Zvoníčková M. 8, 16

Ž

Žaloudík J. 12, 20, 45, 49, 50, 220, 244
Žežulková D. 93

I.
Součinnost onkologů s pacienty

I

Pacientské organizace a informovanost veřejnosti.

Rašková I.
Praha

Alianci českých organizací a žen s rakovinou prsu, o. p. s. založilo v roce 2002 devatenáct aktivních pacientských organizací onkologicky nemocných, které tak projevily vůli dohodnout se na společných záměrech a cestách k jejich naplnění.

Aliance je obecně prospěšnou organizací s celostátní působností, která zastřešuje organizace onkologicky nemocných žen v České republice. V současné době Aliance sdružuje 47 pacientských organizací z celé České republiky.

Posláním Aliance je:
- Sjednocovat snahy pacientských organizací onkologicky nemocných žen o zlepšení kvality jejich života,
- Organizovat celostátní kampaně a akce ve prospěch nemocných i k prevenci,
- Vzdělávat dobrovolnice managementu organizací onkologicky nemocných,
- Zastupovat ženy s rakovinou prsu a lobbovat v jejich prospěch.

Aliance českých organizací a žen s rakovinou prsu je svým posláním zaměřena především na ženy, které již prodělaly onkologickou léčbu. Snažíme se proto, aby všechny ženy postižené rakovinou prsu našly brzy ztracené sebevědomí, fyzickou sílu a odhodlání vrátit se ke své práci, a aby i následně žily šťastný a spokojený život.

Aliance si ovšem také uvědomuje význam prevence, a proto je mnoho našich aktivit nabízeno nejširší veřejnosti. Jedná se o podporu větší informovanosti a kvalitnější prevenci nádorového onemocnění prsu. O tom, že máme možnost jít k lékaři na preventivní hrazené vyšetření, již ví mnoho žen. Dokonce již většina žen díky nejrůznějším preventivně vzdělávacím akcím pacientských organizací i díky aktivitám a významné podpoře některých komerčních subjektů je informovaná, že ve věku od 45 let do věku 69 let má každá žena ze zákona jednou za dva roky plně hrazenu preventivní prohlídku na mamografu nebo sonografu.

Stále častěji slyšíme i čteme o významu prevence. Samozřejmě souhlasíme, že včas zachycený zdravotní problém je snáze řešitelný než problém zanedbaný. Ale přesto si stále mnohé z žen myslí, že jich se tak hrozná nemoc, jakou je rakovina prsu, netýká a radši o ní ani nechtějí slyšet. „Vždyť co kdyby už jen při takové myšlence na sebe něco zlého přivolaly?!“ Jenže výskyt rakoviny prsu u žen nadále stoupá. V současné době statistika uvádí, že denně onemocní rakovinou prsu 13 českých žen!

Naopak velice potěšitelné je, že úmrtnost žen, které rakovinou prsu onemocní, přece jenom klesá. Informovanost a prevence je kvalitnější a stále se zdokonalují léčebné metody a možnosti.

Právě cílená informovanost pro všechny věkové skupiny žen podporuje přesvědčení o vyléčitelnosti nemoci. Díky preventivně vzdělávacím akcím se zvyšuje počet žen, které se zajímají a samy aktivně vyhledávají možnost preventivního vyšetření. Významný fakt je, že o informace o možnosti prevence projevují vysoký zájem ženy ve věkové skupině 30-44 let. Jsou to ženy ve věku, kdy ještě nemají nárok na plně hrazené vyšetření ze zdravotního pojištění, ale projevuje se u nich vyšší míra rizika nádorového onemocnění. Je to také nejdůležitější věková skupina žen pro přijímání správných návyků v péči o své zdraví.

Samozřejmě Aliance nezapomíná ani na skupiny žen ještě mladších, ani na ty, které již překročily hranici „sedmi křížků“.

Díky vysoké zainteresovanosti Aliance a jednotlivých pacientských organizací je pro všechny ženy každoročně připravováno široké spektrum zajímavých akcí po celé České republice:
- vzdělávací semináře a přednášky
- peer programy na zdravotních školách
- přednášky pacientek pro instituce, které zaměstnávají převážně ženy
- celodenní edukace na veřejnosti v rámci nejrůznějších happeningů
- provozování bezplatné telefonní linky
- informační letáky, brožury, samolepky, billboardy vyzývající k preventivním prohlídkám.
- Internetový server www.breastcancer.cz nebo www.rakovina-prsu.cz.

Pro onkologicky nemocné pak jsou organizovány motivační projekty pro ženy, které se potýkají s následky onkologické nemoci pod názvem Dokážeš to taky!, ozdravné pobyty pro ženy s lymfedémem, internetové diskusní fórum nebo internetová seznamka.

V edukačním programu Aliance rozhodně nezapomínáme na další vzdělávání žen, které se snaží v rámci dobrovolnické práce v pacientských organizacích pomáhat jiným a zvyšovat informovanost veřejnosti o významu prevence.

Dle mnohých ohlasů veřejnosti jsou naše aktivity velice kladně přijímány. Ale jako nejvýznamnější motivační prvek pro práci a rozvoj dalších činností Aliance a všech pacientských organizací je růst zájmu veřejnosti o prevenci a uvědomování si odpovědnosti za své vlastní zdraví.

Mgr. Iva Rašková • Aliance českých organizací a žen s rakovinou prsu, o. p. s.
Vinohradská 176 • 130 00 Praha 3 • tel.: 222 733 733
e-mail: aliance@breastcancer.cz • info@breastcancer.cz

www.breastcancer.cz • www.rakovina-prsu.cz
Bankovní spojení: KB Praha 27-9092620207/0100

Děkujeme všem za sponzorské dary, příspěvky, materiální pomoc a podporu.

2 S kým a jak mohou pacientské organizace při šíření informací spolupracovat?

Drexlerová J.
Mamma Help, Praha

Pacientské organizace, které vznikly v České republice po roce 1989, si ve většině případů kladou za cíl svépomocnou podporu v komunitě onkologicky nemocných a působení na zdravou populaci je až druhým úkolem, pokud vůbec o to usilují. Výjimkou jsou Ligy proti rakovině, kde na prvním místě stojí naopak osvěta, ať se týká informací o prevenci či o možnostech léčby. Specificky se pak chovají tzv. střešní společnosti, jako například Koalice pro zdraví nebo Aliance českých organizací a žen s rakovinou prsu, které upřednostňují zejména lobbying v zájmu pacientů či organizací, jež jim k tomu daly mandát.

Všechny tyto subjekty se však různým dílem na informovanosti veřejnosti dozajista podílejí a suplují tím do jisté míry zatím stále nedostatečné výstupy z institucí, kde se tato činnost očekává – z Ministerstva zdravotnictví a zdravotních pojišťoven.

Mamma HELP patří k organizacím, které mají dnes na poli neziskovek se zaměřením na pacienty významné místo a je vnímán i odbornou veřejností jako důvěryhodný partner.

Přestože naší prioritou je a zůstane poskytování pomoci koncovým klientům v síti MAMMA HELP center, nezříkáme se zejména v posledních 3-4 letech i **cílených edukačních aktivit.**

Týkají se jak prevence, tak pomoci již nemocným.

K těm prvním patří například celorepublikové i regionální projekty zaměřené na prevenci rakoviny prsu (Grant T mobil a nadace VIA v Královéhradeckém kraji, Grant z fondu DM drogerie Markt na projekt Využijte svého práva na preventivní prohlídky, který zahrnuje přednášky pro1.400 žen). Na řadě takových projektů participujeme: jde o Alianční Udělej to pro sebe (přednášky pro studentky i dospělé ženy), Květinový den, resp. Český den proti rakovině Ligy proti rakovině Praha (každoroční distribuce letáků), Dny zdraví v řadě měst pořádané STOBem, stánek na Pragomedice, a řada projektů firmy AVON Cosmetics.

Nejvýznamnějším z nich je **Linka AVON proti rakovině prsu,** kterou provozujeme v pražském MAMMA HELP CENTRU od března 2004. Linka je v provozu v pracovní dny od 9.00 do 19.00, denně se na ni obrátí v průměru 40 osob. Za rok 2006 jsme zaznamenali přes 4 tisíce telefonátů, zhruba polovina dotazů se týká prevence, polovina patří do telefonátů nemocných. Každoročně se podílíme na projektu Ženy ženám, distribucí poukázek na vyšetření, které si ženy objednávají právě na této lince.

Nemocným i zdravé ženské populaci přinášíme potřebné informace také prostřednictvím médií – publicita, pokud jde o rozhovory s pacientkami i terapeutkami MH center, je cca 3-5 výstupů měsíčně. Stejně funguje například projekt Růžová výšivka, který je značně medializován zejména v ženských časopisech a jehož druhotným efektem je lepší orientace čtenářek v tématu.

Šíření informací týkající se zlepšení života nemocných při probíhající léčbě či v následné péči se děje například formou seminářů pro pacientky, či odborníky. Jde například o FYZIO MAMMA pro fyzioterapeuty (od roku 2001) – konkrétním výstupem je videokazeta Cvičení pro ženy po operaci prsu – a mnohé další. Letos například šíříme **poselství Nezůstávej sama** prostřednictvím putovní výstavy portrétních fotografií pacientek a jejich partnerů (zpracováno i jako kalendář) a pracujeme na projektu AFRODITA, zaměřeného na možnosti rekonstrukční operace prsu po nádorovém onemocnění, kde je informovanost pacientek téměř nulová.

Při těchto aktivitách, jejichž cílem je informovat veřejnost o možnostech prevence a léčby rakoviny prsu, jež je nejčastějším ženským onemocněním, postrádáme větší zájem pojišťoven i ministerstva zdravotnictví o partnerství a spolupráci. Narážíme na předsudek, že nejsme v této oblasti kvalifikovaným partnerem, byť naše dosavadní úspěšné projekty svědčí o opaku. Důsledkem je mimo jiné i fakt, že **leadrem na trhu těchto informací jsou z tohoto důvodu v poslední době pouze komerční firmy, jejich kampaně nemůžeme naprosto ovlivnit.**

Chtěli bychom vyvolat diskusi na toto téma i v odborné veřejnosti a v případě shody požádat vás, onkology, o podporu.

Mgr. Jana Drexlerová • Mamma HELP, sdružení pacientek s nádorovým onemocněním prsu

3 Partnerství nemocného a lékaře – příklad spolupráce Klubu nemocných s mnohočetným myelomem a České myelomové skupiny (CMG) a jejího nadačního fondu (CMG ND).

Toufarová Z., Hájek R.
Brno

Česká myelomová skupina a její nadační fond se snaží již více než 6 let vytvářet dobré podmínky pro poskytování informací nemocným a jejich příbuzným. Mezi dlouhodobé aktivity patří publikační činnost (více než 10 brožur pro nemocné s mnohočetným myelomem), informační činnost (www.myeloma.cz a konzultační linka), roční velké semináře pro nemocné a jejich příbuzné a řada dalších modelových aktivit.

Podobné aktivity jsou zaměřeny i na lékařskou veřejnost a laickou veřejnost tak, aby toto onemocnění bylo co nejčastěji rozpoznáno co nejčasněji. Pozdní diagnóza znamená ve více než 20% případů i závažné poškození organizmu. Třebaže naše léčebné možnosti dnes umožňují v řadě případů dlouhodobé přežití, je-li kvalita života výrazně snížena vstupním závažném poškození jde i přes úspěšnou léčbu o dlouhodobé snížení zásadní limitující život nemocného.

Klub pacientů s mnohočetným myelomem vznikl v roce 2006 a během své krátké doby trvání rozvinul své aktivity v Brně, Hradci Králové a Praze. Cíle klubu jsou v řadě případů stejné či podobné jako cíle CMG ND, nicméně úkolem klubu je především obhajoba zájmů nemocných s krevním nádorovým onemocněním – mnohočetným myelomem. Klub rovněž pořádá pravidelná setkání, zajišťuje přístup k nejnovějším informacím o onemocnění a možnostech léčby, problémech s úhradou v ČR. Má své informační stránky (www.mnohocetnymyelom.cz) a pravidelné informační brožury. Ve spolupráci s CMG se podílí na organizaci setkání pacientů a mezinárodní spolupráci s jinými pacientskými organizacemi.

V přednášce budou prezentované zvláště naše společné aktivity. Partnerství mezi lékařem a nemocnýmje náročný a dlouhodobý proces pro oba partnery. Odměnou však je zlepšování léčebných výsledků a kvality života našich nemocných.

4 Organizace stomiků.

Kreml P.
místopředseda Českého ILCO, předseda Slezského klubu stomiků Ostrava

Úvod

Patrně jsme si to zažili všichni. Prakticky ze dne na den se z nás stali stomici. Najednou před námi vyvstala celá řada otázek. Co dál? Jak žít se stomií? Budu moci pracovat, věnovat se zálibám, rodině? Mnohým se zdá, že pro ně život prakticky končí. Psychicky se vyrovnat s novou situací je vůbec nejobtížnější. Zde může napomoci setkání či informace o lidech, kteří se už s problémy vyrovnali. Z potřeby vzájemných kontaktů, výměny zkušeností, získávání nových informací vznikají kluby stomiků.

Kluby stomiků

V současné době v České republice pracuje celkem 16 klubů stomiků: v Brně (2 kluby), Bystřici nad Perštejnem, České Lípě, Chebu, Karlových Varech, Kroměříži, Novém Jičíně, Opavě, Ostravě, Praze, Prostějově, Přerově, Příbrami, Táboře a ve Zlíně. Dalších 5 organizací stomiků, které fungují při poradnách stomasester, nemá statut občanského sdružení. Většina klubů vznikla v první polovině devadesátých let.

Kluby stomiků organizují schůzky, přednášky lékařů a stomasester, prezentace nových pomůcek, pořádají návštěvy divadel a zájezdy. Vyvrcholením činnosti bývají rekondiční pobyty. Stomik zde může získat nové informace, poradit se o svých problémech, setkat se se zajímavými lidmi, vyměňovat si zkušenosti. Výhodou je, že se na akcích setkávají stejně postižení a jejich partneři a tak nemusí mít obavy z případných problémů. Postižený si tak postupně ověřuje, že může dělat prakticky všechno jako před operací. Činnost klubů hodně závisí na aktivitě lidí ve výboru klubu a na finančních prostředcích. Důležité je proto získávání sponzorů.

České ILCO

Řada lékařů a bohužel i pacientů – stomiků považuje kluby stomiků za něco zbytečného, srovnává je se svazem zahrádkářů, včelařů, důchodců atp. Že se tam lidi sejdou, povykládají, občerství se, maximálně zajedou na zájezd, rekondiční pobyt a hotovo. Pro činorodého člověka ztráta času, pro lékařskou obec záležitost nepodstatná. Co si ale málokdo uvědomuje, je to, že člověk se stomií je závislý na každodenním používání velice drahých pomůcek. A že by stačil jediný škrt pera úředníka ministerstva zdravotnictví či zdravotní pojišťovny, který by stomika prakticky vyřadil ze společenského života. A že to není v dnešní době věc nemožná, to si snad uvědomuje každý. A především proto zde je organizace zvaná České ILCO, která sdružuje 16 klubů stomiků.

České ILCO vzniklo v roce 1993 a má předsedu (Ing. Šerý) i sídlo v Brně, hájí zájmy asi 6 000 stomiků při jednáních se státními orgány, zdravotními pojišťovnami, udržuje kontakty s dalšími národními organizacemi, evropskou a světovou asociací, firmami dodávajícími stomické pomůcky. Pořádá rekondiční pobyty, organizuje přípravu dobrovolných návštěvníků. Podrobnější

informace o práci Českého ILCO i klubů stomiků lze získat na internetu na adrese *www.ILCO.cz*.

Stomici ve světě

Podobné národní organizace jsou i ve většině dalších zemí v Evropě a na celém světě. Problémy, kterými se zabývají, jsou dost rozdílné. Méně rozvinuté země (Rusko, Rumunsko, Bulharsko, africké země…) řeší zejména problémy, jak získat alespoň nějaké pomůcky pro stomiky, kteří bývají často zcela vyřazeni z normálního života. Země s rozvinutou péčí o stomiky (mezi ně se můžeme směle počítat) vyvíjejí aktivity v oblasti informovanosti, kulturních a společenských akcí, rehabilitačních pobytů. Snaží se o rychlé zapojení stomiků do normálního života.

Evropské národní organizace jsou sdruženy v Evropské asociaci stomiků (EOA), která má v současnosti 43 členů. Podobné asociace jsou vytvořeny v Asii, Jižní Americe, Severní a Střední Americe a Jižním Pacifiku.

V celosvětovém měřítku hájí zájmy stomiků (je jich kolem 3 milionů) Světová asociace (IOA). Prezidentem této asociace je paní Di Bracken z Kanady. Oceněním práce stomiků u nás je to, že viceprezidentem IOA je Čech, doc. Kleinwächter z Brna. Informace o této organizaci a další kontakty lze nalézt na adrese *www.ostomyinternational.org*.

Každé tři roky je začátkem října vyhlašován Světový den stomiků, kdy probíhá řada akcí po celém světě. V loňském roce proběhl Světový den stomiků 7. října pod heslem „Žít plnohodnotně“. České ILCO a kluby stomiků pod tímto heslem uspořádaly velké množství zajímavých akcí.

Dobrovolní návštěvníci

O tělesnou schránku stomika je u nás již relativně dobře a odborně postaráno. Jsou dostupné kvalitní pomůcky, které umožňují stomikům návrat do běžného života. Psychika osobnosti ovlivněná chorobou je stále ještě v pozadí mimo intenzivní zájem. Jednou z možností jejího pozitivního ovlivňování je využití zkušených, vyškolených stomiků – dobrovolných návštěvníků.

Pacient by měl být informován o všech podstatných otázkách lékařem a stomasestrou. Ale … pacient je ve stresu ovlivňujícím jeho vnímání, zdravotnický personál nemívá dostatek času. Takže zkušenosti a znalosti stomiků, kteří dobře zvládají život se stomií, jsou k nezaplacení. Na základě výzvy odpovědného pracovníka klubu nebo stomasestry nebo přímo příslušného oddělení nemocnice dobrovolník navštíví pacienta, kterého by měl informovat:

O pomůckách – jak, kdy a kde je získávat, jak je používat, jaké jsou zkušenosti s jednotlivými typy pomůcek. Neměl by však ošetřovat stomii pacienta.

O životě se stomií – jak lze žít plnohodnotným životem, o možnostech věnovat se zájmům, sportu, kulturním a společenským aktivitám, možnostech cestování. Měl by hovořit o vlastních zkušenostech, jak překonal prvotní problémy, jak nyní žije. Neměl by však nic vnucovat!

O klubech – kde, s kým se kontaktovat. Jaký je smysl činnosti a co kluby stomiků poskytují.

O zkušenostech se sociálními důsledky nemoci, důchodovém zabezpečení, možných omezeních, ale a to hlavně o pozitivních zkušenostech.

Odpovídá na dotazy nového stomika, vytváří příležitosti pro to, aby postižený měl možnost vyslovit svá přání, postupně vytváří přesvědčení, že stomik je schopen řešit své vlastní problémy, sám rozhodnout o tom, co je pro něj dobré.

Sdružení České ILCO centrálně zabezpečuje přípravu dobrovolníků. Při organizaci vychází z dobrých zkušeností z přípravy a práce dobrovolníků na Slovensku a v Polsku. Proběhly dvě etapy přípravy dobrovolných návštěvníků a celkem je připraveno 20 dobrovolníků. Někteří lékaři a zdravotnická zařízení pomoc dobrovolníků vítají a podporují, jiní ji odmítají.

Závěr

Na posledních kongresech Evropské (EOA) a Světové asociace stomiků (IOA) v Portu byla vysoce oceněna dosavadní práce našich stomiků organizovaných v klubech a ve sdružení České ILCO:

- České republice byla svěřena organizace následujícího evropského kongresu v roce 2008.
- Česká republika obsadila 1. místo v celosvětové soutěži o nejlepší organizaci Světového dne stomiků.
- Doc. Kleinwächter, který dosud vykonával funkci prezidenta Evropské asociace (EOA), byl zvolen do funkce viceprezidenta Světové asociace (IOA).

Tento úspěch je však pouze vrcholkem naší práce. Její těžiště spočívá v pestré a zajímavé činnosti všech klubů stomiků u nás.

info@ILCO.cz • www.ILCO.cz

5 Vliv klubu na psychiku onkologických pacientek a jejich aktivity.

Křížková Z., Chalupová M., Řehořová J., Gajová B.
Sekce pacientská sdružení Onko klub Slunečnice, Olomouc

Na popud onkologické kliniky v Olomouci bylo v roce 2001 založeno občanské sdružení onkologických pacientek, které má v současné době asi 60 členek ve věku 49 – 79 let, převážně invalidní důchodkyně, ženy po operaci s rakovinou prsu. Pravidelně jednou měsíčně se setkávají ženy nejen z Olomouce, ale i z blízkého okolí, např. ze Šternberka, kde dosud takový klub nepracuje.

Činnost klubu je rozmanitá, hlavním cílem je pomoci ženám ve svízelné životní situaci a vytvoření kvalitního vzdělávacího a odpočinkového programu, který alespoň částečně mírní dopad nemoci na psychický stav žen po operaci a v následujících letech. Konkrétně tedy organizujeme např. přednášky lékařů – onkologů, chirurgů, psychologů, dermatologů, kteří nám radí, vysvětlují a doporučují, jak se chovat, vyvarovat dalších zdravotních rizik, na co máme jako onkologické pacientky nárok apod.

Důležitou součástí naší činnosti je ozdravný program, např. organizování rekondičních pobytů, cvičení, jóga, plavání, solana. K našim aktivitám patří také návštěva kulturních akcí. Veškerá činnost klubu onkologických pacientek je zaměřená na zkvalitnění jejich života, povzbuzení do práce, nalezení životních hodnot a jistot.

6 Jsou pacienti léčení paliativní chemoterapií správně informováni o cílech své léčby?

Sláma O., Bartlová M., Cvečková J., Světlák M., Vyzula R.
Masarykův onkologický ústav Brno
Lékařská fakulta LF MU Brno

Úvod

V posledních letech je v onkologii kladen stále větší důraz na zapojení pacientů do rozhodování o léčebném postupu. Při zvažování indikace nekurativní (= paliativní) protinádorové léčby je třeba zohlednit, jaký význam mají pro pacienta potenciální přínosy léčby (krátkodobé prodloužení života, redukce některých symptomů) a rizika a zátěž spojená s léčbou (nežádoucí účinky, nutnost ambulantních kontrol, nutnost hospitalizací atd.) Aby se mohl pacient na tomto rozhodování racionálně podílet, musí mít dostatek informací. Existují data, která naznačují, že část onkologických pacientů není dostatečně informovaná o celkovém „ kontextu“ léčby, tedy o záměru a dosažitelných cílech léčby.

Cíle výzkumu

V období od října 2006 do ledna 2007 jsme provedli dotazníkový průzkum u 80 pacientů léčených paliativní chemoterapií (pCHT) na MOU v Brně s cílem zjistit, jak pacienti chápou cíle léčby, kterou podstupují. Uveřejněná data jsou dílčím výstupem širšího výzkumu informovanosti, spokojenosti a očekávání pacientů léčených paliativní chemoterapií na MOU v Brně.

Soubor:

80 pacientů léčených pCHT ambulantně (n = 36) nebo za hospitalizace (n = 44). Výběr respondentů byl náhodný. 5 pacientů (6%) odmítlo dotazník vyplnit. Zpracováno je tedy 75 dotazníků. 38 pacientů (51%) dostávalo 1. linii pCHT, 28 pacientů (37%) 2. linii pCHT a 9 pacientů (12%) 3. nebo vyšší linii pCHT. Všichni pacienti měli v dokumentaci podepsaný „Informovaný souhlas“ s protinádorovu chemoterapii. Lze tedy předpokládat, že o přínosu a rizicích léčby se svým ošetřujícím onkologem hovořili.

Metoda

Pacienti na otázku „Co Vám váš lékař řekl o chemoterapii, kterou právě dostáváte?“ mohli vybrat jednu z následujících odpovědí:

- Léčba, kterou dostávám, u mě může vést **k** vyléčení, tj. **k úplnému odstranění nádorových buněk** z těla a navození **trvalého stavu zdraví** (kurativní léčba).
- Léčba, kterou dostávám, mě **nemůže zcela vyléčit**, ale může nádor přechodně výrazně zmenšit nebo zastavit jeho růst a tak **prodloužit můj život a zmírnit potíže**, které mi nádor působí (paliativní léčba)
- Nevím, protože jsem od lékaře tak podrobné informace nedostal

Výsledky

48 (64%) pacientů uvedlo, že byli informováni o nekurativním (= paliativním) charakteru podávané léčby, 21 (28%) pacientů vyjádřila na základě informací od ošetřujícího lékaře přesvědčení, že jejich léčba může vést k úplnému vyléčení. 6(8%) nemocných uvedlo, že nejsou schopni na základě informace od ošetřujícího lékaře na otázku na cíle léčby odpovědět.

11 (28%) pacientů léčených 1. linií pCHT považovalo svou léčbu za kurativní. 8 (35%) pacientů léčených 2. linií pCHT považovalo svou léčbu za kurativní. 2(22%) pacienti léčených 3. a vyšší linií pCHT považovalo svou léčbu za kurativní.

Závěr a diskuse

Ve sledovaném souboru 28% pacientů léčených pCHT považovalo svou léčbu za kurativní. Tato „nerealistická očekávání" přetrvávala i s narůstajícím počtem linií chemoterapie. Sledovaný soubor je malý. Analýza výsledků např. podle věku nebo diagnóz respondentů by nebyla přínosná. Přesto lze ze získaných dat lze vyvodit některé obecnější závěry.

Nezanedbatelná část pacientů léčených paliativní chemoterapií očekává od léčby úplné vyléčení. Jejich očekávání se tedy liší od toho, co od léčby očekává lékař. Tato diskrepance může mít závažné důsledky při rozhodování o ukončení pCHT, při diskusi o cílech paliativní symptomatické péči a hospicové péče. Pacienti setrvávají až do velmi pokročilých stádií v „nerealistikém očekávání" přínosu CHT a tuto léčbu proto požadují. Tato „nerealistická očekávání" jsou jistě komplexním fenoménem, který pouze částečně odráží to, co pacientovi lékař řekl. Nelze je tedy jednoduše interpretovat tak, že lékař pacienta informoval nedostatečně. U části nemocných vstupují do hry mechanismy vytěsnění, racionalizace a optimistické reinterpretace lékařových slov.

Je otázkou jaký je vztah „nerealistických očekávání" a naděje. Klinická zkušenost ukazuje že tento vztah je mnohovrstevný a komplexní. Bezpochyby automaticky neplatí rovnice „ konec chemoterapie = konec šance na prodloužení života = konec naděje = rezignace, zoufalství a beznaděje"

Problematika informovanosti pacientů o dosažitelných cílech léčby, nerealistických očekáváních a naději vyžaduje další empirický výzkum.

7 Psychoterapie pro onkologicky nemocné.

Kunertová O.
Praha

Každé onemocnění, tím spíše onemocnění závažnou, život ohrožující chorobou, znamená pro člověka ztrátu dosavadních jistot, ohrožení všech zvyklostí a přesvědčení, o která se do té doby opíral. Je to jistě současně příležitost, přestat být na těchto jistotách závislý a udělat svůj život svobodnější. Především je to však životní situace bolestná a náročná, subjektivně logicky neprožívaná právě pozitivně.

To, čím se v životě trápíme, co nám působí trýzeň a utrpení, nicméně nejsou fakta nebo nějaké objektivní skutečnosti, jsou to právě naše představy, významy, jaké faktům dáváme a očekávání, která jsou s fakty spojena. Není to sama bolest nebo konkrétní omezení, ale strach z bolesti a přesvědčení o tom, že okolnosti jsou omezující, vědomí toho, co by bylo jinak, nebýt nemoci apod. A právě tady je obrovské pole působnosti pro psychoterapii, která pomáhá nemocným netrápit se zbytečně, zorientovat se v nové životní situaci a žít i přes nepříznivou prognózu smysluplný a naplněný život. Ať to zní jakkoli paradoxně.

Je nutnou lidskou potřebou dávat faktům smysl, a ten se může v psychoterapeutickém procesu proměňovat. V člověku, jehož jednoznačné a definitivní soudy o sobě a své chorobě byly zrelativizovány takovýmto význam proměňujícím rozhovorem, je pak zpravidla mnohem snadnější objevit zdroje k vypořádaní se s nepříznivými vlivy a rozhodování se o svém dalším bytí. Vyrovnání se s faktem vlastní smrtelnosti, s vědomím toho, že to, co má člověk ze života před sebou je jakýmsi způsobem časově ohraničeno, je podmíněno rozpuštěním sebezničujících přesvědčení o nespravedlnosti takového údělu, o vlastním zavinění apod. V tomto smyslu přispívá psychoterapie ke smíření se s nevyhnutelným, současně je však také obrovským příspěvkem ke schopnosti pacienta spolupracovat na léčbě a aktivně se podílet na svém případném uzdravení.

Nemoc, jako by předurčovala specifická členství v sociálních systémech, specifickou roli, jednoduše řečeno, dotyčný člověk je najednou ve všech společenstvích za nemocného, a to jak ve společenstvích, ve kterých se dosud pohyboval, tak v nových, vznikajících právě v souvislosti s chorobou. Nemocný jakoby splynul se svou nemocí a přestal být vším tím, čím dosud býval. Přispívají k tomu jak ohledy okolí, tak dobře míněné rady zdravotních pracovníků typu: „…teď na všechno zapomeňte, nejdůležitější je, abyste se uzdravil." Člověk však sám o sobě nikdy není problémem nebo nemocí. Proto považujeme za užitečné využití externalizačních terapeutických postupů, v jejichž důsledku je pak nemoc vnímána jako více či méně důležitá okolnost v pacientově životě, ale vždy pouze okolnost, tedy něco mimo člověka samého. Takové oddělení umožňuje dotyčnému být taky něčím jiným než pacientem.

Jde především o to, aby člověk zůstal protagonistou svého vlastního příběhu a nestal se figurkou na hracím poli někoho jiného, kdo jím táhne dle vlastního plánu, jako by on sám neměl vůli nebo kompetence o sobě rozhodovat. Takové jednání, byť dobře myšlené, zbavuje nemocného lidské důstojnosti a dělá z něj oběť. Cílem psychoterapie je vrátit nemocnému autorství vlastního života. Tedy něco přesně opačného.

Nejen samotným nemocným však choroba komplikuje život. Nepříznivá situace se dotýká všech kolem a nejvíce zpravidla těch nejbližších osob. I ony mají svoje obavy, potřeby a očekávání, s chorobou spojená, a tak je psychoterapie šancí i pro ně. Zkoušce je vystaveno fungování nepsaných pravidel v rodině a nakonec ve všech vztazích. Jelikož se představy o tom, jak by kdo měl v takové situaci vlastně fungovat, u jednotlivých účastníků většinou liší, dochází ke krizím a přehodnocování vztahů zrovna v době, kdy by bylo žádoucí se o ně opřít jako o něco stabilního. Skutečnou pomocí může být v takovýchto chvílích rodinná terapie.

8 Pozitivní prostředí péče – cesta k bezpečí pacientů a sester jako téma ICN pro rok 2007.

Heřmanová J., Zvoníčková M.
3. lékařská fakulta UK Praha, Ústav pro lékařskou etiku a ošetřovatelství

12. květen, den narození Florence Nightingale, je dnem, kdy se slaví Mezinárodní den sester. ICN (Mezinárodní rada sester), která sdružuje národní sesterské asociace ze 120 zemí světa, u příležitosti tohoto dne pravidelně vydává tzv. Tool Kit (informační a akční balíček) s materiály na vybrané téma, které aktuálně ovlivňuje ošetřovatelství. V letošním roce má tato publikace název **Pozitivní prostředí péče: Kvalitní pracovní prostředí = kvalitní péče o pacienty**.

V úvodu se ICN zabývá problematikou nedostatku sester, který postihuje jak rozvinuté tak rozvojové země. Mezi hlavní důvody řadí na jedné straně migraci registrovaných sester z chudých oblastí světa do zemí s vyšším životním standardem, na straně druhé nespokojenost sester v rozvinutých zemích s pracovními podmínkami, nízkým statutem profese i rostoucí pocit ohrožení v důsledku nebezpečných faktorů pracoviště a častějších verbálních či fyzických útoků na zdravotníky. Uvádí se, že „nezdravé pracovní prostředí“ – velká pracovní zátěž, přesčasy, nízký profesionální statut, složité vztahy na pracovišti, problémy při vykonávání profesionálních rolí a množství zdravotních rizik – má dopad na tělesné i duševní zdraví sester. Od vystresovaných a unavených sester se však očekává, že budou poskytovat vysoce kvalitní péči.

Podle ICN vede cesta ke zvyšování kvality přes zlepšení podmínek, ve kterých se ošetřovatelská péče poskytuje a větší spokojenost sester s volbou svého povolání. Jako příklad uvádí takzvané *„Magnet Hospitals“*. Nemocnice se takto označují proto, že jsou schopny přilákat a udržet vysoce kvalifikované sestry a dlouhodobě poskytují kvalitní péči. Pokud chce zdravotnické zařízení získat kredit „Magnet Hospital“, musí splňovat určitá kritéria, která zdůrazňují koncept autonomie a zapojení sester do definování svého pracovního prostředí. Také se posiluje význam potřeby základního a dalšího vzdělávání, jež je nezbytné pro poskytování kvalitní péče.

Jaká je tedy **charakteristika pozitivního prostředí péče**?

V posledním desetiletí se vynořilo několik modelů, které lze aplikovat na prostředí, ve kterém sestry pracují. Jedním z nich je Kristensens model sociální a psychické pohody, který kombinuje šest stresorů, jež se mohou vztahovat jak na jedince tak na celou organizaci. Podle Kristensen k udržení pohody jsou nutné tyto faktory:

- pracovní požadavky, které odpovídají možnostem pracovníka (bez vysokého pracovního tlaku)
- jistá budoucnost (stálá práce a bezpečné prostředí)
- sociální podpora ze strany kolegů a nadřízených a zajištěný přístup ke vzdělávání, příležitost k profesionálnímu rozvoji (týmová práce, studijní volno)
- smysluplná práce (profesionální identita)
- vliv při rozhodování (autonomie, spolurozhodování při sestavování služeb, leadership)
- ohodnocení odpovídající vynaloženému úsilí (plat, uznání, odměny)

V druhé části dokumentu ICN nabízí konkrétní návody na to, jak mohou sestry zvýšit bezpečnost prostředí i samotné poskytované péče. Hlavními tématy jsou posouzení bezpečí na pracovišti, ochrana personálu před následky poranění jehlou a jinými ostrými předměty, ochrana před hepatitidou B a C, bezpečí pacientů, zneužívání sester a násilí ve zdravotnictví, nemoci z povolání.

Součástí prezentace budou příklady z praxe a interakce s publikem, zamyslíme se nad situací na pracovištích v našich nemocnicích.

International Council of Nursing, *Positive Practice Environments: Quality workplaces = Quality Patient Care*. ICN. Geneva, 2007. ISBN 92-95040-80-5

9 Identifikace pacienta, cesta k bezpečné péči.

Kocourková J., Vorlíčková H.
Masarykův onkologický ústav, Brno

V dnešním zdravotnictví, které disponuje neuvěřitelně rozvinutými technickými prostředky a novými zdokonalenými léčebnými postupy, se stále více ukazuje potřeba zabývat se tím, co je součástí lidské přirozenosti, obyčejnou lidskou chybou. Stránky novin rychle zaplňují zprávy o nových přístrojích, lékařských technikách a výsledcích vysoce specializovaných týmů. K modernímu zdravotnictví totiž patří pohled i z úplně opačné strany, z hlediska pacientů, kteří byli hospitalizováni třeba jen kvůli banálnímu výkonu a z nemocnice se vracejí poškození chybou zdravotníků. Chyba není často záležitostí jednotlivce a trest pro chybujícího jedince není řešením. Při zjištění pochybení, které může pacienta poškodit, se naopak musíme vždy ptát, zda není

chyba v systému, zda není možné zažité postupy změnit tak, aby se snížila pravděpodobnost dalšího pochybení na minimum. Preventabilní pochybení jsou centrem zájmu odborníků na kvalitu a bezpečnost péče.

Bezpečnost zdravotnického zařízení je zásadním měřítkem kvality poskytované zdravotní péče a její monitorování je nikdy nekončícím procesem. Jedny z nejzávažnějších chyb s často fatálními následky jsou pochybení spojená se špatnou identifikaci pacienta. Ty nejhorší případy jsou medializovány a dramaticky se snižuje prestiž zdravotnického zařízení. Jednoznačná identifikace pacienta je jedinou možnou prevenci záměny pacientů, zvláště v situacích, kdy není možno ověřit totožnost dotazem. Používání Identifikačních náramků u pacientů samy o sobě opatřením snižujícím riziko záměny. Identifikační náramky, které jsou nosičem čárového kódu a nebo čipu jsou prostředky, které snižují riziko záměny pacienta. Projekt identifikace pacientů v Masarykově onkologickém ústavu pomocí náramků byl zahájen na podzim roku 2005 a plošné zavedení používání náramků bylo od ledna 2006.

K realizaci zdravotní péče v nemocnici orientované na nemocného, musí být zaveden informační a dokumentační systém, ve kterém je chronologicky zachycen průběh poskytnuté zdravotní péče.

Systém je, při pracovně specifické a organizačně náročné práci ošetřovatelského týmu pracujícího ve směnách, základem a zárukou pro plánované, nepřetržité, cílené, proveditelné a přehledné ošetřovatelské výkony. Kvalitní vedení ošetřovatelské dokumentace je odrazem úrovně profesionální praxe. Správné, vhodné a efektivní vedení dokumentace je vizitkou kvalifikovaného odborníka, naopak nedbale vedená a neúplná dokumentace často skrývá i širší problémy praxe určitého jednotlivce nebo zdravotnického zařízení.

10 Projekt sledování pádů pacientů.

Vorlíčková H., Kocourková J., Konečná E., Komínek J.,
Masarykův onkologický ústav, Brno

Zajištění bezpečné péče a bezpečného prostředí pro pacienty je hlavní prioritou našeho zařízení. K úspěšnému dosažení tohoto cíle je zapotřebí pomoc nemocnému při ochraně před nebezpečím pocházejícím od nemocného a zajistit rychlé hlášení mimořádných událostí, jejich efektivní šetření a smysluplné vyhodnocení.

Součástí základní ošetřovatelské péče je pomáhat pacientovi, aby se chránil před mechanickým poraněním, jakým je např. poranění v důsledku pádu.

Management mimořádných událostí je důležitou součástí programu kontinuálního zvyšování kvality a tento program je v oblasti řízené péče součástí managementu rizik.

Metodika

Systematické monitorování kvality péče a příprava Masarykova onkologického ústavu na Joint Commission International (JCI) akreditační řízení tomuto problému dodaly váhu. Od roku 2004 probíhá v Masarykově onkologickém ústavu (MOÚ) projekt zaměřený na sledování rizikových pacientů a pádů. Do projektu sledování pádů pacientů jsou zařazena všechna pracoviště MOÚ.

Sestra provede při příjmu a během hospitalizace vyhodnocení pacienta, posouzení a stanovení rizika pádu. Cílem prevence pádů pacientů a tím i předcházení jejich možných následných zranění.

Nástroj pro určení rizika pádu pacienta, který v našem zařízení používáme obsahuje aktivitu, vyprazdňování, rizikové léky, smyslové poruchy a věk. Jednoduchý screeningový nástroj pro učení rizika pádu je počítačový program, kterým se vypočítá rizikové skóre pádu a sestra na základě standardu navrhne následnou intervenci.

Výsledky za rok 2006

Celkem hospitalizováno za rok 2006:	**10252**
Celkem hospitalizováno pacientů ve věku 65 let a více:	**3284**
Počet pádů:	**126**
Podíl pacientů ve věku 65 let a více na celkový počet pacientů:	**32,03**
Podíl pádů na počet: pacientů ve věku 65 let a více v %:	3,84
Podíl zranění na počet pádů pacientů v %:	59,52

Indikátor kvality péče (podíl pádů na 1000 ošetřovacích dnů): počet pádů na 1000 ošetřovací den je 0,95

Počty pacientů v riziku rok 2006:	**8858**
Bez rizika:	2954
Nízké riziko:	4040
Střední riziko:	1402
Vysoké riziko:	462

Závěr

Prostřednictvím prevalenčních šetření se daří sledovat situaci na odděleních, kde předpokládáme výskyt pádů. Sledování rizikových pacientů a hlášení pádů z jednotlivých odděleních stimuluje ošetřující personál k udržení vysoké úrovně péče o ně. Pád s poraněním i bez poranění znamená pro sestry riziko obvinění z nedostatečné péče. Od roku 2006 se naše zařízení zapojilo do projektu, který probíhá v České republice – sledování pádů.

Čím lepší je ošetřovatelská péče, která je nemocnému poskytována, tím menší je pravděpodobnost, že se u takového pacienta bude muset použít fyzické omezení. Omezujících prostředků je třeba se pokud možno vyvarovat. Jedná se o velkou výzvu pro ošetřovatelský management, aby nejen jasně formulovala cíle ošetřovatelské péče, ale zejména aby vytvořil takové pracovní podmínky sestrám, aby tyto cíle mohly uplatňovat.

II.
Vzdělávání v onkologii

11 Adekvátní pregraduální edukace a orientace v onkologii – imperativ moderní medicíny.

Macháček J.
Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Závažnost onkologické problematiky v ČR stoupá se stále rostoucí incidencí zhoubných nádorů (ZN) a vysokými počty úmrtnosti. Dosud neuspokojivé výsledky léčby jsou podmíněny několika faktory. Prvním z nich je dosavadní neznalost konkrétních příčin onemocnění a rozdílná biologická aktivita nádorů. Ta bývá značně proměnlivá jak ve svém celku, tak v rámci určitého typu a také v čase, v němž nádor prodělává svůj vývoj. Je to oblast, kterou dosud medicína není schopna náležitě ovlivnit.

Druhým faktorem jsou lidé, pacienti samotní, jejich chování, přístup k preventivním opatřením, zejména pak k sekundární prevenci, tedy k včasné diagnostice nemoci. Přes stálé osvětové působení přetrvává v populaci mylná představa, ba až mýty, o nevyléčitelnosti rakoviny. Strach z takto vnímaného onemocnění místo rychlého vyhledání lékaře pak paradoxně nutí pacienta k odkládání návštěvy zdravotnického zařízení a tím přispívá k časové ztrátě, kterou mnohdy již nelze dohnat.

Třetím a pro nás v podstatě nejzávažnějším faktorem zpožďujícím správnou diagnózu onkologického onemocnění je podíl medicínsko-zdravotnický. Kromě některých organizačních opatření (dlouhé čekací doby na vyšetření, na výsledky atd.)způsobujících průtahy v diagnostickém procesu, to ale nejčastěji bývá i neadekvátní postup lékaře, jeho neodpovídající onkologická informovanost, zastaralé náhledy na onkologickou problematiku a nedostatečně formované přesvědčení profesionála, že nádorové choroby jsou ve své podstatě nejen léčitelné, ale i trvale vyléčitelné.

Příčin vyvolávajících obecně negativní pohledy lékařů na onkologickou problematiku může být více. Jednou z nepopiratelných je přílišný vliv nedobrých zkušeností v onkologii v průběhu vlastní lékařovy praxe, daný i tím, že pozitivní výsledky jdou často mimo něj. S opravdu úspěšně léčenými pacienty se setkává spíše onkolog-specialista. Jinou a zřejmě v pořadí první závažnou příčinu představuje samotná výchova mediků v oblasti onkologie během studia medicíny. K tomu nutno dodat, že významné procento lékařů, i když starších, avšak stále aktivních, onkologii na lékařských fakultách studovalo jen okrajově, s nezbytným dřívějším pesimistickým nádechem. Avšak i současní studenti medicíny při dotazníkovém průzkumu o možnostech obecné úspěšnosti léčby ZN vyjadřují své vlastní, v podstatě pesimistické představy při očekávání úspěchu léčby jen u 10-25%, což jsou méně než poloviční čísla proti reálným 40-50 procentům.

Základem úspěšnosti onkologické léčby dnes je a zřejmě ještě dlouho bude včasná diagnostika a zahájení léčení v počátečním, časném stadiu nemoci. Lékařské znalosti významu včasné diagnostiky, způsobů a důsledků terapie, úkolů v doléčování, rehabilitaci a dispenzarizaci, nutnosti a důslednosti plnění povinnosti onkologického hlášení, často zatím nevykazují žádoucí úroveň. Také informovanost lékaře o léčebných výsledcích u onkologických nemocných je obecně neuspokojivá a více méně zkreslená. Pokud lékařova představa, jeho přesvědčení je výrazně pesimistické s ohledem na možnosti vyléčení, pak jeho medicínský postup, zejména v diagnostické sféře, nemůže mít tu žádoucí aktivitu a intenzitu, kterou si akutní choroba-zhoubný nádor-zaslouží. Časová ztráta v diagnostické sféře je mnohdy, ba většinou, již nedostižitelná a ve značné míře rozhoduje o způsobu léčby, její náročnosti medicínské, zatěžuje pacienta, stanovuje úroveň a míry jeho trpělivosti a strádání, jeho konečný osud a samozřejmě i finanční náklady.

Zpoždění v diagnostickém procesu zaviněné lékařem je definováno jako interval mezi dobou, kdy pacient poprvé navštíví lékaře pro obtíže či jiné známky nemoci nebo také v rámci preventivní kontroly a momentem, kdy je diagnóza nádoru potvrzena. Pacienti nepřichází zpravidla k lékaři specialistovi-onkologovi, ale k praktickému, závodnímu lékaři, ke gynekologovi nebo jinému specialistovi (interní, chirurg, ORL, stomatolog, atd.) v terénním zdravotnickém zařízení. Proto již zde u každého lékaře v prvním styku s nemocnými je zřejmá potřeba solidních aktuálních onkologických znalostí a onkologické ostražitosti – jinak řečeno každý takový lékař musí disponovat informacemi o symptomatologii a diagnostice časných forem maligních onemocnění, prekancerozních stavů, metod léčby. Lékař má znát a zvažovat možnosti atypického, komplikovaného či skrytého průběhu onkologického onemocnění. V souhrnu jde o cílenou snahu stanovit nebo alespoň přispět ke stanovení diagnózy a k zajištění léčby v co nejkratší době.

Mnohé chyby a zpoždění v diagnostickém procesu, ve včasné diagnóze, tomto trvalém základu našich úspěchů či neúspěchů, často spočívají právě na nedostatečné orientaci v nádorové problematice, onkologické vzdělanosti lékařů, na nepatřičném negativním vnitřním přesvědčení, pasivním postoji k onkologickým chorobám. Příčiny nedostatků je nutno hledat v několika oblastech a zdrojích. Zcela logicky je v prvé řadě nutno zmínit pregraduální výchovu mediků na lékařských fakultách.

V pregraduálním studiu je dnes již koncipována a do studijního programu zařazena výuka klinické onkologie. Počet hodin se však na jednotlivých fakultách dosti značně různí a vesměs se pohybuje v malých číslech. Jednotlivé ústavy a kliniky sice přednášejí onkologické kapitoly svých oborů, ale většinou chybí syntetizující prvky, mezioborová návaznost a integrace. Multidisciplinární povaha onkologie tak mnohdy snadno vede k roztříštěnému nabývání vědomostí. Také teoretické a praktické znalosti nejsou v procesu výuky dostatečně sladěny. Základní poznatky obecné onkologie prvních létech studia by měly být shrnuty, v některých případech rozšířeny či zdůrazněny. Jistě velkým pozitivem je, že dřívější, avšak ne tak dávný systém „letmé“ výuky onkologických problémů v předmětu radiologie, nukleární medicína, radioterapie byl již vystřídán klinickou a radiační onkologií Počet hodin v klinické a radiační onkologii však nestačí pokrýt ani základní rozsah vědomostí požadovaných u lékařů jako onkologické minimum. Vytvoření patřičné představy o nezastupitelné nutnosti včasné diagnostiky, o léčebných možnostech

v onkologii a jejich důsledcích je takto ztěží možné, o vypěstování správného medicínského a lidského přístupu k onkologickým nemocným už ani nemluvě.

Nedostatky z pregraduální výchovy se později v dalším profesním životě lékaře mnohdy jen těžko dohánějí a projevují se nepříznivě opět především ve sféře časné diagnostiky, tedy tam kde se rozhoduje o dalším vývoji choroby a osudu nemocných. Jestliže opakovaně stále zdůrazňujeme, že zpřesnění a zrychlení diagnostického procesu je alfou a omegou pro léčebný výsledek, pak je také třeba přesvědčit studenty medicíny a budoucí lékaře o reálné kurabilitě nádorových chorob a čím je tato skutečnost podmíněna. Vzhledem k tomu, že onkologická onemocnění jsou velmi častá, dá se očekávat, že téměř každý medik má již nějaké i osobní zkušenosti nebo zážitky se zhoubným nádorem již před vstupem na lékařskou fakultu, a to ať již prostřednictvím někoho ze své přízně, svých rodinných známých, sousedů apod. Takové, ještě před vlastním studiem nebo v jeho průběhu, vnímání maligní choroby, nezřídka fatální, může buď stimulovat další, hlubší zájem studenta o tato onemocnění nebo častěji právě naopak, navodí trvalou skepsi. Většina uchazečů o studium lékařství si zvolí medicínu jako profesi, v níž si přejí lidem pomáhat nebo lépe řečeno je léčit. Protože cílem léčby má být v prvé řadě vyléčení nemoci, pak oblast medicíny, která se ve značné míře zabývá pacienty chronickými, považovanými a priori za inkurabilní, nemá nebo nemusí mít pro budoucí lékaře tu patřičnou přitažlivost. Takovýto už zmíněný více méně negativní postoj, se kterým student může již na fakultu přicházet, bývá bohužel někdy dále posílen i v průběhu studia a to jak v praktické tak v klinické části.

Jedním z důležitých předmětů, kde se studující medicíny poprvé vážně setkává se zhoubnými nádory je patologická anatomie a pitevna. Předchozí vnímání zhoubného nádoru jako nevyhnutelně fatální nemoci může být při sekci onkologického pacienta spíše utvrzeno. Také názory patologů k prognóze pacientů se zhoubným nádorem bývají nezřídka spíše pesimistické, zvláště ve světle ještě stále neuspokojivých výsledků a pomalého pokroku současné protinádorové terapie. I v dalších preklinických předmětech jako např. farmakologie, imunologie atd., se student sice dozvídá o protinádorových lécích, ale i o jejich nedostatečné účinnosti pro trvalé vyléčení choroby. Rovněž nihilistické, skeptické poznámky a náhledy některých členů lékařského sboru, i když se onkologickými nemocnými zabývají spíše okrajově a nejsou vyjádřeny přímo a otevřeně, jsou studenty velmi citlivě vnímány.

V klinické části studia získávané zkušenosti s onkologickými chorobami pocházejí především od hospitalizovaných, často těžce nemocných, mnohdy i terminálních. Vystavení medika těmto zkušenostem a zážitkům pak posiluje asociace mezi nádorem a neradostným koncem, marností léčby a umíráním. Optimistického onkologického pohledu medika sotva dosáhne na interních odděleních (a tam stráví značnou část svého stážovacího času), kde přichází do styku s onkologickými nemocnými, léčenými buď symptomaticky nebo s chroniky se systémovými chorobami, hemoblastózami, u nichž konečná perspektiva je dosud dost tristní. Také praxe na klinikách TRN, kde po onkologické stránce se setkávají převážně s paliativně nebo symptomaticky léčenými bronchiálními karcinomy, nemůže v medikovi vzbudit optimismus a podpořit názor, že onkologické choroby jsou také kurativně zvládnutelné. Zmíněné zkušenosti pak logicky spíše dál utvrzují skepsi, konec konců dodnes mezi zdravotníky dosti rozšířenou, a představy, že onkologická onemocnění jsou vlastně nevyléčitelná se tradují dál. S takovým přesvědčením a názory budou mladí začínající lékaři a později odborníci sotva brát vážně slova o nutnosti co nejrychlejší diagnózy. Nevyhnutelným důsledkem je pak i dnešní skutečnost, že počty nemocných s pokročilými, pozdě rozpoznanými a tudíž již zřídka kurativně ovlivnitelnými klinickými stadii, stále stoupají. Proto je třeba, aby už pregraduální výuka onkologie, jak v obecné tak klinické části, a zejména tam kde student může získat optimističtější náhled, byla akcentována a rozšířena, cíleně pozitivně integrována, změněna jak kvalitativně tak i kvantitativně. Studentům je nutno předvádět především optimistické, reálně pozitivní výsledky, poukazovat na příčiny neúspěšné léčby, demonstrovat způsoby hledání a odstraňování nedostatků. Spolu se zvyšováním úrovně komplexních znalostí a orientace v onkologické problematice musíme pomáhat budovat nové pozitivní přesvědčení a aktivizovat osobní odborné vědomí pro úspěšný boj se zákeřným nepřítelem-nádorovou nemocí. K tomu je bezpodmínečně zapotřebí spojit síly jednotlivých oborů a postupně začít pracovat na vytváření nové koncepce onkologické výuky v rámci LF a FN. Ve spolupráci s novými Komplexními Onkologickými Centry hledat způsoby ke vzájemné návaznosti předávaných znalostí a poznatků uvnitř a mezi jednotlivými specializacemi, usilovat o racionální a efektivní vzájemnou koordinaci. Velmi významná při sestavování takového náročného programu by měla být i účast, pomoc, porozumění odborných společností JEP. Podporu nutno hledat i u Lékařské komory a v neposlední řadě u Ministerstva školství a zdravotnictví.

Přes značné pokroky v jednotlivých onkologických disciplinách i v onkologii jako celku se doposud nepodařilo, a to i v těch nejvyspělejších státech, dosáhnout trvalého vyléčení u více jak poloviny postižených. S dosažením takových výsledků se však počítá již v tomto desetiletí. Předpokládá to nejen pokroky v diagnostice a léčbě, ale i to co zde zdůrazňujeme, tedy zvýšení úrovně edukace, informovanosti i onkologických znalostí mediků a začínajících lékařů.

12 Potřeba strukturovaného a otevřeného specializačního vzdělávání v onkologii.

Žaloudík J.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Zákon 95/2004 o specializačním vzdělávání lékařů a farmaceutů je špatný. Pokud by se ho snad podařilo naplnit, nastavil by na dlouhou dobu novou etapu omezenosti v lékařském vzdělávání. Pro svou nepromyšlenost a nepřipravenost se ho naštěstí nepodařilo uvést v život ani v přípravném dvouletém období 2004-2006, ani od dubna 2006 dosud, tedy již rok po jeho formální úplné platnosti. Zasluhuje rychlou nouzovou novelizaci a perspektivně zcela novou podobu. Nepotkal jsem zatím nikoho, kdo by tento zákon hájil jako dobrý a ve své současné podobě realizovatelný. Nehlásí se k němu ani jeho garanti a autoři snad s odvoláním, že jde o zákonodárnost kolektivní.

Všichni zajisté zákony respektujeme. Bohužel i ty špatné. Uvádíme se tak občas do kolektivní schizofrenie naplňování nenaplnitelného zákona či respektování zákona, k němuž nechováme respekt. Špatným vzdělávacím zákonem uvádíme do obtížné situace nyní především mladé kolegy. Sami tiše vzpomínáme na doby, kdy my starší jsme se specializačním vzděláváním tolik problémů neměli. Šlo o dvoustupňový atestační systém s možností dalších nadstavbových atestací, celoživotně otevřený, poměrně funkční i flexibilní. Plné tři roky jsme už propásli ignorancí, taktizováním, žvaněním a administrativními tanečky. Patří k našemu národnímu údělu vymýšlet sami na sebe nemoudré zákony a pak je s nasazením všech intelektuálních sil vykládat do podoby, která se dá aspoň přežít.

Zákon 95/2004 i se svým euronevídaným seznamem 83 oborů, v nichž se lékaři mohou specializovat, však zatím platí. Jeho kýžená novelizace se může nakonec také zvrhnout. Navíc není v některých oborech dosud prodiskutováno a vyřešeno jakou podobu vzdělávání vlastně potřebují a k jakému obrazu, účelu a prospěchu má být adept vychován. Je mi osobně velmi líto, že k těmto oborům patří také onkologie, byť se mnozí tváří, že všechno je jasné. Není a bohužel nebylo ani v minulosti. Jen je to s novým zákonem ještě horší.

Podle Zákona 95/2004 lze získat specializační kvalifikaci v oborech klinická onkologie, dětská onkologie a radiační onkologie. Do specializačních vzdělávacích programů se vstupuje bez prerekvizit, prakticky hned po promoci. Rovnýma nohama do specializace či dokonce superspecializace.

Komentář je možná dobré začít lékařským tajemstvím, jakkoli zní kacířsky, že totiž klinická onkologie není obor. Tento název oboru u nás postupně vznikl žonglováním s termíny „clinical oncology“ a „medical oncology“. Pravým obsahem našeho „oboru“ klinická onkologie je ovšem „interní onkologie“. Zcizení názvu klinická onkologie pro onkologicky profilované internisty zabývající se chemoterapií nádorových onemocnění, tedy adjuvantní a paliativní medikamentózní léčbou solidních nádorů a jejich systémových komplikací je podstatou zmatení jazyků i vytěsněním účasti oborů jiných za rámec klinické onkologie.

Klinická onkologie není obor, nýbrž označení nutného multidisciplinárního rámce oborové součinnosti v diagnostice, léčbě, dispenzarizaci i prevenci nádorových onemocnění. Zahrnuje obory chirurgické, radioterapii, interní obory včetně specialistů na chemoterapii, ovšem i obory diagnostické. Teprve jejich provázanost v péči o onkologicky nemocné vytváří rámec klinické onkologie, kterým samozřejmě rozumíme nejen práci v lůžkových zařízeních, nýbrž i činnosti ambulantní. Přídavné jméno „klinická“ je pro praxi vlastně abundantní a měla se snad pouze vymezit proti onkologii experimentální. Z dobrých důvodů však v medicíně netrváme na označeních klinická chirurgie, klinická gynekologie, klinická pediatrie, klinická urologie, klinická revmatologie a tak dále. Že by už zbyla coby klinická jen onkologie? Nikoli. Je to jen klamné české označení pro interní onkologii čili pro *medical oncology*.

Označení oboru „klinická“ onkologie tolik nevadilo v dřívějším atestačním systému, kdy šlo o nadstavbovou atestaci, kterou mohli získat erudovaní internisté, pediatři, ovšem i specialisté z chirurgických oborů, kteří se v rámci svého základního oboru a kompetencí profilovali na léčbu nádorových onemocnění. Předmětem vzdělávání a zkoušek byla kromě základních znalostí z biologie, patologie, klasifikace a obecných diagnosticko-léčebných strategií zejména chemoterapie nádorových onemocnění a léčba komplikací h chemoterapií způsobených. Examinátory byli interně profilovaní onkologové, obvykle s participací radiačních onkologů v komisi. Nebylo to úplně dokonalé, ale akceptovatelné, protože adepti z chirurgických oborů přicházeli s již zažitou znalostí onkochirurgické problematiky a obzor si rozšiřovali spíše jen v oblasti konzervativní léčby. Pouze hrozilo pouze, že adepti z interních oborů si nerozšíří obzor směrem do onkochirurgické problematiky. Pro praxi to nebylo ani potřeba, indikačně se spoléhalo na zdůrazňovanou multidisciplinární součinnost.

Teoreticky prý také hrozilo, že se nekritický chirurg, vybavený nadstavbovou atestací z klinické onkologie, pustí třeba do chemoterapie lymfomů jak tomu snad byl formálně oprávněn. Lékaři jsou však lidé převážně rozumní a já sám o takových ambicích ani příkladu nevím. Stejně tak nevím, že by se třeba někdo z hematoonkologů pouštěl do operační léčby nádorů, byť jde rovněž o metody onkologické léčby.

V posledních letech platnosti starého vzdělávacího zákona se diskutovalo o možnosti funkční nadstavbové atestace z onkologie pro zájemce z chirurgických oborů s vymezením oblasti jejich profilace, tedy obecně onkochirurgické, onkourologické či onkogynekologické. Ne snad proto, aby tito specialisté nezačali rozšafně léčit leukémie, ale zejména proto, aby v jejich zkušebních komisích participovali také příslušně profilovaní odborníci z chirurgických oborů a o tématech se hovořilo vskutku komplexně, tedy ve smyslu skutečné klinické onkologie.

Po léta dřímala určitá kompetenční tenze mezi internisty-chemoterapeuty atestovanými z klinické onkologie a radioterapeuty atestovanými v oboru radioterapie, jehož náplní byla rovněž chemoterapie se zdůvodněním, že jde o součást onkologické léčby, například kombinované chemoradioterapie. Měli jsme tedy, a dodnes máme, několik skupin kvalifikovaných lékařů aplikujících protinádorovou chemoterapii u solidních nádorů. Lékaře atestované v oboru klinická onkologie, lékaře atestované v oboru radioterapie, nemnohé lékaře s atestací v obou těchto oborech. A pak ovšem lékaře atestované z pouze gynekologie, urologie či pneumologie i dalších oborů, kteří ovšem protinádorovou chemoterapii indikovali a aplikovali v praxi rovněž. Někteří z nich pod vlivem tlaků či hledání kvalifikačních jistot úspěšně absolvovali onu nadstavovou atestaci z klinické onkologie, byť jejich aspirací nebylo překročit hranice svého oboru směrem k jiným nádorovým diagnózám. Takový byl stav onkologického vzdělávání pokud jde o solidní nádory a ten dosud určuje současnou kvalifikační základnu specialistů v onkologii.

Samostatně se vyvíjeli specialisté v hematoonkologii, kombinující zpravidla vzdělání interní, hematologické a případně i v klinické onkologii, ovšem bez aspirací věnovat se solidním nádorům. V hematoonkologii se stále více projevoval koordinační a garanční vliv oboru hematologie než oné širokospektré klinické onkologie. Podobně tomu bylo a je v dětské onkologii, kde máme pediatrické specialisty profilované v onkologii, zpravidla také s atestací z klinické onkologie, ale zase bez ambicí léčit dospělé onkologické pacienty.

Popsaný stav minulých desetiletí jasně ukazuje, že vzdělávání v onkologii byl a zůstane složitě strukturovaný problém. Nicméně to byl vzdělávací systém funkční, schopný vývoje a produkující vesměs kvalitní odborníky, protože onkologie byla pojata jako nadstavbový obor, do něhož už vstupovali lékaři již kvalifikovaní v základních oborech.

Teď máme zákonem daný systém jednostupňový, v němž klinická (respektive interní) onkologie, radiační onkologie a dětská onkologie jsou ustanoveny obory základními, jedinými a z hlediska vzdělávaného adepta konečnými. *Naprosto skončila jakákoli možnost získání onkologické kvalifikace či certifikované profilace pro chirurgické obory.* Je to dáno především onou striktní jednostupňovostí. O zavedení specializačního oboru chirurgické onkologie nemá smysl usilovat, neboť jako neexistuje univerzální chirurg, tak neexistuje ani univerzální onkochirurg. Může existovat pouze onkologicky profilovaný chirurg, urolog, gynekolog, otorhinolaryngolog, neurochirurg. Pro svou profilaci, kvalifikaci a kompetenci však není schopen získat žádný certifikát. Kompetence operovat nádory bude mít jen jako součást náplně svého základního oboru.

To je samozřejmě krok zpět, kamsi do historie. V onkologii totiž neléčí jen operační výkon, záření či cytostatikum, ale také algoritmus a včasná diagnostika. Do výsledků péče se promítají algoritmus vyšetřovací, algoritmus a timing kombinací léčebných modalit, dispenzarizační režim, postupy v prevenci primární, sekundární i terciární. O všech těchto aspektech bude již s plnou kvalifikací přemýšlet a rozhodovat pouze klinický onkolog, radiační onkolog nebo dětský onkolog. Lékaři z chirurgických, ovšem také interních, oborů nebudou nadále moci kvalifikovaně hovořit do indikací a taktiky onkologické léčby, byť by péče o onkologicky nemocné tvořila i velkou nebo převážnou část jejich každodenní praxe.

Tato polemika by mohla být pokládána za pouhé rétorické cvičení, nebýt ovšem pasportizací a nasmlouvávání kompetencí a úhrad výkonů a činností zdravotními pojišťovami. Dříve či později začnou potíže, včetně sporů kompetenčních a odpovědnostních. Každý ponese jen tu svoji za svůj dílčí výkon. Komplexnost přístupu vypadne zcela a v lepších zařízeních ji budou možná substituovat komise. Čeká nás komisionální onkologie ultraspecialistů s univerzálním klinickým onkologem (už ne ani internistou) jako předsedou podniku. Uplný absurdistan pro rozhodování nad pacientem snad doufejme nehrozí, protože v lokálních podmínkách si rozum zpravidla najde cestu, ať již v souladu se špatnými pravidly či mimo ně.

Poměrně nejlépe se v novém systému jednostupňové kvalifikační přípravy může dařit radiační onkologii, která prostě vzdělá adepty v léčbě zářením. Záření je užíváno v drtivé většině indikací k terapii nádorových onemocnění. Tento obor si nesporně stanovil i jakýsi rozsah kompetencí v chemoterapii, což bude či nebude předmětem dalších diskusí s klinickými onkology, nicméně samotná odbornost radiační onkologie tím neutrpí.

Žalostným produktem našeho monotématického vzdělávání v klinické onkologii bude ovšem podle nového zákona onen klinický onkolog. Odborník rychle vzniklý a dosud nevídaný, zcela nepodobný našim dosavadním váženým a zkušeným internistům, kteří se dále specializovali v péči o onkologicky nemocné a v chemoterapii nádorových onemocnění.

Z hlediska analýzy rizik je protinádorová chemoterapie vlastně řízená klinická toxikologie. Rizika, která přináší progrese nádoru jsou mnohdy v zájmu jeho poničení či pozastavení ještě násobena rizikem obligátní toxicity protinádorové medikamentosní léčby. Často se tak děje v terénu dalších interkurentních onemocnění. Tedy zpravidla problém pro zkušené internisty. Tím klinický onkolog nebude. Absolvuje prý snad jakýsi kmen interní průpravy spolu s jinými průpravami a poté se vydá už do širého světa onkologie, mozkovými nádory počínaje, rakovinou rekta konče. Nelze než přát mu hodně štěstí. Rozhodne o všem, máloco, kromě aplikace protinádorových medikamentů, však sám vyřeší. Asi ani vážnější léčbou indukované komplikace. Bude především shánět konzilia. Konzilium interní, intenzivistické, hematologické, gastroenterologické, chirurgické, urologické, gynekologické a další. Dokonce i konzilium paliativního specialisty, protože už máme také samostatný obor paliativní medicína. Absolventem je paliativní lékař, paliativec, paliatr, paliatolog, ani nevím. Konziliární svět, vzešlý z jeho vlastní limitace, z obav, z alibismu, pohltí nového klinického onkologa a promění ho v každodenního organizátora konzilií. Nepochybuji, že klinický onkolog bude ochotně zahrnován především případy pokročilých nádorových onemocnění a z tohoto úhlu pohledu začne nahlížet na takzvanou klinickou onkologii, na její smysl, cíle i strategii. Bude reprezentantem vidění klinické onkologie odzadu, s čímž se i tak celá desetiletí potýkáme a s novým zákonem už z toho nevybředneme. Nejméně dvě třetiny případů onkologické praxe budou však ve skutečnosti řešeny mimo kompetence tohoto klinického onkologa nové doby. A časný záchyt nádorových onemocnění jakbysmet. Klinického onkologa budou mít nesporně rády farmaceutické firmy a nejlépe časem udělá, když se uchýlí

k řídícím a koordinačním činnostem. Většina péče o dospělé onkologicky nemocné se solidními zhoubnými nádory se bude nadále odehrávat v rukou těch, kterým Zákon 95/2004 získání jakékoli nadstavbové onkologické kvalifikace jednou provždy odepřel.

Málokterý obor klade na zkušenosti a osobnost lékaře takové nároky jako dětská onkologie. Zkušený pediatr s onkologickou profilací je pro zdravotnictví poklad. Primárně rychle vzniklý dětský onkolog může být naopak osobou rizikovou. Snad se v nějaké zrychlené verzi s celou šíří pediatrie nějak seznámí než utone v protinádorové chemoterapii. Pediatrie je možná oblast kompaktnější, byť si pro Zákon 95/2004 vymyslela asi patnáct primárních superspecializací. Nějak si to asi pediatři vyřeší. Děti, doufejme, neutrpí. Nádorových onemocnění v dětském věku je naštěstí pouze jedna setina z počtu ve věku dospělém a kompetence dětských onkocenter je jasně definovaná na pár míst.

Specializovaní hematoonkologové zcela jistě nevzniknou z klinických onkologů, nýbrž na bázi oboru hematologie, který našich šest center v republice ovlivňuje více než širokospektrá onkologie. Definičně se tak hematoonkologové dostanou podobně jako chirurgové také mimo obor klinické onkologie. Budou to prostě hematologové. Asi nejsou spolu se svou oblasti leukémií a lymfomů dost „kliničtí“ ani dost onkologičtí.

Existuje vůbec východisko z tohoto pochmurného scénaře ? Jistě. Neprodlená novelizace Zákona 95/2004 tak, aby by otevřený a nebránil vícestupňovém specializačnímu vzdělávání. V samotné onkologické komunitě je už teď nutno rychle pracovat na skutečné definici cílů a potřeb specializačního vzdělávání v onkologické problematice ve strukturované a dostatečně flexibilní podobě. Kromě oborové šíře musí být v tomto řešení především respektována hlavně potřeba dvoustupňového vzdělávání, otevřeného i dalším nadstavbám a profilacím jak je praktické potřeby a vývoj medicíny přinesou. *Onkologie je typicky nadstavbová problematika nad obory základní, interní, chirurgické a brzy i diagnostické.*

Univerzální klinický onkolog neexistuje, klinická onkologie jako samostatný obor je fikce. Klinická onkologie je koncept víceoborové součinnosti. E pluribus unum, jak stojí psáno na dolarových bankovkách. Nadstavbovými obory pro širokou problematiku onkologie jsou interní onkologie, hematologická onkologie, dětská onkologie, chirurgická onkologie jako funkční nadstavbové specializace v rámci jednotlivých chirurgických oborů. Radiační onkologii čili radioterapii sluší statut oboru základního.

Máme v srpnovém věstníku z loňského roku uvedeno sedmnáct komplexních onkologických center pro solidní zhoubné nádory dospělých, jeden pozapomenutý specializovaný rezortní onkologický ústav, šest hematoonkologických center a dvě centra dětské onkologie. Zda tato účelná integrace onkologické péče bude celým zdravotnickým systémem respektována a pojišťovenským systémem nakonec i zohledněna je dosud zcela ve hvězdách. Je to však aspoň dostatečná základna pro strukturované onkologické specializační vzdělávání lékařů. Ovšem takových lékařů, kteří již zvládli základy oboru, v jehož rámci se hodlají onkologicky nemocným věnovat. Kapacity pro realizaci programů specializačního vzdělávání ani v onkologii nechybějí. Zatím chybí jen zákonodárný rozum.

13 Chirurgové a jejich vzdělávání v onkologii u nás a v zahraničí.

Duda M.
II.chirurgická klinika FN a LF UP Olomouc

Historie

Již počátky chirurgie jsou spojovány s bojem proti zhoubným nádorům. V egyptských papyrosech z roku 1700 je popisována destrukce rakoviny prsu kauterem. John Hunter (1728 – 1793), který je považován za otce moderní chirurgie popsal základní principy onkochirurgie, tj. nutnost odstranění nádoru spolu s lymfatickým povodím. Za jednoho z prvních onkochirurgů je možné považovat Theodora Billrotha z Vídně, který je znám především provedením parciální resekce žaludku pro karcinom v roce 1881. Teprve v roce 1896 Roentgen objevem „X“ paprsků položil základy radiační onkologie. Éra chemoterapie a hormonální terapie pak byla započata až objevy počátkem čtyřicátých let minulého století. V oblasti onkochirurgie se i světově přičítá jedna priorita českému chirurgovi Jiřímu Divišovi z Prahy za provedení první plicní resekce pro metastázu v roce 1927.

Výraz „chirurgická onkologie“ se začal užívat v šedesátých létech minulého století, ne však aby odlišil všeobecné chirurgy od onkochirurgů, nýbrž chirurgy od onkologů. Zatímco interní a radiační onkologie se rychle formovaly jako samostatné specializace, chirurgická onkologie se jen obtížně oddělovala od všeobecné chirurgie. Zkušení všeobecní chirurgové prováděli a dodnes provádějí většinu onkochirurgických operací a subspecializace, chirurgická onkologie, se omezila jen na velké, většinou univerzitní nemocnice. V USA vznikla první specializovaná univerzitní onkochirurgická klinika v polovině šedesátých let ve Virginii vedená dr. Waltrem Lawrencem (Division of Surgical Oncology at the Medical College of Virginia). Do roku 1986 vznikla obdobná oddělení na 38% univerzit v USA. Tento vývoj vedl v roce 1975 k založení onkochirurgické společnosti (The Society of Surgical Onkology – SSO). V roce 1978 pak tato společnost spolu s National Cancer Institute (NCI) definovala termín onkochirurg (surgical oncologist) a byly formulovány směrnice pro postgraduální výcvik v chirurgické onkologii. Později pak byly založeny další odborné společnosti s tímto zaměřením. The American Board of Surgery ustavil v roce 1998 Advisory Council for Surgical Oncology a ve stejném roce vznikla The American Colloge of Surgeons Oncology Group (ACOSOG).

Obdobný vývoj probíhal a probíhá i v Evropě, i když s jistým zpožděním. Eropská společnost pro chirurgickou onkologii byla založena v roce 1981 (European Society of Surgical Oncology – ESSO).

Na valné hromadě Spolku českých lékařů v Praze vznikl v roce 1903 návrh na ustanovení spolku, který by usiloval o zřízení sanatoria pro nemocné se zhoubnými nádory. V čele přípravného výboru stáli prof. V. Rubeška (gynekolog), prof. K. Maydl (chirurg) a doc. L. Syllaba (internista). Dne 18.11.1904 pak byl ustanoven „Spolek pro zkoumání a potírání rakoviny v Praze“ a do jeho čela byl zvolen prof. Rubeška. Později ho ve vedení spolku vystřídali prof. J. Hlava (patolog) a po roce 1918 chirurg prof. R. Jedlička. Z iniciativy spolku byl v roce 1936 otevřen v Praze první specializovaný onkologický ústav (dnešní Ústav radiační onkologie Na Bulovce). Pobočky tohoto spolku vznikaly i v dalších městech. V Brně existoval od roku 1928 obdobný spolek pod názvem „Dům útěchy“, který z iniciativy chirurga prim. J. Bakeše usiloval o zřízení specializovaného vědeckého a léčebného ústavu pro nemocné se zhoubnými nádory v Brně. Zařízení, které dnes nese jméno Masarykův onkologický ústav, se podařilo vybudovat v letech 1933 – 1935. Slibně se rozvíjející onkologické aktivity po druhé světové válce byly přerušeny politickými událostmi v roce 1948. V roce 1952 došlo k transformaci spolku na Kancerologickou sekci nově vzniklé Československé společnosti J. E. Purkyně. Společnost se postupně profilovala jako radiologická a v roce 1969 se rozdělila na radioterapeutickou a onkologickou. I když byl trvale proklamován komplexní pohled na onkologii, chirurgové se z těžko pochopitelných důvodů ani v následujících desetiletích na činnosti onkologické společnosti významněji nepodíleli a tato situace s malými výjimkami trvá do dnešních dnů.

Současnost

V současnosti existuje několik desítek národních a mezinárodních společností sdružujících zájemce o problematiku onkochirurgie. Sekce onkochirurgie při České onkologické společnosti (Czech Section of Surgical Oncology) se od svého vzniku v roce 2002 stala členem Světové federace onkochirurgických společností (World Federation of Surgical Oncology Societies), t.č. se sídlem v Rio de Janeiru v Brazílii. V Evropě existují různá specializovaná onkochirurgická pracoviště a řada klinik, zejména v Německu, ve svém názvu tuto specializaci uvádí, např. Klinika pro chirurgii a chirurgickou onkologii. V ČR existuje prakticky jediný specializovaný ústav s dlouholetou tradicí se zaměřením na onkologii a onkochirurgii – Masarykův onkologický ústav Brno. Jinak se onkochirurgické operace v různém rozsahu provádějí prakticky na všech chirurgických pracovištích, aniž by to bylo deklarováno v jejich názvu.

Onkochirurgie

Lékařským oborem, resp. vědní disciplinou zabývající se studiem nádorů a všestrannou péčí o nemocné s nádorovými onemocněními je onkologie. Řeší tuto problematiku z nejrůznějších aspektů a je proto oborem multidisciplinárním. Problematika související s klinickou praxí tj. především diagnostika a léčba nádorů se označuje jako klinická onkologie. Jejími základními pilíři jsou chirurgická onkologie (onkochirurgie), radiační onkologie, interní onkologie (chemoterapie) a k nim přistupují diagnostické obory. Přestože se chirurgové podílejí na všech fázích diagnosticko-léčebného procesu a význam chirurgické léčby u většiny solidních nádorů je naprosto zásadní, neodpovídá to postavení chirurgie v rámci onkologie. Je to nepochybně i vinou vlastní neochoty či nezájmu chirurgů přebírat více odpovědnosti za osud onkologických nemocných v rámci jejich specializace a šířeji se angažovat v onkologii. Role klinického onkologa byla u nás historickým vývojem přisouzena specialistům z interní onkologie a jim také podle současné koncepce onkologie a specializační průpravy přísluší oficiálně koordinační a integrační a tím i vedoucí role v řízení týmů pečujících o onkologicky nemocné. Chirurgové v intencích hesla „Salus aegroti suprema lex esto“ respektují, že je třeba za největší prestiž považovat prospěch nemocného a v žádném případě neusilují o získání hegemonie v onkologii, už proto, že podstatou oboru chirurgie je týmová práce. Jde pouze o prosazení možnosti chirurgů vzdělávat se oficiálně v onkologii a profilovat se v onkochirurgii a být tak rovnocennými partnery ostatním odborníkům v klinické onkologii v oblasti, kterou se zabývají.

Onkochirurg (Surgical Oncologist)

Jde o zkušeného všeobecného chirurga, který má kvalifikaci a zkušenosti v dalších onkologických disciplinách a jeho podstatnou či hlavní pracovní náplní je práce v onkologii. Má vůdčí postavení v koordinaci práce všeobecných chirurgů a dalších specialistů v péči o onkologické nemocné za přísného respektování zásad kolegiální interdisciplinární spolupráce.

V Evropě i USA je chirurgická onkologie uznávanou subspecializací. Podle ESSO – evropské společnosti je ji možno získat jako základní specializaci v rámci šestiletého školení (2 roky všeobecné chirurgie a 4 roky školení v chirurgické onkologii), (www.esso-surgeonline.be). V USA jsou podmínky obdobné, ale postgraduální trénink je variabilnější a je možno kombinovat školení ve všeobecné chirurgii se získáním subspecializace v onkochirurgii (www.facs.cz).

Evropská náplň postgraduálního studia, která je velmi podrobně rozpracována, je k dispozici na internetu. Jsou požadovány podrobné teoretické i praktické znalosti z onkologie a onkochirurgie a velký počet provedených i náročných operací (např. 10 ezofagektomií, 10 duodenopankreatikoektomií, 20 resekcí jater atd.).

Postgraduální školení je nutno absolvovat v onkologických centrech, která jsou akreditována dle podmínek příslušných států. Musí zde být dobrá interdisciplinární spolupráce mezi chirurgy, radiačními a interními onkology, radiology, patology a výzkumnou základnou a chirurg se musí seznámit se všemi těmito oblastmi.

V našich podmínkách zatím oficiální program pro školení v onkochirurgii neexistuje a chirurgická léčba nádorů je začleněna do výuky všeobecné a speciální chirurgie. Abychom sledovali celosvětový trend, bylo by vhodné zařadit toto školení i jako nadstavbovou atestaci všeobecné chirurgie v délce 2 – 3 roky.

Síť onkologické péče v ČR – onkocentra

Koncepce hodnocení kvality v chirurgii dnes vychází z předpokladu, že se zvyšujícím se počtem výkonů (operací) stoupá i kvalita výsledků. Tuto koncepci „high-volum center" však není možné přijímat zcela bez výhrad. V ČR bylo ustanoveno 18 onkocenter (Věstník MZ částka 6, srpen 2006). Na tato pracoviště je nutno soustředit vybrané onkochirurgické operace a v oblasti, která s centrem spolupracuje, koordinovat práci dalších chirurgických oddělení s přihlédnutím k místním podmínkám a to zejména personálním a materiálním.

Pro chirurgy v onkocentrech se nepochybně onkochirurgie stane převažující částí jejich činnosti a daleko více než v minulosti tak vystoupí do popředí nutnost profilizace v této specializaci. Konstituování onkocenter je pro chirurgy příležitostí, aby se v péči o onkologicky nemocné vrátili na místo, které jim patří a Česká chirurgická společnost a Sekce onkochirurgie České onkologické společnosti v tom musí vyvinout iniciativu.

Prezentace onkochirurgie

Mediální prezentace onkochirurgie v laické veřejnosti, ale i v odborných medicínských kruzích je zcela nedostatečná a často až zavádějící. Chirurgie se nechala zatlačit, a to nejen v onkochirurgii, do postavení servisního ne-li řemeslného oboru, který by měl technicky dokonale provádět svěřené úkoly. Často slyšíme jaký typ a rozsah operace indikuje nechirurg, jako by indikace k operaci nebyla zcela výsadním právem a zodpovědností operatéra. Vina je však i na straně chirurgů, mnohdy v jejich nezájmu garantovat nemocnému něco víc než jen operaci. Chirurg se nemůže omezit jen na činnost na operačním sále, byť by byla sebe náročnější, ale musí být široce vzdělán a angažován v rozsahu své specializace. Je nezbytné vzkřísit a v život uvést požadavek našich učitelů, že „dobrý chirurg je operující internista".

Současné cíle

1. Dopracovat a podrobit diskusi náplň specializace z onkochirurgie. Koncipovat ji tak, aby byla rovnocennou kvalifikací se specializací klinická onkologie pro danou oblast chirurgie např. gastrointestinální, hrudní apod. a navrhnout toto doplnění v rámci novelizace do zákona o postgraduálním vzdělávání.
2. Požadovat zařazení základů onkochirurgie do atestační náplně klinické onkologie a účast chirurgů při těchto kvalifikačních atestacích.
3. Dopracovat a podrobit diskusi koncepci pracovní náplně a pravomoci ordináře pro onkochirurgii v rámci onkocenter případně dalších větších nemocnic. Prosadit tuto funkci okamžitě do činnosti onkocenter a výhledově do novelizované vyhlášky.
4. Prosazovat účast zástupců chirurgů při jednání o financování onkologie a onkocenter.

14 Postgraduální vzdělávání v radiační onkologii v České republice a zahraničí.

Petera J.
Klinika onkologie a radioterapie, FN a LF Hradec Králové

Základním dokumentem, o který se opírá specializační průprava v radiační onkologii v zemích Evropské unie, je „Recommended Curriculum for the Specialist Training of Medical Practitioners in Radiotherapy (Radiation Oncology) within Europe." Tento dokument je výsledkem několikaleté činnosti pracovní skupiny European Core Curriculum Working Party, pověřené European Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ESTRO) a European Board of Radiotherapy (EBR) harmonizací specializačního vzdělávání v radiační onkologii v zemích rozšiřující se Evropy. Cílem projektu je zajištění ekvivalentní odborné přípravy ve všech evropských zemích a umožnění v evropských právních normách zakotvené mobility pracovníků. Projekt byl podpořen programem Europe Against Cancer. 14. 12. 2002 představitelé národních odborných společností a radioterapeutických organizací z 35 evropských zemí nové curriculum radioterapie přijali. Evropské Core Curriculum je rovněž kompatibilní s Programme Requirements for Residency Education in Radiation Oncology publikovaným The American Board of Radiology. Odpovědnost za implementaci evropských standardů a zásad specializační průpravy spočívá na národních organizacích a institucích zodpovědných za vzdělávání.

Podle definice evropského curricula je radioterapie (radiační onkologie) obor klinické medicíny, který používá ionizační záření, samostatně nebo v kombinaci s jinými modalitami, pro léčbu pacientů s maligními nebo jinými onemocněními. Odtud pramení dvojitá terminologie – radiační onkologie/radioterapie. Radiační onkologie/radioterapie zahrnuje odpovědnost za diagnostiku, léčbu, sledování a podpůrnou péči u onkologických pacientů jako integrální část multidisciplinární léčby.

Cílem specializační průpravy je vzdělávat a prakticky vyškolit lékaře v oboru radiační onkologie/radioterapie na úroveň nezávislého specialisty.

Délka specializační přípravy je pětiletá při plném úvazku, nebo příslušně prodloužená při částečném úvazku. Nejméně 60% času musí být stráveno klinickou prací v souladu s obsahem core curricula.

Forma udělení licence pro radiační onkologii/radioterapii je ponechán na systému vytvořeném v jednotlivých zemích.

Evropské Core Curriculum definuje požadavky na technické vybavení a personální zabezpečení výukových pracovišť a na počty léčených pacientů.

Na každém výukovém pracovišti má být vedoucí výukového programu. Nedoporučuje se, aby byl totožný s vedoucím oddělení. Je zodpovědný za pravidelné dokumentované schůzky vyučujících, na kterých se probírají cíle programu a stav jejich realizace. Schůzek se má zúčastnit alespoň jeden lékař ve specializační průpravě.

Pracoviště musí mít adekvátní personální zabezpečení, aby se radiační onkologové zodpovědní za výuku mohli studentům dostatečně věnovat. Na pracovišti musí být rovněž přítomni radiologičtí fyzici podílející se na výuce. Je rovněž požadována biologická laboratoř pro seznámení s experimentální radiobiologií. Pokud k dispozici není, měla by být výuka radiobiologie poskytnuta formou akreditovaných národních nebo mezinárodních kurzů.

Personální zabezpečení výuky má být prověřováno 1x za 5 let.

Výukové pracoviště musí mít dostupná oddělení hematologie/klinické onkologie, chirurgické onkologie, gynekologické onkologie, ORL, dětské onkologie, urologie. Musí být zabezpečen přístup k moderním zobrazovacím technikám včetně nukleární medicíny a k moderní histopatologické diagnostice. Musí být k dispozici knihovna vybavená odbornými časopisy a učebnicemi a přístup k internetovým databázím.

Studentům má být zajištěna účast na národních a alespoň dvou evropských výukových kurzech. Každý student musí mít logbook dokumentující jeho praxi.

K zajištění kvality výuky jsou doporučeny pravidelné zevní audity.

Curriculum zahrnuje znalosti biologie nádorového bujení, radiobiologie, základů radiologické fyziky, ochrany před ionizujícím zářením, zobrazovacích technik, metod klinického výzkumu, ekonomiky zdravotnictví, diagnostiky, epidemiologie nádorových onemocnění, principů chirurgické léčby, patologie nádorů, chemoterapie, hormonální léčby, biologické léčby, psychologie a speciální onkologii jednotlivých nádorových onemocnění.

Na základě evropského curricula byl kolektivem výboru Společnosti radiační onkologie, biologie a fyziky ČLS JEP vypracován Vzdělávací program v oboru radiační onkologie. Editorem byl nejprve Doc. MUDr. Josef Kovařík, po jeho odchodu do Spojného království Doc. MUDr. Pavel Šlampa.

Podmínkou získání specializace v oboru radiační onkologie je absolvování společného interního základu v délce trvání minimálně 24 měsíců a specializované strukturované přípravy v minimální délce 48 měsíců. Celková doba přípravy je tedy minimálně 6 let. Specializovaný výcvik v oboru radiační onkologie zahrnuje 36 měsíců praxe v radiační onkologii a 12 měsíců praxe v terapeutické aplikaci cytotoxické chemoterapie, bioterapie a hormonální léčby.

Rozsah požadovaných teoretických znalostí a praktických dovedností je dán náplní společného interního základu a doporučeními evropského curricula.

Dále byly stanoveny minimální požadavky pro přiznání statutu akreditovaného výukového pracoviště pro obor radiační onkologie. Akreditované pracoviště musí léčit zevní radioterapií minimálně 600 nových onkologických pacientů a brachyterapií 70 pacientů za rok. Musí mít vytvořený program kvality poskytované léčby. Přístrojové vybavení musí zahrnovat přístup k plánovacímu CT a trojrozměrnému plánování radioterapie, simulátor, minimálně dva vysokoenergetické moderní ozařovače (z toho minimálně jeden lineární urychlovač s možností elektronového svazku), vybavení pro intersticiální a intrakavitární brachyterapii, modelovou laboratoř, dozimetrické vybavení.

Na pracovišti musí být dostatek personálu, tj. minimálně jeden radiační onkolog se specializovanou způsobilostí na 125 nových pacientů za rok a příslušný počet radiologických fyziků dle doporučení EFOMP. Vedoucí akreditovaného pracoviště je lékař s nejvyšším vzděláním v oboru radiační onkologie/radioterapie, vědecky a publikačně činný.

Jak Vzdělávací program v oboru radiační onkologie tak požadavky na akreditovaná centra jsou plně v souladu s požadavky Evropské unie a byly schváleny MZ ČR.

15 Variabilita onkologickej starostlivosti – aký je prínos edukácie v onkológii pre „State of the art of treatment“.

Jurga L. M.
Okologická klinika FN a Trnavskej univerzity v Trnave

V posledných dekádach je liečba zhubných nádorov (ZN) charakterizovaná tým, že z pôvodne čisto chirurgického prístupu sa vyvinula komplexne koordinovaná a sofistikovaná chirurgická liečba, radiačná terapia a chemoterapia v širšom slova zmysle, teda včítane hormonálnej manipulácie a biologickej liečby. Patrí sem tiež manažment liečby bolesti, výživy a starostlivosť o psychosociálne otázky pacientov. Súčasne však rastie a prehlbuje sa nevyhnutná vedomostná báza, ktorá je predpokladom správnej indikácie a aplikácie často vysoko sofistikovaných terapeutických postupov. Výsledkom, je, že sa vytvorili subšpecializácie a tímy zaoberajúce sa jednou z liečebných modalít, prípadne liečbou niektorej nádorovej entity. Analýzy kvality jasne ukázali, že najlepšie terapeutické výsledky sa dosahujú vo veľkých centrách (ústavy, kliniky).

Odpoveďou na inherentné výzvy pri poskytovaní „state-of-the-art treatment“ („best current management“) je napr. „The American College of Surgeons“, ktorá certifikuje hospitalizačné onkologické programy („hospital-based cancer programs“); vyžaduje však spoluprácu s internistickými onkológmi, radiačnými onkológmi a chirurgmi pri tzv. „prospective treatment planning conferences“.

Pre spoluprácu početných medicínskych disciplín pri onkologickej starostlivosti sa používajú 2 termíny: multidisciplinárny/interdisciplinárny – je však potrebné ich presne vymedziť.

Termín „multidisciplinary care“ znamená starostlivosť zahŕňajúcu spoluprácu viacerých odborníkov; táto však nie je väčšinou koordinovaná.

Termín „interdisciplinary care“je vymedzený pre formálnu spoluprácu odborníkov tých klinických disciplín, ktorí sa podieľajú na plánovaní liečby u každého onkologického pacienta. Táto definícia odpovedá programu the American College of Surgeons.

Cieľom tejto kapitoly je podať prehľad o vedeckej báze a logistických výzvach týkajúcich sa zavedenia interdisciplinárnej onkologickej starostlivosti v porovnaní s konvenčným prístupom k liečbe.

Vynárajú sa preto nasledovné otázky:

1) Bola zmena chovania sa zhubných nádorov taká, že si zrazu vyžaduje koordinovanú starostlivosť?
2) Môže byť onkologická starostlivosť na základe klinických štúdií štandardizovaná, alebo musia byť terapeutické rozhodnutia individualizované?
3) Môže variabilita poskytovania onkologickej starostlivosti zásadne znížiť jej kvalitu?
4) Ako môže byť lekárovo chovanie modifikované v snahe poskytnúť najlepšiu starostlivosť?
5) Ako môže inštitúcia, ktorá menovala interdisciplinárny liečebný tím zvýšiť pravdepodobnosť, že bude aplikovaná „state-of-the-art treatment?

Antineoplastická liečba je charakterizovaná komplexnosťou, nezriedkavo absenciou jediného správneho prístupu a vhodnosťou individualizovať liečebné rozhodnutia.

Sme teda svedkami variability v klinickej praxi. Je preto potrebné dať odpoveď na otázku v akom rozsahu je variabilita v onkologickej starostlivosti výsledkom ospravedlniteľných diferencií v interpretácií výsledkov klinických triálov versus chýbajúcim/nedostatočným oboznámením sa časti lekárov s state-of-the-art treatment (medicínskymi informáciami).

Prehľad údajov týkajúcich sa variability liečebných postupov v jednotlivých medicínskych disciplínach, včítane onkológie ukázal, že v niektorých prípadoch táto variabilita odráža absenciu jedného správneho prístupu založeného na dôkazoch, kým v iných prípadoch odchýlka od stanovenej štandardnej praxe znamená pochybenie v kvalite zdravotnej starostlivosti.

Zmeny v praxi lekárov

V úsilí o uniformitu zdravotnej starostlivosti (ak je najlepšia klinická prax pri jednotlivých chorobných entitách definovaná) boli použité viaceré stratégie:

- Kontinuálne didaktické medicínske vzdelávanie formou prezentácie – obmedzený efekt
- Distribúcia odporúčaní konsenzuálnych konferencií
- Aktívna účasť pri príprave guidelines
- Spätná väzba lekára versus liečebné rozhodnutie – mix efekt
- Pripomienky zaznamenané lekárom v priebehu aktívnej starostlivosti o chorého – väčšinou efektívne

Viaceré štúdie ukázali, že ani tradičné kontinuálne didaktické edukačné programy, ani distribúcia metodických listov (guidelines) nie sú efektívne pri zmene odborného správania (postojov) lekárov.

Napr. chirurgovia sa pri manažmente karcinómu prsníka málo pridržiavali metodických listov (guidelines). Efektívnejšie boli niektoré ďalšie intervencie. Osvedčila sa individuálna edukácia kolegov; viedlo to k zmene odborného správania (postojov). Pripomienky v chorobopisoch jednotlivých chorých sa tiež ukázali ako oveľa efektívnejšie než prednášky, alebo referované všeobecné pripomienky.

Stretnutia vedúcich pracovníkov tlmočiacich mienky miestnych lekárov a konfrontácia s opatreniami metodických listov predstavuje spätnú väzbu; táto forma môže zmeniť správanie (postoje) lekárov. Ako účinné sa javí zahrnutie lekárov do procesu vývoja lokálnych guidelines.

Viacerí autori sa snažili vysvetliť ťažkosti, s ktorými sa stretávame pri pokuse zmeniť prax lekárov. W. Smith naznačil, že mnohé roky formálneho vzdelávania a postgraduálnej praxe, ktorým sa lekári podrobujú, rovnako ich vlastné rigídne praktické vzory, je ťažké zmeniť. Všimol si tiež, že množstvo tlačených materiálov, ktorým sú lekári vystavení ich skutočne môže odradiť od novších edukačných obsahov.

R. Grol navrhuje nasledovné stratégie za účelom zmeny prístupu k lekárskej praxi:

- Dostatok vedeckých dôkazov pri vývoji guidelines
- Interaktívna edukácia má prednosť pred “top down„ doškoľovania lekárov – väčšinou efektívna
- Prebiehajúci monitoring klinickej výkonnosti a opatrenia za účelom získania spätnej väzby – mix efekt

P. Greco pridáva ďalšie vplyvné parametre (finančné motívy; finančné pokuty; administratívne pravidlá).

Interdisciplinárny terapeutický tím a plánovanie onkologickej liečby

Na základe doteraz uvedeného predkladáme sumarizáciu kontroverzií a variability pri konštituovaní interdisciplinárneho tímu a plánovaní antineoplastickej liečby:

- Vedomostná báza nutná pre poskytovanie "state-of-the-art,, onkologickej starostlivosti je rozsiahla
- Onkologická literatúra spočíva na špecifických časopisoch orientovaných na viaceré medicínske špecializácie a žiaden lekár sa nemôže oboznámiť so všetkými aspektami ich vedeckého dôkazu
- Potrebné je poznanie priebehu aktívnych štúdií a vychádzajúcich vedeckých dát pri všetkých nádorových entitách
- Lekári iných špecializácií podieľajúcich sa na protinádorovej liečbe v onkológii majú nezriedkavo odlišné postoje týkajúce sa liečby a prognózy.
- Pri mnohých medicínsky a spoločensky významných ZN sú ustanovené liečebné odporúčania slúžiace ako štandard, kým pri mnohých ďalších ostávajú kontroverzné
- I keď nie sú k dispozícii údaje, ktoré by vyčíslili v akej miere klinickí onkológovia dodržiavajú štandardné liečebné odporúčania, štúdie v iných medicínskych disciplínach naznačujú, že miera je suboptimálna.
- V prípade vynorenia sa nových medicínskych poznatkov prezentovaných lekárom didaktickým štýlom, je ich prenos do klinickej praxe pomalý
- Obyčajné rozširovanie terapeutických protokolov/postupov/guidelines medzi lekárov nemení ich liečebné rozhodnutia

S cieľom zmeny štýlu praxe lekárov je nutné akceptovať nasledovné kroky:
Interaktívne doškoľovanie
Angažovanie lekárov na tvorbe vývoja guidelines
Zahrnutie „thought leaders" do postgraduálneho vzdelávania
Zaopatrenie priebežných výsledkov

Akceptovanie týchto záverov umožňuje rozvinúť spoluprácu. Ak lekár niektorej z početných cancer-related specialties má referovať, diskutovať nového onkologického pacienta a prospektívne plánovať optimálny liečebný plán zohľadňujúci výskyt niekoľkých dôležitých udalostí:

- Špecifické vedomosti špecializácie sa prezentujú medzi zúčastnenými lekármi
- Nové informácie z medicínskej literatúry vlastnené niektorým členom skupiny musia byť prezentované a využité pri plánovaní liečby
- Diskrepancie medzi jednotlivými špecialistami musia byť diskutované kým nie je formulované spoločné stanovisko; umožňuje to poskytnúť pacientovi jasnú a konzistentnú informáciu

Guidelines lokálne aplikovateľnej liečby sú vyvinuté zúčastnenými lekármi; zvyšuje to pravdepodobnosť doldržania „state-of-the-art treatment" Interdisciplinárny tím je ideálne fórum pre identifikáciu kľúčových výsledkov a ich využitie pri výstavbe liečebného plánu

Tí istí lekári môžu revidovať údaje a modifikovať liečebný proces; ide o cyklus manažmentu totálnej kvality

Medicínske inštitúcie zahrnuté do klinického výskumu môžu využiť tieto mítingy pri určovaní kritérií vhodnosti (eligibility criteria) a zaradenia do štúdie a informovať liečiacich lekárov o dodržiavaní protokolu

Modely interdisciplinárnej starostlivosti

Je zrejmé, že existuje široká podpora pre interdiciplinárny prístup k onkologickej starostlivosti nielen zo strany profesionálnych medicínskych organizácií, ale tiež zo strany pacientskej advokátskej skupiny. Interdisciplinárna starostlivosť je charakterizovaná účasťou početných špecialistov na formulácií

individualizovaného liečebného plánu pre každého chorého. Žiaľ, napriek tomu optimálna štruktúra tohto procesu nateraz nebola jasne definovaná.

The Advisory Board Company publikovala v roku 2002 monografiu, v ktorej predstavila „interdisciplinary gasrtointestinal cancer care model". Najjednoduchší model pozostáva z „prospective treatment planning conference". Ďalší model, rádovo vyššej komplexnosti predstavuje *„virtual clinic",* v ktorej koordinátor urýchľuje pohyb chorého cez početné lekárske vizity a diagnostické procedúry. Najvyššiu hladinu integrácie predstavuje založenie *„comprehensive clinic",* v ktorej všetci lekári zainteresovaní na starostlivosti o pacienta pôsobia v jednej lokalite (Tab. 26.1)

Tab. 26.1 **Modely interdisciplinárnej starostlivosti**

Model	Štart interdisciplinárnej kliniky	Plánovanie liečby v spolupráci
Konferencia prospektívneho plánovania liečby	Vizity koordinované neformálne	Interdisciplinárna liečbu plánovacia konferencia
Virtuálna GI klinika	Pacientov vidia početní odborníci počas osobitných, ale koordinovaných vizít	Interdisciplinárna liečbu plánovacia konf. ale koordinovaných v separátny deň
Komprehensívna GI klinika	Pacienti stretnú množstvo špecialistov počas single vizity	GI špecialisti diskutujú liečebný plán počas vizity

Za hranicou chirurgie, rádioterapie a chemoterape

Doteraz sme analyzovali integrovanú starostlivosť, ktorej princípom je koordinácia činnosti lekárov rôznych odborov so vzťahom k onkológii. Definícia interdisciplinárnej liečby neobsahovala všetky komponenty onkologickej starostlivosti. Onkologickí chorí trpia komorbiditou (srdcocievne a metabolické ochorenia, ochorenia dýchacieho, uropoetického systému, atď.) Vážne sú tiež komplikácie ochorenia (trombembolická choroba, nádorová kachexia, chronická patologická únava – fatique, atď.). K tomu pristupujú závažné nutričné, psychosociálne a ďalšie problémy. Viaceré klinické štúdie testovali hypotézu, že psychoterapia môže predĺžiť prežívanie onkologických pacientov; výsledky sú nateraz kontrovezné. Psychoterapia však môže významne zlepšiť kvalitu života chorých. Rovnako nutričné intervencie (enterálne/parenterálne) prispievajú k zlepšeniu kvality života. Interdiciplinárny tím má byť preto rozšírený o psychiatra a/alebo psychológa a dietológa. Za úvahu stojí projekt the Ireland Cancer at University Hospitals of Cleveland pomenovaný Safe Conduct. Členom interdisciplinárneho tímu je aj duchovný poradca, sociálny pracovník a odborník v ošetrovateľstve. Chronickú nádorovú bolesť kontroluje algeziológ. Rozšírený interdisciplinárny tím takto rieši aj spirituálne, emocionálne a logistické potreby participujúcich pacientov.

Pravdepodobné budúce smerovanie

Štúdium nie príliš bohatej literatúry venovanej ustanoveniu interdisciplinárnych tímov pre multimodálnu liečbu ZN ukázalo, že ich optimálna štruktúra nie je jasne definovaná. Jestvuje však konsensus týkajúci sa ich úlohy a významu. Nateraz nie je definovaný dopad interdisciplinárnej starostlivosti na bezrelapsové, celkové prežívanie a kvalitu života chorých. Sú preto potrebné obozretne dizajnované výsledkové štúdie, ktoré by mali dať na tieto položky odpoveď.

The American Society of Clinical Oncology (ASCO) a the European Society for Medical Oncology (ESMO) dlhodobo venovali pozornosť opatreniam na zaistenie kvality onkologickej starostlivosti pre pacientov na celom svete. Je známe, že zdroje (finančné a iné) varírujú od krajiny po krajinu, podobne systémy poskytujúce medicínsku starostlivosť sú podobne variabilné. Napriek tomu ASCO a ESMO predsa verí, že plány zdravotnej starostlivosti by mali usilovať o dosiahnutie istých základných a spoločných cieľov zaisťujúcich prístup a kontinuitu kvality onkologickej starostlivosti. Výstupom tejto bilaterálnej snahy je ASCO-ESMO Consensus Statement on Quality Cancer Care pozostávajúci z 10 – ich článkov:

1. Prístup k informáciam
   Pacienti by mali dostať primerané informácie o ich chorobe, možných intervenciách a o známych ziskoch a rizikách liečby. Pacient by mal mať možnosť zistiť mená, postavenie a kvalifikáciu tých, ktorí ho liečia.

2. Súkromie, dôvernosť a dôstojnosť
   Pacienti majú mať, pokiaľ ide o ich diagnózu a liečbu, zaistené súkromie. Ak je však prístup k informáciám potrebný pre klinické/epidemiologické štúdie alebo iný klinický výskum, pacienti majú dostať možnosť súhlasiť s použitím jeho osobných informácií. Pacient má byť liečený po celý čas s dôstojnosťou.

3. Prístup k medicínskym záznamom
   Pacientom sa má dovoliť prezrieť chorobopis, ev. urobiť si kópie. Poskytovatelia zdravotnej starostlivosti majú byť dostupní s vysvetlením obsahu chorobopisu.

4. Preventívne služby
   Pacientom sa majú poradiť preventívne opatrenia (ak sú podložené evidence-based medicine)

5. Nediskriminácia
   Prístup k zdravotníckej starostlivosti musí byť poskytnutá bez diskriminácie ohľadom rasy, náboženstva, pohlavia, národnosti, handicapu. Pacienti nesmú byť diskriminovaní na základe ich choroby, s ohľadom na zamestnanie a dostupnosť zdravotného poistenia.

6. Súhlas s liečbou a možnosť voľby
   Pacienti sa podieľajú na rozhodovaní o liečebnom pláne. Majú mať prístup k druhej mienke. s možnosťou voľby liečby i poskytovateľa

7. Multidisciplinárna onkologická starostlivosť ……
   Optimálnu liečbu môže poskytnúť len tím pozostávajúci z internistického onkológa, radiačného onkológa, experta na paliatívnu starostlivosť, onkologických sestier a sociálneho pracovníka

8. Inovačná onkologická starostlivosť
   Pacientom sa má ponúknuť účasť v klinických triáloch, ktorá môže zlepšiť ich zdravotný stav.

9. Plánovanie starostlivosti o prežívajúcich pacientov
   Prežívajúcim onkologickým pacientom sa má poskytnúť komprehensívne vyšetrenie po primárnej liečbe a majú byť monitorovaní kvôli neskorej toxicite. Súčasťou follow-up plánu je potreba rehabilitačného servisu

10. Manažment bolesti, podporná a paliatívna starostlivosť
    Quality Cancer Care vyžaduje zvládnuť manažment bolesti a podpornú liečbu. Ak už efektívna liečba nie je aktuálna, pacienti majú mať paliatívnu starostlivosť.

Literatúra

1. Hornig SJ, Mellstedt H Introduction:
2. ASCO-ESMO Consensus Statement on Quality Care. J Clin Oncol 2006; 24(21): 3497-3498

16 Klinická praxe studentů ošetřovatelství a „bezpečná péče“.

Zvoníčková M., Heřmanová J.
3. lékařská fakulta UK, Ústav pro lékařskou etiku a ošetřovatelství, Praha

Podle platných evropských i národních norem představuje praktická část kurikula ošetřovatelství nejméně jednu polovinu celkové časové dotace studia, z toho klinická praxe tvoří nejdelší část. Podmínky pro praktickou výuku se v souvislosti s vysokoškolským pojetím zásadně změnily. Klade se velký důraz na samostatnost studentů a jejich spoluodpovědnost za plnění vzdělávacích cílů praktické výuky.

Role odborných učitelek směřuje spíše ke koordinaci, vlastní praktická výuka se přesouvá na vysokoškolsky vzdělané sestry – mentorky.

S touto změnou souvisí i problematika bezpečnosti, respektive vzájemné informovanosti a ochoty ke spolupráci mezi školou a klinickou praxí. Dochází k situacím, že ve škole se studenti v rámci bezpečnosti a ochrany zdraví při práci učí předepsané postupy, které se v praxi často nedodržují nebo i vědomě porušují. Týká se to zejména používání ochranných pomůcek, mytí rukou, manipulace s biologickými materiály apod.

Stejně důležitá je správná manipulace s nemocným a prevence poranění zad. Specifickou problematiku představuje podávání léků studenty a možnost chyby.

Pro bezpečnost klinické praxe má význam i fakt, že předměty ošetřovatelství a ošetřovatelská praxe není součástí pouze kurikula ošetřovatelství, ale i ostatních nelékařských zdravotnických oborů a studia všeobecného lékařství. Medici na rozdíl od sester znají ošetřovatelství pouze okrajově, neznají klinické souvislosti a mohou se snadno dopustit chyby. Prezentace bude doplněna kazustikami.

17 Nevedomosť zdravotníkov – bariéra v prevencii nádorových ochorení?

Schmidtová Z., Kvasnicová Z., Poledníková Ľ.
Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre, Fakulta sociálnych vied a zdravotníctva, Katedra ošetrovateľstva
Trenčianska univerzita A. Dubčeka v Trenčíne, Ústav zdravotníctva a ošetrovateľstva

Na celom svete sa registruje približne 11 miliónov nových prípadov rakoviny ročne a až 24,6 milióna ľudí žije so zhubným nádorovým ochorením. Na Slovensku sa ročne registruje viac než 23 000 nových prípadov rakoviny a okolo 11 000 ľudí na rakovinu zomiera.

Podľa doterajších štatistických ukazovateľov sa predpokladá, že počet ľudí so zhubným nádorovým ochorením bude mať vzrastajúcu tendenciu na celom svete a Slovenská republika nebude výnimkou. Poskytovatelia zdravotnej starostlivosti musia s touto situáciou počítať a pripraviť podmienky na jej zvládnutie na úseku diagnostiky a liečby a zároveň sa zamerať i na zlepšenie primárnej a sekundárnej prevencie onkologických ochorení (Zdravotnícka ročenka Slovenskej republiky 2003).

Práve prevencia je jednou z najúčinnejších opatrení proti zhubným nádorom. Napriek novým vedeckým poznatkom z onkológie a informáciám ako predchádzať vzniku nádorových ochorení, stále v našej populácii pretrvávajú zvyky zlého životného štýlu, nevšímavosť k alarmujúcim príznakom, ale aj rôzne mýty a mylné informácie o rakovine samotnej, jej diagnostike a aj liečbe. V prípade zhubných nádorových ochorení sa mýty a povery stávajú nebezpečnými, ak ľudia pod ich vplyvom na jednej strane nechodia na pravidelné preventívne prehliadky zamerané na vyhľadávanie včasných a väčšinou liečiteľných štádií rakoviny a na strane druhej ani ich správanie nie je preventívne (nesprávna životospráva, vystavovanie sa škodlivým vplyvom vonkajšieho prostredia).

Hlavným poslaním ošetrovateľstva je poskytovať starostlivosť nielen chorým ľuďom, ale aj zdravým. Medzi dôležité činnosti profesionálnych zdravotníkov patria práve aktivity zamerané na podporu zdravia, predchádzanie ochoreniam, či vyhľadávanie (rozpoznanie) ochorení v ich skorých štádiách. Rola sestry ako edukátorky je v prevencii nádorových ochorení nezastupiteľná. Sestra môže informovať verejnosť/pacientov nielen v ambulanciách, ale aj v nemocnici na lôžkových oddeleniach. Ak chce byť v spomínanej roly úspešná musí mať dostatok kvalitných informácií týkajúcich sa prevencie nádorových ochorení. Sestra by mala vedieť vysvetliť nepravdivosť mylných informácií o vzniku, diagnostike a liečbe nádorových ochorení. V príspevku prezentujeme výsledky prieskumu, v ktorom sme sa chceli dozvedieť do akej miery sú samotní zdravotnícki profesionáli – sestry presvedčení o nepravdivých informáciách o rakovine, nakoľko nevedomosť zdravotníckeho personálu je jednou z bariér prevencie nádorových ochorení.

Literatúra

1. LÍŠKOVÁ, M., NÁDASKÁ, I., PEŤKOVÁ, J., PAVELOVÁ, Ľ. Podpora zdravia ako vízia práce sestier v 21. storočí. In *Zborník vedeckých prác z* medzinárodnej *konferencie s* názvom *„Uplatnenie absolventov vysokých škôl na trhu práce v* podmienkach *Európskej únie“*. Nitra : SPU, 2005, s. 170-174. ISBN 80-969430-0-6.
2. Siracká, E. Prečo Fórum onkologických pacientov? In *Zborník I. Fórum onkologických pacientov*. Bratislava : Liga proti rakovine, 2006. s. 5. ISBN 80-89201-26-1.
3. VORLÍČEK, J., ABRAHÁMOVÁ, J., VORLÍČKOVÁ, H. a kol. *Klinická onkologie pro sestry*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2006. 328 s. ISBN 80-247-1716-6.
4. *Zdravotnícka ročenka Slovenskej republiky 2003*. Bratislava : Ústav zdravotníckych informácií a štatistiky, 2004. 221 s. ISBN 80-968936-5-3.

III.
Organizace onkologické péče

18 Národní onkologický program ČR on-line a webová mapa onkologických center.

Šnajdrová L., Zemánek P., Schwarz D., Brabec P., Dušek L., Vorlíček J.
Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno
Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno

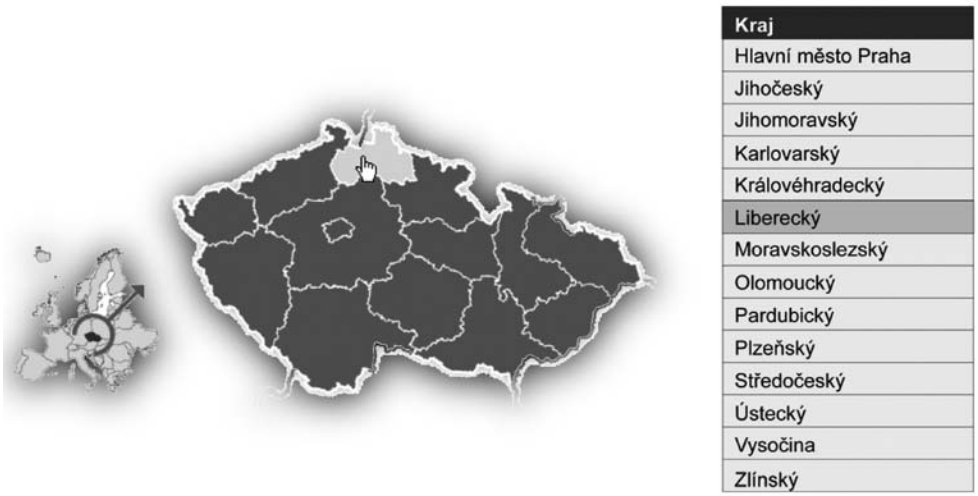
Národní onkologický program (NOP, viz též *www.linkos.cz*) je platformou zasahující celou českou společnost s cílem sjednotit ji v boji proti jednomu z nejnebezpečnějších onemocnění současnosti – zhoubným nádorům. Z hlediska informatiky je NOP především výzvou ke komunikaci, která může nabývat mnoha podob:

- vzájemná komunikace komplexních onkologických center mezi sebou nebo se svými partnery, výměna zkušeností, sjednocení a standardizace postupů
- komunikace onkologických pracovišť a zdravotnických zařízení s laickou veřejností
- komunikace onkologických pracovišť s managementem českého zdravotnictví za účelem optimalizace a zvýšení kvality poskytované péče
- komunikace nebo spíše prezentace české onkologie v zahraničí

V rámci informační podpory programu je od roku 2006 vyvíjen prezentační portál, jehož cílem je prezentovat síť onkologických pracovišť ČR a probíhající výzkumné a registrační projekty programu. Náplň projektu „NOP on-line“ (*www.lynconet.cz*) lze sumarizovat následovně:

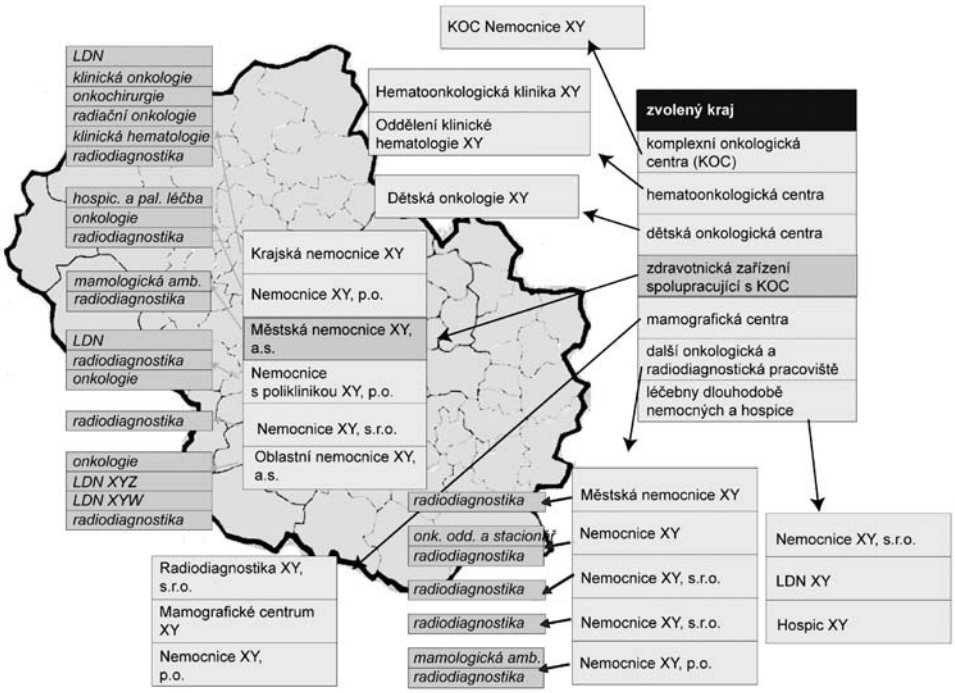
- Nově vytvořený portál zabývající se komunikací cílů Národního onkologického programu a jejich naplňováním. Hlavním cílem portálu je vyvážená prezentace všech komplexních onkologických center a poskytování informačních služeb v jejich regionech (komunikace center s jejich partnery, regionální sběr dat, …). Jednotlivá onkologická centra mohou využívat služeb portálu k prezentaci svých cílů, vybavení a kvality péče. V sekci „data&projekty“ portál usiluje o jednotnou prezentaci českých projektů do zahraničí a o vytvoření sjednocující prezentace různých výzkumných projektů, klinických registrů, apod.

V tomto příspěvku je prezentována nová verze portálu, na které již lze nalézt standardizovanou prezentaci všech Komplexních onkologických center a skupin a dále řadu detailních prezentací konkrétních pracovišť. Pro snadnou orientaci byla ve spolupráci s lékaři center zmapována síť pracovišť a tato je k dispozici interaktivně přes mapu ČR a mapu regionů.



Obrázek 1. Mapa onkosítě ČR dostupná přes mapu ČR

Interaktivní zpracování sítě pracovišť je napojeno na jejich strukturovanou databázi a celý systém lze tedy relativně snadno aktualizovat. Funkce portálu včetně adresného vyhledávání pracovišť umožňují orientaci i laickým uživatelům, pacientům nebo jejich příbuzným. Interaktivní mapa onkologických pracovišť bude dále rozvíjena a ve vazbě na ni budou prezentovány specifické informace o prevenci, diagnostice a léčbě onkologických onemocnění.



Obrázek 2. Anonymizovaná ukázka interaktivně dostupné sítě onkologických pracovišť v regionech

Generálním partnerem projektu NOP On-line a poskytovatelem grantu je společnost AstraZeneca Czech Republic.

19 Organizace péče o pacienty zařazené do klinických hodnocení v MOÚ.

Demlová R., Horová R., Hanáková M., Haičmanová J., Bártová E., Smílková S., Hofmanová Ž
Oddělení klinického hodnocení MOÚ, Brno

Managementem provádění klinických hodnocení léčiv se v Masarykově onkologickém ústavu zabývá Oddělení klinického hodnocení již od roku 1998.

Počet aktivních klinických studií každým rokem stoupá. Na konci roku 2006 se v MOÚ realizovalo 51 studií (21 s aktivním náborem a 30 ve follow-up fázi). S počtem studií souvisí i zvyšující se počet subjektů – pacientů, kteří jsou v MOÚ léčeni a sledováni v rámci klinických hodnocení. Od roku 1998 do roku 2006 bylo zařazeno 451 pacientů, přičemž 187 bylo k tomuto datu v aktivní léčbě. V mnoha studiích MOÚ v počtu zařazených pacientech stojí na čelných místech v rámci ČR i celosvětově.

Péče o subjekty hodnocení je organizována komplexně, v rámci celého řešitelského týmu, který tvoří zkoušející, koordinátorka/výzkumná sestra, farmaceut a radiolog. Dobrá spolupráce a komunikace mezi jednotlivými členy týmu je nezbytnou podmínkou kvalitně provedeného hodnocení, jejichž náročnost v mnoha ohledech roste.

Přípravná fáze

V úvodní fázi příprav nového klinického hodnocení zkoušející ve spolupráci s Oddělením klinického hodnocení zvažuje proveditelnost studie na pracovišti, zejm. z hlediska zaměření studie a její personálně-technické náročnosti, výběru subjektů, etických, ekonomických a dalších aspektů.

Přípravu klinických studií provází rovněž neustále se zvyšující administrativní zátěž. Oddělení klinického hodnocení zajišťuje pro zadavatele řadu potřebných dokumentů a školení řešitelského týmu.

Smluvní jednání je vedeno v časovém souladu s rozhodováním Státního úřadu pro kontrolu léčiv (SÚKL) a etických komisí.

Prováděcí fáze

Po získání souhlasu SÚKLu a etických komisí a po podepsání smlouvy mezi zadavatelem a poskytovatelem, vstupuje klinická studie do prováděcí fáze, kterou zahajuje iniciační schůzka.

Pro úspěšné provádění klinické studie na pracovišti je nutná výborná a včasná informovanost lékařů i sester o požadavcích nové studie, zejména ve vztahu ke specifikám předepsaných vyšetření a vedení zdrojové dokumentace. Klíčová je v této fázi také práce s pacienty, kterým je nutné dát k dispozici všechny potřebné informace, a to rozhodně nejen prostřednictvím informovaného souhlasu, ale i pohovorem.

Výzkumná sestra se zkoušejícím lékařem úzce spolupracuje na vyhodnocení vhodnosti pacientů pro danou studii, koordinuje screeningová vyšetření a jeho výsledky, pracuje s centrálními laboratořemi v zahraničí (odesílání vzorků, radiologických vyšetření apod.) a pacienta randomizuje, nejčastěji pomocí IVRS systému.

Pacient po zahájení studiové léčby pravidelně dochází na kontroly a dle požadavků protokolu se podrobuje předepsaným vyšetřením a odběrům. Koordinátoka/výzkumná sestra jeho návštěvy zpracovává do záznamových listů pacienta (CRF), které jsou nyní již většinou elektronické.

Kvalitu odvedené práce pravidelně kontroluje při svých návštěvách monitor, úzce spolupracující zejména s koordinátorkami/výzkumnými sestrami. Závěry monitorů jsou cennou zpětnou vazbou pro zkoušející, zejména v oblasti správné vedené zdrojové dokumentace.

Sledovací a ukončovací fáze

Léčba v klinické studii může být ukončena buď standardně, nebo mimořádně: v případě progrese onemocnění, neakceptovatelné toxicity nebo z rozhodnutí pacienta, zkoušejícího či jiných důvodů dle protokolu.

Pacient je i nadále sledován v rámci follow-up fáze. Charakteristika sledování této fázi z hlediska frekvence či sledovaných faktorů je dána protokolem.

Po ukončení sledování, shromáždění a zkompletování veškerých dat, je centrum uzavřeno a materiály se archivují po dobu 15 let.

Provádění klinického hodnocení léčiv je práce s pacienty i s daty. Vyžaduje vysoké pracovní nasazení, dobré řízení týmu, kvalitní komunikační schopnosti a pečlivý data management.

IV.
Informatika v onkologii

20 Možnosti využití dat z informačního systému nemocnice – zkušenosti Masarykova onkologického ústavu.

Brabec P., Andres P., Komínek J., Šebesta R., Klimeš D., Vyzula R., Žaloudík J., Dušek L.
Masarykův onkologický ústav, Brno
Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno

Souhrn

Informační systémy v prostředí nemocničního zařízení procházejí neustálým vývojem, který ale mnohdy nereaguje efektivně na aktuální potřeby nemocnice. To je způsobeno složitostí problematiky, dlouhodobým sběrem neparametrických dat a implementací dodatečných softwarových modulů, které nakonec vytvářejí z nemocničních informačních systémů značně heterogenní prostředí, které neumožňuje nad daty provádět jednoduchou analýzu a reporting. Velice častým problémem, se kterým je možno se běžně setkat na úrovni managementu nemocnice i na úrovni běžného provozního personálu, je nepochopení požadavků uživatelů na straně nasazených konzultantů. Zadání, které pak dostává tvůrce softwaru, nerespektují informační systém nemocnice jako celek a ústí pouze v parciální řešení, která mohou v budoucnosti způsobit velké problémy. Těmto problémům je lépe předcházet, a to co nejdříve. Pokud totiž nebudou data jednotlivých pracovišť alespoň částečně parametrizovatelná, nebude v budoucnu možné je navzájem propojovat a provádět nad nimi analýzu. Nebude tak možné rozhodovat o efektivním řízení léčby, vyhodnocovat ekonomickou situaci nemocnice a provádět benchmarking mezi pracovišti. Tvrzení, že dané pracoviště léčí správně a současně hospodárně, tak nebude ve skutečnosti ničím podloženo. V současné době je v ČR velice málo nemocnic, které by skutečně měly svá data „pod kontrolou“ a jednoznačně dokázaly pohotově argumentovat na dotazy. Jedním ze skutečně efektivních řešení je datový sklad (Data Ware House) a sofistikovaný reportingový systém. Jeden takovýto sklad je právě vyvíjen v Masarykově onkologickém ústavu a první výsledky ukazují, že by to mohla být za současné situace rozumná cesta, jak konečně dostat „data pod kontrolu“.

Popis současného stavu

Problémem dnešních nemocnic není nedostatek informací, ale jejich **využitelnost**, **nákladovost** a možnost **integrace**. Každého z nás napadne jistě napadne že když již existují nějaká data a jsou využitelná i jinde měla by se využít ty již existující. Jedním z podobných problémů může být hlášení NOR, které je dáno zákonem a nařízeno ministerstvem zdravotnictví. Teď nediskutuji o metodice ale o možnosti využitelnosti. ÚZIS v letošním roce zavedl pilotní projekt ve kterém je hlavním cílem integrovat data z hlášení NOR do jednotných datových struktur v NIS u onkologických pracovišť. To je jistě rozumná myšlenka, která ovšem nese řadu otázek. Pokud se nad tímto problém chvíli pozastavíme, napadne nás spousta otázek typu „Jak to asi bude drahé? Má to vůbec smysl? Je to reálné? Co to pro nás bude znamenat? Vyjděme z předpokladu, že hlášení NOR má jednotnou logickou strukturu a unifikovanou metodiku. Pak nastává problém kde získat data a jak je napojit do centrální databáze. V případě, že všechny uvedené problémy jsou vyřešeny, pak problém vlastně neexistuje a řeší se pouze technologická otázka jak data vyexportovat a z jakých zdrojů.

Dalším podobným problémem může být otázka provázanosti parametrů mezi systémy. Příkladem může být složitější otázka typu „Kolik máme v každém měsíci unikátních pacientů ve třetím klinickém stadiu, s jakou diagnózou, jakou mají nejčastější léčbu, jaké jsou jejich náklady a jaký je průměrný počet ‘lůžko-dnů‘ u těchto pacientů?“ Toto je velice komplikovaný dotaz na který dokáže málo kdo odpovědět během krátké chvíle. Z praxe víme, že pokud systémy a to nejen NIS, ale i ty ostatní nejsou provázané, nejsme schopni adekvátně odpovědět aniž bychom zadali tento požadavek do analytického oddělení a čekali 14 dní na výsledek analýz. V rámci tohoto dotazu můžeme narazit i na problém, že některý parametr vyskytující se v otázce není v NIS či jiném systému veden parametricky a stádium prostě nezjistíme, aniž bychom procházeli jednotlivé textové lékařské zprávy.

Dle zkušeností různých pracovišť v ČR patří mezi nečastější problémy:

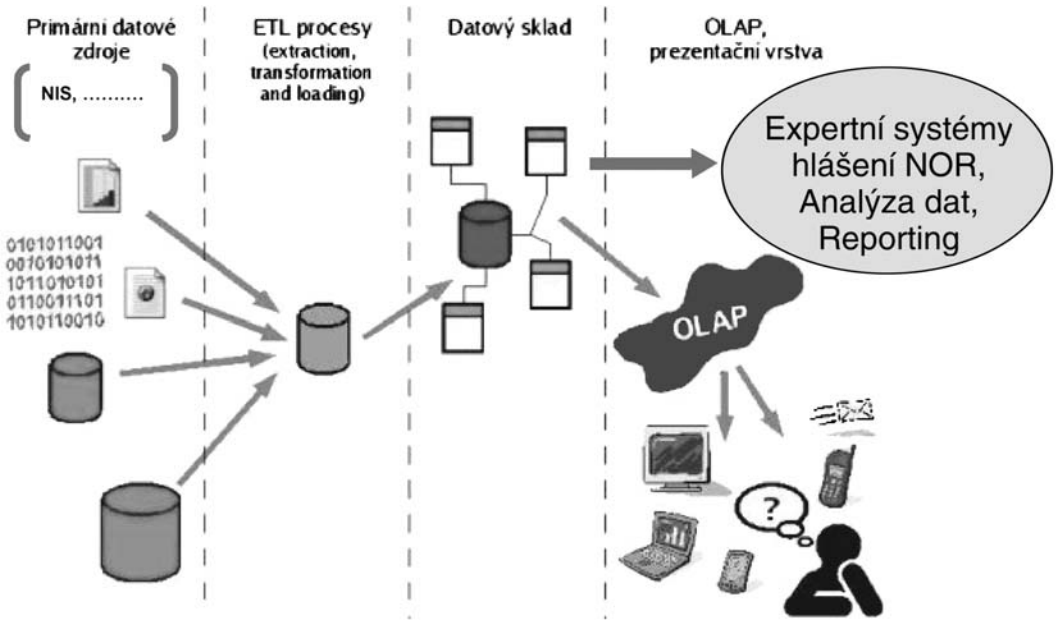
- Výrazná heterogenita informačních systémů
- Nejednoznačná identifikace provázanosti parametrů mezi systémy
- Chybějící dokumentace
- Nedostatečná definice finálních výstupů
- Záznamy parametrů v textové podobě
- Roztříštěnost modulů
- Špatná implementace
- Systém nerespektuje procesní chod nemocnice
- Složitá integrace

Jaká jsou možná řešení ?

Z výše popsaných problémů by se mohlo zdát že splnit předpoklad využitelnosti dat je prostě nemožné, nebo příliš komplikované. Není tomu tak. Když si uvědomíme, kolik informací již v současné době máme v různých systémech v nemocnici tak nám jednoznačně vyplívá že musí existovat jednoduché řešení. Osobně se domnívám, že není možné aby existoval jednotný

systém, který bude naprosto variabilní, flexibilní, parametrický a přitom měl nízké provozní náklady. Dnešní nemocnice se neobejdou bez IT či ICT oddělení, neustálého doplňování parametrů, rozšiřování datových struktur. Vznikají nové přístroje, diagnostické metody, mění se legislativa atd. to je potřeba všechno respektovat a přitom je nutné data umět integrovat. Jedním z možných východisek za daných podmínek může být datový sklad (Data Ware House DWH).

Datový sklad si můžeme pro jednoduchost představit jako velkou databázi, která obsahuje kromě dat samotných i vazby a definice vazeb mezi jednotlivými systémy. Jakmile jsou data uloženy, můžeme na data nahlížet různými zobrazovacími nástroji a dál data zpracovávat do dalších struktur jako jsou například OLAP kostky, rovnou vytvářet reporty, napojovat další aplikace apod. Příklad jak vypadá proces získávání dat do DWH ilustruje obrázek 1.



Obrázek 1

Implementace DWH na MOÚ

Masarykův onkologický ústav jako jedno z progresivních pracovišť se rozhodl technologie DWH využít a před 2 lety se rozběhla implementace zahrnující nejrozsáhlejší informační systémy nemocnice. Z pohledu navrhovaných a možných řešení se rozhodovalo na základě definice požadavků na DWH a dospělo se k následujícím závěrům: Návrh řešení datového skladu, musí být dostatečně robustní nejen z hlediska spolehlivosti a bezpečnosti, ale musí být také schopné plnit analytické funkce manažerského informačního systému s požadovanými výkonovými a ekonomickými parametry. Řešení je charakterizováno zejména následujícími vlastnostmi:

1. Použitá metodologie relačního on-line analytického zpracování umožňuje provádět **komplexní analýzu dat** (včetně adhoc analýzy, analýzy jednotlivých transakcí, tzv. analýzy nákupního koše, implementace data mining metod, atd.) a **minimalizuje dodatečné investice** při dalším rozvoji systému (rozšiřování počtu uživatelů, objemu analyzovaných dat, jejich granularity, počtu dimenzí a aplikace komplexnějších analytických metod).
2. Použitá technologie tzv. ETL procesů (zajišťujících přenos dat z provozních systémů do datového skladu a kontrolu jejich kvality) využívá distribuovaného zpracování pro zajištění **vysoké spolehlivosti** procesu a nesymetrického šifrování a systému certifikátů pro zajištění **bezpečnosti a autenticity dat**.
3. Systém využívá open source technologií, což kromě **nízkých celkových nákladů na vlastnictví** znamená i vyšší bezpečnost, úroveň **ochrany investice** a transparentnost celého řešení v důsledku přístupu ke zdrojovým kódům všech použitých komponent.
4. technologie musí obsahovat prezentační vrstvu, která bude splňovat předpoklad jednoduchosti a získatelnosti informace v reálném čase.

Cílem prezentační vrstvy je zpřístupnit analytickou informaci uživateli tak, aby pro něj byla **snadno vyhodnotitelná,** snadno **dostupná** (tj. informace „ve správný čas na správném místě“) a **důvěryhodná**. Samozřejmým požadavkem je potřeba volit takové technologie, které jsou optimální z hlediska **celkových nákladů na vlastnictví** systému (tedy nízké náklady na údržbu a administraci, na provoz hardware a síťové infrastruktury, nízké náklady na rozšiřování počtu uživatelů). Splnění výše uvedených požadavků je zajištěno vhodným výběrem použitých technologií a jejich promyšlenou implementací:

- **Snadné a jednoznačné vyhodnocení informace:** Kromě standardních výstupů ve formě vhodně formátovaných a parametrizovatelných tabulek je možné analytickou informaci prezentovat ve formě 2D grafů, map nebo přímo exportovat do

souborů tabulkového procesoru. Je také možné vytvářet prezentace dat v 3D prostoru s možností interaktivní manipulace a tak umožnit uživateli snadno získat přehled o struktuře dat a trendech jejího vývoje.

- **Snadná dostupnost informace:** Analytická informace musí být snadno dostupná jak uvnitř firemní sítě, tak i pro mobilní uživatele. Kromě interaktivního přístupu (např. přes web portál) je vhodné mít možnost doručit potřebnou informaci uživateli i proaktivně pomocí nejrůznějších komunikačních kanálů (např. e-mail, SMS, fax).
- **Nízké celkové náklady na vlastnictví systému:** Pro implementaci je využito open source technologií, jejichž licenční model zaručuje uživateli jejich nízkou pořizovací cenu, vysokou míru ochrany investic a díky důslednému používání otevřených standardů i malou závislost na jednom dodavateli. Kritické části systému jsou implementovány na platformě operačního systému GNU/Linux, díky jehož vysoké stabilitě a snadné údržbě je možné udržet velmi nízké náklady na provoz řešení.

Konkrétní požadavky a návrh datové struktury je součástí detailní Projektové dokumentace, která jasně specifikuje, struktury do kterých mají dodavatelé systémů exportovat data, včetně popisu jednotlivých parametrů.

Obecně lze říci že řešené požadavky se vyskytují z následujících oblastí:

- Klinická (pacient, hodnocení pacienta v čase, čistě klinická záležitost)
- Ekonomická (náklady, výnosy, hospodaření nemocnice…)
- Multilaterální (náklady na pacienta, obecně data agregovaná z více systémů)

Přístup prostřednictvím www portálu je vhodný pro širokou škálu uživatelů, kterým může poskytnout různou míru funkcionality a interaktivity podle jejich konkrétních potřeb. Vývojáři (tzv. „power-user“) mohou prostřednictvím portálu vyvíjet nové reporty a analytické objekty (metriky, filtry, atd.), které pak mohou využít ostatní uživatelé na různých stupních rozhodování ve firmě. Předem připravené reporty jsou snadno začlenitelné např. do firemního portálu, kde pak mohou poskytovat potřebné informace pro širokou komunitu uživatelů, a to i těch, kteří nejsou pro práci s OLAP technologií nijak speciálně školeni.

Uživatel může vytvářet reporty velmi jednoduchým způsobem přenášením (tzv. **„drag and drop“**) **atributů** a **metrik** do předem připravené mřížky modelu tabulky. Uživatel si tedy sám určí rozložení tabulky a které metriky chce sledovat v návaznosti na vybrané atributy. Součástí definice reportu je i možnost definice filtrace reportu a jeho formátování. Formát zobrazení lze definovat přímo v prostředí tenkého klienta (web browser) interaktivním způsobem využívajícím obvyklých ovládacích prvků pro definici barvy výstupu, typu a velikosti písma, zarovnání atd.

Pro formátování reportu lze také využít tzv. podmíněného formátování. Je možné definovat podmínku (např. obrat je větší než…) a na její splnění vázat určitý způsob formátování výstupní buňky reportu (barva, typ písma, buňku je možné doplnit o různé ikony, poznámky atd.).

V průběhu životního cyklu systému roste počet vytvořených objektů (atributů, faktů, metrik, filtrů, reportů, mřížek atd.) a je třeba přesně kontrolovat přístupová práva uživatelů k reportům a k jednotlivým analytickým objektům. Lze si např. představit situaci, kdy primář má být schopen vytvářet reporty zobrazující výkony jednotlivých lékařů jeho kliniky, ale neměl by mít možnost sledovat výkony ostatních klinik. Pro řízení přístupu k datům je použit systém tzv. **„uživatelských rolí“**. Každý uživatel pak může v systému vystupovat v jedné nebo více rolích a každý objekt (např. report, metrika, atribut) má pak svůj vlastní tzv. **„Access Control List“**. Snadno lze pak definovat, které operace s objektem jsou povoleny a které zakázány pro konkrétní roli.

Pro práci ve vícejazyčném prostředí je výhodná důsledná internacionalizace použité technologie a lokalizace prostředí aplikace podle potřeby konkrétní organizace. Nastavením uživatelských preferencí se **lokalizuje** nejen prostředí www portálu, ale také **názvy** všech vytvořených **objektů** (metrik, filtrů, reportů) a **obsah reportů** (např. názvy diagnóz a formát data). Alternativou zobrazení dat je grafická reprezentace pomocí **2D grafů** a **3D prezentací**, která umožní uživateli snadno a rychle se zorientovat v rozsáhlých reportech a nacházet různé spojitosti a trendy v datech, které nejsou z tabulkové prezentace na první pohled patrné. Grafická prezentace výsledků je přístupná prostřednictvím tenkého klienta (web browser), a to i včetně možnosti interaktivní manipulace.

Užitečnou pomocnou metodou pro analýzu vícerozměrných dat je **interaktivní zobrazení dat v třírozměrném prostoru** (tyto metody bývají zahrnovány do oblasti vizuálního data miningu). Možnost interaktivní manipulace s 3D prezentací usnadňuje uživateli pochopení struktury dat, popř. trendů jejich vývoje. Vyžití statistického software projektu „R“ umožňuje analytikům použít širokou škálu pokročilých statistických metod a metod pro dolování dat (**data mining**), vyvíjených na nejvýznamnějších světových akademických pracovištích. Grafické knihovny projektu „R“ lze také využít pro generování kvalitní tzv. „statistické“ a „obchodní“ grafiky.

Využití kontingenčních tabulek tabulkového procesoru. Po přenosu dat z datového tržiště do tabulkového procesoru je možné velice efektivně provádět tzv. „řezy“ vícerozměrným datovým prostorem, včetně snadného drillování, pivotování a filtrování. Výsledky je možné snadno formátovat, zobrazovat v podobě 2D a 3D grafů a publikovat (ve formě PDF dokumentů nebo XLS souborů). Tento způsob práce s daty je vhodný pro menší objemy zpracovávané informace a menší počty sledovaných atributů a metrik. Data konkrétního reportu je také možno exportovat přímo z rozhraní tenkého klienta do tabulkového procesoru (MS Office, OpenOffice.org, StarOffice) ve formě tabulky včetně formátování. Jako vhodný tabulkový procesor je možné jme-

novat produkty OpenOffice.org nebo StarOffice firmy Sun, zejména pro dobře propracovaný a pružný systém definování kontingenčních tabulek a kvalitní grafický výstup (i ve formě 3D grafů).

Použité technologie

Navrhované řešení manažerského informačního systému je založeno na koncepci relační on-line analýzy dat, (tzv. **ROLAP** – Relational On-Line Analytical Processing), která poskytuje vynikající možnosti analýzy jak agregovaných ukazatelů, tak i atomických dat (např. dat jednotlivých obchodních transakcí). Využitím těchto prostředků je možné efektivně připravovat širokou škálu výstupů, od jednoduchých reportů až po komplexní analýzy, jinými technologiemi nerealizovatelnými. Systém umožňuje zpřístupnit výstupy uživatelům jak prostřednictvím tenkých klientů (WEB technologie), tak i formou přímé analýzy prostřednictvím kontingenčních tabulek v tabulkovém procesoru nebo je automaticky vhodně zformátované distribuovat uživatelům prostřednictvím faxu, elektronické pošty nebo SMS zpráv.

Použitá platforma díky své modulárnosti a škálovatelnosti umožňuje efektivně rozvrhnout projekt do jednotlivých etap a tak optimálně rozložit a zhodnotit nutné investice i zapojení vnitřních zdrojů odběratele. Otevřenost systému a využití standardních technologií (**XML, SOAP API**) zaručuje jeho snadnou integraci s technologiemi třetích stran. Flexibilita relačního datového modelování dává možnost optimálně navrhnout datový sklad a pružně reagovat na jeho budoucí modifikace a optimalizovat jej tak, aby bylo zaručeno efektivní fungování systému i při jeho dalším rozvoji. Podobně jako obecný systém pro podporu rozhodování, tak i řešení využívající technologie projektu MOÚ je rozděleno do tří základních vrstev: ETL procesy, datový sklad a prezentační vrstva. Tzv. ETL procesy zajišťují extrakci dat z primárních datových zdrojů, jejich transformaci a zavedení do datového skladu (z angl. „Extraction, Transformation and Loading“). Podle určení systému tato vrstva může být reprezentována datovým tržištěm nebo datovým skladem.

Vlastní úložiště datového skladu (ev. datového tržiště) může být zabezpečeno obecným relačním systémem řízení báze dat. V současné době se jeví jako výhodné pro uvažované objemy využít technologie databáze MySQL (http://www.mysql.com), která disponuje vynikajícími vlastnostmi pro využití v režimu tzv. RO (read-only) databáze při jedné z nejlepších propustností na trhu. Pro využití v oblasti datových skladů stojí za zmínku zejména následující vlastnosti:

- možnost uzamčení tabulek v paměti a využití hash indexů
- možnost komprimace tabulek a indexů
- možnost uložení a rychlého čtení dat přímo z indexových B-stromů
- tzv. „Merge“ tabulky umožňující partikulární komprimaci virtuální datové tabulky
- tzv. stripping tabulek umožňující jejich rozložení přes více diskových svazků a tím zvýšení I/O propustnosti
- možnost replikace databáze na více fyzických systémů jak pro zvýšení spolehlivosti, tak pro rozložení zátěže při čtecích operacích

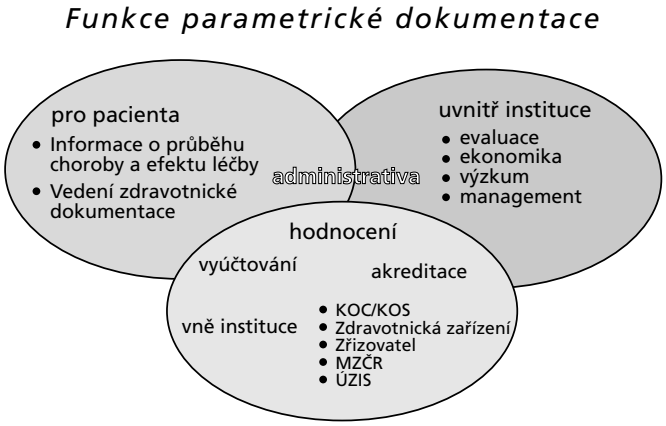
Systém řízení báze dat MySQL je produktem švédské firmy MySQL AB. Jedná se o Open Source technologii publikovanou jak pod GPL, tak pod komerční licencí. Se svými více než 4 miliony aktivních instalací se řadí mezi celosvětově nejrozšířenější databázové platformy. Díky tak širokému nasazení a dostupnosti zdrojových kódů se vyznačuje výbornou stabilitou. V oblasti datových skladů firma MySQL AB disponuje referencí databáze o velikosti tabulek faktů 50GB, celkové velikosti 200 GB (7 mil. záznamů/měsíc) udržující historii až 10 let.

21 Parametrický záznam onkologického pacienta jako součást nemocničního informačního systému.

Vydra J.[1], Šubrt D.[2], Aschermannová A.[1], Šmakal M.[1]
1) Onkologická klinika 1. lékařské fakulty Karlovy university Praha, Ústav onkologie a pneumologie na Pleši
2) Medicalc software s.r.o. Plzeň

Přes značný rozvoj léčebných metod nedošlo k zásadnímu zlomu v léčebných výsledcích. Nové léky a metody zvyšují náklady na léčbu na hranici ekonomické únosnosti, přitom ne vždy s odpovídajícím výsledkem. Základním problémem je výběr optimální léčebné modality pro konkrétního pacienta a zpětná vazba mezi léčebnými výsledky, náklady na léčbu a efektem pro pacienta. Stanovení léčebného plánu se provádí na základě některých klinických, histologických, biochemických či molekulárně genetických znaků – prognostických faktorů a negativních nebo pozitivních prediktivních faktorů. V současné době je známa řada prognostických a prediktivních faktorů. Jedná se zejména o klinické faktory jako jsou velikost nádoru a jeho rozsah (staging), jeho histologický typ (typing), jeho vyzrávání (grading), počet a rozsah metastatického postižení, hladina hormonálních receptorů, exprese receptorů EGF a VEGF rodiny, onkogenní aktivace, ploidita DNA a další. Význam těchto faktorů je dnes jednoznačně stanoven a jsou vedle klinického stavu pacienta rozhodující při výběru léčebné modality. Validita jednotlivých prognostických faktorů však může být rasově i regionálně diferencována a v neposlední řadě je známým významným faktorem i pracoviště, kde je pacient léčen.

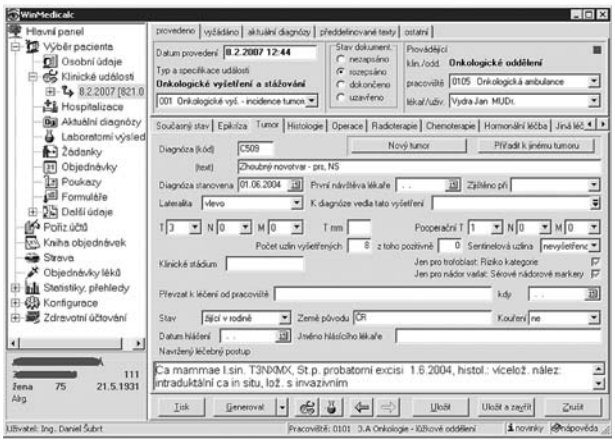
Zatímco indikace léčby pomocí individuálních parametrů pacienta již vstoupila do klinické praxe, chybí zpětné vyhodnocení výsledků ve vazbě na tyto faktory v klinické praxi. Nově připravované systémy úhrad v klinické onkologii též předpokládají diferenciaci úhrad podle detailní struktury pacientů. Parametrizace údajů je tedy i ekonomicky nezbytná. Stávající nemocniční informační systémy (NIS) neobsahují potřebná data v parametrické formě. Proto jsme jako součást nemocničního informačního systému nově aplikovali onkologický modul, který umožňuje parametrizovat klinické údaje.



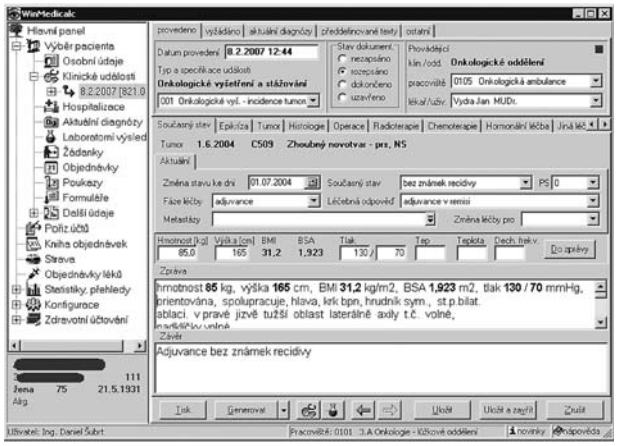
Obr. 1: Funkce parametrické dokumentace

Parametrický onkologický záznam tvoří:

1) Vstupní charakteristika pacienta – standardní součást NIS je doplněna o vstupní charakteristiku nádoru, základní jednotkou je tedy pacient a jeho nádor včetně vstupních prognostických faktorů, a to jak klinických, tak biologických.
2) Časová osa definující jednotlivé fáze léčby. Diagnostika, primární léčba – s případným členěním na neoadjuvanci, operační výkon, adjuvanci, dispenzarizace, recidiva/progrese, léčba další linie, symptomatická péče.
3) Sled klinických vyšetření ve vazbě na jednotlivé fáze léčby s hodnocením odpovědi na léčbu, a celkový stav pacienta – tato vyšetření představují primární zápis dokumentace a umožňují zároveň vyúčtovat provedené výkony.

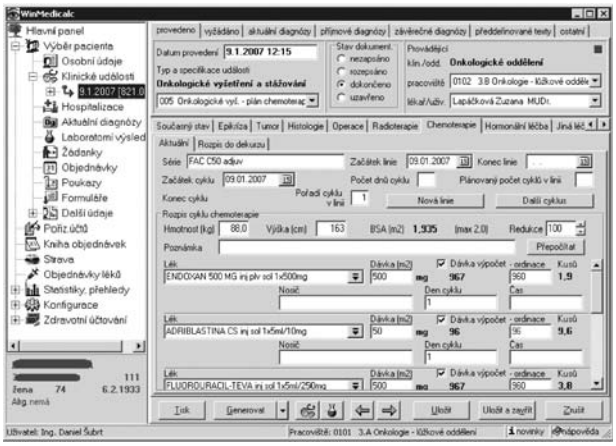


Obr. 2: Charakteristika nádoru

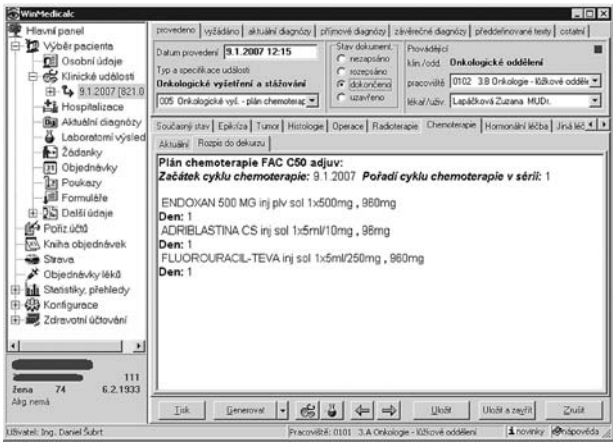


Obr. 3: Klinická vyšetření a fáze léčby

4) Samostatné moduly pro jednotlivé léčebné modality umožňují jak plánování léčby, tak její předpis a vyúčtování: plán chemoterapie, aplikace, předpis do dokumentace, radioterapie včetně sledování aplikovaných dávek a reakcí, operace s definicí radikality výkonu, hormonální léčba.

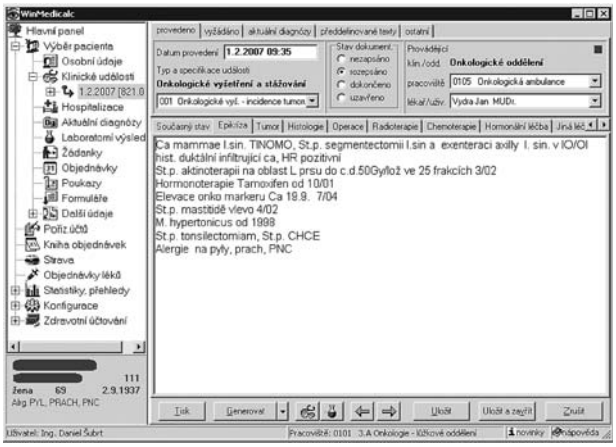


Obr. 4: Plánování chemoterapie



Obr. 5: Rozpis chemoterapie

5) Automatické generování výstupních zpráv o pacientovi – formou epikrízy dosavadního klinického průběhu, která je napojena na ostatní moduly NIS, jako jsou žádanky o vyšetření, zprávy z hospitalizace, zprávy o ambulantním ošetření/vyšetření. V závěru je systém schopen převést informace z parametrických údajů do textových. Odpadá tedy nutnost dvojího zápisu dokumentace, což byl základní požadavek na systém. Jednou zapsaný údaj již není nutné opakovaně zapisovat.
6) Výstupní sestavy: hlášení ZN, sestavy pro zdravotní pojišťovny včetně registru pacientů s léčbou vyhrazenou specializovaným centrům na základě zvláštní smlouvy, hodnocení vlastních léčebných výsledků u jednotlivých skupin pacientů, analytická data pro výzkumné účely.
7) Přenos individuálních a souhrnných dat pro komunikaci uvnitř komplexní onkologické skupiny (KOS/KOC) a mezi centry.



Obr. 6: Výstupní epikríza

Parametrický onkologický záznam jsme zprovoznili v Ústavu onkologie a pneumologie na Pleši k 1.10.2006. Moduly pro vedení onkologických záznamů jsou integrální součástí nemocničního informačního systému WinMedicalc. Díky tomu je práce s onkologickými pacienty navázána do kontextu celonemocniční péče, v jednom uživatelském prostředí, shodnými způsoby ovládání, lze získat o pacientovi maximum informací potřebných pro správné lékařské rozhodování.

WinMedicalc využívá osvědčeného modelu klient-server, jeho tlustý klient pracuje v prostředí Microsoft Windows a data jsou ukládána do centrální relační databáze Oracle (aktuálně ve verzi 10g). WinMedicalc je stavěn modulárně s použitím objektově orientovaného návrhu. Základem je univerzální jádro, zprostředkovávající datové operace s databází (prostřednictvím dotazovacího jazyka SQL) včetně doménových validací a definující jednotné způsoby ovládání a chování aplikace. Jádro má implementován unikátní mechanismus ukládání dat nadstavbových klinických modulů, prostřednictvím mezivrstvy metadat se data všech klinických modulů ukládají do jednotné datové struktury.

Koncepce WinMedicalcu je založena na tzv. klinických událostech, což je základní entita procesu léčby pacienta. Klinickými událostmi je popsán i proces onkologického pacienta, který začíná událostí incidence tumoru, může pokračovat událostí operace, radioterapií, plánem chemoterapie, jednotlivými aplikacemi chemoterapie až třeba po pravidelné kontroly vyléčeného pacienta na onkologické ambulanci a jeho další sledování.

Podpořeno grantem IGA MZČR NR/8323-3

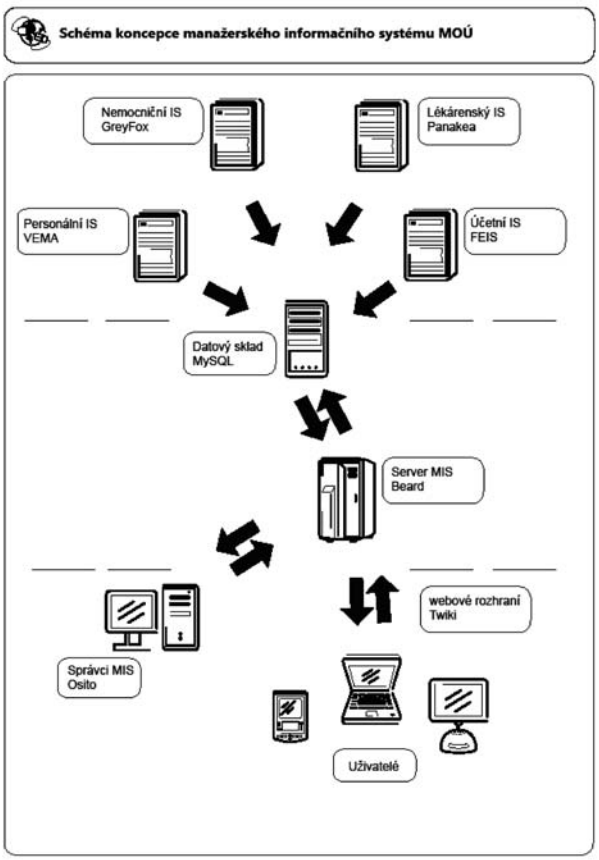
22 Koncepce manažerského informačního systému na MOÚ.

Šebesta R., Komínek J., Andres P., Novák J.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Manažerský informační systém (MIS) je významným nástrojem pro podporu strategického i operativního rozhodování na všech úrovních zdravotnického zařízení. Podstatou funkce MIS je vytěžování požadovaných dat (v databázích jednotlivých informačních systémů), jejich zpracování, zobrazení a předání příslušným uživatelům.

Možnost exportu zobrazených přehledů (reportů) do nejčastěji používaných formátů (xls, ppt, doc, pdf, xml) činí z tohoto nástroje univerzálně využitelnou pomůcku.

MIS na MOÚ je koncipován jako nadstavba nad jednotlivými, již existujícími informačními systémy (IS), mezi nimiž není komunikace. Rámcově se MIS dělí do tří částí: integrace dat do datového skladu (ETL), data miniing a prezentace – jak vyplývá z přiloženého schématu:



V MOÚ je využívána pro bussiness intelligence výstupy technologie BEE, vyvíjená na platformě Open Source. Vlastní datový sklad je provozován nad databází MySQL, výstupy jsou možné přes rozhraní osito a Twiki. Datový sklad vychází z datového modelu přizpůsobeného potřebám MOÚ.

Je použita metodologie relačního on-line analytického zpracování dat (ROLAP), umožňující komplexní analýzy jak agregovaných ukazatelů, tak atomických dat. Projekt je plně lokalizován.

Výstupy jsou ve formě uživatelsky definovatelných reportů, tj. tabulek nebo různých typů grafů. Soubor reportů je přístupný přes webové rozhraní, pomocí internetového prohlížeče (tenkého klienta).

MIS budovaný na MOÚ je příkladem sofistikované aplikace vyspělých informačních technologií pro potřeby managementu špičkového onkologického centra.

23 ICT a řešení digitální knihovny chemoterapeutických režimů.

Klimeš D.[1], Dušek L.[1], Vyzula R.[2], Kubásek M.[1], Schwarz D.[1], Sošková R.[2], Koptíková J.[1], Brabec P.[1], Ráček J.[1], Andres P.[2]
1) Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno
2) Masarykův onkologický ústav, Brno

Úvod

V rámci projektu DIOS („Dose Intensity as Oncology Standard“), zaměřeného na sledování intenzity dávky cytostatik aplikovaných v rámci protinádorové chemoterapie, vznikla a dále se vyvíjí digitální knihovna současných chemoterapeutických režimů. Jde o nový on-line zdroj aktuálních a podrobných informací v oblasti protinádorové chemoterapie. Hlavními důvody digitalizace jsou:

1. Větší a rychlejší dostupnost informací o aktuálních chemoterapeutických režimů pro jednotlivé onkologické diagnózy
2. Brána pro nasazení výpočetní techniky v oblasti hodnocení dodržování chemoterapeutických režimů
3. Možnost elektronické distribuce chemoterapeutických režimů z centrální knihovny do heterogenního prostředí nemocničních informačních systémů

V současnosti jsou definice režimů dostupné buď v tištěné podobě formou knižních publikací a odborných článků v recenzovaných časopisech, nebo elektronicky jako doporučené postupy (guidelines). Elektronická podoba publikací usnadňuje distribuci informací o nových režimech. Budovaná digitální knihovna navazuje na tyto informační zdroje a dále rozšiřuje jejich možnosti. Knihovna nabízí on-line přístup přímo ke konkrétnímu režimu a uživateli nabízí vznést k němu připomínku či dotaz, který je automaticky přeposlán na garanty dané diagnózy. Informace uložené v knihovně jsou tak neustále upřesňovány či korigovány.

Základní struktura chemoterapeutických režimů je v knihovně ukládána tak, aby bylo možné definice využívat přímo v počítačových aplikacích. Každý přidávaný režim je nejprve dokomponován na jednotlivé elementy, které jsou přepsány do struktur XML jazyka. Základní elementy CHR jsou popsány v tabulce 1. Podrobná struktura XML dokumentů je popsána pomocí XML schématu.

Element	Popis
Hlavička	Obsahuje souhrnné informace o CHR. Hlavička obsahuje elementy určující unikátní označení CHR, diagnózu, účel a linii
Cytostatikum	Označení cytostatika. Definice obsahuje český i anglický název, zkratku a ATC kód
Dávkování	Dávkování daného cytostatika, obsahuje dávku, jednotky, den aplikace a způsob podání
Délka cyklu	Délka cyklu ve dnech
Počet cyklů	Doporučený počet cyklů (opakování schématu)

Tabulka 1

Tato forma ukládání definic umožňuje nasazení výpočetní techniky v široké paletě aplikací, což je demonstrováno přímo na portálu knihovny, jehož součástí jsou tři webové aplikace: Vyhledávání v knihovně, Plánovač terapie a Kalkulátor intensity dávky (DI).

Vyhledávání umožňuje vyhledávat v knihovně podle zadaných kritérií jako je diagnóza, aplikované cytostatikum, účelu terapie (paliace/adjuvance) a dalších komponent definice režimu. Plánovač terapie umožňuje promítnout zvolený režim do kalendáře a připravit plán ambulantních návštěv s přepočítanými dávkami na povrch těla či hmotnost konkrétního pacienta. Tento rozpis je možné si přímo na portálu vytisknout. Kalkulátor DI nabízí možnost vypočítat intensitu dávky jak standardního (stoprocentně dodrženého) režimu, tak reálně aplikovaného režimu, kdy se do výpočtu promítnou případná zpoždění aplikací či redukce dávek cytostatik.

Digitální knihovna může být využita aplikacemi třetích stran jako jsou například nemocniční informační systémy, které by knihovnu mohli využívat jako zdroj aktuálních chemoterapeutických schémat ve specifických modulech pro plánování, administraci a hodnocení chemoterapie. Digitální knihovna režimů je volně dostupná prostřednictvím internetu na stránkách https://dios.registry.cz. V první fázi byly digitalizovány režimy publikované v oficiální publikaci České onkologické společnosti. Jednotlivé režimy jsou vkládány centrálně na základě podnětu garanta pro danou onkologickou diagnózu.

Cílem další fáze projektu je kromě aktualizace a dalšího rozšiřování obsahu knihovny také zprostředkování XML definic chemoterapeutických režimů zájemcům třetích stran v podobě webových služeb (web services). Pomocí této technologie bude možné například automaticky aktualizovat interní databázi chemomodulů nemocničních informačních systémů.

Výzva ke spolupráci

Projekt DIOS byl iniciován se schválením Výboru České onkologické společnosti. Ve své současné podobě nabízí nástroje využitelné širokou škálou uživatelů od studentů medicíny až po síť specializovaných onkologických center. Jakékoli podněty nebo náměty lze sdělovat přímo správci portálu na adresu uvedenou na portálu.

Literatura

- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncologyt NCCN, [accessed 1.10.2006].
  Available from http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp.
- Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění: Česká onkologická společnost ČLS JEP, 2005.
- David S. Fischer, Henry J. Durivage, M. Tish Knobf, Nancy Beaulieu (Editor): The Cancer Chemotherapy Handbook (Mosby's Cancer Chemotherapy Hadbook)
- Edward, M.D. Chu: Pocket Guide to Chemotherapy Protocols (Spiral-bound)
- W3C Recommendation: SOAP Version 1.2, http://www.w3.org/TR/soap12-part0/

Poděkování

Vývoj portálu DIOS je podporován grantem Fondu rozvoje vysokých škol č. 2608 a dále výzkumným grantem společností AMGEN.

24 Hematoonkologie v telehematologii: ICT řešení webového archivu.

Schwarz D.[1], Penka M.[2], Dušek L.[1]
1) Institut biostatistiky a analýz LF a PřF MU, Brno
2) Oddělení klinické hematologie a Interní hematoonkologická klinika LF MU a FN Brno

Abstract-Telehematology, the educational program at the Faculty of Medicine of Masaryk University, presents formation and utilization of a web image archive and connected telehematology workstations. The archive includes a clinical part as well as an educational part. It allows physicians to remotely consult indefinite findings with the use of a shared repository. In the educational part, it is available for contact tuition as well as for effective distant learning.

Cílem tohoto příspěvku je popsat aktuální stav programu Telehematologie, který byl v rámci aktivit RITM (Rada pro informační technologie v medicíně při LF MU) nastartován na začátku roku 2006. Program Telehematologie zahrnuje vznik a využití webového archivu snímků a k němu připojených telehematologických stanic. Archiv má svou klinickou a edukační část. V klinické části je možno komplikovaný nebo nejasný nález přes společné úložiště předat jiným lékařům a formou rychlé výměny informací po síti s nimi nález probrat; snímky i diskuze jsou anonymní, bez identifikace pacienta. V edukační části jsou snímky doplněny o nezbytné údaje tak, aby byl archiv využitelný pro interaktivní výuku včetně cenné možnosti efektivního samostudia.

Struktura atlasu

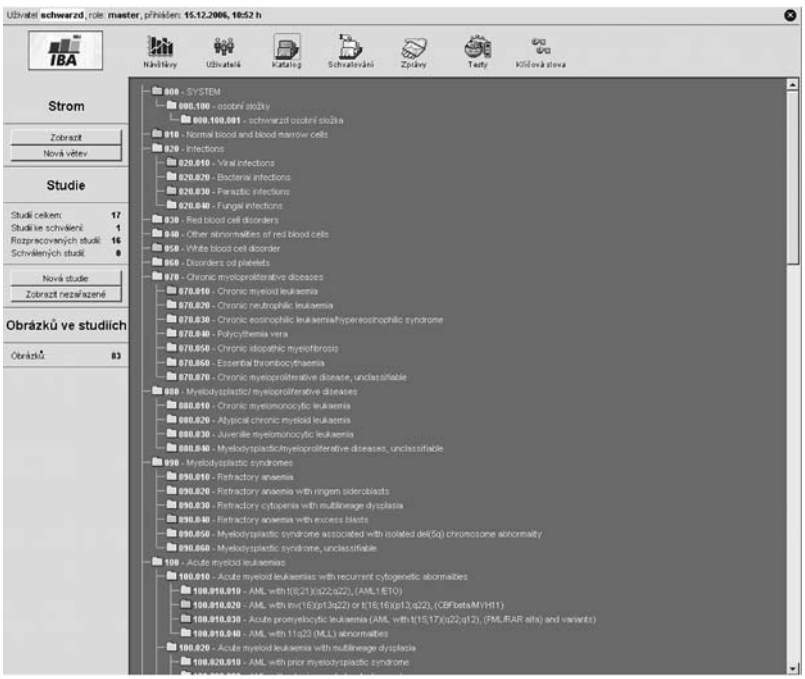
Základní taxonomii atlasu tvoří stromová struktura, kde jednotlivé větve představují diagnózy dle klasifikace WHO s českým překladem dle MKN. Strom umožňuje libovolně hluboké substruktury a přidávání dalších větví, viz obr. 1.

V každé větvi je možno ukládat tzv. studie, kterými se zde rozumí soubor snímků k jedné diagnóze a jednomu konkrétnímu pacientovi. Studie je identifikována upřesněnou diagnózou a volným textovým popisem. Ke studii je možno asociovat libovolný počet snímků. Každý snímek je identifikován kromě svého názvu a volného textového popisu také atributem nabývajícího hodnot z výběru:

- periferní krev,
- kostní dřeň,
- mozkomišní mok.

Kromě výše uvedených parametrů jsou ke každému snímku přidávány seznamy klíčových slov, které uživatel vybírá z předem nadefinovaného slovníku, viz obr. 2. Snímky jsou v archivu ukládány v několika verzích:

- soubor v původním formátu a rozlišení,
- soubor v původním rozlišení převedený do formátu JPEG,
- soubor převzorkovaný na velikost větší hrany 800 px,
- soubor 800 px s aplikovaným vodoznakem MU,
- soubor představující zmenšeninu snímku na větší velikost hrany 75 px.



Obrázek 1:
Ukázka části klasifikačního stromu webového archivu programu Telehematologie.

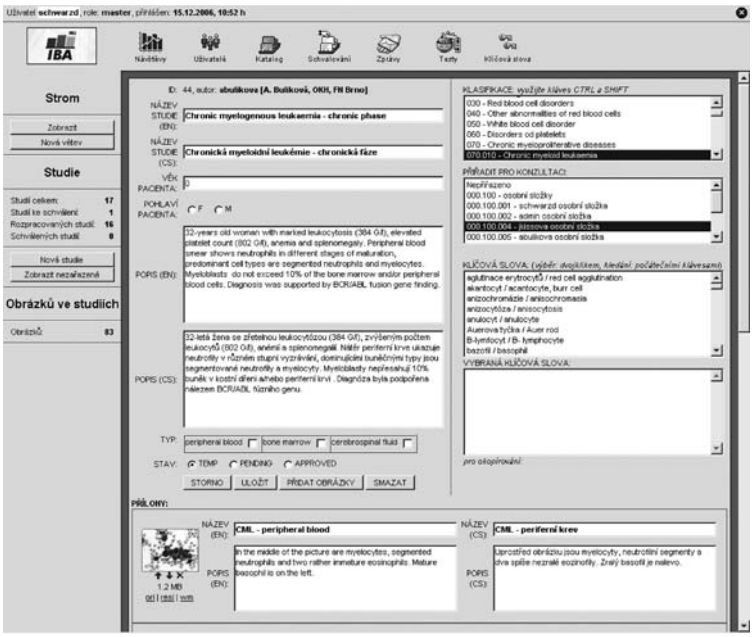
Veškeré převody a konverze formátu se dějí zcela automaticky bez zásahu uživatel na serveru, který zabezpečuje chod archivu. Uživatelé mají možnost posílat do archivu obrázky ve formátu JPEG nebo TIFF. Pro účely konverze, převzorkování a obtisku vodoznaku je využito volně dostupného softwaru ImageMagick. Server je vybaven operačním systémem Linux, pro chod archivu jsou dále nutné: Apache, PHP a MySQL (vše volně dostupné).

Uživatelské role v archivu jsou následující:

- Author: ve zpřístupněných větvích stromové struktury je mu umožněno vytvářet nové studie a upravovat dosud zadané vlastní studie ve stavu TEMP a PENDING.
- Garant: kontroluje studie ve stavu PENDING (tj. studie, které autor označil ze své strany jako hotové) a může studii přesunout do stavu APPROVED.
- Dummy (budoucí role): koncový uživatel archivu: může prohlížet studie ve stavu APPROVED, budou mu nabídnuty jen snímky po konverzi z původního formátu, pro neregistrované uživatele to budou snímky opatřené vodoznakem MU.
- Administrator: má všechna práva a provádí dohled nad chodem archivu. Při požadavku odborných garantů programu Telehematologie rozšiřuje slovník klíčových slov a upravuje klasifikační strom archivu.

Veškeré role je možno uživatelům přidělovat nejen globálně na celý archiv, ale také na vybrané substruktury klasifikačního stromu.

Pro účely vzdálených konzultací je možno snímky ukládat mimo větve klasifikačního stromu, a to do tzv. osobních složek vybraných uživatelů. Nad každou studií je možno vést diskuzi, uchovává se její historie a je možno zapnout/vypnout emailové notifikace na nové zprávy nebo na nové studie v osobních složkách. Vzhledem k webové povaze archivu je možno k diskuzi přizvat odborníka odkudkoli, kde je připojení k síti Internet.



Obrázek 2: Ukázka části formuláře studie ve webovém archivu programu Telehematologie.

Technické prostředky

Do sběru snímků se může zapojit každé pracoviště, které je schopné se svým technickým vybavením pořídit digitální obraz z mikroskopu v kvalitě dostačující cílům programu.

Telehematologickou pracovní stanicí se zde rozumí pracovní místo vybavené mikroskopem s optickým výstupem pro digitální kameru nebo fotoaparát a běžný počítač PC umožňující připojení daného fotoaparátu nebo kamery přes rozhraní USB nebo Firewire. Pro ukládání snímků do počítače postačí software, který je většinou součástí dodávky kamery nebo fotoaparátu (např. QuickPhotoMicro), a dále je výhodné počítač vybavit vhodným programem pro úpravy snímků, včetně jejich popisků, šipek apod. (např. volně dostupný Gimp). Pro zasílání snímků do archivu a jejich popisování postačí uživateli běžný internetový prohlížeč.

Na dosud zapojených pracovištích je využito následujících zařízení:

OKH FN Brno, pracoviště dětské medicíny:

- mikroskop Olympus BX41,
- digitální fotoaparát OLYMPUS C4000 Zoom (4 Mpx)
- optický adaptér U-TV1X-2
- PC (USB spojení s fotoaparátem)

OKH FN Brno, pracoviště medicíny dospělého věku:
- mikroskop Olympus BX41,
- digitální kamera ARTCAM 300MI CMOS (3 Mpx)
- optický adaptér U-TV0.5X
- PC (USB spojení s kamerou)

Do budoucna je třeba především zvýšit počet a vybavení telehematologických stanic tak, aby bylo možné do archivu pořizovat snímky i během rutinního klinického provozu. Jako klíčové se přitom jeví vybavit pracoviště mikroskopy s kvalitní optikou a digitální kamerou. Nezanedbatelnou položkou v případných investicích do programu Telehematologie musí logicky tvořit také prostředky na nákup kvalitních zobrazovacích zařízení, tj. především projektorů pro kontaktní formu výuky. V rámci dalšího vývoje softwaru se předpokládají úpravy stávající verze archivu a dále se chystá tvorba srozumitelného rozhraní archivu pro studenty s komfortními možnostmi vyhledávání a prohlížení snímků.

Poděkování
Projekt je podporován rozvojovým programem Masarykovy univerzity zaměřeným na e-learning a tvorbu multimediálních učebních pomůcek.

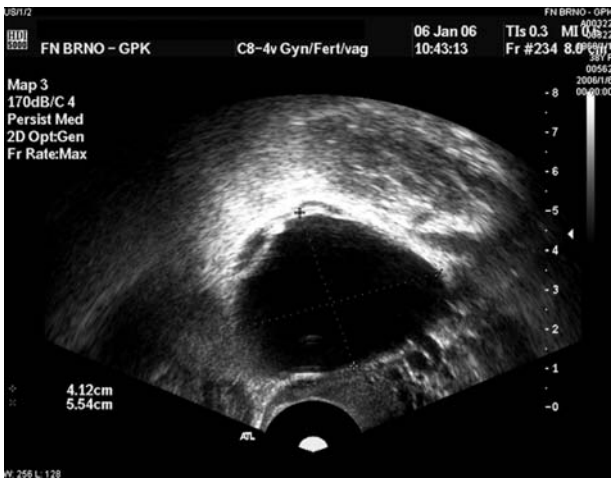
25 PACS v gynekologii.

Račanská E.[1], Petrenko M.[1], Ventruba P.[1], Dostál O.[2], Javorník M.[2]
1) Gynekologicko – porodnická klinika LF MU a FN Brno
2) Ústav výpočetní techniky, Masarykova Univerzita Brno

Úvod

PACS (Picture Archiving and Communication System) se na našem pracovišti začal využívat v roce 2004. Jeho zavedení do oboru gynekologie a porodnictví přináší celou řadu výhod. Vede k nezpochybnitelnému zkvalitnění lékařské péče, zejména v oblasti bezpečné archivace obrazových dat a jejich dalším využití. Archivovaný materiál neztrácí na kvalitě je snadno a rychle dostupný, tvoří základ výukové anonymní databáze určené studentům lékařských oborů a lékařům. Základním zdrojem obrazových dat v gynekologii je ultrazvuk a endoskopická i kolposkopická kamera. Archivované endoskopické záznamy slouží k obrazové dokumentaci a významně doplňují operační protokoly, které popisují peroperační nález a provedený výkon.

Obr. 1. Laparoskopie, cysta levého ovaria



Obr. 2. Vaginální ultrazvukové vyšetření anechogenní cysta levého ovaria

Materiál a Metody

Ultrazvukové snímky, kolposkopické a endoskopické záznamy pacientek vyšetřených na našem pracovišti jsou ukládány v digitální formě prostřednictvím PACS v archívu Fakultní nemocnice (FN) Brno. Ultrazvuk a kolposkop mají digitální výstup a snímky mohou být ihned odesílány do archívu FN Brno. Digitální endoskopické záznamy jsou někdy zkráceny a upraveny a všechny archivovány prostřednictvím PACS v archívu FN Brno. Každý archivovaný endoskopický záznam obsahuje důkladný pohled na oblast malé pánve se zaměřením na dělohu, vaječníky a vejcovody a patologický nález. Důležité momenty z pro-

váděného operačního výkonu a stav po výkonu jsou důkladně zdokumentovány. Celkový záznam trvá v průměru 60 vteřin a je většinou rozdělen do několika kratších sekvencí.

Obr. 3. Příklad záznamu ve výukové anonymní databázi, dermoid.

Výsledky

Od září 2005 bylo na Gynekologicko-porodnické klinice provedeno okolo 1100 diagnostických a operačních laparoskopií a hysteroskopií. Videozáznamy z těchto výkonů, které byly dříve ukládány na videokazetu, jsou nyní bezpečně archivovány v digitální podobě prostřednictvím PACS v archívu FN Brno (1).

Záznamy lze po zadání rodného čísla pacienta lehce vyhledat, zhodnotit a dále využívat. Doplní operační protokol o prováděné operaci, zpřístupní peroperační nález i jiným lékařům, kteří nebyli při výkonu přítomni. Umožní lékařům přípravu na tzv. „ second look laparoscopy“. Nálezy v malé pánvi nebo dutině děložní lze srovnávat s ultrazvukovými nálezy, které byly získány během předoperačních vyšetření a definitivním histologickým nálezem (Obr.1, 2).

Naše pacientky podstupují v rámci vyšetřovacího algoritmu i jiná zobrazovací diagnostická vyšetření, CT, MRI, PET, RTG. Tato vyšetření jsou prováděna na jiných pracovištích. Žádanku nyní doplníme i o příslušný ultrazvukový nález z vyšetření malé pánve archivovaný prostřednictvím PACS. Radiolog takto může srovnat sono a např.CT vyšetření a upřesnit zjištěný nález.

Dříve jsme měli k dispozici pouze slovní závěr těchto vyšetření a obrazovou dokumentaci (snímky) až na vyžádání. Nyní je popis doplněn i o digitálními snímky, které lze lehce a rychle vyhledat na příslušném počítači na našem pracovišti.

Všechny zajímavé digitální snímky a záznamy uchované prostřednictvím PACS tvoří základ pro tvorbu anonymní výukové databáze (obr.3).

Závěr

Zavedení PACS je významným přínosem v oboru gynekologie. Umožňuje bezpečnou archivaci všech obrazových dat, rychlý a bezdrátový přenos mezi jednotlivými pracovišti a odborníky (2, 3). Přispívá ke zpřesnění a zrychlení diagnostiky, kvalitnímu zhodnocení léčby a hlavně zlepšení péče o pacienty.

Literatura

1. Račanská, E., Petrenko, M., Ventruba, P.: Vysokorychlostní přenosy a archivace obrazových medicínských dat. Prakt Gyn 2005: 9: 31-33.
2. Dostál O, Javorník M., Ventruba P: Collaborative environment supporting research and education in the area of medical image information. Int J CARS. 2006; 1: 98-100.
3. Dostál O, Javorník M., Slavíček K: Opportunity of Current ICT in the processing of Medical Image Information. Paper presented at: International Conference of International Association of Science and Technology for Development; January 23-25, 2006; Puerto Vallarta, Mexico.

26 Zkušenosti s robotickým monitorovacím systémem RP-7 v praxi.

Jelínek P., Buřilová H.
ARO, Masarykův onkologický ústav, Brno

RP-7 je systém zprostředkující prostřednictvím internetu vzdálenou vizuální i verbální komunikaci mezi lékaři a mezi lékařem a pacientem. Díku využití protokolu WI-FI umožňuje volný pohyb zařízení po oddělení intenzivní péče a dostupnost prakticky každého lůžka.

Na ARO Masarykova onkologického ústavu je využíván od listopadu r. 2006.

Přínosem je především možnost častějších kontrol pacientů na intenzivních lůžcích jejich ošetřujícím lékařem mimo pracovní dobu a poskytnutí konzultace. Pohotovostní služba je samozřejmě obsazena specializovaným lékařem, ale lékař který pacienta dokonale zná dokáže na základě vyhodnocení trendu dříve odhadnout komplikace. Principem tedy není nahrazení přítomnosti lékaře u intenzivního lůžka strojem, ale naopak zintenzivnění dostupnosti specialisty v mimopracovní době. Kromě toho je využíván ke komunikaci s imunokompromitovaným onkologickým pacientem.

V.
Monitorování a predikce v onkologii

27 Paradigma predikce odpovědi na inhibitory HER rodiny u nádorových onemocnění různého histogenetického původu: více indikací, více léčiv, ale téměř shodné prediktory.

Hajdúch M.[1], Berkovcová J.[1], Trojanec R.[1], Dziechciarková M.[1], Radová L.[1], Janošťáková A.[1], Mlčochová S.[1], Wiecek S.[1], Staňková M.[2], Grygárková Y.[3], Kolek V.[3], Cwiertka K.[4], Kiss I.[5], Radzioch D.[5], Kolář Z. 7, Škarda J.[7], Minárik M.[8], Mihál V.[1]

1) Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika, LF UP a FN v Olomouci
2) Genetica, s.r.o., Praha
3) Klinika plicních nemocí a tuberkulózy, LF UP a FN v Olomouci
4) Onkologické klinika LF UP a FN v Olomouci
5) Oddělení klinické onkologie FN Brno
6) Department of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, Canada
7) Ústav patologie LF UP a FN Olomouc
8) Genomac International, s.r.o., Praha

U nádorů epiteliálního původu je často detekovaná zvýšená aktivace receptoru pro epidermální růstový faktor (Egfr1). Protein Egfr1 je tak vhodnou molekulou k cílenému ovlivnění různými typy inhibitorů. Jedná se o protilátky, svým účinkem zaměřené proti vazebné doméně extracelulární části receptoru, např. cetuximab. Druhou skupinou látek s inhibičním účinkem jsou nízkomolekulární terapeutika prostupující buněčnou membránu, např. Iressa a Tarceva. Jedná se o nákladnou léčbu, proto je nezbytné před aplikací vyšetřit status *egfr1* genu. Často za nárůstem aktivity receptoru stojí amplifikace a overexprese genu. Výhradně u plicních karcinomů byl popsán další způsob patologické aktivace receptoru a to somatickými mutacemi v jeho tyrozinkinázové části. V případech potvrzené zvýšené aktivace Egfr1 proteinu je jeho cílená inhibice správnou volbou pro pacienta. Pokud má nádorové onemocnění příčinu v aktivaci sekundárního přenašeče signálu, je inhibice zaměřená proti receptoru neúčinná. Řada tumorů má přítomnou aktivující somatickou mutaci onkogenu *k-ras*, který exprimuje GTP-vázající protein a je za fyziologických podmínek aktivován proteinem Egfr1.

Naše pracoviště má široké zkušenosti se stanovením predikce odpovědi na inhibitory Egfr1. Byly zpracovány dvě retrospektivní studie pacientů. V prvním případě se jednalo o 146 pacientů s plicním karcinomem, kteří byli zařazeni do Programu časného přístupu a byli léčeni Iressou. Do druhé skupiny bylo zařazeno 28 pacientů s nádorem hlavy a krku, kteří byli rovněž léčeni Iressou. V současné době prospektivně vyšetřujeme pacienty s karcinomem kolorekta pro plánovanou terapii cetuximabem a pacienty s plicním karcinomem, u nichž je zamýšlena léčba erlotinibem.

Při našich vyšetření analyzujeme Egfr1 na úrovni genu i proteinu. K určení exprese užíváme imunuhistochemické stanovení pomocí myší monoklonální protilátky (Anti-humane EGFR, firmy DakoCytomation, Česká republika). Dalším běžným vyšetřením je fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) k určení počtu kopií genu *egfr1*. Při molekulárních analýzách jsou testovány geny *egfr1* a *k-ras*. Během těchto vyšetření je přistupováno k přímé sekvenaci často mutovaných úseků obou genů (exon 19 a 21 genu *egfr1* a exon 1 genu *k-ras*). Vedle klasického terminačního značení amplifikovaného řetězce s následnou automatickou kapilární elekroforézou jsou testované další metody. Především fragmentační analýza PCR produktů je snadná pro detekci delečních mutací. Dále je užívána metoda pyrosekvenování, jako vysoce senzitivní analýza při stanovení minimálního množství mutovaných molekul v testovaném materiálu. Rovněž vysokou senzitivitu má metoda *real time* PCR s využitím PNA oligonukleotidů, která je vhodná pro detekci jednotlivých mutací.

Pro správný závěr vyšetření a stanovení predikce odpovědi na léčbu je nutné především molekulární analýzy zacílit přímo na nádorové buňky, případně používat metody s dostatečnou senzitivitou, při kterých kontaminace nenádorovou DNA neovlivní výsledek. Stejně zásadní je i načasování odběru materiálu, neboť díky nestabilitě genomu tumorových buněk často dochází ke změnám biologických vlastností s progresí nádorového onemocnění.

Práce podporována výzkumným záměrem MŠMT 6198959216,
granty LC07017, MPO 1H-PK/45, IGA MZČR NR8335 a NR/9076.

28 Cytotoxický MTT test – boj za kvalitnější data a vyšší úspěšnost metody.

Michalová E.[1], Němečková I.[1], Valík D.[2], Nenutil, R.[1], Vojtěšek B.[1]

1) Oddělení klinické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno
2) Oddělení laboratorní medicíny, Masarykův onkologický ústav, Brno

Ex vivo testy chemorezistence nikdy nemohou zcela napodobit podmínky *in vivo* a na základě nich tedy není možno naprosto přesně předpovědět citlivost nádorových buněk k cytostatiku. Cílem *ex vivo* testů je však nalézt cytostatikum potenciálně účinné pro daný typ nádoru a to zejména v případě pacientů, kteří již vyčerpali možnosti standardní léčby či pro něž standardní chemoterapie neexistuje.

Metoda stanovení chemorezistence je založena na kultivaci izolovaných buněk nádoru s cytostatiky o různých koncentracích a následné zjištění viability buněk prostřednictvím metabolického testu. Vlastní provedení je komplikováno především faktorem heterogenity nádorového materiálu, který se v konečném důsledku nejvíce projevuje v kvalitě získaných dat a možnosti jejich hodnocení. Nicméně i striktní dodržení dílčích kroků je nezbytné pro dosažení maximální možné účinnosti testu, na níž závisí výsledné hodnocení citlivosti vzorku.

Z výsledků vyplynulo, že pouze z 50% vzorků zpracovaných v období 09-11/2006 bylo izolováno dostatečné množství živých nádorových buněk pro následnou kultivaci s cytostatiky. Avšak pouze u poloviny z nich byla získána relevantní data, která byla možno vyhodnotit. Ve standardním operačním protokolu používaném v MOÚ byly odhaleny nedostatky, které mohly do značné míry ovlivnit získaná data a tím i celkový výsledek hodnocení. Limitujícím faktorem se ukázala být především příprava většího počtu desek s kultivačním médiem a roztoky cytostatiky předem a jejich dlouhodobé uchování ve zmraženém stavu. Důsledkem tohoto postupu došlo zejména ke snížení kvality kultivačního média v deskách, lze taktéž pochybovat o stabilitě dlouhodobě skladovaných roztoků cytostatik v kultivačním médiu aj.

Pomůže postupné odstranění nedostatků a optimalizace protokolu k celkovému zvýšení úspěšnosti metody?

Práce byla podpořena výzkumným záměrem MOÚ MZO 00209805.

29 Predikce odpovědi na terapii trastuzumabem u pacientů se vzdáleně metastazovaným karcinomem prsu. Příčiny selhání léčby a jejich možné řešení.

Grell P.[1,2], Svoboda M.[1,2], Šimíčková M.[3], Fabián P.[4], Palácová M.[1], Petráková, K.[1], Macková D.[1], Nenutil R.[4], Hajdúch M.[5], Cwiertka K.[6], Vyzula R.[1,2]

1) Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav v Brně (MOÚ)
2) Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně (LF MU)
3) Oddělení laboratorní medicíny, MOÚ
4) Oddělení patologie, MOÚ
5) Laboratoř experimentální medicíny
6) Onkologická klinika FN a LF UP Olomouc.

Trastuzumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti extracelulární doméně receptoru Her-2/neu (ErbB2, dále jen Her-2), jehož nadměrná exprese (Her-2+) je detekována přibližně u 15-25% karcinomů prsu, které se vyznačují agresivním biologickým chováním. Trastuzumab je v současnosti zároveň i jedinou látkou použitelnou k cílené terapii těchto karcinomů, kde v kombinaci s chemoterapií výrazně zvyšuje léčebnou odpověď a prodlužuje čas do progrese onemocnění i celkové přežití pacientek. U většiny pacientek, jejichž onemocnění iniciálně odpovídalo na terapii trastuzumabem, však dochází během jednoho roku k progresi choroby (1). Pomineme-li situaci, kdy tato progrese nastává v centrálním nervovém systému, tedy v kompartmentu nedostupném pro trastuzumab, je nutné hledat příčiny selhání léčby v mechanismech, které interferují s působením trastuzumabu nebo obecně působí cytoprotektivním účinkem.

I. ovlivnění vazby trastuzumabu k Her-2 receptoru. K negativnímu ovlivnění vazby trastuzumabu k Her-2 receptoru může docházet: a) mutací genu, která se projeví změnou struktury receptoru, b) maskováním vazebných epitopů receptoru membránovým glykoproteinem mucinem-4 (MUC4), c) štěpením extracelulární domény receptoru prostřednictvím metalloproteás skupiny ADAM (2,3).

II. změna vazebných interakcí uvnitř receptorové sítě. Po navázání ligandu dochází k homodimerizaci nebo heterodimerizaci mezi receptory ErbB rodiny (EGFR, Her-2, Her-3 a Her-4), což vede k jejich aktivaci. Změna exprese jednotlivých receptorů nebo jejich preferenčních vazeb může vést k dimerizaci, kterou podávání trastuzumabu neovlivní (EGFR/EGFR, EGFR/Her-3) (4).

III. zvýšená tvorba ligandů receptorů ErbB rodiny. Autokrinní a zejména parakrinní sekrece heregulinu a EGF byla v preklinických studiích jednou z příčin inhibice účinnosti trastuzumabu (1,4).

IV. alternativní aktivace PI3K/Akt a Ras/MAPK signální dráhy. Stimulace řady dalších receptorů vede k aktivaci signálních drah klíčových pro přežívání buňky. Zejména aktivace PI3K/Akt a Ras/MAPK signální dráhy prostřednictvím receptorů adheze (např. integriny) nebo receptorů jiných růstových faktorů (např. IGF-1) vedou k inhibici apoptózy, zvýšení buněčného metabolismu a proliferace. Stálá aktivace PI3K/Akt signální dráhy může být rovněž způsobena ztrátou funkce fosfatázy PTEN, která vzniká nejčastěji na podkladě mutace stejnojmenného genu (5-7).

Mechanismy, které přispívají ke vzniku rezistence karcinomu prsu na cílenou terapii trastuzumabem, předurčují i způsoby možného řešení této situace. Do jednotlivých fází klinického zkoušení se již dostaly nové monoklonální protilátky, které jsou schopné blokovat vazbu Her-2 receptoru k několika dimerizačním partnerům (např. pertuzumab), bispecifické protilátky (např. MDX-H210, 2B1), nízkomolekulární inhibitory kinázové aktivity jednotlivých erbB receptorů, nebo jejich skupin (např. lapatinib /GW572016/, CI-1033). K podobné situaci dochází i v případě receptoru pro IGF-1 (monoklonální protilátka CP-751817,

inhibitor kinázové aktivity NVP-AEW541). Ve fázi klinického zkoušení jsou rovněž inhibitory kináz: Akt (Perifosine, QLT394, VD0002), MAPK (SCIO-469, PD325901) a mTOR (Temsirolimus, Everolimus, Rapamycin) (1,8). Další otázkou zůstává i možnost predikce účinnosti cytostatika do kombinace s cílenou léčbou tak, aby vzájemný účinek byl co nejvíce potencován. V případě antracyklinů se diskutuje o významu amplifikace genu topoizomerázy-II alfa (TOP2A), a o expresi proteinů proteinů Bcl-2 a p53. Naopak u taxánů o mutacích a expresi jednotlivých izoforem beta-tubulinu, nebo o proteinu TRAG-3 (9).

Z pohledu na výše uvedené je zřejmé, že zásadní úlohu v indikaci a aplikaci jakékoliv cílené terapie představuje průkaz cílové struktury v nádorových buňkách aktuálního vzorku a případná determinace dalších prediktivních markerů. Ve spolupráci s olomouckými kolegy v současné době zpracováváme soubor 150 pacientek se vzdáleně metastazovaným karcinomem prsu, které v rámci paliativní léčby byly léčené trastuzumabem. Ve vzorcích primárních tumorů a/nebo metastáz analyzujeme expresi vybraných genů a proteinů (Akt, MAPK, EGFR1, Her-2, Her-3, Her-4, TOP2A, PTEN, mTOR, S6K, MAPK, IGF1-R, survivin, MUC-4, p53). Vzhledem k tomu, že není vždy realizovatelné vyšetřit aktuální vzorek nádoru před zahájením léčby, zpracováváme rovněž vzorky séra aktuálně léčených pacientů, v nichž detekujeme sérové hladiny fragmentů receptorů Her-2, IGF-1R a Her-3 a ligandu IGF-1.

V průběhu léčby trastuzumabem došlo u 28% pacientek k výskytu metastáz v CNS. Proto zvlášť vyhodnocujeme i skupinu 186 pacientek s karcinomem prsu metastazovaným do CNS, ve kterém se zaměřujeme na pacientky s Her-2 pozitivním karcinomem. Tento fenotyp je mezi karcinomy nejčastěji zastoupen. V kontextu našich dat se však metastazování těchto karcinomů do CNS jeví jako manifestace jejich biologického chování, a ne jako závislost na podávané terapii.

Cílem přednášky je přehledně shrnout mechanismy vedoucí k rezistenci na trastuzumab, představit možná řešení a zejména první výsledky našich projektů.

Poděkování: Práce byla podpořena grantovým projektem IGA MZČR NR/8335-3.

Literatura

1. Nahta R., et al. Cancer Letters 2006;232:123-138.
2. Nagy P., et al. Cancer Res 2005;65:473-482.
3. Lee J.W., et al. Clin Cancer Res 2006; 12:57-61.
4. Diermeier S., et al. Exp Cell Res 2005; 304:604-619.
5. Lu Y.H., et al. J Natl Cancer Inst 2001;93:1852-1857.
6. Chan C.T., et al. Breast Cancer Res Treat 2005;91:187-201.
7. Nagata Y., et al. Cancer Cell 2004;6:117-127.
8. Konecny G.E., et al. Cancer Res 2006; 66:1630-1639.
9. Pegram M.D., et al. J Natl Cancer Inst 2004;96(10):739-749.

30 C -Telopeptid kolagenu typu I (ICTP) v diagnóze a monitorování kostních metastáz karcinomu prsu.

Nekulová M., Petráková K., Šimíčková M., Pecen L., Pilný R., Dubská L., Valík D.
MOÚ, Brno, UIVT–AV ČR, Praha

Cíl práce

V rámci řešení VVZ v roce 2006 jsme vyšetřili kostní markery (prokolagen typu 1 N terminální propeptid (P1NP), b-CrossLaps (b-CTX) a ICTP u 60 nemocných s diagnózou karcinom prsu a hodnotili validitu metod vzhledem k přítomnosti kostních metastáz a efektu terapie.

ICTP je koncová, nehelikální část kolagenu typu I. Jedná se o části peptidových řetězců, spojených pomocí vazeb (cross-links). Používá se pro posouzení stupně resorpce kosti. Existují 2 různé cesty kostní resorpce: zprostředkovaná kathepsinem K, která se uplatňuje během fyziologické resorpce kosti a druhá, zprostředkovaná matrix metaloproteinázou 9 (MMP9), která se aktivuje převážně v patologických situacích. ICTP specificky reflektuje patologickou degradaci kostního kolagenu zprostředkovanou MMP9.

Pacientky a metody

U 60 žen s diagnózou karcinom prsu vzhledem k podezření na kostní rozsev byly vyšetřovány kostní markery b-CrossLaps (CTX) a P1NP, specifický indikátor depositu kolagenu 1, definovaný jako marker novotvorby kostí, metodou elektrochemiluminiscence na imunoanalyzátoru Elecsys 2010, ROCHE a ICTP manuální EIA metodou (Orion – Diag).

Byly hodnoceny parametry validity (senzitivita, specifičnost, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, relativní riziko a ROC křivka). Bodové odhady parametrů validity byly doprovázeny výpočtem 95% konfidenčních intervalů. Ke statistickému hodnocení byl užit Spearmanův korelační koeficient.

Výsledky

U 44 nemocných byly skutečně prokázány kostní metastázy pomocí RTG či CT, u 16 nemocných byl nález na kostech hodnocen jako negativní.

Při referenční hodnotě 5,3 ug/l pro ICTP je specifičnost 87,5%, senzitivita 81,8% a plocha pod ROC křivkou (AUC) činí 0,87.ICTP u nemocných s kostním rozsevem hodnoceno proti souboru nemocných bez metastáz metodou ANOVA vykázalo: p–value = 0.0011, Wilcoxonův test p-value 0.0001 a mediánový test s p-value <0.0005.

Závěr

Kostní markery, zejména ICTP, ß-Cross Laps (b-CTX), markery kostní resorpce a P1NP jako marker novotvorby kostí, jsou doporučovány k diagnóze kostních metastáz i hodnocení efektu jejich terapie podle doporučení EGTM.

Pro ICTP u kostních metastáz karcinomu prsu byla prokázána specifičnost 87,5% a senzitivita 81,8%, tedy nejvalidnější parametry ze srovnávaných metod.

ICTP je tedy vysoce specifický marker kostní degradace v kostních metastázách a představuje citlivou a snadnou metodu detekce kostních metastáz i monitorování jejich terapie. První výsledky monitorování efektu terapie budou prezentovány.

Práce byla provedena s podporou VVZ MZ00020980501-5

31 Prognostické faktory u ovariálního karcinomu – možnosti imunohistochemické detekce.

Tomšová M.[1], Melichar B.[2], Šteiner I.[1], Sedláková I.[3]
1) Fingerlandův ústav patologie
2) Klinika onkologie a radioterapie
3) Gynekologicko-porodnická klinika, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Úvod

Karcinom ovária je šestým nejčastějším maligním onemocněním u žen na světě. Tento nádor je nejčastější příčinou smrti ze všech gynekologických maligních nádorů. Vysoká mortalita je zapříčiněna zejména tím, že tento nádor je často diagnostikován až v pokročilých stádiích (st. III, event. IV), neboť časná stádia jsou obvykle asymptomatická a neexistují efektivní skríningové metody. Průměrné 5-leté přežití je 40%, v pokročilých stádiích je to však pouhých 10-20%. Z hlediska prognózy mají zásadní význam stádium nádoru dle FIGO, velikost reziduálního tumoru, věk a celkový stav pacientky v době diagnózy, histologie tumoru a v případě časných stádií též stupeň diferenciace nádoru (grade).

V současné době je problém ovariálního karcinomu ve světové literatuře velmi diskutovaným tématem. Existuje velké množství studií, které přinášejí často rozporuplné údaje. Rozsáhle studovanou oblastí je zejména určení možných prognostických markerů, které by mohly predikovat další vývoj onemocnění a pomoci tak při volbě vhodné protinádorové terapie.

Cíle studie

Cílem projektu bylo přispět k hledání prognostických faktorů u ovariálního karcinomu, které je možno stanovit imunohistochemicky. Ve studii jsme se zaměřili na šest okruhů výzkumu:

1) expresi hormonálních receptorů (estrogenové a progesteronové receptory)
2) zhodnocení kinetiky buněčného růstu prostřednictvím stanovení proliferační aktivity pomocí protilátky Ki-67 (MIB-1) a topoizomerázy IIα
3) expresi onkoproteinů majících vztah k apoptóze (p53, p21, bcl-2 a bax)
4) overexpresi onkoproteinu HER-2/neu
5) stanovení angiogenního potenciálu imunohistochemickým průkazem jednoho z nejvýznamnějším angiogenních faktorů (VEGF) a kvantifikací kapilár v místech největší angiogenní aktivity
6) průkaz CD3+ tumor infiltrujících lymfocytů (TIL).

Materiál a metody

Jednalo se o retrospektivní studii. Soubor tvoří 116 pacientek s karcinomem ovária histologicky diagnostikovaným na Fingerlandově ústavu patologie v rozmezí let 1996 až 2003. Z klinických údajů jsem sledovali stage nádoru, velikost reziduálního tumoru po operaci a dobu přežití. Materiál získaný při operaci byl rutinně fixován v 10% formalinu, zpracován běžnou parafinovou technikou a barven hematoxylinem-eozinem. Stanoven byl histologický typ nádoru a stupeň jeho diferenciace.

Reprezentativní vzorky nádorové tkáně byly dále imunohistochemicky vyšetřeny za použití nepřímé imunohistochemické metody a těchto primárních protilátek: estrogenové a progesteronové receptory, proliferační antigeny Ki-67 a topoizomeraza IIá, onkoproteiny p53, p21, bcl-2, bax, HER-2/neu, VEGF, FVIII a CD34 (ke stanovení angiogenní kapacity nádoru) a CD3 (průkaz tumor infiltrujících T lymfocytů). Estrogenové a progesteronové receptory, onkoproteiny p53, p21, bcl-2, bax a VEGF byly hod-

noceny semikvantitativně. Onkoprotein HER-2/neu byl hodnocen dle HER skóre (0 – 3+). Exprese proliferačních antigenů Ki-67 a topoizomerázy IIá byly hodnoceny kvantitativně v místech největší proliferační aktivity, tj. většinou v periferii nádoru. Počet CD3+ TIL byl hodnocen kvantitativně nejméně na pěti místech při velkém zvětšení (400x). Hodnocen byl počet lymfocytů v nádorovém stromatu a lymfocytů v nádorovém epitelu (intraepiteliální TIL). Při kvantifikaci kapilár byla použita metodika poprvé popsaná Weidnerem a kol. u karcinomu prsu. Nejprve byla při malém zvětšení (objektiv 10x) identifikována místa s největší koncentrací kapilár (tzv. „hot spots“). V druhém kroku byly v těchto „hot spots“ při větším zvětšení (200x) kvantifikovány jednotlivé kapiláry. Použita byla okulárová mřížka o celkové ploše 0,24 mm^2 (počet kapilár byl přepočten na plochu 1 mm^2). Zhodnoceny byly nejméně tři „hot spots“. Prognostický význam byl stanovován jednak u nejvyšší, ale též u průměrné hodnoty počtu kapilár ve vaskulárních „hot spots“.

Pro statistické zpracování byl použit program NCSS. Celkové přežití bylo sledováno Kaplan-Meierovou metodou, univariantní analýza byla provedena pomocí log-rank testu.

Výsledky

Soubor tvořilo 116 pacientek ve věkovém rozmezí 27 až 82 let (průměr 55,2±10,3; medián 53 let). Reziduální tumor po operaci byl zjištěn u 44,7% pacientek (z toho ve 26% případů větší jak 2 cm). Většina nádorů byla histologicky serózní (47,4%) či endometroidní (31%) karcinom, grade 2 (45,7%) nebo 3 (41,4%). V souboru převládala pokročilá onemocnění (stádium III 62,9%, stádium IV 16,4%).

Follow-up byl 1-120 měsíců (medián 39 měsíců). V době statistického zhodnocení na toto onemocnění zemřelo 62 pacientek ze souboru (tj. 53,4%).

Estrogenové receptory byly pozitivní v 76 karcinomech (65,6%), progesteronové receptory v 52 karcinomech (44,8%). Proliferační antigen Ki-67 byl exprimován v 6,9-98,1% nádorových buněk (medián 41,9%), topoisomeráza IIα v 4,1-92% nádorových buněk (medián 35,2%). Onkoprotein HER-2/neu byl exprimován pouze v 10 karcinomech (9,5%). Onkoprotein p21 byl pozitivní ve 44 případech (37,9%), p53 v 88 karcinomech (75,9%), bax v 81 nádorech (69,2%) a bcl-2 ve 49 případech (42,2%). VEGF byl pozitivní v 80 nádorech (69%). Průměrný počet kapilár ve vaskulárních „hot spots“ při použití protilátky proti FVIII se pohyboval v rozmezí 27,8 – 213,9 kapiláry/mm^2 (medián 77,8), maximální počet kapilár za použití téže protilátky v rozmezí 33,3 – 229,2 kapiláry/mm^2 (medián 83,3). Při použití protilátky proti CD34 antigenu byl průměrný počet kapilár 43 – 379,2 kapiláry/mm^2 (medián 150) a maximální počet kapilár 45 – 387,5 kapiláry/mm^2 (medián 164,6). Počet stromálních tumor infiltrujících lymfocytů byl 81-2094 lymfocytů/mm^2 (medián 338) a intraepiteliálních tumor infiltrujících lymfocytů 7-1563 lymfocytů/mm^2 (medián 125).

V univariantní analýze jsme nalezli prognostický význam na dobu přežití těchto faktorů: věk (p=0,02), stage (p=0,000004), residuální nádor (p=0,0002), grade (p=0,02), topoisomeráza IIá (p=0,04), Ki-67 (p=0,005), progesteronové receptory (p=0,0008), průměrná hodnota počtu kapilár ve vaskulárních „hot spots“ za použití protilátky proti antigenu CD34 (p=0,01), maximální hodnota počtu kapilár za použití protilátky proti antigenu CD34 (p=0.05) a počet intraepiteliálních TIL (p=0,000005). V multivariantní analýze jsme za nezávislé prognostické faktory prokázali pouze věk (p=0,01), reziduální nádor (p=0,0004), stage (p=0,02), průměrnou hodnotu počtu kapilár ve vaskulárních „hot spots“ za použití protilátky proti antigenu CD34 (p=0,04) a počet intraepiteliálních TIL (p>0,00000).

Závěr

Tato studie potvrdila prognostický význam klinických parametru jako je věk pacientek, velikost reziduálního nádoru po operaci a stádium nádorového onemocnění. Kromě toho jsme však nalezli dva imunohistochemicky detekovatelné prognostické faktory na přežití pacientek s ovariálním karcinomem: počet CD3+ tumor infiltrujících intraepiteliálních T lymfocytů v nádorové tkáni (p>0,00000) a průměrnou hodnotu počtu kapilár ve vaskulárních „hot spots“ za použití protilátky proti antigenu CD34 (p=0,04).

Projekt byl podpořen grantem IGA MZ NR8363-3/2005

32 Vztah sérových koncentrací selenu k tyreoidálním laboratorním parametrům a prognóze u žen s karcinomem prsu.

Jiskra J.[1], Antošová M.[1], Límanová Z.[1], Vinglerová M.[3], Barkmanová J.[2]
1) III. Interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha
2) Onkologická klinika 1. LF UK a VFN, Praha
3) Ústav klinické biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN, Praha

Východisko

U žen s karcinomem prsu byla opakovaně prokázána zvýšená prevalence pozitivity protilátek proti tyreoidální peroxidáze (TPOAb) – sérového diagnostického markeru autoimunitních tyreopatií (AITD) (Smyth et al. 1998, Gogas et al. 2001, Turken et

al. 2003, Jiskra et al. 2004). Pozitivita těchto protilátek byla v některých studiích spojena s lepší prognózou žen s karcinomem prsu (Goldman et al. 1992, Smyth et al. 1998, Cenzig et al. 2004). Deficit selenu a nadbytek jodu v potravě je spojován s vyšší incidencí autoimunitních tyreopatií. Cílem studie bylo porovnat sérové koncentrace selenu u žen s karcinomem prsu a kolorektálním karcinomem, zjistit, existuje-li nějaký vztah selenu v séru k tyreoidálním laboratorním parametrům a zjistit, ovlivňuje-li nějak koncentrace selenu v séru prognózou pacientek s karcinomem prsu.

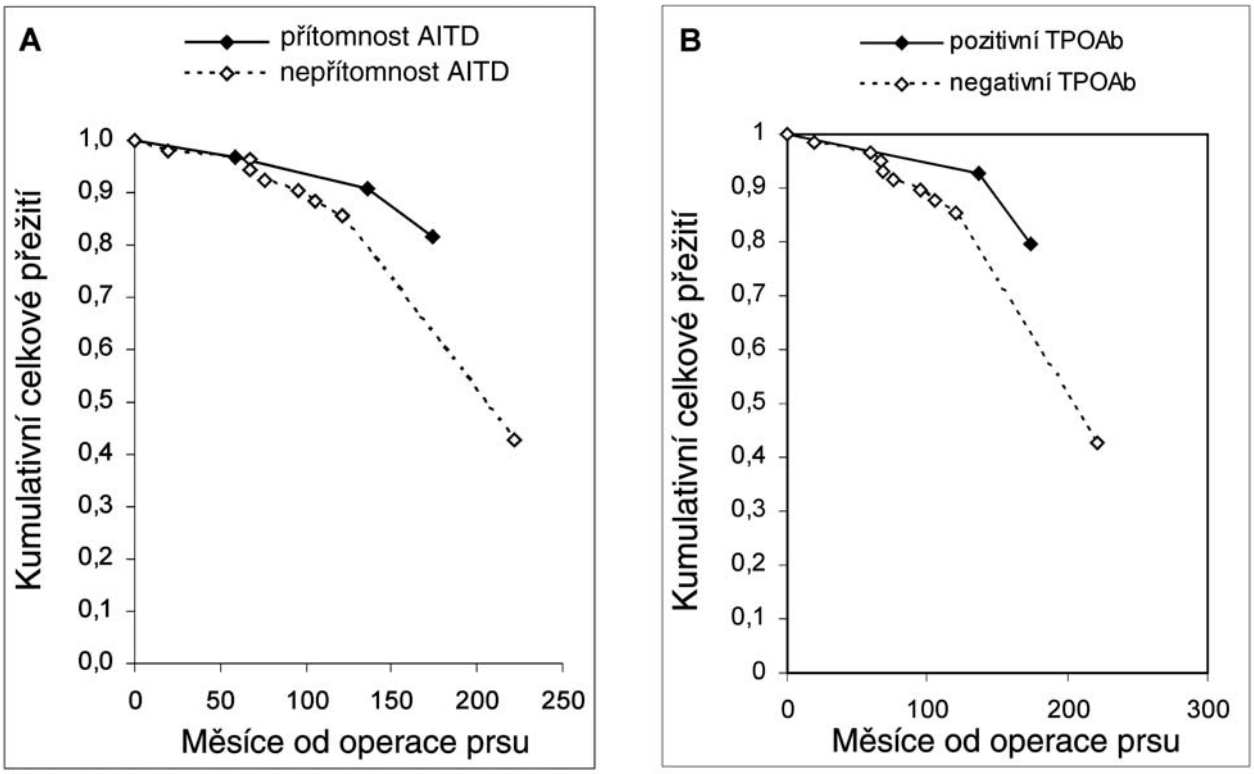
Pacienti a metody

U 65 žen s karcinomem prsu a 29 žen s kolorektálním karcinomem byly v průměru 2,5 roku po stanovení diagnózy a operaci (nejméně 0,4, nejvíce 9,25 let, 95% konfidenční interval 1,82-3,1 let) vyšetřeny metodou chemiluminiscence sérové koncentrace tyreoidálního stimulačního hormonu (TSH), volného tyroxinu (FT4), protilátek proti tyreoidální peroxidáze (TPOAb), protilátek proti tyreoglobulinu (TgAb) a metodou nukleární absorpční spektroskopie sérové koncentrace selenu. U dvou žen se objevil relaps onemocnění ještě před odběrem krevního vzorku.

Výsledky

Sérové koncentrace selenu se signifikantně nelišily u žen s karcinomem prsu a kolorektálním karcinomem (72,257±18,028 vs. 70,41±18,78 ug.l^{-1}). Nebyl zjištěn žádný vztah mezi sérovými koncentracemi selenu a tyreoidálními laboratorními parametry (TSH, FT4, TPOAb a TgAb). Sérové koncentrace selenu, tyreoidálních laboratorních parametrů a prevalence AITD se signifikantně nelišily u žen s premenopauzálním a postmenopauzálním vznikem karcinomu prsu. Ženy s karcinomem prsu byly prospektivně sledovány průměrně 11,3 let (nejméně 1,58, nejvíce 21,75 let, 95% konfidenční interval 10,5-12,1 let). Za tu dobu 6 žen (9,2%) zemřelo na karcinom prsu, 1 žena (1,5%) zemřela bez dokumentované recidivy karcinomu prsu a u 23 (35,4%) došlo k recidivě nádorového onemocnění.

Sérové koncentrace selenu byly signifikantně vyšší u žen s recidivou karcinomu prsu oproti ženám v remisi (81,036±18,245 vs. 67,449±16,181, t-test, P=0,003). S využitím Coxova regresního modelu byl zjištěn statisticky signifikantní negativní prognostický význam sérových koncentrací selenu na interval bez recidivy nádorového onemocnění (regresní koeficient 0,028, standardní chyba 0,009, P<0,0025). Byl také zjištěn trend k lepšímu celkovému přežití žen s karcinomem prsu a autoimunitními tyreopatiemi a pozitivními protilátkami proti tyreoidální peroxidáze (graf 1), který ale nedosáhl statistické významnosti (metoda Kaplan-Mayer).



Graf 1

Trend k lepšímu celkovému přežití u žen s karcinomem prsu v závislosti na přítomnosti autoimunitní tyreopatie – AITD (A) a pozitivitě protilátek pro tyreoidální peroxidáze – TPOAb (B), metoda Kaplan-Meier.

Diskuze a závěry

Negativní prognostický význam selenu v séru na interval bez recidivy karcinomu prsu je překvapivým zjištěním, protože dosud publikované práce považovali selen spíše za protektivní faktor vzniku a progrese nádorových chorob (Cann et al. 2001, Shah et al. 2005, Breedlove et al. 2006). Nižší hladiny selenu u pacientek bez recidivy karcinomu prsu mohou souviset se zjištěným trendem k delšímu přežití žen se současnou autoimunitní tyreopatií, který byl i v minulosti opakovaně popsán. Nedostatek selenu je totiž považován za rizikový faktor rozvoje autoimunitních tyreopatií.

Literatura

1. Breedlove HA, Smith AM, Burk RF, Hill KE, Shapiro CL: Serum selenium measurements in women with early-stage breast cancer with and without chemotherapy-induced ovarian failure. Breast Cancer Res Treat, 2006, 7: 225-230.
2. Cann SA, van Netten JP, van Netten C: Hypothesis: Iodine, selenium and the development of breast cancer. Cancer Causes Control, 2001, 11: 121-127.
3. The relationship between prognostic factors of breast cancer and thyroid disorders in Turkish women. J Surg Oncol, 2004, 87: 19-25.
4. Gogas J, Kouskos E, Tseleni-Balafouta S, Markopoulos C, Revenas K, Gogas G, Kostakis A: Autoimmune thyroid disease in women with breast carcinoma. Eur J Surg Oncol, 2001, 27: 626-630.
5. Goldman MB, Monson RR, Maloof F: Benign thyroid-diseases and the risk of death from breast-cancer. Oncology, 1992, 49: 461-466.
6. Jiskra J, Límanová Z, Barkmanová J, Smutek D, Friedmannová Z: Autoimmune thyroid diseases in women with breast cancer and colorectal cancer. Physiol Res, 2004, 53: 693-702.
7. Shah YM, Al-Dhaheri M, Dong Y, Ip C, Jones FE, Rowan BG: Selenium disrupts estrogen receptor (alpha) signaling and potentiates tamoxifen antagonism in endometrial cancer cells and tamoxifen-resistant breast cancer cells. Mol Cancer Ther, 2005, 4: 1239-1249.
8. Smyth PP, Shering SG, Kilbane MT, Murray MJ, McDermot EW, Smith DF, O'Higgins NJ: Serum thyroid peroxidase autoantibodies, thyroid volume, and outcome in breast cancer. J Clin Enocrinol Metab, 1998, 83: 2711-2716.
9. Breast cancer in association with thyroid disorders. Breast Cancer Res, 2003, 5: 110-113.

33 Korelace sérových hladin CEA a CA 19-9 s expresí CEA a klinickopatologickými charakteristikami nemoci u kolorektálního karcinomu.

Srovnal J.[1], Kesselová M.[1], Kořínková G.[1], Vysloužil K.[2], Duda M.[2], Skalický P.[2], Cwiertka K.[3], Švébišová H.[3], Gajová B.[3], Hajdúch M.[1,3]
1) Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, Olomouc
2) I. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc, Olomouc
3) Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc, Olomouc

Sledování sérových hladin onkomarkerů CEA a CA 19-9 má svůj význam pro hodnocení klinického průběhu onemocnění, tj. stanovení remise a progrese nemoci. Karcinoembryonální antigen (CEA) však může sloužit také jako marker cirkulujících nádorových buněk při detekci minimální reziduální choroby (MRD) metodou real-time RT-PCR, tehdy se ale stanovuje míra jeho genové exprese.

Dlouhodobě se zabýváme detekcí MRD u kolorektálního karcinomu, jako osvědčený marker nádorových buněk používáme právě CEA. Cílem naší studie bylo vzájemně porovnat sérové hladiny CEA a CA 19-9 s expresí CEA v tumoru, krvi a kostní dřeni pacienta a zároveň s klinicko-patologickými charakteristikami onemocnění.

Metodou kvantitativní real-time RT-PCR jsme vyšetřili expresi CEA ve vzorcích nádorové tkáně, kostní dřeně a systémové krve 64 pacientů operovaných ve FN Olomouc pro kolorektální karcinom. U všech pacientů byla dále stanovena předoperační sérová hladina CEA a CA 19-9 standardními imunoanalytickými metodami.

Z výsledků vyplývá, že sérové hladiny CEA ani CA 19-9 nekorelují s expresí CEA v primárním tumoru. Pozitivita CEA, na rozdíl od CA 19-9, predikuje nádorové postižení lymfatických uzlin. Hladina CA 19-9 souvisí spíše s objemem primárního tumoru. Na rozdíl od CEA, pacienti s objemnějšími tumory mají vyšší hladinu CA 19-9 v séru. Dále jsme pozorovali, že sérové hladiny CEA i CA 19-9 dokáží diferencovat pacienty klinických stádií A a D dle Dukese, nikoliv však mezi klinickými stádii B a C. Zajímavým nálezem bylo, že pacienti s pozitivním záchytem MRD v kostní dřeni mají výrazně nižší sérové hladiny CEA i CA 19-9, než pacienti bez postižení kostní dřeně, což ukazuje na nízkou výpovědní hodnotu klasických tumor markerů v odhadu hematogenní diseminace nádorových buněk.

Stanovení sérových hladin onkomarkerů má své místo v klinické onkologii, zatímco stanovení MRD je zatím metodou experimentální. Věříme, že vzájemné srovnávací studie přispějí k přesnějšímu zasazení obou metod do rutinní klinické praxe.

Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216, IGA MZCR NR/7804-5 a MPO 1H-PK/45.

34 Role sérové hladiny inhibitoru urokinase-typ plazminogen aktivátoru (PAI 1), jeho genového polymorfismu a současně inhibitoru urokinase-typ plazminogen aktivátoru (PAI 1) a receptoru urokinase-typ plazminogen aktivátoru (uPAR) v nádorové tkáni u pacientů s kolorektálním karcinomem.

Halámková J.[1], Tomášek J.[1], Čech Z.[2], Pavlovský Z.[3], Moulis M.[3], Svobodník A.[4], Hanáková L.[1], Tuček Š.[1], Vodáková P.[1], Kiss I.[1], Penka M.[2]
1) Oddělení klinické onkologie, FN Brno
2) Oddělení klinické hematologie, FN Brno
3) Ústav patologie, FN Brno
4) Institut biostatistiky a analýz MU, Brno

Urokináza (uPA) hraje zásadní roli v aktivaci plazminogenu na plazmin, který patří mezi serinové proteázy a současně se podílí na aktivaci matrixmetaloproteináz, latentních elastáz, růstových faktorů a cytokinů, které se účastní degradace elementů extracelulární matrix. Společně se svým receptorem (uPAR) tkáňovým aktivátorem (tPA) a inhibitory urokinázy (PAI 1 a PAI 2) tvoří plazminogen aktivátor systém (PAS), který je součástí metastatické kaskády a významnou měrou se podílí na invazivním růstu a angiogenezi maligních nádorů. Plazminogen aktivátor inhibitor (PAI) je tvořen převážně v hladké svalovině cév a v megakaryocytech. Jedná se o serpin, přítomný v plazmě a v α-granulích trombocytů, který má schopnost vazby na vitronectin. Komplex vitronectin-PAI-1 inhibuje migraci hladkých svalových buněk blokádou v3 integrinu k vitronectinu. Paradoxně však je rostoucí exprese PAI-1 v nádorové tkáni u nádorových pacientů spojena s horší prognózou. Tím je jeho role v celé šíři nádorového růstu zatím neobjasněná. U kolorektálního karcinomu některé studie prokázaly, že uPAR a uPA lze považovat za nezávislé prognostické faktory, zvláště u pacientů stádia Dukes B. Exprese uPAR roste s přeměnou adenomu střeva od mírných dysplastických změn po těžkou dysplazii až v karcinom. U některých typů nádorů jako např. karcinom prsu byla zvýšená exprese uPA, PAI 1 spojena s horší prognózou a tím nižším přežitím, a byla uznána jako negativní prognostický faktor.

Kromě hodnocení sérové hladiny PAI 1 a exprese uPAR a PA1v nádorové tkáni pacientů s kolorektálním karcinomem, byl v rámci projektu zkoumán i genový polymorfismus PAI 1 (4G/4G, 4G/5G, 5G/5G). Některé studie naznačují, že by genotyp 4G/4G mohl být spojen i s pokročilejšími typy karcinomu kolorekta a genotyp 5G/5G s méně pokročilým nádorem, současně by genotyp 4G/4G mohl být spojen s proximálními typy karcinomů kolon.

Dosud bylo do projektu zařazeno celkem 29 pacientů ve věku 51-72 let, 21 mužů a 8 žen. 1 pacient zemřel (bez souvislosti s nádorovým onemocněním), 28 pacientů žije, medián follow-up je k 31.1.2007 9 měsíců. Počet pacientů rozdělených dle jednotlivých stádií kolorektálního karcinomu: I. stádium 7 pacientů, II. stádium 7 pacientů, III. stádium 7 pacientů a IV. stádium 8 pacientů. Rozdělení dle lokalizace nádoru: 7 pacientů s adenokarcinomem vzestupného tračníku, 5 pacientů s nádorem sestupného tračníku a 17 pacientů s karcinomem rekta. Polymorfismus PAI 1 byl vyšetřen u 27 pacientů s následujícím výsledkem: 12 pacientů s polymorfismem 4G/4G, 9 pacientů 4G/5G a 6 pacientů 5G/5G.

Dosavadní výsledky naznačují, že hladina PAI 1 v séru je u pacientů s pokročilým onemocněním vyšší stejně jako exprese uPAR a PAI 1 v nádorové tkáni. Zatím se nejeví žádná závislost ve vztahu mezi polymorfismem PAI 1 a pokročilostí nádorového onemocnění.

Plazminogen aktivátor systém či některé jeho součásti by měly být předmětem dalšího zkoumání, neboť nelze vyloučit jejich významnou prognostickou hodnotu u pacientů s kolorektálním karcinomem.

35 Změny biologické aktivity nádoru v souvislosti s chirurgickou léčbou maligních onemocnění.

Topolčan O., Holubec L. jr., Třeška V., Fínek J., Svobodová Š., Sutnar A., Šafránek J., Rupert K., Liška V., Špišáková M., Pražáková M.
Fakultní nemocnice Plzeň a Univerzita Karlova v Praze – Lékařská fakulta Plzeň

Cíl studie

Podat přehled současných poznatků o biologické aktivitě nádorového onemocnění a změnách, ke kterým dochází v souvislosti s chirurgickou léčbou nádorových onemocnění na základě vlastních zkušeností a provedené literární rešerše.

Materiál a metodika

Autoři sledovali biologickou aktivitu nádoru pomocí stanovení nádorových markerů, adhezivních molekul, adiponektinu, leptinu a vybraných cytokinů a to před operací a v průběhu minimálně 2 letého follow up u 300 nemocných s nádory prsu, kolorekta a plic. Kontrolní skupinu tvořili nemocní s různým rozsahem chirurgického zákroku (minimální zákrok – ošetření úrazu, malý chirurgický výkon – kýly, apendicitidy, rozsáhlý chirurgický výkon pro benigní příčinu – resekce hemangiomů, resekce nezhoubných nádorů).

Výsledky

Prokázali jsme, že předoperační senzitivita nádorových markerů je nízká, i když jsou, stejně jako ostatní výše uvedené parametry biologické aktivity nádoru, předoperačně signifikantně. Senzitivita se výrazně zvyšuje při kombinaci klasických nádorových markerů s markery proliferačními a solubilními cytokeratininovými fragmenty. Bohužel senzitivita mezi 75-90% existuje prakticky pouze pokročilého nádorového onemocnění. Prokázali jsme, že předoperační hodnoty cytokeratininů korelují s bezpříznakovým obdobím (DFI) a celkovým přežitím (OS). Ze všech parametrů biologické aktivity nádoru korelovaly s efektem operace vždy pouze „základní“ nádorové markery pro dané onemocnění, to znamená, že signifikantně klesaly. U nádorů kolorekta a jater se jednalo o CEA, u nádorů prsu marker CA 15-3 a u nádorů plic CYFRA 21-1. TK a TPS se u maligních nádorů po operaci výrazně zvyšovaly, ale zcela stejný typ vzestupu nádorových markerů jsme prokázali i u nemocných s rozsáhlým chirurgickým výkonem pro benigní příčinu, což jednoznačně potvrdilo naši hypotézu, že tyto změny jsou důsledkem pooperační buněčné proliferace při reparativních změnách a nejsou měřítkem efektu chirurgického zákroku. Ostatní markery biologické aktivity nevykazovaly signifikantní změny a chovaly se nestandardně. Při follow up nádoru jsme prokázali, že pokud základní nádorový marker byl zvýšen před operací, byl při follow up v případě progrese zvýšen v 85-95%. Naproti tomu, pokud předoperačně nebyl nádorový marker zvýšen, pak při progresi se jeho hodnoty měnily pouze u 30-40% nemocných. Thymidinkináza a TPS se u všech námi sledovaných maligních onemocnění zvyšovaly 3-6 měsíců před klinickou manifestací progrese a to přibližně u poloviny nemocných. Při interpretaci těchto dvou markerů je však vždy nutno mít na zřeteli, že se mohou nespecificky zvyšovat v důsledku zánětlivých a autoimunitních onemocnění. Adhezivní molekuly se výrazně zvyšovaly při follow up především u distančních metastáz a tudíž výrazně zvyšovaly senzitivitu ostatních sledovaných markerů. Výsledky jsou konfrontovány se současným stavem interpretace nádorových markerů ve světě a to především s doporučenými postupy ASCO, NACB a EGTM.

Závěr

Autoři prokázali, že nádorové markery je nutno hodnotit komplexně s biologickým vývojem nádorového onemocnění, optimální je využívání kombinací různých parametrů biologické aktivity v závislosti na cílech, které tímto vyšetřením sledujeme. Pro prognózu jsou to cytokeratininy, pro invazivitu nádoru především proliferační marker thymidinkináza a pro hodnocení efektu chirurgického zákroku základní marker daného nádorového onemocnění. Při follow up je situace otevřena a nepochybně kromě běžně užívaných markerů budou v budoucnosti využity i jiné kombinace parametrů biologické aktivity nádoru, než dosud.

Tato práce byla podpořena granty IGA NR 8301-3, IGA NR 9343-3 a výzkumným záměrem VZ MSM 0021620819.

36 Solubilní cytokeratininové markery a jejich význam pro prognózu chirurgického řešení jaterních metastáz.

Holubec L. jr, Třeška V., Topolčan O., Sutnar A., Liška V., Svobodová Š., Špišáková M., Pražáková M., Časová M., Roušarová M., Fínek J.
Fakultní nemocnice Plzeň a Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova v Praze

Úvod

Jedinou radikální léčbou u nemocných s primárním či sekundárním nádorem jater je resekční výkon. Radikální jaterní resekci (LR) lze v době stanovení diagnózy provést pouze u 15-20% pacientů Další metodou volby u pacientů, kde nelze provést radikální chirurgický výkon je provedení radiofrekvenční ablace (RFA), která však má ve srovnání s radikální resekcí horší léčebné výsledky a recidivu lze očekávat u 40-80% takto léčených pacientů. Cílem práce bylo zhodnotit význam stanovení nádorových markerů pro prognózu metastatického procesu do jater.

Metodika

Soubor nemocných tvořilo 46 nemocných (medián věku 62 let, min.-max. 48-82 let), kteří byly operováni na chirurgické klinice Fakultní nemocnice pro metastatické postižení jater. U 34 pacientů (71%) se jednalo o metastázy kolorektálního karcinomu, u 12 pacientů (29%) se jednalo o metastázy jiných nádorových lokalizací (prs, pankreas, žlučník). U 27 pacientů byla provedena radikální resekce jater (liver resection= LR), u 19 pacientů byla provedena radiofrekvenční ablace (RFA), která je považována za výkon paliativní.

U všech nemocných byly vybrány následující nádorové markery jako typičtí zástupci jednotlivých typů nádorových markerů: onkofetální nádorový marker karcinoembryonálního antigenu (CEA), mucinové nádorové markery glykoproteinového antigenu mucinosního typu 19-9 (CA19-9), glykoproteinového antigenu mucinosního typu 72-4 (CA 72-4), cytokeratininové fragmenty: tkáňového polypeptidového antigenu (TPA) a tkáňového polypeptidového specifického antigenu (TPS) a proliferační nádorové markery thymidinkináza (TK). Nádorové markery u sledované skupiny nemocných byly stanoveny současně a to jednak před operací (interval 2 týdny až 1 den před operací), dále pak po operaci (interval 1-3 týdny po operaci), dle doporučení EGTM.

Statistická analýza byla provedena s užitím software S.A.S. (Statistical Analysis Software) release 8.02.

Výsledky

Předoperačně byly nejčastěji zvýšené sérové hladiny CEA a TK avšak ani ve frekvenci ani v ostatních sledovaných parametrech nebyl zaznamenám statisticky významný rozdíl mezi skupinou LR a RFA. U předoperačních hodnot byl u jaterních resekcí nalezen významný korelační koeficient (r= 0.79 ; p<0.0001) mezi oběma sledovanými cytokeratininovými fragmenty (TPA vs.TPS), a dále u jsme prokázali významnou korelaci mezi CEA a TPS (r=0.60; p<0.0009) a mezi CEA a TPA (r=0.61 ; p<0.0007). U RFA jsme u předoperačních hodnot zaznamenali významnou korelaci opět mezi cytokeratininovými fragmenty TPA a TPS (r=0.65; p<0.0021).

Pooperačně byly nejčastěji zvýšeny sérové hladiny TK a TPS. Po operaci docházelo na jedné straně k výraznému vzestupu hladiny proliferačního markeru TK a současně na straně druhé k statisticky významnému poklesu CEA a to shodně v obou námi sledovaných skupinách nemocných. Naproti tomu vzestup TPS a TPA jsme pozorovali pouze ve skupině po RFA. Rozdíly v před a po operačních hodnotách CA 19-9 a CA 72 -4 jsme nenalezli. Vzestup TK a TPS však není v závislosti na maligním onemocnění, ale na rozsahu pooperačních reparativních procesů.

U pooperačních hodnot bylo u jaterních resekcí nejlepší korelace opět dosaženo u cytokeratininových nádorových markerů TPA vs.TPS (r=0.77; p<0.0001), stejně jako u RFA: TPA vs.TPS (r=0.65; p<0.0021).

U jaterních resekcí jsme prokázali, že pokud je předoperačně zvýšena hladina cytokeratininových nádorových markerů je 6,5x pravděpodobnější nepříznivé celkové přežití

Naproti tomu prognostický význam žádného ze sledovaných markerů u nemocných s RFA jsme neprokázali.

Závěr

Autoři doporučují u nemocných s metastatickým procesem vyšetřovat kromě CEA současně proliferační nádorový marker TK a jeden solubilní cytokeratininový fragment (TPA či TPS). Vyšetření cytokeratininového fragmentu umožní i odhad prognózy a tím i optimální frekvenci pooperačního sledování nemocných. Bezprostředně po operaci (do 3 týdnů) má význam vyšetřovat pouze CEA jako měřítko úspěšnosti chirurgického výkonu, sledování ostatních markerů v rutinní praxi nepřináší žádnou novou informaci.

Tato práce byla podpořena granty IGA NR 8301-3 a výzkumným záměrem VZ MSM 0021620819.

37 EGFR a CEA jako markery minimální reziduální choroby u kolorektálního karcinomu.

Kesselová M.[1], Srovnal J.[1], Kořínková G.[1], Vysloužil K.[2], Duda M.[2], Skalický P.[2], Cwiertka K.[3], Švébišová H.[3], Gajová B.[3], Hajdúch M.[1,3]

1) Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, Olomouc
2) I. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc, Olomouc
3) Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc, Olomouc

Pro detekci minimální reziduální choroby (MRD) u solidních nádorů metodou real-time RT-PCR je velmi důležité nalézt vhodný marker cirkulujících nádorových buněk. Každý marker má však pro různé typy nádorů různou senzitivitu a specificitu. Velmi často platí pravidlo, že čím specifičtější marker máme, tím menší senzitivitu nám poskytuje, a naopak. Avšak pro detekci MRD je senzitivita jedním z nejdůležitějších požadavků. Pro zvýšení senzitivity se proto používá kombinace různých markerů nádorových buněk. Pro detekci MRD u pacientů s kolorektálním karcinomem byly v mnoha pracech použity markery jako karcinoembryonální antigen (CEA), receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), cytokeratiny 19 a 20 (CK19, CK 20), telomerázová reverzní transkriptáza (hTERT) a další.

Na našem pracovišti se dlouhodobě zabýváme detekcí MRD u kolorektálního karcinomu, jako osvědčený marker používáme CEA. Cílem naší studie bylo zjistit vhodnost EGFR jako markeru nádorových buněk u kolorektálního karcinomu, porovnat ho s expresí CEA a s dalšími klinickopatologickými charakteristikami onemocnění.

Vyšetřili jsme předoperační vzorky kostní dřeně a systémové krve od 160 pacientů operovaných ve FN Olomouc pro kolorektální karcinom (čtyřicet pacientů od každého klinického stadia dle Dukese) na míru exprese CEA a EGFR.

Z výsledků vyplývá, že CEA je vhodnějším markerem než EGFR. Rozdíly zjištěné v jednotlivých statistických analýzách, kde jsme porovnávali vztah mezi expresí EGFR a CEA s klinickopatologickými charakteristikami nemoci, však nejsou příliš výrazné. Fyziologická exprese EGFR je navíc velmi vysoká v kostní dřeni (vyšší než 20 000 kopií/μg RNA), což značně omezuje použití EGFR jako markeru nádorových buněk v kostní dřeni. Avšak v systémové krvi zdravých jedinců je jeho exprese nízká, dokonce nižší než v případě CEA (49 vs. 83 kopií/μg RNA), EGFR je tak potencionálním markerem nádorových buněk v systémové krvi. Při korelační analýze exprese EGFR vs. CEA v krvi a kostní dřeni pacientů jsme žádnou souvislost nenalezli.

Zdá se, že stoprocentně senzitivní a specifický marker nádorových buněk se nám nalézt nepodaří, ale podaří se sestavit kombinace několika různých markerů tak, abychom se dobrali optimálního výsledku. V hledání a ověřování dalších potencionálních markerů budeme pokračovat i nadále.

Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216, IGA MZCR NR/7804-5 a MPO 1H-PK/45.

38 Komplexní farmakogenetické sledování pacientů léčených protinádorovou chemoterapií s 5-fluorouracilem zaměřené na deficienci dihydropyrimidin dehydrogenázy.

Demlová R.[1], Bednaříková M.[1], Riedlová P.[2], Fišer J.[2], Meijer J.[3], Kuilenburg A.[3], Valík D.[1]
1) Masarykův onkologický ústav, Brno
2) Onkologické centrum J. G. Mendela, Nový Jičín
3) Academic Medical Center Amsterdam, The Netherlands

Úvod

Dihydropyrimidin dehydrogenasa (DHPD) je iniciálním a „rate-limiting“ enzymem odpovědným za katabolismus protinádorového léku 5-fluorouracilu, zapojeným v třístupňové katabolické dráze uracilu a thyminu vedoucí ke tvorbě beta-alaninu a beta-aminoisomáselné kyseliny. Významná jaterní a renální eliminace 5-fluorouracilu způsobuje, že pouze minimální množství podané látky je ve vlastním tumoru k dispozici pro biotransformaci na fluoropyrimidinnukleotidy, jelikož 10-20% látky se vyloučí v nezměněné podobě močí a cca 80% podané látky je metabolizováno převážně v játrech na 5-fluorodihydrouracil. Klinické odezvy na lék bývají poměrně nízké (cca 20-40%), zčásti z důvodů úzkého terapeutického rozpětí a nelineární kinetiky léčiva. To vede k tomu, že je obtížné dosáhnout klinické odezvy bez navození významné systémové toxicity. V populaci vykazuje aktivita DPD výraznou variabilitu (myšlena jaterní aktivita enzymu, tj. ta, která je dominantně odpovědná za katabolismus). Přibližně 3-5% má aktivitu tohoto enzymu redukovanou. Snížená aktivita DPD resultuje v závažnou gastrointestinální, hematologickou a neurologickou toxicitu u pacientů léčených 5-fluorouracilem. V literatuře je doposud popsáno asi 20 případů těžkých projevů toxicity 5-FU daných sníženou aktivitou DPD. Léčení těchto pacientů je nákladné a navíc, takové nežádoucí reakce snižují compliance pacienta s další chemoterapeutickou léčbou. Farmakokineticky se snížená aktivita DPD projevuje zvýšením eliminačního poločasu z 8 až na 160 min a systémová clearance léčiva klesne na hodnoty 70 ml/min/m^2 (normální hodnota je 594 198 ml/min/m^2). Molekulární studie ukázaly, že incidence mutace G>A v exonu 14 vedoucí k přeskočení 165 bp exonu je 1 : 270, z čehož plyne, že k vysvětlení molekulární podstaty DPD deficience bude třeba identifikovat další mutace. Jelikož řada z pozorovaných změn má charakter tzv. SNP (single nucleotide polymorphism), které se přímo neodrážejí ve snížené aktivitě DPD, nelze zatím nahradit fenotypické sledování aktivity DPD jednodušším postupem molekulární genetiky.

Cíl studie

Prospektivní zhodnocení farmakogeneticky determinované interindividuální variability klinických projevů toxicity a dosažených léčebných výsledků u pacientů léčených 5-fluorouracilem. Cílem je vyhodnotit a případně korelovat výsledky získané molekulární analýzou vybraných mutací DPD, farmakokinetickým monitorováním 5-FU a vyšetřením renální exkrece thyminu. Souběžně s laboratorní částí jsou prospektivně zaznamenávány a vyhodnocovány klinické aspekty léčby, tedy její efektivita a nežádoucí účinky.

Metodika

1. molekulárně-genetické vyšetření genu pro DHPD pomocí jeho sekvenace: se provádí z genomové DNA izolované z leukocytů periferní krve před zahájením terapie
2. stanovení základních farmakokinetických parametrů 5-FU: primární sledovanou veličinou je plocha pod křivkou (AUC) vypočítaná z naměřených plazmatických hladin 5-FU a jeho metabolitu 5-DHFU u jednotlivých pacientů. Odběry jsou provedeny v předem stanovených časových intervalech v závislosti na zvoleném chemoterapeutickém režimu. Plasma-

tické koncentrace 5-FU a 5-DHFU se stanovují HPLC. Vlastní farmakokinetický výpočet je prováděn pomocí software MW/PHARM verze 3.02.

3. vyšetření renální exkrece thyminu: Biochemický fenotyp poruchy DHPD tkví ve zvýšené exkreci thyminu, uracilu a 5-hydroxymethyluracilu. Vyšetření renální exkrece thyminu se provádí v moči odebrané před zahájením terapie metodou GCMS.

Výběr pacientů

Do studie jsou zařazováni pacienti léčení chemoterapeutickým režimem obsahujícím 5-FU, a to buď v kontinuálním nebo bolusovém podání.

Obě skupiny budou hodnoceny samostatně:

a) režim s bolusovým podání 5-FU, modifikace Mayo: leukovorin 20 mg/m^2 i.v. bolus D1-5, 5-FU 425 mg/m^2 i.v. bolus D1-5, interval 28 dnů
b) režim s kontinuálním podáváním 5-FU v režimu dle deGramonta: leukovorin 200 mg/m^2, inf./2hod, 5-FU 400 mg/m^2 i.v. bolus, 5-FU 600 mg/m^2 i.v. inf./22 hod, vše den 1,2, interval 14 dní)

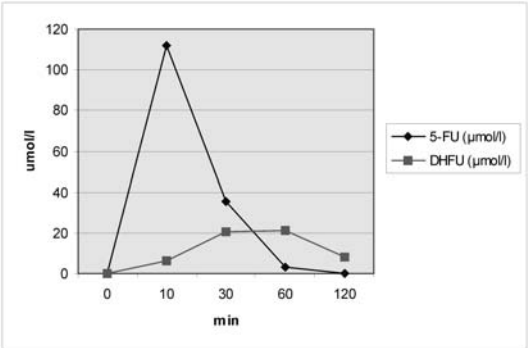
Průběžné výsledky

V období 12/2004 – 9/2005 bylo do studie zařazeno **68 pacientů**

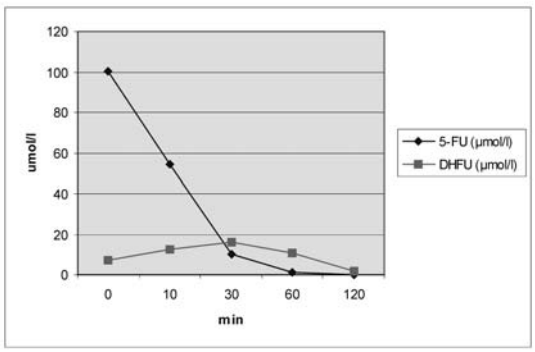
klinická data k dispozici u	n = 68
z toho ≥60 let	n = 29
farmakokinetické odběry	n = 68
z toho doposud zanalyzováno	n = 48
odběry k analýze DNA	n = 67
sekvenace provedena	n = 25
odběry ke stanovení exkrece thyminu v moči	n = 67

Průběžné závěry

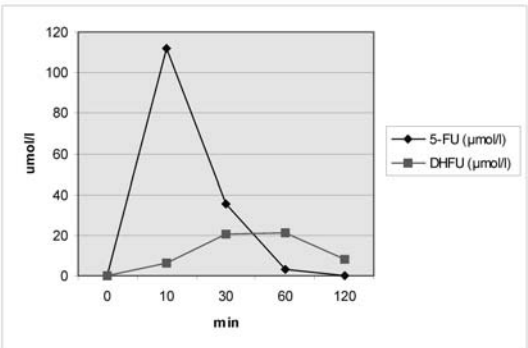
Celý projekt je náročný především na organizaci, zejména správné načasování farmakokinetických odběrů, na jejichž hodnotách závisí následné kalkulované farmakokinetické parametry (AUC, Cmax atd.):



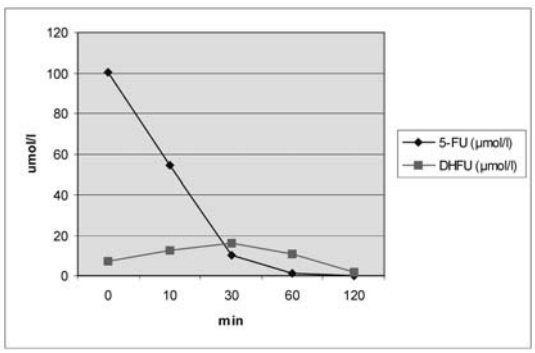
a) Mayo režim, správné časování odběrů:



b) Mayo režim, chybné časování odběrů:



c) DeGramont, správné časování odběrů:



d) DeGramont, chybné časování odběrů:

Průběžné závěry

Při analýze farmakokinetických parametrů jeví poměr hodnot AUC 5-FU/DHFU značnou korelaci se skutečnou tolerancí léčby.

U režimu s bolusovým 5-FU jsou hladiny AUC 5-FU i 5,6-DHFU překvapivě výrazně vyšší než u kontinuálního podání

Analýza DNA sekvenací je prováděna selektivně, výběr pacientů se provádí na základě poměrů hodnot AUC 5-FU/DHFU v korelaci s klinických projevy výraznější toxicity. Doposud jsme nezaznamenali záchyt parciálního deficitu DHPD u pacientů.

39 Význam genotypizace jednonukleotidových polymorfismů genů ERCC1, ERCC2, XRCC1, XRCC3, CCND1 a MDR1 pro předpověď léčebné odpovědi a hematologické toxicity chemoterapie nemalobuněčného karcinomu plic.

Pešek M.[1], Brůha F.[1], Bittenglová R.[1], Krákorová G.[1], Benešová L.[2], Slováčková R.[2], Šampalík J.[1], Šefrna, F.[3], Minárik M.[2]

1) Plicní klinika FN Plzeň, Plzeň

2) Laboratoř molekulární genetiky a onkologie, Genomac International, Praha

3) Informační systém FN Plzeň

Úvod

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP) genů opravujících poškození DNA mají význam pro predikci léčebné odpovědi u nemalobuněčných karcinomů plic, karcinom hlavy a krku, pokročilých karcinomů mléčné žlázy a kolorektálních karcinomů. Polymorfismy gen pro MDR1 a CCND1 mají dle některých zpráv rovněž význam pro předpověď léčebné odpovědi a krevní toxicity. Cílem naší studie tyto posoudit význam SNP, jejich variant a kombinací pro předpověď účinnosti a krevní toxicity různých kombinací cytostatik u NSCLC.

Materiál a metodika

SNP byly vyšetřovány z DNA izolované z periferní krve nemocných s použitím cysling-gradient kapilární elektroforézy a standardní DNA sekvenací produkce PCR. Vyšetřovali jsme ERCC1 Asn118Asn (CT), ERCC2-1 Lys751Gln (AC), ERCC2-2 Asp312Asn (GA), XRCC1 Arg399Gln (GA), CCND1 A870G, MDR-1 C3435T a XRCC3 Thr241Met (CT). V našem souboru nemocných byli nemocní s ověřeným NSCLC léčení v roce 2006 chemoterapií, u kterých byla vyhodnocena léčebná odpověď i krevní toxicita určité chemoterapie. Kategorizace pacientů byla podle toho, zda dostávali cisplatinu nebo karboplatinu, druhé dělení, bez ohledu na užitý platinový derivát, podle toho, zda dostávali gemcitabin, nebo taxany/vinorelbin.

Výsledky

Vyhodnotili jsme 80 nemocných, 57 mužů, 23 žen, průměrného věku 59,9 let, věkové rozmezí 27 – 78 let. Typy nádorů – epidermoidní karcinom 38 pacientů, adenokarcinom u 33, anaplastický u 7, smíšený u jednoho a blíže neurčený u jednoho pacienta. Tři nemocní měli stádium nemoci IIB, pět st. IIIA, 36 st. IIIB a 36 st. IV.

Frekvence léčebných odpovědí na kombinace obsahující cisplatin nebo karboplatin se statisticky významně nelišily, nebyly zjištěny rozdíly v odpovědi ani mezi schematy obsahujícími gemcitabin nebo taxany/vinorelbin. Krevní toxicita byla významně nižší u kombinací obsahující taxany/vinorelbin.

Léčebné odpovědi se vyskytly častěji u nemocných s projevy leukotoxicity ve srovnání s pacienty s polékovými anemiemi a nebo trombocytopeniemi. Jako statisticky významné prediktory léčebné odpovědi se prokázaly některé varianty genu ERCC1, XRCC1, XRCC3, MDR-1 a CCND1 a prediktory polékové krevní toxicity se ukázaly některé varianty genu MDR-1.

Závěr

Jednonukleotidové polymorfismy genů opravujících poškození DNA chemoterapií a geny pro MDR-1 a CCND1 mohou u nemocných s nemalobuněčnými karcinomy plic sloužit jako prediktory účinné chemoterapie. Mohou přispět k volbě mezi schematy obsahujícími cisplatinu nebo karboplatinu, a mezi schematy obsahujícími gemcitabin nebo taxany/vinorelbin. Variace genů pro MDR-1 mohou pomoci předpovědět hematologickou toxicitu.

Podporováno grantem IGA MZ 9087-3

40 Prognostický a prediktivní význam immunohistochemické exprese hMLH1, hMSH2 a hMLH6 u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic.

Škarda J.[1], Plevová P.[1], Fridman E.[3], Hajdúch M.[2], Kolek V.[4], Kolář Z.[1]
1) Ústav patologie a Laboratoř molekulární patologie LF UP v Olomouci a FN Olomouc,
2) Laboratoř experimentální medicíny LF UP a FN Olomouc,
3) Department of Pathology, The Chaim Sheba Medical Center and Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel-Aviv, Israel
4) Klinika tuberkulózy a respiračních nemocí LF UP v Olomouci a FN Olomouc.

Úvod

Jednou z hlavních příčin neúspěšnosti chemoterapie nemalobuněčného karcinomu plic je získaná mnohočetná léková rezistence nádorových buněk. Je definovaná jako neschopnost buněk reagovat na cytostatika s různou strukturou a mechanizmem účinku. Důležitými faktory podílejícími se na mnohočetné lékové rezistenci jsou systémy reparace poškozených úseků DNA, na kterých se účastní reparační proteiny hMLH1, hMSH2 a hMLH6. Dřívější studie prokázali sníženou expresi těhto proteinů u některých typů nádorů zažívacího traktu. Četné údaje z preklinických studií nasvědčují že existuje nepřímá uměra mezi ztrátou exprese hMLH1 a hMSH2 a rezistencí buněčných linii nemalobuněčného karcinomu plic na cisplatinu a karboplatinu.

Cíl práce

Z uvedených důvodů jsme sledovali immunohistochemickou expresi výše uvedených proteinů u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic a pokusili se stanovit její prognostický a prediktivní význam.

Metodika

Do studie bylo zařazeno 179 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic ve stádiu III u kterých byla aplikována adjuvantní chemotetapie na bázi platinových derivátů (cisplatiny a karboplatiny). Detekce výše uvedených proteinů byla provedena na tkáňových mikroerejích standardní dvoustupňovou imunoperoxidázouvou metodou za použití komerčně dostupných protilátek. Výsledky imunohistochemické exprese daných proteinů byly korelovány s věkem pacientů, histologickým typem nádoru, délkou přežívání a délkou bezpříznakového období. V rámci statistického zpracování byl použit t-test, log rank test a Kaplan Meierova analýza. Za statisticky signifikantní bylo považováno $p <= 0,05$.

Výsledky

Ztráta exprese proteinů hMLH1 a hMSH2 byla pozorována u 10% pacientů. Byla prokázána signifikantní negativní korelace mezi expresí uvedených proteinů. Exprese hMLH6 byla pozorována u všech pacientů. V rámci našeho souboru nebyly zjištěny žádné signifikantní korelace mezi expresí výše sledovaných proteinů, věkem pacientů, histologickým typem nádoru, délkou přežívání a délkou bezpřiznakového období pacientů.

Závěr

Ztráta exprese hMLH1 a hMSH2 nemá pro pacienty s nemalobuněčným karcinomem plic, na rozdíl od karcinomů tlustého střeva, prognostický a prediktivní význam.

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NR/8425-3/2005 a MSM6198959216.

41 Thyreoid transcription factor 1 u karcinomu plic: diagnostický marker minimální residuální choroby.

Srovnal J.[1], Kesselová M.[1], Kořínková G.[1], Kolek V.[2], Grygárková I.[2], Cwiertka K.[3], Švébišová H.[3], Gajová B.[3], Hajdúch M.[1,3]
1) Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc, Olomouc
2) Klinika plicních nemocí a tuberkulózy LF UP a FN Olomouc, Olomouc
3) Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc, Olomouc

Gen pro thyreoid transcription factor 1 (TTF1) je specificky exprimován ve štítné žláze, plicích a mezimozku. Tento gen byl poprvé identifikován v roce 1995 a je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu 14. TTF1 je členem rodiny NKx2 transkripčních faktorů.

TTF1 aktivuje transkripci thyreoglobulinu a thyreoperoxidázy u karcinomu štítné žlázy a transkripci surfaktant proteinu B v plicích, ovlivňuje také vývoj bazálních ganglií. Při ztrátě funkce tohoto genu je popisován hypothyreoidismus a respirační selhání u novorozenců a dyskineze.

V onkologii má TTF1 pro svou vysokou specificitu důležité místo v diferenciální diagnostice tumorů plic a pleurálních výpotků, dále může sloužit jako marker cirkulujících nádorových buněk při detekci minimální reziduální choroby (MRD).

Cílem naší studie bylo zjistit míru genové exprese TTF1 u nejčastěji diagnostikovaných karcinomů a otestovat vhodnost TTF1 jako molekulárního markeru při diferenciální diagnostice tumorů a výpotků neznámého původu. Dalším cílem bylo zavést TTF1 jako marker pro detekci MRD u karcinomu plic. Rovněž jsme chtěli porovnat získané výsledky s již dříve zjištěnými daty, kdy jsme jako markery použili karcinoembryonální antigen (CEA), receptor pro epidermální růstový faktor 1 (EGFR1), adhezní molekulu epiteliálních buněk (EpCAM) a cytokeratiny 19 a 20 (CK19, CK20).

Zavedli jsme metodu real-time RT-PCR pro absolutní kvantifikaci exprese TTF1. Na míru exprese TTF1 jsme otestovali celkem 110 vzorků primárních tumorů (23 vzorků nemalobuněčného karcinomu plic, 23 vzorků kolorektálního karcinomu, 23 vzorků karcinomu prsu, 20 vzorků ovariálního karcinomu a 21 primárních tumorů mozku). Metodou real-time RT-PCR jsme diferenciálně diagnosticky vyšetřili celkem deset vzorků výpotků a metastáz neznámého původu. Dále jsme provedli detekci MRD u pěti pacientů s karcinomem plic.

Z výsledků jasně plyne vysoká specificita TTF1 pro karcinomy plic v porovnání s ostatními testovanými diagnózami. Toto bylo ověřeno na souboru výpotků a metastáz neznámého původu, kde jsme za použití TTF1 spolu s ostatními zavedenými markery dokázali odhalit původ u 75% předtím neurčených vzorků. V souboru pěti pacientů s karcinomem plic jsme za použití TTF1 jako markeru nádorových buněk detekovali MRD u 60% pacientů.

TTF1 je vysoce specifický marker umožňující přesnou diferenciální diagnostiku primárních vs. metastatických plicních adenokarcinomů, TTF1 lze také použít jako velmi specifický marker pro detekci MRD u pacientů s karcinomem plic.

Práce na tomto projektu je podporována granty MSM6198959216, IGA MZCR NR/7804-5 a MPO 1H-PK/45.

42 Predikce účinnosti terapie inhibitory tyrosinkináz a odhad prognózy nemalobuněčného karcinomu plic na základě kombinovaného vyšetření somatických mutací onkogenů K-RAS a EGFR (ERBB1).

Benešová L.[1], Pešek M.[2], Hajdúch M.[3], Skřičková J.[4], Minárik M.[1]
1) Laboratoř molekulární genetiky a onkologie, Genomac International, s.r.o., Praha
2) Plicní klinika, FN Plzeň, Plzeň
3) Laboratoř experimentální medicíny, LF UP a FN Olomouc, Olomouc
4) Klinika nemocí plicních a tuberkulózy, FN Brno, Brno

Vyšetřování molekulárních profilů tumorů se v poslední době stává významným nástrojem při racionální volbě nádorové terapie. Mezi nejčastější patří analýza somatických genetických alterací jako jsou genové amplifikace, genové mutace, či nadměrná genová exprese. Specifické mutace v oblasti tyrozinkinázové domény genu pro EGFR, především v exonech 19 a 21 indikují positivní odpověď na cílenou biologickou léčbu inhibitory tyrosinkináz (např. gefitinib a erlotinib), zatímco mutace onkogenu k-ras je naopak pokládána za negativní prediktor účinnosti a celkově faktor negativní prognózy onemocnění. Cytologické a histologické preparáty nádorové tkáně části nemocných léčených pro nemalobuněčný karcinom plic gefitinibem v rámci programu časného přístupu v letech 2002-2005 byly vyšetřeny na přítomnost mutací genů k-ras a EGFR. Podle typu preparátu a zastoupení tumorózní tkáně byly nádorové buňky vybírány makro- nebo mikrodisekčními technikami. Výsledné frekvence výskytu mutací obou genů odpovídají literárním údajům o naší kavkazské populaci. U jednoho nemocného byly prokázány jak mutace EGFR, tak i mutace k-ras onkogenu. Křivky přežití indikují nejlepší prognózu u pacientů nesoucích mutace EGFR a nejhorší prognózu u k-ras pacientů.

Podporováno grantem IGA MZ 9087-3

43 Sledování hladiny angiogeninu, PDGF a MCP-1 u nemocných s renálním karcinomem.

Lukešová Š.[1,4], Kopecký O.[1,4], Vroblová V.[2], Andrýs C.[2], Morávek P.[3], Šafránek H.[3]
1) II. interní klinika Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta UK Hradec Králové
2) Ústav klinické imunologie a alergologie Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta UK Hradec Králové
3) Urologická klinika Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta UK Hradec Králové
4) Onkologické oddělení Oblastní nemocnice Náchod, a.s.

Úvod

Důležitým procesem doprovázejícím růst nádorů je angiogeneze. Za fyziologických okolností je angiogeneze kontrolována vyvážeností proangiogenních a antiangiogenních faktorů. Tato rovnováha je u nádorových tkání porušena. Výsledkem je podpo-

ra angiogeneze. Ke zvýšené expresi angiogenních faktorů dochází na podkladě různých stimulů (6). Nejvíce studovaným podnětem je hypoxie, která vede ke zvýšené expresi VEGF (vascular endothelial growth factor) i dalších angiogenních faktorů (7). Citlivost buněk k hypoxickým stavům a transkripce angiogenních faktorů se zvyšuje při mutaci VHL (von Hippel-Lindau gen) genu (4, 7).

V průběhu vaskulárního stadia nádorové angiogeneze dochází ke změnám v poměru angiogenních a antiangiogenních faktorů, k morfologickým změnám endotelových buněk, k uvolnění proteolytických enzymů, k migraci endotelií a kapilární morfogenezi, k reprodukci endotelií a k mikrovaskulární diferenciaci (1).

Jednotlivé fáze procesu angiogeneze mohou být shrnuty následovně:

1. Vasodilatace preexistujících cév a formování vesiculo- vakuolárních organel v endoteliálních buňkách. Nejdůležitější pro tento krok je VEGF. 2. Cévní destabilizace a degradace matrix s remodelací perivaskulárního stromatu. Tohoto kroku se účastní angiopoietin 2 a proteázy (jako chymázy a matrix metallo-proteázy). 3. Proliferace endoteliálních buněk a migrace podél gradientu chemotaktických agens skrz desintegrovanou basální membránu do remodelovaného, měkkého perivaskulárního prostoru. Specifickými mitogeny endoteliálních buněk v této fázi jsou VEGF a angiopoietin, ostatní molekuly jako angiogenin a FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), CXC-chemokiny a insulin-like growth factor typ 1 indukují proliferaci širokého spektra buněk. 4. Formování lumen a stabilizace cévy; díky migraci endoteliálních buněk nejprve formující jednoduchou vrstvu, později dutou cévu s okolními mesenchymálními buňkami a cévními buňkami hladké svaloviny. Do této fáze jsou zapojeny různé formy VEGF a integrinů (10).

Analýzy chemoatraktantů a angiogenních faktorů jsou důležité za účelem determinovat maligní potenciál renálního karcinomu. V rámci našeho výzkumného záměru jsme sledovali hladiny angiogeninu, PDGF (plateled-derived growth factor) a MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1).

Soubor pacientů

Světlobuněčný renální karcinom byl diagnostikován u 32 pacientů v období od října 2005 do září 2006. U všech nemocných byl odstraněn primární nádor ledviny, 8krát byla provedena záchovná operace, 24krát nefrektomie. Diagnóza renálního karcinomu byla potvrzena histologicky a ve všech případech byl stanoven buněčný grading dle Fuhrmanové. Séra od pacientů byla získána opakovanými odběry periferní žilní krve provedenými v den operace, v období 5.-7. dne po operaci a 8 týdnů po operaci. Hodinu po odběru byl každý odebraný vzorek krve 10 minut centrifugován při 3000 rpm. Séra pak byla rozdělena do dvou alikvotů a skladována při –20°C do zpracování. Kontrolní séra byla získána od 14 zdravých dárců krve podobného věkového složení.

Metoda

Pro stanovení hladiny angiogenních faktorů byla použita metoda protein arrays firmy RayBiotech (USA), RayBio Human Angiogenesis Antibody Array I. Podstatou je membrána pokrytá spoty (skvrnami, oblastmi), kde jsou navázány specifické protilátky proti jednotlivým vyšetřovaným faktorům. Po aplikaci vzorku se analyzované proteiny navážou na příslušné protilátky. V dalším kroku je aplikována směs protilátek proti měřeným proteinům značená enzymem. Vzniklé imunokomplexy fixované v oblasti příslušných spotů jsou vizualizovány vhodnou barevnou reakcí. Výsledkem je membrána s viditelnými skvrnami o různé intenzitě. Koncentrace příslušného faktoru potom odpovídá intenzitě zbarvení konkrétní skvrny. Membrána obsahuje kromě měřených parametrů ještě negativní a pozitivní kontroly. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí software ARES ARay Evaluation System (Baria, Czech Republic). Výsledná koncentrace jednotlivých proteinů je vyjádřena jako relativní intenzita (hodnota) zbarvení spotů vzhledem ke kontrolám. Statistické porovnání naměřených hodnot bylo provedeno pomocí programu Sigmastat.

Výsledky

Nemocní s RCC, 11 žen a 21 mužů, Ř věk 65,9 roků, byli rozděleni do tří skupin podle TNM klasifikace (10. revize z roku 2002). První skupina zahrnovala 15 pacientů v I. a II. stadiu choroby, druhá skupina 8 pacientů ve III. stadiu choroby a třetí skupina 9 pacientů ve IV. stadiu choroby. Tabulka ukazuje porovnání hladin angiogeninu, PDGF a MCP-1 v den operace, týden po operaci a 8 týdnů po odstranění tumoru.

Diskuse

Angiogenin je polypeptid enzymatické povahy, který stimuluje endotelové buňky k produkci prostacyklinu (aktivuje fosfolipázu C a fosfolipázu A_2), omezuje produkci adhezních molekul (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular adhesion molecule-1). Angiogenin může být uvolňován nádorovými buňkami a má úzký vztah k růstu nádoru, jeho progresi a agresivnosti. U mnohých solidních nádorů byla nalezena zvýšená hladina angiogeninu, nemocní s vyšší hladinou angiogeninu měli horší prognózu. V některých případech dochází k poklesu hladiny angiogeninu u nádorů po léčbě a zvýšení při recidivě (8). Z tohoto důvodu by mohl být angiogenin užitečný při monitování léčby nádorů a detekci recidivy nádoru. Tyto výsledky však nejsou jednoznačné. Například dvě studie týkající se karcinomu prsu vykazovaly opačné výsledky pokud jde o prognózu; zvýšená hladina angiogeninu byla spojena s dobrou prognózou v jedné studii (9) a špatnou prognózou ve studii druhé (3).

PDGF (plateled-derived growth factor) je mitogen stimulující proliferaci fibroblastů a produkci kolagenu. Má význam pro formování nového lumen cévy. Zvyšuje syntézu kolagenu a působí jako chemoatraktant pro endotelové buňky. Původně byl izo-

lován z destiček, ale také ho exprimují za různých podmínek fibroblasty, keratinocyty a různé další buněčné typy. PDGF a jeho receptory jsou homo- a heterodimerické proteiny o dvou samostatných α a β podjednotkách. Endoteliální buňky exprimují jen PDGF-β receptor. PDGF má nepostradatelnou úlohu ve stabilizaci cév (2).

MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) je chemokin, který má různé role v nádorovém růstu a progresi. Vedle chemotaktické aktivity vykazuje také indukci angiogeneze. Je členem CC chemokinové rodiny a hraje důležitou úlohu v aktivaci monocytů v průběhu akutního zánětu. Dále ovlivňuje i NK buňky, basofily a T lymfocyty, které všechny exprimují chemokinové receptory, predominantně CC-chemokinový receptor 2.

S nádorem asociované makrofágy jsou komponentou stromatu a hrají v nádoru duální roli. S nádorem asociované makrofágy mohou produkovat množství angiogenních faktorů, cytokinů a proteáz, které podporují nádorovou progresi. Mnohé studie ukazují, že infiltrace nádoru makrofágy má negativní efekt na přežívání pacientů. Je také prokázáno, že s nádorem asociované makrofágy mohou být tumoricidní a mohou vyvolat IL-2, IL-12, a IFN-γ mediovanou destruktivní reakci (5).

Tabulka: Porovnání sérových hladin angiogeninu, PDGF a MCP-1 u nemocných s RCC v průběhu léčby

	kontrola (n 14)	I.+ II.stadium	III. stadium	IV. stadium	kontrola v.s.I.+II.	kontrola v.s.III.	kontrola v.s.IV.	I+II v.s. III.	I+II v.s.IV.	III. v.s.IV.
angiogenin										
odběr 1	40,44 ± 1,67	48,13 ± 5,12	51,94 ± 3,39	47,57 ± 3,73	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,003	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 2		48,50 ± 6,36	50,25 ± 4,11	52,14 ± 4,19	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,002	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		48,34 ± 5,10	50,67 ± 2,46	48,90 ± 4,75	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
PDGF										
odběr 1	39,11 ± 2,46	44,08 ± 5,37	42,94 ± 3,99	35,49 ± 3,96	p = 0,002	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,025
odběr 2		46,93 ± 4,76	44,87 ± 2,63	41,34 ± 7,58	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		45,89 ± 4,76	44,01 ± 2,40	43,56 ± 2,53	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	p < 0,001	n.s.	p < 0,001
MCP-1										
odběr 1	9,78 ± 3,66	20,57 ± 7,81	23,06 ± 5,69	13,43 ± 5,58	p = 0,002	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	p = 0,025
odběr 2		25,57 ± 7,85	25,44 ± 7,65	17,33 ± 7,89	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		23,86 ± 7,55	25,49 ± 8,01	9,83 ± 5,33	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	p < 0,001	n.s.	p < 0,001

Závěr

1) Sérové hladiny angiogeninu byly před operací významně vyšší u nemocných s RCC oproti zdravým dárcům krve a přetrvávaly ještě 5.-7. den a dokonce i 8. týden po odstranění tumoru. Nebyly však prokázány signifikantní rozdíly hladin angiogeninu mezi jednotlivými stádii choroby.
2) Hladiny MCP i PDGF v séru nemocných s RCC I.-III. stadia byly významně zvýšené oproti skupině zdravých osob.
3) U pacientů IV. stadia jevil ze třech sledovaných parametrů pouze angiogenin předoperačně i pooperačně statisticky významně zvýšenou hladinu v porovnání s hladinou u zdravých osob.
4) Nemocní s pokročilým RCC (IV. stádium) měli nižší sérové hodnoty MCP i PDGF. Tento nález je možné považovat za projev imunitní nedostatečností na základě nutriční poruchy, poruchy vnitřního prostředí, faktorů produkovaných nádorovými buňkami.

Tento příspěvek vznikl s podporou grantu výzkumného záměru IGA MZ ČR: NR/8914-4.

Literatura

1. Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. Eur J Int Med 2003; 14: 459-469.
2. Distler JW, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O. Angiogenic and angiostatic factor in the molecular kontrol of angiogenesis. Nucl Med 2003; 47: 149-61.
3. Eppenberger U, Kueng W, Schlaeppi JM, Roesel JL, Benz C, Mueller H, Matter A, Zuber M, Luescher K, Litschgi M, Schmidt M, Foekens JA, Eppenberger-Castori S. Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independenty devone high- and low-risk subsets of node-negative breast cancer patients. J Clin Oncol 1998; 16: 3129-36.
4. Kim W, Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. Curr Opin Genetics Develop 2003; 13: 55-60.
5. Kuroda T, Kitadai Y, Tanaka S, Yang X, Mukaida N, Yoshihara M, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 transfection induces angiogenesis and tumorigenesis of gastric carcinoma in nude mice via macrophage recruitment. Clin Cancer Res 2005; 11 (21): 7629-7636.
6. Lukešová Š, Kopecký O, Dvořák J, Hlávková D, Vroblová V. Nádorová angiogeneze. Vnitřní lékařství 2006; 52: 797-800.
7. Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. Seminars Cancer Biol 2004; 14: 123-130.

8. Musolino C, Alonci A, Bellomo G, Loteta B, Quartarone E, Gangemi D, Massara E, Calabro L. Levels of soluble angiogenin in chronic myeloid malignancies: clinical implications. Eur J Haematol 2004; 72: 416-19.
9. Sheen-Chen SM, Eng HL, Chen WJ, Chou FF, Chen HS. Serum level of angiogenin in breast cancor. Anticancer Res 2000; 20: 4769-71.
10. Tello-Montoliu A, Patel JV, Lip GYH Angiogenin: a rewiev of the pathophysiology and potential clinical applications. J of Tromb and Haem 2006; 4: 1864-1874.

44 Sledování hladin angiogeninu, EAN-78, GRO, IL-8 v séru nemocných s renálním karcinomem v průběhu léčby.

Kopecký O.[1,5], Lukešová Š.[1,5], Vroblová V.[2], Andrýs C.[2], Morávek P.[3], Podhola M.[4], Vokurková D.[2], Šafránek H.[3]
1) Fakultní nemocnice Hradec Králové, 2. interní klinika
2) Ústav klinické imunologie a alergologie
3) Urologická klinika
4) Fingerlandův ústav patologické anatomie
5) Oblastní nemocnice Náchod, Onkologické oddělení

Úvod

Neovaskularizace je důležitá pro růst a metastazování solidních tumorů. Je prokázáno, že u řady tumorů „microvessel density“ koreluje s maligním potenciálem. Maligní buňky jsou během nádorové expanze vystaveny hypoxii, která je hlavním stimulem syntézy peptidů podporujících neovaskularizaci. Za fyziologické situace je tento dynamický vztah mezi proangiogenními a antiangiogenními stimuly vyvážený. V případě neoplastických procesů převažuje vliv proangiogenních faktorů. Solidní tumory nejsou tvořeny pouze nádorovými buňkami, ale v nádorové tkáni se nachází i stromální buňky. Nádorové buňky společně se stromálními buňkami vytváří cytokinové a chemokinové mikroprostředí, které má zásadní vliv na růst nádoru a protinádorovou imunitní odpověď. „Tumor-associated macrophages“ (TAMs) jsou hlavní komponentou stroma. Aktivované TAMs jsou schopny přímo zabíjet nádorové buňky, ale také produkují TGF-β, TNF-α, IL-8, proteinázy a metabolity kyseliny arachidonové. Působením angiogenních faktorů, produkovaných nádorovými buňkami, TAMs exprimují VEGF-C (Vascular endothelial growth factor), VEGF-D, a VEGFR-3 (VEGF receptor-3), které se podílí na lymfangiogenezi a šíření metastáz lymfatickými cévami. Řada studií dokládá významnou korelaci mezi TAMs a „tumor vessel density“ a jejich negativní vliv na přežití pacientů. TAMs se diferencují z monocytů, které vstupují do nádorové tkáně působením chemoatraktivních peptidů, chemokinů. VEGF byl považován za hlavní proangiogenní mediátor. Výsledky fáze II klinické studie, hodnotící klinický efekt humanizované monoklonální protilátky anti VEGF (bevacizumab), tuto představu nepotvrdily. Proto je nutné hledat další faktory zasahující do regulace angiogeneze. ELR+ CXC chemokiny výrazně zesilují angiogenezi u různých typů nádorů. Growth-related oncogene α, β, γ (GRO-α, β, γ) (CXCL1, CXCL2, CXCL3 chemokine) byl prokázán na melanomových buňkách a potencoval jejich proliferaci. U nemocných s non-small cell lung carcinoma potencoval nádorový růst, vaskularizaci a metastazování epithelial-neutrophil-activating peptid 78 (ENA-78) (CxCL5 chemokine) a IL-8 (CXCL8 chemokine). Tyto nálezy opravňují k vyslovení domněnky, že ELR+ CXC chemokiny jsou důležitým faktorem malignity i u dalších nádorů, jako je například karcinom ledviny.

Soubor pacientů

Světlobuněčný renální karcinom byl diagnostikován u 32 pacientů v období od října 2005 do září 2006. U všech nemocných byl odstraněn primární nádor ledviny, 8krát byla provedena záchovná operace, 24krát nefrektomie. Diagnóza renálního karcinomu byla potvrzena histologicky a ve všech případech byl stanoven buněčný grading dle Fuhrmanové. Séra od pacientů byla získána opakovanými odběry periferní žilní krve provedenými v den operace, v období 5.-7. dne po operaci a 8 týdnů po operaci. Hodinu po odběru byl každý odebraný vzorek krve 10 minut centrifugován při 3000 rpm. Séra pak byla rozdělena do dvou alikvotů a skladována při –20°C do zpracování. Kontrolní séra byla získána od 14 zdravých dárců krve podobného věkového složení.

Metoda

Pro stanovení hladiny angiogenních faktorů byla použita metoda protein arrays firmy RayBiotech (USA), RayBio Human Angiogenesis Antibody Array I. Podstatou je membrána pokrytá spoty (skvrnami, oblastmi), kde jsou navázány specifické protilátky proti jednotlivým vyšetřovaným faktorům. Po aplikaci vzorku se analyzované proteiny navážou na příslušné protilátky. V dalším kroku je aplikována směs protilátek proti měřeným proteinům značená enzymem. Vzniklé imunokomplexy fixované v oblasti příslušných spotů jsou vizualizovány vhodnou barevnou reakcí. Výsledkem je membrána s viditelnými skvrnami o různé intenzitě. Koncentrace příslušného faktoru potom odpovídá intenzitě zbarvení konkrétní skvrny. Membrána obsahuje kromě měřených parametrů ještě negativní a pozitivní kontroly. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí software ARES ARay Evaluati-

on System (Baria, Czech Republic). Výsledná koncentrace jednotlivých proteinů je vyjádřena jako relativní hodnota zbarvení spotů vzhledem ke kontrolám. Statistické porovnání naměřených hodnot bylo provedeno pomocí programu Sigmastat.

Výsledky

Nemocní s RCC, 11 žen a 21 mužů, průměrný věk 65,9 roků, byli rozděleni do tří skupin podle TNM klasifikace (10. revize z roku 2002), stádia choroby I – IV., metastatická postižení ve skupině 9 nemocných RCC IV. stadia jsou uvedeny v tabulce. č. 1. Výsledky měření jsou uvedeny tabulce č. 2.

Pacient	Pohlaví	věk	Stadium	Tumor	Uzliny	Metastázy	Grade	Lokalizace metastáz (počet)
1	ž	78	I	T1a	N0	M0	II	žádné
2	m	74	I	T1b	N0	M0	II	žádné
3	m	80	I	T1b	N0	M0	II	žádné
4	m	55	I	T1b	N0	M0	I-II	žádné
5	m	55	I	T1a	N0	M0	II	žádné
6	m	59	I	T1b	N0	M0	II	žádné
7	m	51	I	T1b	N0	M0	III	žádné
8	m	78	I	T1b	N0	M0	II	žádné
9	m	58	I	T1a	N0	M0	III	žádné
10	ž	72	I	T1b	N0	M0	I-II	žádné
11	ž	46	I	T1a	N0	M0	I	žádné
12	m	50	II	T2	N0	M0	II	žádné
13	m	66	II	T2	N0	M0	II	žádné
14	m	54	I	T1a	N0	M0	III	žádné
15	m	78	I	T1a	N0	M0	II	žádné
16	ž	83	III	T3a	N0	M0	I-II	nadledvina
17	m	66	III	T3b	N0	M0	II	renální žíla
18	ž	73	III	T3b	Nx	M0	III	renální žíla
19	m	64	III	T3b	N0	M0	II	renální žíla
20	m	57	III	T3a	N0	M0	II-III	oboustranný TU, renální žíla
21	ž	66	III	T3a	N0	M0	II	nadledvina
22	ž	77	III	T3a	N0	M0	II-III	nadledvina
23	m	75	III	T3a	N0	M0	I-II	nadledvina
24	m	77	IV	T3a	Nx	M1	III	játra (1)
25	m	74	IV	T4	N0	M1	III-IV	skelet, játra, plíce (3)
26	ž	70	IV	T3b	N2	M0	III-IV	abdominální uzliny (1)
27	ž	71	IV	T3a	N0	M1	Sarkomat.	játra, peritoneum (2)
28	ž	62	IV	T1b	N0	M1	I-II	lymf. uzliny - mediastinum (1)
29	m	44	IV	T3b	N0	M1	III-IV	játra, plíce (2)
30	ž	74	IV	T1b	Nx	M1	III	plíce (1)
31	m	57	IV	T3b	N0	M1	II	vícečetné kostní (3)
32	m	65	IV	T1b	N1	M1	III	páteř, plíce (2)

ž – žena m - muž

Tab. č. 1:
Charakteristika souboru nemocných

angiogenin

		I + II stadium	III. stadium	IV. stadium	kontrola v.s.I.+II.	kontrola v.s.III.	kontrola v.s.IV	I+II v.s. III.	I+II v.s.IV.	III v.s.IV.
odběr 1	40,44 ± 1,67	48,13 ± 5,12	51,94 ± 3,39	47,57 ± 3,73	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,003	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 2		48,50 ± 6,36	50,25 ± 4,11	52,14 ± 4,19	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,002	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		48,34 ± 5,10	50,67 ± 2,46	48,90 ± 4,75	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.

EAN-78

	kontrola (n 14)	I + II stadium	III. stadium	IV. stadium	kontrola v.s.I.+II.	kontrola v.s.III.	kontrola v.s.IV.	I+II v.s. III.	I+II v.s.IV.	III v.s.IV.
odběr 1	3,20 ± 1,44	9,77 ± 3,34	14,25 ± 2,92	6,78 ± 3,28	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	p = 0,009	n.s.	p < 0,001
odběr 2		11,54 ± 4,74	15,06 ± 5,34	10,22 ± 4,18	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,036	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		12,36 ± 4,23	12,68 ± 4,99	8,85 ± 2,21	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,04	n.s.	n.s.	n.s.

GRO

	kontrola (n 14)	I+II. stadium	III. stadium	IV. stadium	kontrola v.s.I.+II.	kontrola v.s.III.	kontrola v.s.IV.	I+II v.s. III.	I+II v.s.IV.	III v.s.IV.
odběr 1	9,53 ± 2,87	23,96 ± 7,41	30,69 ± 5,44	25,54 ± 5,59	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 2		31,23 ± 7,72	31,88 ± 7,14	26,51 ± 7,94	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		31,23 ± 7,72	28,36 ± 7,22	21,61 ± 9,12	p < 0,001	p < 0,001	p = 0,004	n.s.	n.s.	p < 0,001

IL-8

	kontrola (n 14)	I + II stadium	III. stadium	IV. stadium	kontrola v.s.I.+II.	kontrola v.s.III.	kontrola v.s.IV.	I+II v.s. III.	I+II v.s.IV.	III v.s.IV.
odběr 1	2,78 ± 2,24	4,08 ± 2,43	6,44 ± 3,54	6,72 ± 4,61	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 2		2,03 ± 2,06	2,44 ± 1,80	6,72 ± 4,61	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
odběr 3		1,96 ± 2,00	2,85 ± 2,20	1,53 ± 1,69	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. č. 2:
Porovnání sérových hladin angiogeninu, EAN-78, GRO, IL-8 u nemocných s RCC v průběhu léčby

Závěr

1) Sérové hladiny angiogeninu byly před operací významně vyšší u nemocných s RCC oproti zdravým dárcům krve a přetrvávaly ještě 5.-7. den a dokonce i 8. týden po odstranění tumoru. Nebyly však prokázány signifikantní rozdíly hladin angiogeninu mezi jednotlivými stádii choroby.
2) Hladiny ELR+ CXC chemokinů (ENA-78, GRO) v séru nemocných s RCC byly významně zvýšené oproti skupině zdravých osob. Na rozdíl od angiogenimu, 8. týden po odstranění tumoru došlo ke snížení hladin ENA-78 a GRO. Oba chemokiny jsou produkovány nádor infiltrujícími monocyty a dendritickými buňkami a podporují vstup polymorfonukleárních leukocytů do nádoru. Zdá se, že oba CXC chemokiny lépe odrážejí intenzitu jak protinádorové imunitní odpovědi, tak neoangiogeneze.
3) Nemocní s pokročilým RCC (IV. stádium) měli nižší sérové hodnoty ENA-78 a GRO. Tento nález je možné považovat za projev imunitní nedostatečnosti při pokročilém nádorovém onemocnění (nutriční poruchy, změny vnitřního prostředí, faktory produkované nádorovými buňkami).
4) Na rozdíl od prací sledujících produkci IL-8 u jiných malignit, nenalezli jsme porovnáním skupiny zdravých osob a nemocných s RCC rozdíly v jeho hladinách. Je však třeba ověřit, zda tento závěr není ovlivněn volbou metody detekce, a vyšetření zopakovat s využitím standardní ELISA metody.

Literatura

1. Smith D.F., Galkina E., Ley K., Huo Y. GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. AJP-Heart Circ Physiol, 76: 1976-1984,2005
2. Scimone M.L., Lutzky V.P., Zittermann S.I., Maffia P., Jancic C., Buzzola F., Issekutz A.C., Chuluyan H.E. Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. Immunology 114: 375-385, 2005
3. Mestas J., Burdick M.D., Reckamp K., Pantuck A., Figlin R.A., Strieter R.M. The role of CXC2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. J.Immunol. 175: 5351-5357, 2005
4. Tello-Montoliu A., Patel J.V., Lip G.Y.H. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. 4: 1864-1874, 2006

Tento příspěvek vznikl s podporou grantu IGA MZ ČR: NR/8914-4.

45 Individual immunodominant CD8+ T cell clones monitoring in patients with metastatic melanoma.

Michálek J.[1,2,4], Fait V.[3], Kocák I.[3], Vidláková P.[1], Kovářová L.[1], Žaloudík J.[3], Hájek R.[1], Vitetta E.S.[4]
1) Centrum buněčné imunoterapie, Masarykova univerzita Brno
2) 1. Dětská interní klinika, FN Brno
3) Masarykův onkologický ústav, Brno
4) Cancer Immunobiology Center, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX, U.S.A.

We investigated the presence of individual melanoma-specific T cell clones in patients with metastatic melanoma. Ten patients were examined for the presence of melanoma-reactive T cells using dendritic cells loaded with autologous tumor cells. Their specificity was tested using non-radiactive cytotoxicity test. Individual immunodominant T cell clones were identified by the clonotypic assay that combines in vitro cell culture, immunomagnetic sorting of activated IFNγ+ T cells, T cell receptor beta locus anchored reverse transcription-PCR, and clonotypic quantitative PCR.

All patients had detectable melanoma-reactive T cells in vitro. Expanded melanoma-reactive T cells demonstrated specific cytotoxic effect against autologous tumor cells in vitro. Three patients experienced objective responses and their clinical responses were closely associated with the in vivo expansion and long-term persistence of individual CD8+ T cell clones with frequencies of 10^{-6} to 10^{-3} of all circulating CD8+ T cells. Five patients with progressive disease experienced no or temporary presence of circulating melanoma-reactive T cell clones. Thus, circulating immunodominant CD8+ T cell clones closely correlate with clinical outcome in patients with metastatic melanoma.

Supported by MŠMT NPVII 2B06058.

46 Snížení počtu kopií a změny exprese genu N-myc u chemorezistentních neuroblastomových linií.

Procházka P., Hraběta J., Vícha A., Poljaková J., Eckschlager T.
Klinika dětské hematologie a onkologie UK, 2. LF a FN Motol, Praha

I přes úspěchy pediatrické onkologie zůstává neuroblastom vysokého rizika (HR NBL) jedním z nejhůře léčitelných dětských nádorových onemocnění. Pro diagnostiku HR NBL je nejdůležitějším prognostickým znakem amplifikace onkogenu **N-myc**. Ten je lokalizovaný na krátkém raménku 2. chromozómu v oblasti 2p24 a je složen se ze tří exonů. Jeho produktem je jaderný fosfoprotein s vazebnou afinitou k DNA ovlivňující transkripci a replikaci. Gen N-myc je nezbytný pro vývoj a diferenciaci neuroektodermu. Jeho nadměrná exprese výrazně přispívá k malignímu potenciálu buňky. N-myc amplifikuje v časném stádiu vývoje nádoru a v dalším průběhu onemocnění se amplifikace nemění. Vyskytuje se ve dvou formách: 1/ extrachromozomální acentrické fragmenty (Double minute Chromatin Bodies, dmin); 2/ intrachromozomální, homologně se barvící oblasti (Homogenously Staining Regions, HSRs). Amplifikovaný onkogen N-myc je v neuroblastomových buňkách přítomen zpravidla ve 3-300 kopiích. [1] Přesný počet není z klinického hlediska důležitý, neboť je jednoznačně ověřeno, že nádorové buňky obsahující více než 8 kopií při zachování diploidního stavu chromozómu, jsou vždy agresivní. Změny počtu kopií genu N-myc klasifikujeme do dvou skupin. Gain – zmnožení kopií nejvýše o trojnásobek počtu 2. chromozómů. Amplifikace – zmnožení o čtyřnásobek a větší oproti kontrolní centromerické próbě na témže chromozómu. Amplifikace N-myc u HR NBL koreluje s agresivním růstem a velmi nepříznivou prognózou bez ohledu na klinické stádium. S tím souvisí snaha o ovlivnění HR NBL novými léky. Jednou z hlavních příčin selhání chemoterapie je vznik rezistence na použitá cytostatika. Zaměřili jsme se na studium N-mycu u buněk HR NBL rezistentních k běžně používaným cytostatikům: doxorubicinu, vinkristinu, cisplatině a látkám, které vykazující protinádorové účinky: BS-RNáze a ellipticinu.

Ellipticin má více mechanismů účinku, za hlavní je považována interkalace do DNA a tvorba aduktů, inhibice topoizomerázy II, narušení oxidativní fosforylace v mitochondriích, regulace exprese cyklinu B1 a Cdc2 a fosforylace Cdc2. Pro účinnost ellipticinu je nezbytná jeho aktivace oxidativními enzymy (cytochromy P450, cyklooxygenáza, myeloperoxidáza). Mechanizmus protinádorového účinku **RNáz** není plně objasněn. Nedávno bylo zjištěno, že indukují autofagii nádorových buněk. [2] Dále se předpokládá inhibice proteosyntézy štěpením tRNA, uplatňuje se i štěpení rRNA, aktivace kaspáz a snížení exprese Bcl-2. Ani mechanismus cytotoxických a antiproliferativních účinků **doxorubicinu** nebyl dosud plně vysvětlen. Doxorubicin je cytostatikum ze skupiny antracyklinů. Jeho hlavním účinkem je interkalace DNA a dále inhibice topoizomerázy-II, což vede k poškozování DNA, narušení replikace DNA, DNA-dependentní syntézy RNA a proteosyntézy. Doxorubicin je redukován na volné radikály semichinonu, které reagují s molekulárním kyslíkem za vzniku vysoce reaktivních sloučenin. Další místo působení doxorubicinu je na úrovni buněčné membrány, kde se váže na lipidy a ovlivňuje tak řadu buněčných funkcí. Protinádorový a cytotoxický účinek **vinkristinu** je dán několika mechanizmy. Vinkristin interaguje s mikrotubulárním systémem, přičemž dochází ke zničení mikrotubulů a tím všech struktur je obsahující, jako např. dělící vřeténko. Chromozómy se tak nedostanou do jádra dceřiných buněk. Selektivně inhibuje v nádorových buňkách opravné mechanizmy DNA a blokuje účinek DNA-dependentní RNA polymerázy, což inhibuje syntézu RNA. **Cisplatina** je komplexní sloučenina těžkého kovu určená k terapii nádorů. Mechanismus působení platinových derivátů je podobný ostatním alkylačním cytostatikům. tj. poškozování DNA a vznik interkalačních vazeb mezi řetězci a vznik aduktů, což zamezuje replikaci. [3] Uvnitř buněk je menší množství iontů chloru než mimo buňky. Proto v tomto prostředí dochází k uvolňování kovalentně vázaného chlóru z cisplatiny a vzniku nukleofilního radikálu. Ten reaguje s purinovými bázemi nukleových kyselin.

Primární i získaná rezistence nádorových buněk k cytostatikům je podmíněna řadou mechanizmů. Nejčastěji se jedná o zvýšenou schopnost odstranit cytostatika z buňky (P-glykoprotein – produkt genu MDR1, MRP, LRP) [4-6], detoxifikovat je (glutathion-S-transferáza, metalothioneiny, monooxygenázy) [7, 8], zabránit vzniku apoptózy (zvýšená exprese Bcl-2) [9] nebo zvýšit opravu poškozené DNA (alkylguanin-DNA alkyltransferáza, O6-metylguanin-DNA transferáza) [10]. Jindy jsou v nádorové buňce neaktivní enzymy aktivující cytostatika nebo jsou modifikované cíle cytostatik (topoizomeráza I a II, dihydrofolátreduktáza) [11].

Cílem naší práce bylo pomocí komparativní geonomové hybridizace (CGH) [12], umožňující zjistit nově vzniklé amplifikace, zmnožení nebo ztráty konkrétních chromozomových oblastí, vyšetřit pět HR NBL buněčných linií s experimentálně navozenou chemorezistencí na BS-RNázu, ellipticin, vinkristin, doxorubicin nebo cisplatinu. Při CGH vyšetření jsme porovnali DNA parentální linie UKF-NB4 s DNA zdravého dobrovolníka a prokázali změny odpovídající HR NBL zahrnující amplifikaci N-myc (2p24), zmnožení 17q a deleci 1p32.2-ter. Dále jsme porovnali DNA parentální linie s DNA rezistentních linií ke zjištění zmnožení nebo ztráty DNA. Pomocí CGH jsme prokázali ztrátu 2p24 u všech pěti rezistentních linií odpovídající snížení počtu kopií amplifikovaného N-myc.

Tento úbytek kopií N-myc genu jsme ověřili metodou FISH, kterou bylo možné stanovit přesný počet kopií v každé buňce. Počet nadbytečných kopií byl počítán jako počet kopií N-myc snížený o počet centromer druhého chromozomu. Buňky parentální linie UKF-NB4 mají průměrně 62 kopií. U linie rezistentní k ellipticinu byl počet kopií snížen na 38 kopií, u linie rezistentní k BS-RNáze a k vinkristinu na 44 kopií, k doxorubicinu na 43 kopií a k cisplatině na 45 kopií. Rozdíly mezi počtem kopií v paren-

tální linii a v jednotlivých rezistentních liniích byly statisticky významné (t-test, $p < 0,05$). Výsledek je zajímavý tím, že v průběhu léčby se nepopisují významné změny počtu kopií. Ale v našem experimentu u rezistentních linií, připravených kultivací v mediu s přídavkem protinádorové látky, se počet kopií snížil.

Metodou RT PCR v reálném čase jsme zjišťovali expresi mRNA N-myc. Parentální linie má ve srovnání se vzorkem leukocytů periferní krve zdravého dobrovolníka expresi o více než 3 řády vyšší. Všech pět rezistentních linií UKF-NB4 ve srovnání s parentální linií exprimovalo mRNA N-myc přibližně o jeden řád méně. Mezi počtem kopií genu a jeho expresí byla zjištěna korelace.

Nejasný zatím zůstává význam poklesu počtu kopií genu N-myc a snížení jeho exprese u chemorezistentních linií. Jednou z možností je význam při vzniku chemorezistence, kdy nižší amplifikace umožňuje býti buňce rezistentní. Jinou možností by byla zvýšená citlivost vysoce amplifikujících buněk na cytostatika v důsledku, kterého se amplifikace u buněk nemění, ale snižuje se množství buněk s vysokou amplifikací.

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT, IGA a GAUK.

Literatura

1. Vícha, A. and T. Eckschlager, Molekulární biologie neuroblastomu. Klin. Onkol., 2005. 18(5): p. 159-165.
2. Michaelis, M., J. Cinatl, P. Anand, et al., Onconase induces caspase-independent cell death in chemoresistant neuroblastoma cells. Cancer Lett, 2006.
3. Adam, V., J. Petrlová, R. Mikelová, et al., Elektrochemicke studium tvorby aduktu s nukleovymi kyselinami. Čas Lék Česk, 2006. 145(3): p. 225-225.
4. Ambudkar, S.V., Z.E. Sauna, M.M. Gottesman, et al., A novel way to spread drug resistance in tumor cells: functional intercellular transfer of P-glycoprotein (ABCB1). Trends Pharmacol Sci, 2005. 26(8): p. 385-7.
5. Noskova, V., M. Hajduch, V. Mihal, et al., Mechanizmy mnohočetné lékové rezistence a jejich význam pro klinickou praxi. Klin. Onkol., 2000. 2: p. 4-14.
6. Fukushima, K., Y. Okai, S. Matsuura, et al., Molecular cloning of feline lung resistance-related protein (LRP) cDNA and its expression in a feline lymphoma cell line and adriamycin-resistant subline. J Vet Med Sci, 2006. 68(8): p. 885-90.
7. Depeille, P., P. Cuq, S. Mary, et al., Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects. Mol Pharmacol, 2004. 65(4): p. 897-905.
8. Hraběta, J., K. Figová, T. Eckschlager, et al., Obsah metalothioneinu v buňkách neuroblastomu ve vztahu k erzistenci vůči platinovým cytostatikům. Zborník abstraktov XVI. konferencia detských hematológov a onkológov SR a ČR., 2006(ISBN 80-89057-14-4): p. 90.
9. Chun, E. and K.Y. Lee, Bcl-2 and Bcl-xL are important for the induction of paclitaxel resistance in human hepatocellular carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 315(3): p. 771-9.
10. Kodydkova, K. and J. Krejsek, [Resistance of cells in hematopoietic malignancies to cytostatic agents. Part 1]. Cas Lek Cesk, 2000. 139(18): p. 553-6.
11. Rasheed, Z.A. and E.H. Rubin, Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs. Oncogene, 2003. 22(47): p. 7296-304.
12. Vícha, A. and T. Eckschlager, Metody molekulárně cytogenetického vyšetření v klinické onkologii. Prakt.Lék., 2005. 85: p. 387-390.

47 Komplexní sledování kardiotoxicity onkologické léčby.

Horáček J. M.[1,2], Jebavý L.[1,2], Pudil R.[3], Tichý M.[1], Slováček L.[1,2]
1) Katedra válečného vnitřního lékařství, FVZ UO Hradec Králové
2) II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, FN a LF UK Hradec Králové
3) I. interní klinika, FN a LF UK Hradec Králové

Úvod

Kardiotoxicita onkologické léčby představuje závažný problém, zejména při použití režimů obsahujících antracykliny. Ke sledování kardiotoxicity onkologické léčby byla doporučena řada metod. Kromě standardně používaných metod (echokardiografie, elektrokardiografie) se v poslední době na tomto poli prosazují i biochemické markery srdečního poškození.

Cíl

Sledování akutní a chronické kardiotoxicity antracyklinů pomocí 3 diagnostických metod – biochemických markerů – N-terminálního pro brain natriuretického peptidu (NT-proBNP), kardiálního troponinu T (cTnT); echokardiografie (ECHO) a elektrokardiografie (EKG).

Soubor a metodika

Do studie bylo zařazeno 26 pacientů s akutní leukemií. V souboru bylo 15 mužů a 11 žen s průměrným věkem 46,2±12,4 let. Pacienti byli léčeni 2-6 cykly chemoterapie (CHT) obsahující antracyklinový preparát (idarubicin, daunorubicin nebo mitoxantron). Kardiální vyšetření bylo provedeno vstupně (před CHT), po první CHT (po 1. CHT) – průměrná kumulativní dávka antracyklinů 136,3±28,3 mg/m^2, po poslední CHT (po posl. CHT) – průměrná kumulativní dávka antracyklinů 464,3±117,5 mg/m^2 a s odstupem 6 měsíců po ukončení léčby (1/2 R po CHT).

Tabulka. Abnormální kardiální nálezy při léčbě antracykliny (n=26)

abnormální kardiální nálezy	před CHT	po 1. CHT	po posl. CHT	1/2 R po CHT
elevace NT-proBNP	3 (11,5 %)	23 (88,5 %)	23 (88,5 %)	16 (61,5 %)
pozitivní cTnT	0	0	0	3 (11,5 %)
porucha systol. funkce LK	0	1 (3,8 %)	1 (3,8 %)	2 (7,7 %)
porucha diastol. funkce LK	1 (3,8 %)	5 (19,2 %)	6 (23,1 %)	12 (46,2 %)
prodloužení QTc intervalu	1 (3,8 %)	3 (11,5 %)	7 (26,9 %)	9 (34,6 %)
snížení voltáže QRS	-	3 (11,5 %)	5 (19,2 %)	6 (23,1 %)

Vysvětlivky: elevace NT-proBNP – NT-proBNP nad 100 pg/ml pro muže, nad 150 pg/ml pro ženy, pozitivní cTnT – cTnT nad 0,01 ng/ml, porucha systolické funkce LK – EF pod 55 %, porucha diastolické funkce LK – inverze E/A, DT nad 220 ms, prodloužení QTc intervalu – QTc nad 440 ms, snížení voltáže QRS – snížení úhrnné voltáže QRS komplexu v končetinových svodech o více než 1.0 mV oproti před CHT.

Výsledky

Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce.

Šest měsíců po léčbě koncentrace NT-proBNP korelovaly se systolickou a diastolickou dysfunkcí LK na ECHO – (r=0,514; p<0,01) a (r=0,587; p<0,01). Snížená voltáž QRS na EKG korelovala se systolickou a diastolickou dysfunkcí LK na ECHO (r=0,660; p<0,001) a (r=0,592; p<0,01).

Závěry

Naše výsledky ukazují výskyt akutní a chronické kardiotoxicity antracyklinů. Klinická manifestace kardiotoxicity ve smyslu srdečního selhání se rozvinula u 2 (7,7%) pacientů. U asymptomatických pacientů abnormální kardiální nálezy (elevace NT-proBNP, diastolická dysfunkce LK, prodloužení QTc intervalu) naznačují subklinickou kardiotoxicitu, což představuje riziko pro rozvoj srdečního selhání a maligních komorových arytmií v budoucnosti. Vzhledem k riziku pozdní kardiotoxicity antracyklinů je další kardiologické sledování nezbytné u všech pacientů po prodělané onkologické léčbě obsahující antracykliny.

Práce byla podpořena z výzkumného záměru MO 0FVZ 0000 503.

48 Vliv paclitaxelu na změnu obsahu minerálů ve tkáních při současném příjmu Mg^{2+}.

Wilhelm, Z.[1], Sedláčková M.[2], Pechová, A.[3], Kleinová J.[4]
1) Fyziologický ústav LF MU
2) Ústav histologie a embryologie LF MU
3) VFU, Brno
4) MOÚ Brno

Změny minerálů v séru a jejich zvýšený odpad do moče je často sledovaný u onkologicky nemocných, přičemž se tento stav prohlubuje podáním chemoterapie. Změny bývají vysvětlovány komplexními změnami v organismu, včetně nižší schopností ledvin minerály z primární moči zpětně resorbovat. Výsledkem je nevyvážený stav minerálů v jednotlivých tkáních a tím i výrazné omezení řady metabolických reakcí.

Paclitaxel je cytostatikum k léčbě tumorů vycházejících ze zárodečných buněk či pro léčbu v kombinaci s jiným cytostatikem. Mechanismus účinku na buněčné úrovni spočívá v interakci s mikrotubuly, které stabilizuje a zabraňuje jejich desintegraci, čímž znemožňuje dokončení mitózy. Hořčík jako minerál a nedílná součást ATP může v těchto dějích hrát velmi významnou roli. Studie, které by sledovaly minerální změny v jednotlivých orgánech po chemoterapii jsou ojedinělé.

Cíl

Cílem studie bylo zhodnotit změny minerálů v orgánech po podání paclitaxelu v závislosti na současném podávání solí hořčíku.

Materiál a metodika

Bylo použito celkem 70 samic laboratorního potkana. Polovině zvířat byla k dispozici voda ad libitum s vyšším obsahem hořčíku (Magnesia, Mg^{2+} = 200 mg/l), druhá polovina zvířat dostávala vodu s nízkým obsahem hořčíku (Dobrá voda, Mg^{2+} = 10 mg/l). Odběry biologického materiálu (myokard, kosterní svalovina, slezina, játra, střevo, ledvina, děloha, kost) byly prováděny před podáním paclitaxelu a dále pak 1., 8. a 15. den po intraperitoneálním podání paclitaxelu (3 mg/kg). Kontrolním zvířatům byl místo paclitaxelu injikován fyziologický roztok ve stejném objemu. Analýza vzorků tkání byla provedena plamenovou atomovou absorpční spektrofotometrií.

Výsledky

Změny iontového složení tkání byly nejvýznamnější u kationtu vápníku; den po podání paclitaxelu docházelo k významnému snížení jak u skupiny suplementované hořčíkem, tak i u skupiny bez jeho suplementace u srdce, střeva. V obou sledovaných skupinách se ale významně lišila dynamika změn, kdy u skupiny suplementované hořčíkem byly tyto změny významně méně vyjádřené (srdce, slezina, střevo, kosterní sval i děloha).

Závěr

Ve skupině suplementované solemi Mg^{2+} ve sledovaných tkáních byly pozorovány nižší změny v obsahu minerálů i pomalejší dynamika těchto změn.

Literatura

1. Hildebrand J.: Neurological complications of cancer chemotherapy. Current Opinion in Oncology, 2006; 18(4):321-324.
2. Lipp H-P.: Acute neurotoxicity during oxaliplatin-based chemotherapy – Administration of calcium/magnesium containing infusions. Krankenhauspharmazie; 2005. 26(5):153-159.
3. Senthilnathan P., Padmavathi R., Maresh V.: Stabilization of membrane bound enzyme profiles and lipid peroxidation by Withania Somnifera along with paclitaxel on benzo(a)pyrene induced experimental lung cancer. Molecular & Cellular Biochemistry. 2006; 292(1-2):13-17.
4. Wilhelm Z., Kleinová J., Hegyi P., Sedláčková M.: Magnesium loading test in oncologically ill patients before therapy. Clinical Nutrition, 2001; 20: 12-13.
5. Wilhelm Z., Pechová P., Scheer P., Kleinová J., Roubalíková L.: Serum and tissue concentration of magnesium, calcium, potasssium and sodium in rats. Acta Veterinaria 2005; 74: 183-190.

VI.
Hodnocení efektu onkologické léčby

49 Kvantifikace přínosu časné diagnostiky a chirurgické léčby u preventabilních zhoubných nádorů v České republice.

Žaloudík J., & SVOD NOR
Masarykův onkologický ústav v Brně

Motto:
Nejvíce poučení přináší sám život.
Není průkaznosti bez čísel.

V současné onkologii, tedy na konferencích, kongresech, v odborných publikacích, ovšem i v popularizačních článcích, je věnována pozornost především účinkům nových protinádorových léků. Vytvořil se dojem, že vědecké poznání a pokrok zajišťují v onkologické praxi pouze prospektivní randomizované klinické studie srovnávající za kontrolovaných podmínek postup nebo lék A s postupem či lékem B, případně C. Je-li dosaženo statistické významnosti mezi oběma postupy, kterou určuje mezi jiným velikost zkoumaného souboru, je to pokládáno za důkaz nalezení účinnějšího postupu. Nalezené rozdíly nejsou obvykle nijak dramatické. Je stále více zvykem hodnotit je v kategoriích dočasné léčebné odpovědi, kde většina efektů se projevuje jako částečná odpověď nebo stabilizace nálezu po dobu několika měsíců. Při tvrdším kriteriu hodnocení, tedy v parametru celkové doby přežití, jde zpravidla jen o několik málo procent rozdílu.

Automaticky se však předpokládá, že tento rozdíl či úspěch se objeví při široké aplikaci i mimo kontrolovanou studii v populaci. Nebo se to nepředpokládá, ale obvykle také nezkoumá, protože úspěchu jako by už bylo dosaženo výsledkem studie. Ostatně ani mnohé medicínsky velmi vyspělé země podrobné populační registry jaký funguje v onkologii u nás a který zachycuje léčebný postup i výsledky, nemají a populační analýzy jsou tak pro ně stěží dostupné. Jejich někdy kritický pohled na užitečnost analýz populačních registru a verifikaci výsledků kontrolovaných studií v praxi je tak málo důvěryhodný.

Největší kontrolované studie v onkologii pracují se soubory tisícovými, nezřídka pro průkaz efektu vystačí i soubory o několika stovkách a týkají se přísně selektovaných případů. Efekt v praxi pak může být z řady důvodů jiný. Zdá se však, že onkologická odborná veřejnost, farmaceutické firmy, organizátoři studií, plátci zdravotního pojištění i organizátoři onkologické péče jsou s tímto postupem spokojeni. Odraz nových léků a postupů, zpravidla také ekonomicky nákladnějších, v celkových výsledcích diagnosticko-léčebné onkologické péče a dopad na mortalitu či morbiditu nádorových onemocnění v populaci příliš nikoho nezajímá. Postupně se tak dostáváme do nové etapy trvale neudržitelného rozvoje a pokřivených proporcí mezi cenou, výsledkem a ekvitou.

Mnohem méně pozornosti je věnováno hodnocení přínosu časné diagnostiky a navazující lokální léčby u nádorů zachycených v prvních stádiích. Důvodů je několik. Především téma praxe zavedené diagnostiky a chirurgické léčby připadá mnohým banální, nejde o nic objevného a komerčně podporovaného. Dále ani chirurgové sami často nevědí jak prokázat efekt chirurgické léčby v konkurenci s tak propracovaným metodickým aparátem jakým jsou lékové klinické studie v několika fázích klinického hodnocení. Modifikace operační léčby nádorů také zpravidla nelze z praktických a etických důvodů randomizovat, nelze radikálně neoperovat jen z důvodu zařazení nemocného do klinické studie. Srovnávat výsledky u většiny radikálně operovaných s malou skupinou z nějakých důvodů neoperovaných nelze rovněž, protože individuální upuštění od operace v časnějších stádiích nádorů vždy znamená jiné velmi závažné důvody zdravotního stavu pacienta, polymorbiditu a nesrovnatelnost takového případu se standardním většinovým postupem.

Na druhé straně se laická, a často i odborná veřejnost, mylně domnívá, že relativně úspěšný nový lék či postup znamená změnu dramatickou, která se odrazí ve snížení úmrtnosti na daný typ zhoubného nádoru. Je to nesmírně hluboký omyl či lépe chybná premisa. Aby se vliv léku promítl do mortality na dané onemocnění, muselo by jít o léky či postupy průlomové jako svého času zaznamenala antituberkulotika, antimalarika nebo inzulin. V oněch případech však šlo o nástupy kvalitativně nové léčby, jejíž efekt už nebyl analyzován jen v diskrétních statistických rozdílech, nýbrž byl zřejmý v každé jednotlivé aplikaci a zároveň u drtivé většiny případů populačního hodnocení. V onkologii solidních nádorů se takové situaci jen vzdáleně přibližuje snad jen zavedení kombinované chemoterapie s cytostatiky na bázi platiny u germinativních nádorů varlat a další příklady bychom už hledali obtížně.

Paradoxně méně povšimnuty, odborně i laicky, zůstávají skutečné markantní rozdíly mezi efekty, které přináší běžná klinická praxe, samotná heterogenita nádorových onemocnění, časové souvislosti diagnostiky a léčby a hodnocení celkových dopadů v populačním registru. Tedy okolnosti, které se týkají více organizace a algoritmů péče nebo poměrně málo sofistikovaných léčebných postupů, zpravidla tradičních a poměrně levných. Je těžko říci, zda je to v moderním výkonovém světě permanentně dorážejícího a nákladnějšího pokroku jejich výhoda či nevýhoda.

Do vývoje nových protinádorových léků v celosvětovém měřítku zasáhne Česká republika jenom minimálně nebo spíše vůbec. Budeme prostě dále nové léky a postupy ochotně akceptovat a aplikovat v rozsahu, v němž budeme schopni je zaplatit. *Velkým úkolem pro českomoravskoslezskou onkologii, mnohými ještě nepochopeným a mnohým nepohodlným, je zabývat se disproporcemi mezi výsledkem, cenou, kvalitou a ekvitou jak je lze objektivně sledovat ve velkých registrech. Nikoli z kritického či negujícího úhlu pohledu, nýbrž pro hledání cest ke skutečným proměnám onkologie od paliativní ke kurativní, od málo efektivní k efektivnější, prostě k onkologii celkově úspěšnější a méně zatěžující.*

Mezinárodně se ustálilo dělení přístupů k časné diagnostice nádorů na časný záchyt *(early detection),* jako informované úsilí lékařů či klientů zaměřené na zachycení daného typu nádorů v časných a plně vyléčitelných fázích progrese, a *cancer screening* jako organizované úsilí, obvykle i legislativně zakotvené a s pevnými pravidly hodnocení kvality i výsledku.

V České republice naplňuje mezinárodně obhájitelná kriteria screeningu zatím pouze screening mammární. Na dobré cestě ke kultivaci, lepším pravidlům i měřitelnému efektu se zdá být i časná detekce kolorektálního karcinomu. Možná také karcinomu hrdla děložního, podaří-li se sjednotit různé zainteresované skupiny na rozumných pravidlech. Pro oba programy nesporně existuje kvalitní a hustá síť praktiků i navazujících odborných diagnostiků – gastroenterologů a gynekologů. Časná, byť i náhodná, detekce maligního melanomu je pro viditelnou dostupnost součástí skoro každé odpovědné lékařské práce. Za lze časněji diagnostikovatelné lze pokládat i nádory prostaty a plic. U nádorů prostaty se to zatím v systémové podobě spíše učíme. U nádorů plic jsme podle mého názoru příliš brzy rezignovali konstatováním, že časná diagnostika nádorů plic rentgenovým snímkováním mortalitu nesnižuje a klíčový je pouze boj proti kouření. To jistě je, ale než primární prevence odmítáním kouření a odnaučováním kuřáků zvítězí, zbývá nám ještě pro několik generací prostor také pro sekundární prevenci časným záchytem.

Jakkoli si umíme představit i programy pro časný záchyt také u dalších zhoubných nádorů a v Masarykově onkologickém ústavu je zavádíme v rámci projektu *Preventivní onkologické prohlídky pro každého*, jsou obvykle za preventabilní nádory vhodné pro masovou časnou diagnostiku pokládány *maligní melanom, karcinom prsu, karcinom kolorekta, karcinom hrdla děložního, karcinom prostaty a karcinom plic.* Jejich podíl na celkové nádorové incidenci v České republice a proporci těchto nádorů zachycených v I. stadiu v údajích NOR z posledního datově kompletizovaného roku 2003 ukazuje tabulka 1:

Tab. 1: *Celková incidence a zastoupení I. stádií u šesti preventabilních zhoubných nádorů v České republice (NOR 2003).*

	Abs. incidence 2003	Z toho I. stádií	(v %)
maligní melanom	1695	956	56
karcinom prsu	5820	2004	34
karcinom kolorekta	7874	1341	17
karcinom hrdla děložního	1007	464	46
karcinom prostaty	3728	531	14
karcinom plic	5986	501	8
celkem preventabilních	26	110	
všech zhoubných nádorů	52	102	

Byla-li v roce 2003 incidence zhoubných nádorů v České republice (bez kožních karcinomů C44) 52 102 nových případů, podílí se těchto šest preventabilních nádorů na celkové nádorové incidenci plnou polovinou (50,1%). Každé zvýšení záchytu těchto zhoubných nádorů v prvním stádiu se tak viditelně promítne do celkového snížení mortality na nádorová onemocnění v ČR, neboť první stádia jsou u těchto diagnóz až na výjimky, související spíše s rezervami v diagnostickém stagingu, plně vyléčitelná. Zastoupení prvních stádií odpovídá nejen diagnostické dostupnosti daného typu nádoru, ale také míře informovanosti veřejnosti a kvalitě onkopreventivních programů. U karcinomů plic, prostaty a kolorekta je zatím nízká proporce prvních stádií alarmující. Lepší je tento podíl u ostatních třech diagnóz a může být samozřejmě dále zvyšován. Limitací sekundární prevence je pouze neoslovitelnost a naprostá nespolupráce určité části části obyvatelstva, která patrně nepřesahuje více než 10-20%.

Přesvědčivými kriterii úspěšnosti programu sekundární prevence, tedy časné detekce nebo organizovaného screeningu jsou pouze:

- vzestup proporce prvních stádií,
- následný pokles mortality a
- udržení takového trendu v čase

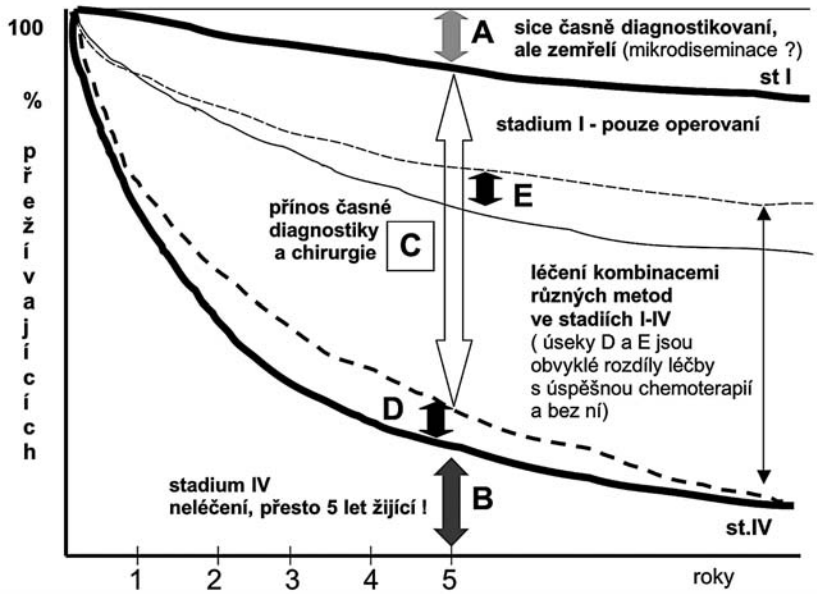
Hodnocení onkopreventivního programu bez těchto konkrétních údajů nemůže být vnímáno důvěryhodně a jinak než účelové, politické, naivní nebo neinformované.

Objevuje se diskuse nakolik může sekundární prevence časnějším záchytem snížit incidenci nádorového onemocnění, což se očekává především od účinné, a dosud prakticky nefungující, prevence primární. Redukce incidence zhoubných nádorů ovšem vyžaduje vstoupit již do preinvazivní fáze vzniku nádorového bujení a diagnostickou možnost tento patologický stav vůbec plošně odhalovat. Z oněch šesti preventabilních diagnóz by snad bylo možno očekávat tento vliv po řadě let úspěšného programu u karcinomů hrdla děložního a kolorekta. Na čípku děložním jsou přesně definované, dobře diagnostikovatelné i terapeuticky řešitelné preinvazivní změny typu cervikální intraepiteiální neoplasie (CIN). Oč více je takových lézí odstraněno v rámci dobře a kontinuálně fungujícího preventivního programu, který postihuje velkou část populace, o to méně bychom pak měli zaznamenat případů invazivních karcinomů. Totéž by mohlo platit pro kolorektum, pokud by celoplošnou metodou byla stratifikační kolonoskopie, odstraňující zároveň i dysplastické polypy a adenomy, tedy nejen zcela benigní polypy hyperplastické. Stěží však reduk-

ce incidence karcinomů screeningem dosáhneme v programu založeném pouze na testu okultního krvácení ve stolici, protože preinvazivní léze krvácejí méně často a indikace ke kolonoskopiím při pozitivitě testu na krvácení se pohybují jen mezi 5-10%.

Teoretická možnost zasáhnout sekundární prevencí do incidence by mohla existovat u maligního melanomu a nádorů prsu. Zde je však problém v rozlišení těchto premaligních lézí. Preinvazivní intradermální névy jsou nezřídka pouhým okem těžko odlišitelné od superficiálních melanomů. Stejně tak mammografická detekce prekanceroz vyhledávat snad jen mikrokalcifikace, které však neprovázejí všechny prekancerozní léze. Navíc je zde riziko vysoké falešné pozitivity, indukované přemíry verifikačních chirurgických výkonů a diskreditace preventivních programů, v nichž by pak cenu za záchyt jedné prekancerózy platilo mnoho jedinců zbytečnými, obtěžujícími, byť malými operačními výkony, případně jen zbytečně masovou psychickou tenzí a nejistotami.

Hodnocení křivek přežití, jak je komfortně z dat populačního registru NOR nabízí software SVOD, poskytuje nejen více či méně překvapivá zjištění stran efektivity léčebných postupů z naší klinické praxe. Nabízí také možnost nových interpretací jako je třeba stanovení podílu léčebných metod na výsledném efektu, rezerv v diagnostice nebo přirozeného průběhu nádorových chorob. Ačkoli lze takový přístup demonstrovat u každé nádorové diagnózy zvlášť, bude lépe tyto dosud nezvyklé interpretace vysvětlit nejprve na schématickém modelu – viz obr. 1



Obr. 1: *Modelové schéma obvyklých proporcí pro celkovou interpretaci analýz přežití v populačním registru*

Legenda k šipkami vyznačeným úsekům či parametr A,B,C,D a E v obr. 1:

A – případy jen zdánlivě I. klinického stádia, které i přes časný záchyt na nádor do 5 let umírají, jde převážně o vysoce agresivní nádory, jejichž iniciální subklinická diseminace zůstala neodhalena

B – specificky neléčené případy pokročilého IV. klinického stadia přežívající i s neléčeným nádorem pět let, jde o pomalu rostoucí nádory dlouhodobě koexistující s organismem

C – přínos samotné chirurgické léčby, rozdíl v křivkách přežití mezi případy I. stadia léčenými pouze chirurgickým odstraněním a případy paliativně léčenými ve IV. stadiu ukazuje hypoteticky maximální možný přínos časné diagnostiky a chirurgické léčby, neboť pokud by tyto nádory nebyly včas odstraněny, progredovaly by v drtivé většině do IV. stadia, pak již léčeného zpravidla paliativní systémovou chemoterapií, úsek c tedy ukazuje rozdíl mezi optimálním časným, zpravidla chirurgickým řešením a řešením pozdním a nejméně výhodným

D – rozdíl v přežití s pokročilým nádorem IV. stadia léčeným a neléčeným protinádorovou chemoterapií

E – rozdíl v přežití s chirurgicky odstraněným nádorem s prokázanými regionálními metastázami s adjuvantní chemoterapií a bez ní, zpravidla II. nebo III. klinické stadium podle typu nádoru, značná část těchto nádorů je již subklinicky diseminovaná a chirurgický výkon má jen podstatný cytoredukční efekt, byť bývá nazýván radikálním, chemoterapie podaná v adjuvantní čili zajišťovací indikaci má rovněž jen omezený účinek

Z modelového schématu obr.1 jasně vyplývá, že v jedné analýze lze zobrazit heterogenitu daného typu nádoru, který nese v morfologické terminologii jeden název, limitace naší diagnostiky pokud jde o detekci subklinické diseminace i pozici souhry časné diagnostiky a chirurgického řešení. Ukazuje také rozdíly mezi případy léčenými systémovou chemoterapií, ať již při prokázaném metastatickém rozsevu nebo v adjuvanci u mikrodiseminace pouze předpokládané.

V analýzách populačního registru pracujeme se soubory tisícovými a desetitisícovými. Nehomogenita případů a multifaktoriálnost nalézaných vztahů jako nevýhoda populačních studií je vyvažována na druhé straně právě těmito vysokými počty ana-

lyzovaných případů. Nejde nám ani tak o exaktní vyčíslení rozdílu jako v randomizovaných studiích, nýbrž o samotný nález rozdílu mezi různě léčenými skupinami a jeho porovnání s rozdíly výsledků podle stádií. Případně může jít o srovnání skupin s vývojem onemocnění extrémně nepříznivým v časném stadiu či překvapivě příznivým ve stadiu pokročilém. Právě toto posledně jmenované srovnání může zároveň identifikovat skupiny, v nichž je vhodné bádat nad rozdíly v genotypu či fenotypu nádorů klasifikačně dosud zdánlivě stejných, fakticky však s vlastnostmi velmi rozdílnými.

V neposlední řadě může být takový vhled do dané onkologické diagnózy velmi instruktivní, přiřadíme-li k těmto konkrétně vyčísleným rozdílům A-E také náklady na léčbu nebo relevantní hodnocení kvality života srovnávaných skupin. Nelze prostě tvrdit, že „evidence-based“ jsou pouze zjištění z kontrolovaných klinických studií, obvykle lékových, protože ty zcela postrádají komplexnost pohledu i kontext s dalšími léčebnými modalitami, včetně vlivu časné diagnostiky a timingu léčby.

Nejúčinnější je totiž stále „léčba nádorů časnou diagnostikou“, pochopitelně s chirurgickým odstraněním nádoru, jakkoli jejich přínos běžně nevídáme kvantifikován právě vysvětleným postupem ve vztahu k celému rozložení situací u daného nádorového onemocnění.

Nepochybně by mohla být tato interpretace analýz přežití z populačního registru pokládána za příliš obecnou a pouze teoretickou a proto je doplněna stručným popisem konkrétních proporcí u šesti uvedených nádorových diagnóz C43, C50, C18-20, C53, C61 a C34. V přednášce na XXXI.BOD ji dokladují také konkrétních grafická zobrazení.

Podle dané nádorové diagnózy jsou jako časná stadia klasifikována buď samotné I klinické stadium (C50, C53, C34) nebo společně I. a II. stadium (C43, C18-20, C61). Samotná lokální léčba je léčebným standardem u rakoviny plic a hrdla děložního jen u I. stadia, u rakoviny prsu je už i v tomto časném stadiu nezřídka zajišťována adjuvancí. Na druhé straně je samotná lokální chirurgická léčba u melanomu, rakoviny prostaty a kolorekta ve většině případů pokládána za dostačující nejen u I. ale také u II. klinického stadia. Tzv. „časnost“ první diagnózy tak v praxi určuje spíše léčebný standard spojený s omezením n lokální léčbu chirurgickou, případně zářením.

Pro analýzu přežití a proporcí podle popsaného schématu byly použity údaje o souborech z let 1995-2003, které již mají vysokou míru spolehlivosti a byly při přenosu dat z NOR do SVOD validovány. Do analyzovaných souborů byli zařazeni jen pacienti a pacientky do věku 70 let.

Součástí popisu situace u jednotlivých diagnóz preventabilních nádorů jsou i stručné charakteristiky epidemiologických trendů v celém registrovaném souboru 1977-2003, počet hodnocených případů v obou analýzách udává hodnota *n*.

Maligní melanom (n = 8 222)

Parametr A zahrnuje přes 20% případů, které do pěti let umírají i ve zdánlivém stadiu I a II. Znamená to, že až v pětině případů je přítomna mikrodiseminace, kterou neumíme identifikovat. Na druhé straně jakkoli je maligní melanom ve IV. stadiu pokládán za zcela fatální onemocnění, přežívá s ním v tomto pokročilém stadiu i bez systémové léčby až 15% nemocných – parametr B. Parametr C čili přínos chirurgické léčby při časné diagnóze u lokalizovaného nádoru činí 65%. Přínos paliativní chemoterapie ve IV stadiu není žádný (D) a přínos adjuvance interferonem ve st. III (E) je v 5-letém hodnocení v populační studii z registru rovněž zcela nezřetelný.

Současné epidemiologické trendy maligního melanomu v ČR (n = 25 840) : Incidence dále příkře stoupá, mortalita ještě neklesá, ale v posledních třech letech se už nezvyšuje. Tento efekt je způsobem významným nárůstem proporce I. stádií. Prudce narůstá také záchyt lézí v preinvazivní fázi melanoma in situ (D03).

Karcinom prsu (n = 27 911)

Pacientek umírajících na nádor do 5 let ve zdánlivém stadiu I (A) je asi 7%, což je zároveň hodnota podílu primárních subklinických diseminací, které jsme neuměli, respektive nemohli nalézt. Plná třetina nemocných ve stadiu IV (B) na druhé straně přežívá 5 let i bez chemoterapie. Přínos samotné chirurgické léčby je zhruba 45-50% (C). Skoro 10% přínosu lze zaznamenat pro paliativní chemoterapii ve stadiu IV (D). Naopak je v populačním registru prakticky neprůkazný jakýkoli přínos chemoadjuvance ve stadiu II (E) byť jde o standardní doporučovaný postup. Byť lze namítnout, že chemoterapií neléčené pacientky (n=4573) mohly mít méně agresivní, více diferencované nádory než chemoterapií léčené (n = 8602), absence jakéhokoli přínosu adjuvantní chemoterapie v naší realitě při srovnání tak velkých souborů přece jen překvapuje a je v rozporu s tradovaným optimismem, opírajícím se o publikované klinické studie. Lépe než polemizovat s tímto nečekaným nálezem v populační registru bude hledat jeho praktické příčiny.

Současné epidemiologické trendy karcinomu prsu v ČR (n = 106 178): Incidence karcinomu prsu dále příkře stoupá, mortalita však několik let stagnovala a nyní se už začíná snižovat. Tento příznivý efekt je zjevně způsoben výrazným růstem podílu I. stádií. Ještě strměji stoupá záchyt preinvazivních karcinomů in situ (D05).

Karcinom hrdla děložního (n = 5 431)

Asi 10% pacientek umírá do 5 let i s diagnózou karcinomu v I. stádiu, tedy nesporně s neodhalenými metastázami a ve skutečnosti nesprávně určeným stádiem. Stejných zhruba 10% případů klasifikovaných jako stadium IV pět let přežívá i bez specifické protinádorové léčby. Rozdíl mezi radikálně operovanými v iniciálním stadiu a konzervativně léčenými případy v pokročilém IV. stadiu činí až 70% a vyjadřuje fakticky přínos časné diagnostiky a chirurgické léčby. Přínos chemoterapie ve stádiích III a IV je naproti tomu menší a činí jen něco mezi 5-10%.

Současné epidemiologické trendy karcinomu hrdla děložního v ČR (n = 29 976):

Incidence v posledním desetiletí pozvolna klesá, mortalita ovšem klesá pomaleji či spíše stagnuje. Podíl prvních stádií také jen stagnuje. Prudký nárůst záchytu preinvazivního in situ karcinomu (D06) z let devadesátých se ovšem v posledních několika letech rovněž zastavil.

Kolorektální karcinom (n = 30 196)

Až 35% nemocných umírá do pěti let i přes deklarovaná časná stadia I a II, omezená jen na stěnu střevní. Jde buď o případy časné a diagnosticky nezachycené mikrodiseminace nebo nedokonalou diagnostiku metastáz, ať již uzlinových nebo orgánových. Z jiných analýz víme, že podíl kolorektálních karcinomu s uzlinovými metastázami (III. stadium, Dukes C) je u nás významně podhodnocen. Dokonalá není v řadě případů ani předoperační detekce drobných jaterních metastáz. Rezervy v přesném stagingu jsou u kolorektálního karcinomu u nás značné. Jen asi 3% nemocných přežívá pět let bez léčby s primárním metastatickým orgánovým postižením ve stadiu IV. Chemoterapie v tomto stádiu zlepšuje pětileté výsledky jen asi o 5%. Významný je efekt chemoadjuvance u operovaných v III. klinickém stadiu (Dukes C), neboť zlepšuje výsledky o 15-20%. Kalkulovaný přínos časné diagnostiky a následné samotné chirurgické léčby činí asi 50%. Výsledky by mohly být zlepšeny zejména dokonalejším stagingem a vlivem adjuvantní chemoterapie v III. stadiu s uzlinovým postižením, neboť odhadem 10-20% případů klasifikovaných stadiem I a II. jsou při podrobnějším vyšetření dostatečného počtu regionálních uzlin ve skutečnosti stadia III a měly by být léčeny následnou zajišťovací chemoterapií. Celkové výsledky však může významněji ovlivnit pouze propracovanější sekundární prevence se záchytem velmi časných a preinvazivních nádorů, včetně odstraňování dysplastických polypů, které zatím unikají jakékoli registraci.

Současné epidemiologické trendy kolorektálního karcinomu v ČR (n = 159 551):

Dlouhodobý trvalý nárůst incidence kolorektálního karcinomu se jakoby zastavuje až rokem 2003 a je dosud předčasné říci, jde-li pouze o meziroční výchylku nebo nástup nového trendu stabilizace nebo dokonce poklesu incidence. Mortalita sleduje podobnou tendenci, nutno však říci, že v předchozích letech nenarůstala tak strmě jako incidence, patrně způsobila úspěšnější léčba, zajisté především bezpečnější operování, poněkud možná i zvýšené používání chemoadjuvance. Na tomto relativně příznivém trendu mortality záchyt karcinomů v časných stádiích projevit příliš nemohl, protože podíl prvních stádií dlouhodobě stagnuje a ve srovnání s počátkem devadesátých let se i poněkud snížil. Nakolik se zvýšené preventivní endoskopické odstraňování dysplastických polypů a adenomů může na těchto trendech projevit zatím nevíme, protože zde chybí podrobnější registrace i analýzy. V tomto případě bychom však mohli očekávat především vliv na incidenci, až sekundárně na mortalitu.

Karcinom prostaty (n = 4 993)

Asi pětina všech nemocných do pěti let umírá i ve stádiích deklarovaných jako lokalizovaná, tedy prvním a druhém. Plná čtvrtina nemocných naopak žije pět let i ve IV. stádiu bez protinádorové léčby. Standardní hormonální terapie ve IV. stadiu nepřináší podle populačního registru v pětiletém žádný prospěch, její relativní 10-15% přínos se vytrácí po třetím roce sledování. U karcinomu prostaty je třeba specificky posuzovat také přínos radikální operační léčby v časných stádiích. S ohledem na pomalý růst většiny těchto nádorů spolu s jejich výskytem ve vyšší věku stojí vedle sebe skoro rovnocenně radikální operace, radioterapie a dokonce pouhé sledování nemocného označované jako *watchful waiting* nebo *watch and wait* přístup. Přestože kontrolované studie z poslední doby prokázaly přínos moderní radikální operativy, neliší se v údajích z našeho populačního registru výsledky léčby chirurgické a ozařováním. Obě metody dosahují jen asi o 5% lepšího výsledku než pouhé sledování bez léčby. Je také nutno vzít v úvahu, že bez léčby zůstávají zpravidla spíše nemocní polymorbidní a v celkově horším zdravotním stavu. Skutečný přínos aktivní léčby karcinomu prostaty v prvních dvou stádiích nemusí být tedy v běžné praxi ani tak významný jaký byl zachycen analýzou registru. U vskutku pomalu rostoucích nádorů nemůžeme zřejmě hodnotit přínos časné diagnostiky a chirurgické léčby rozdílem mezi operovanými v prvním stadiu a nemocnými léčenými až v pokročilém čtvrtém stadiu jako to lze u ostatních nádorů s rychlejší dynamikou progrese. Proto je onen asi padesátiprocentní přínos chirurgické léčby u karcinomu prostaty v praxi iluzorní a platí možná jen pro podskupinu agresivnějších, dediferencovaných a rychleji rostoucích nádorů s výskytem v mladším věku.

Současné epidemiologické trendy karcinomu prostaty v ČR (n = 53 805):

Incidence karcinomu prostaty prudce narůstá. Mortalita roste podstatně mírněji a v posledních letech spíše již stagnuje. Stadia nádorových onemocnění jsou u urologických diagnóz registrována až od první poloviny devadesátých let. Od této doby se podíl časně diagnostikovaných karcinomů prostaty I. stadia významněji nemění a zůstává stále velmi nízký. Poměrně příznivý vývoj mortality i při narůstající incidenci způsobuje nejspíše již diskutovaná nízká dynamika progrese typická pro karcinom prostaty spolu s vyšším průměrný věkem nemocných, z nichž většina pak zmírá na jiné choroby senia.

Bronchogenní karcinom (n = 23 490)

Více než polovina (55%)případů rakoviny plic klasifikovaných jako I. a II. stadium onemocnění umírá do pěti let, což svědčí pro velmi časnou diseminaci a dosud velmi nepřesný diagnostický staging této diagnózy, limitovaný patrně i velmi časným subklinickým šířením. S touto diagnózou ve IV. stadiu nepřežívá prakticky nikdo. Rozdíl pětiletého přežití u radikálně operovaných v I. a II. klinickém stadiu a paliativně léčenými ve IV. stadiu, do něhož i časněji zachycené, avšak neoperované případy poměrně rychle dospějí, činí kolem 40%. Těchto 40% lze zajisté prohlásit za efekt radikální chirurgické léčby, jejímž předpo-

kladem je u tohoto onemocnění více než jinde především včasná diagnostika. Přínos chemoterapie ve stadiích III i IV je zde zcela zanedbatelný a lze ho na úrovni několika procent vysledovat pouze po dvou letech sledování.

Současné epidemiologické trendy bronchogenního karcinomu v ČR (n = 155 719)

Je stále nejisté, zda je nepříznivý stav epidemiologie a rozložení stádií u bronchogenního karcinomu vůbec možno ovlivnit organizovaným časným záchytem, jestliže i počáteční stadia mají tak vysoké riziko diseminace a relapsu. Naěje jsou zde vkládány spíše do prevence primární, tedy především všech forem boje s kouřením, aktivním i pasivním, a to zejména u mladé generace. Incidence bronchogenního karcinomu se nicméně za tři desetiletí při hodnocení obou pohlaví podstatně nemění, poněkud klesá u mužů, stoupá u žen. Mortalita se rovněž nemění, v několika posledních letech poněkud klesá, což je možná vlivem aktivnější a bezpečnější operační léčby i perioperační péče. Podíl I. klinického stadia se totiž nijak nezvyšuje, v druhé polovině devadesátých let dokonce proti předchozímu období poklesl.

K této práci lze namítnout, že uvedené analýzy vůbec nezohledňují efekt radioterapie. Činí tak záměrně, protože efekt radioterapie by měl být analyzován odborným specialitou se zohledněním techniky i dávky. Radioterapie je podobně jako chirurgie lokální metodou léčby, prolíná kombinovanými postupy radikální lokální i paliativní kombinované léčby spolu s chemoterapií u pokročilých stádiích. Systémové progresi pokročilejších fází onemocnění nezabrání. ejí role je podobná jako role chirurgie, obvykle ji nenahradí, často činně doplní, výjimečně přinese srovnatelný efekt jako je tomu například u karcinomu prostaty. Ať. už bychom však volili lokální chirurgickou léčbu, ozařování jako alternativu nebo kombinaci obou, vztah těchto dvou modalit k časné diagnostice, srovnání s výsledky chemoterapie a proporce mezi lokální a systémovou léčbou zůstávají stejné.

Závěrem je třeba zdůraznit, že na stav diagnostiky a léčby onkologických diagnóz je třeba pohlížet vcelku a citlivě vnímat proporce výsledků u jednotlivých léčebných postupů a ve vztahu ke klinickému stadiu nádorového onemocnění. Proto je v práci nabídnut především obecný model a teprve poté jeho konkrétní aplikace u jednotlivých preventabilních onkologických diagnóz. Současná snaha a nutnost zohledňovat v onkologii také ekonomické souvislosti a vztahy mezi náklady a výsledky nemůže být úspěšná půjde-li pouze cestou izolovaných farmakoekonomických analýz. Z analýzy šesti častých onkologických diagnóz takzvaných preventabilních nádorů, které společně představují polovinu všech malignit, jasně vyplývá, že o úspěšnosti léčby dané diagnózy rozhodují především včasnost diagnostiky a chirurgická léčba, z velké části pak také samotná biologie nádorového onemocnění a dosavadní diagnostické limitace rozpoznat subklinickou diseminaci. Rozdíly mezi chemoterapií léčenými a neléčenými případy jsou minimální a dosavadní investice neúměrné výsledkům. Naopak málo výzkumných ambicí i organizační pozornosti je stále věnováno majoritním aspektům sekundární prevence, stagingu, standardizace chirurgických metod a individualizace léčby podle aktuální agresivity nádoru. O medicíně založené na průkaznosti ani analýzách efektivity v onkologii však nebudeme již dále moci hovořit jen únikem do údajů vyčtených z různých zahraničních zdrojů, nýbrž především na základě vhledu do vlastního Národního onkologického registru, tedy databáze vedené od roku 1977 již 30 let a s 1,4 milióny registrovaných případů.

Doporučená literatura

1. Systém po vizualizaci onkologických dat NOR, IBA MU, aktualizace 2003, http://www.svod.cz
2. Novotvary 2003 ČR, Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2006
3. Becker H.D, Hohenberger,W., Junginger, T, Schlag, P.M.: Chirurgická onkologie. (editor českého překladu ed. Duda, M.), Grada Publishing a.s. 2005, 854 s.
4. Žaloudík J., Dušek, L., Mužík, J et al.:Práce s datovými zdroji a výsledky chirurgické a kombinované léčby některých častých zhoubných náorů v České republice v posledních dvou dekádách. Dodatek k českému vydání. In.: Becker H.D, Hohenberger,W., Junginger, T, Schlag, P.M.: Chirurgická onkologie. (editor českého překladu Duda, M.), Grada Publishing a.s. 2005, 823-841
5. Cancer risk assessment. (Ed.P.G.Schields). Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2005, 753 s.
6. Fundamentals of Cancer Prevention, (ed. Alberts, D.S., Hess, L.M.) Springer, Berlin-Heidelberg 2005, 393 s.
7. Bosanquet, N, Sikora, K.: The economics of cancer care. Cambridge University Press 2006, 184 s.

Práce je podpořena výzkumným záměrem MOÚ s názvem Funkční diagnostika zhoubných nádorů podporovaným MZd ČR.

50 Analýza přežití v hodnocení výsledků onkologické péče: možnosti a limity.

Dušek L, Pavlík T., Koptíková J., Mužík J., Gelnarová E., Vyzula R., Žaloudík J.
Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno; Masarykův onkologický ústav, Brno

Shrnutí

Analýza přežití je jednou z nejčastěji používaných statistických metod v onkologii. Přežití je obecně považováno za základní cílový parametr („end-point“) vypovídající o výsledcích léčby a o celkové obtížnosti onkologických onemocnění. Hodnocení různých parametrů přežití dominuje v klinických studiích i v populačních registrech. V tomto příspěvku bychom chtěli částečně připomenout metodiky hodnocení přežití se zvláštním důrazem na analýzu přežití z populačních dat. Z hodnocení různých meto-

dik jednoznačně vyplývá, že analýza přežití má v každé své podobě značné limity a výsledky musí být velmi opatrně používány a interpretovány. Tyto skutečnosti lze stručně shrnout ve dvou hlavních bodech.

1) Přežití je sice velmi podstatným cílovým parametrem klinických hodnocení, není ale parametrem jediným. Pro komplexní hodnocení výsledků a kvality onkologické péče je nutné zapojit i řadu dalších měřítek, které se vztahují k vlastnímu průběhu a výsledku jednotlivých fází léčebné péče, tj. výskyt komplikací, toxicita související s terapií, dodržení léčebných režimů, léčebná odpověď. Pokud by hodnocení kvality a výsledků péče stálo pouze na vyhodnocení celkového přežití, pak by se u řady diagnóz a méně pokročilých stadií onemocnění tato data vztahovala k minulosti, neboť medián přežití často přesahuje 10, 15 i více let. Analýza celkového přežití nadto vyžaduje dlouhodobá data od dostatečně velkého počtu pacientů, takže práci nově založených center nebo center zabývajících se méně častými diagnózami by takto šlo hodnotit jen obtížně.
2) Jsou – li údaje o přežití čerpány z populačních dat, tj. z populačních registrů typu českého Národního onkologického registru, musí být v místních podmínkách interpretovány velmi opatrně. Vždy musí jít o výpočty demograficky standardizované, tedy vztažené na konkrétní populační situaci v hodnocené jednotce. Při takových hodnoceních musíme kalkulovat s chybou populačních dat, omezenou interpretační hodnotou celkového přežití (viz bod 1) i s rozdílnou velikostí hodnocených subpopulací. Z těchto důvodů nelze doporučit využívání populačních odhadů celkového přežití pro vzájemné srovnávání výsledků malých organizačních jednotek, například konkrétních nemocnic. Naopak doporučujeme výpočet tzv. populačních standardů přežití, tedy hodnot získaných z populačních dat pro celou populaci. Tyto demograficky standardizované odhady pak mohou sloužit k sebehodnocení dílčích jednotek, regionů i zdravotnických zařízení, za předpokladu že tyto dodrží metodiku výpočtu na svých vlastních datech.

Standardní hodnocení přežití metodou dle Kaplan-Meiera

Má-li být dokumentace onkologického pacienta úplná, musí obsahovat data o dosaženém přežití. Sledování přežití je i významným cílovým parametrem onkologických klinických studií. Analýza přežití je velkým tématem, jehož ucelený výklad přesahuje možnosti tohoto textu, je zde tedy pouze krátce pojednáno o terminologii a analytických přístupech. Obecně analýza přežití znamená sledování doby přežití vybrané skupiny pacientů v čase, kdy postupně ubývá žijících jedinců. Standardní parametrizace je založena na hodnocení mediánu přežití, který je v přesné definici roven času, kdy přežití dosahuje 50% subjektů hodnocení. Jiným vyjádřením je stanovení podílu subjektů, kteří dosáhli určité doby přežití – nejčastěji je takto v procentech případů hodnoceno pětileté nebo desetileté přežití.

Přežití je parametr, jehož sledování je závislé na čase. Sledování se ale nemusí týkat pouze doby do úmrtí pacienta, je takto možno sledovat dobu do nastání jakéhokoli jevu (zhoršení stavu, relaps, progrese, atd.). Obecně jsou analýzy tohoto typu nazývány „**time-to-event analyses**“, neboť po určitou dobu sledování (tzv. „**follow-up time**“) zaznamenáváme postupně rostoucí počet hodnocených událostí (tzv. „**events**“). Definici významných parametrů hodnocených analýzou přežití v onkologii přináší tabulka 1.

V závislosti na typu onkologické diagnózy a klinickém stadiu onemocnění může ovšem doba sledování nutná pro zachycení většího počtu událostí představovat měsíce až roky, ale může překročit i deset let. Dostáváme se tak do problému s průběžným hodnocením přežití, neboť rozhodneme-li se hodnotit přežití v nějakém konkrétním bodě, nebude čas nastání hodnocené události znám pro všechny zařazené subjekty. V konkrétním čase trvání studie získáváme jednak subjekty, u kterých již událost proběhla a její čas je znám, a subjekty bez události, dále pokračující ve studii. Doba sledování případů bez události je k datu analýzy brána jako cenzorovaná („censored times“, „**censored points**“) a tyto body nemění tvar křivky přežití.

Smyslem analýzy přežití je získat odhad pravděpodobnosti přežití v čase, tedy vyhodnotit podíl přežívajících jako funkci času. Standardní matematickou procedurou odhadu přežití je analýza dle **Kaplan-Meiera**, jejíž výstup v podobě **křivky přežití** je všeobecně znám. Právě metoda Kaplan-Meiera je maximálně věrohodným odhadem funkce přežití cenzorovaných dat a měla by být pro průběžné hodnocení klinických dat používána jako standard. Podrobněji se lze o analýze přežití informovat například v učebnici Altman (1991).

Přežití lze srovnávat u různých experimentálních skupin nebo v rámci jednoho souboru pacientů při třídění na podskupiny. V druhém případě hovoříme o tzv. **stratifikaci souboru** a o **stratifikované analýze přežití.** Parametr dělící soubor pacientů na podskupiny je nazýván stratifikační faktor. Mezi významné stratifikační faktory určující výsledné přežití v onkologii patří zejména:

- věk a pohlaví pacienta
- TNM klasifikace nádoru, klinické stadium,
- markery biologické povahy nádoru (proliferace, apoptóza, angiogeneze, metastatický potenciál), genetické markery
- významné léčebné úkony (např. transplantace kostní dřeně)
- dosažená léčebná odpověď

Parametr	Definice
Celkové přežití (overall survival, OS)	Časový interval mezi datem diagnózy a datem smrtí. Žijící pacienti jsou cenzorováni k datu poslední kontroly. Analýza může být dle okolností omezena pouze na pacienty s určitou příčinou smrti.
Bezpříznakové přežití (disease-free survival, relapse-free survival, DFS)	Časový interval mezi datem dosažení kompletní remise a prvním projevem další aktivity nemoci (relaps) nebo úmrtím. Hodnocení se týká pouze pacientů, kteří dosáhli kompletní remise onemocnění. Pacienti v kompletní remisi, kteří zemřou před projevem aktivity choroby, jsou hodnoceni k datu úmrtí. Smrt ještě před relapsem je v tomto parametru brána jako projevená událost a ovlivňuje profil přežití. Žijící pacienti bez příznaků nemoci jsou cenzorováni k datu poslední kontroly.
Doba do progrese (progression-free interval, time to progression, TTP)	Časový interval mezi datem ukončení konkrétní fáze léčby a datem následné progrese onemocnění. Pacienti, kteří zemřou před projevem progrese jsou cenzorováni k datu úmrtí. Žijící pacienti bez progrese onemocnění jsou cenzorováni k datu poslední kontroly. Při hodnocení TTP nemusí pacient žít zcela bez příznaků choroby, může být například ve stavu stabilizovaného onemocnění. Parametr je často využíván pro hodnocení výsledků léčby pokročilých stádií onemocnění nebo léčby relapsů, kde je následná progrese relativně pravděpodobná.
Interval přežití bez příznaků nemoci (disease free interval, DFI)	Časový interval mezi dosažením kompletní remise a relapsem. Týká se pouze pacientů v kompletní remisi. Pacienti, kteří zemřou před projevem relapsu jsou cenzorováni k datu úmrtí. Žijící pacienti bez příznaků nemoci jsou cenzorováni k datu poslední kontroly.
Jakýkoli „time-to-event“ interval (event-free survival, EFS)	Protokolárně specifické parametry přežití, které definují různé události („events“) ve vývoji pacienta. Při definici je třeba dbát na způsob zařazení pacientů zemřelých bez projevu této události, při zařazení smrti jako platné události půjde o hodnocení přežití (EFS), při cenzorování smrti půjde o hodnocení časového intervalu k dané události.
Sumarizované časové intervaly	
Doba trvání kompletní remise	Časový interval mezi dosažením kompletní remise a projevem aktivity nemoci (relaps). Tato charakteristika je vyhodnocována pouze pro pacienty, kteří po určité léčebné fázi dosáhli kompletní remise. V případě celkového hodnocení pacienta, který prošel více fázemi léčby, je možné hodnotit sumární dobu setrvání v kompletní remisi.
Doba trvání odpovědi	Stejný parametr jako doba trvání kompletní remise, je pouze definičně rozšířen na pacienty s kompletní i částečnou remisí onemocnění.
Výše uvedené definice obsahují jako vstup pro výpočet buď datum diagnózy, datum ukončení určité fáze léčby nebo datum dosažení kompletní remise. Různé typy parametrů přežití takto pokrývají různé etapy možného vývoje pacienta. Při hodnocení přežití v rámci klinické studie je stav pacienta na vstupu i typ analýzy dán protokolem a jako vstupní bod je vždy bráno datum randomizace pacienta (u randomizovaných studií) nebo obecněji datum zařazení pacienta do studie.	

Tabulka 1. Základní typy parametrů hodnocených analýzou přežití v onkologii

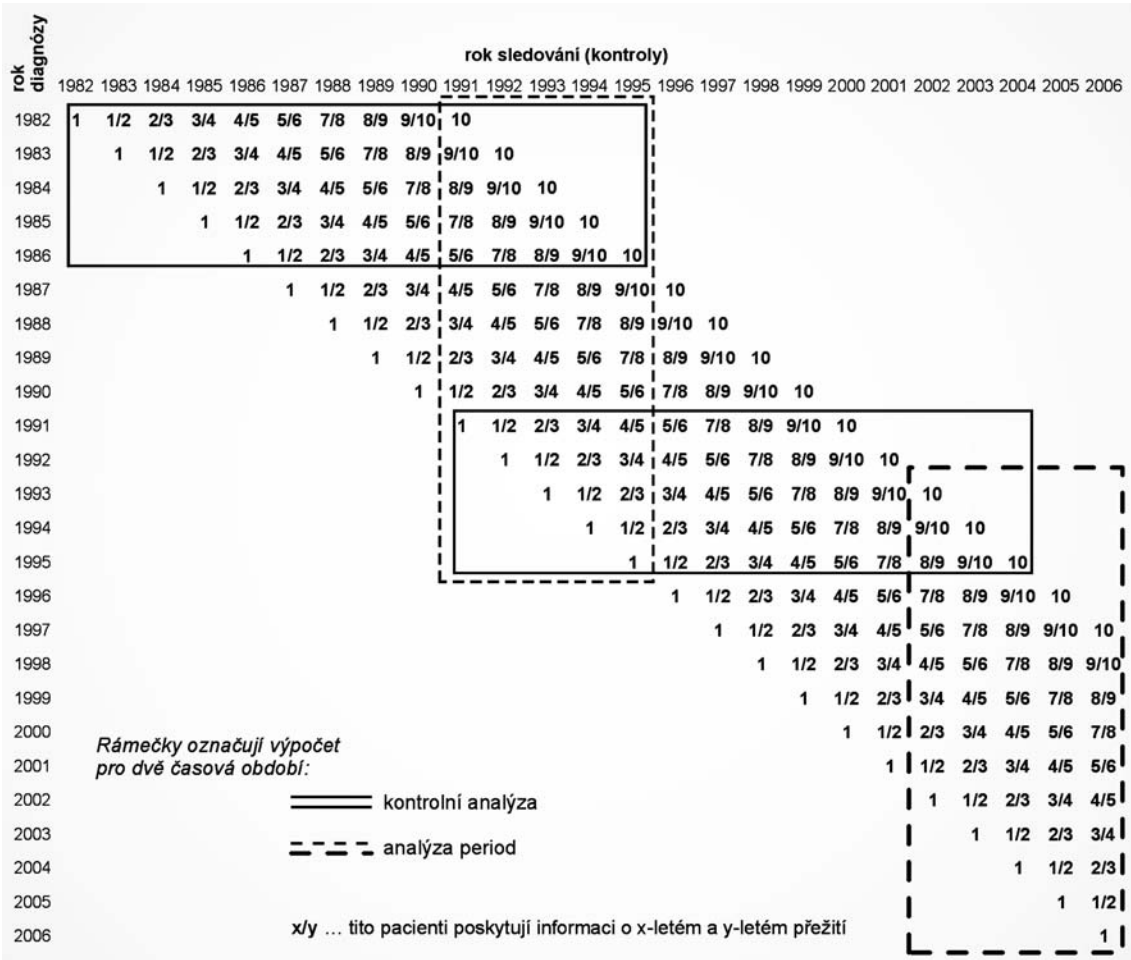
Hodnocení přežití onkologických pacientů z populačních dat

Předchozí odstavce byly věnovány popisu metodiky hodnocení přežití s typickým výstupem v podobě křivky přežití. Tato metodika je vhodná především pro srovnávací analýzy přežití v klinických experimentech, kde umíme garantovat plnou srovnatelnost skupin. To z hlediska analýzy přežití znamená srovnatelnost:

- charakteristik hodnocených pacientů
- velikosti srovnávaných souborů
- doby sledování
- počtu (podílu) tzv. cenzorovaných bodů

Metodiku dle Kaplan-Meiera lze aplikovat i na populační data, tedy na údaje o přežití pacientů z populačních (národních) registrů. Tyto výstupy však generují obraz přežití, který má následující interpretační problémy:

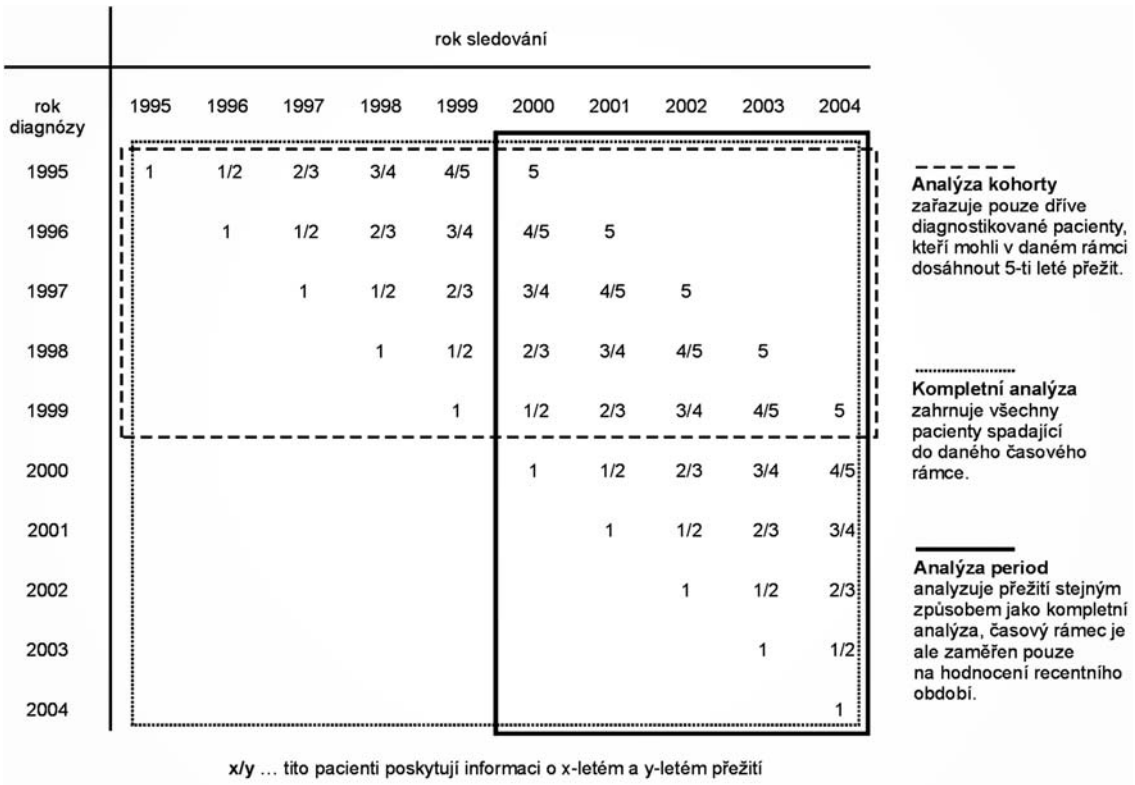
1. Jde o popis přežití dosahovaného v dané skupině pacientů, odhad je ale ovlivňovaný velikostí skupiny a dobou, po kterou je skupina sledována. Tento „časový rámec“ určuje, do jaké míry bude odhad celkového přežití smysluplný. Málo četné diagnózy často nemohou být v některých skupinách hodnoceny z důvodu malého počtu záznamů. Velkým problémem je především srovnání přežití dvou skupin pacientů různé velikosti a různé doby sledování.
2. Obraz přežití měřený na srovnávaných subpopulacích pacientů nesouvisí pouze s léčbou, ale je určován řadou dalších faktorů, například věkem pacientů. Vzájemná srovnatelnost souborů je tak ovlivňována charakteristikami pacientů, které se nemusí nutně vzájemně shodovat. Přímočaré srovnávání křivek přežití může být bez populační standardizace velmi zavádějící.
3. Celkové přežití patří mezi parametry, které označujeme za tzv. „integrující“. Tím je řečeno, že odráží různorodé vlivy, které nesouvisí jen s kvalitou léčebné péče. Zvláště u časných stadií řady diagnóz dosahuje medián přežití mnoha let a vztahuje se tak k pacientům, kteří byli léčeni podle jiných pravidel než v současnosti. Tento fakt může ovlivnit interpretaci dlouhodobých trendů.



Obr. 1. Metodické schéma hodnocení 10-ti letého přežití kohortní analýzou a analýzou period

Z výše uvedeného vyplývá, že pro analýzu přežití z populačních dat potřebujeme více robustní metodiku než přímočaré odhady mediánu přežití. Takové analýzy lze provádět v předem plánovaných klinických studiích, kde je zaručena srovnatelnost vzorků, u populačních dat se musíme bohužel potýkat s výrazně větší heterogenitou. Vliv náhodných časových fluktuací částečně řeší **odhady x-letého přežití** (typicky 5-, 10-, 20-letého). Výstup je uváděn v procentech pacientů, kteří dosáhli hranice x-letého přežití. Následující odstavce definují metody vhodné pro tyto populační odhady.

1. Podíl pacientů dožívajících se určité doby přežití se označuje jako odhad **absolutního x-letého přežití**. Potřebnou populační standardizaci zavádí vážení těchto odhadů v hodnocené subpopulaci (kohortě) v relaci ke stavu celkové populace, tedy výpočet tzv. **relativního x-letého přežití**. Výpočet vztahuje x-leté přežití ve vybrané skupině pacientů k přežití dosahovanému v tom samém období v normální populaci, která odpovídá skupině pacientů věkem i poměrem pohlaví (tzv. „**matched population**“). Ke konkrétnímu výpočtu lze doporučit metodu dle Hakulinena a výsledný odhad relativního přežití dále doplnit ukazatelem variability. Relativní přežití je tedy populačně váženým odhadem přežití dané kohorty pacientů.
2. Běžnou metodou výpočtu x-letého absolutního nebo relativního přežití je tzv. **kohortní analýza**. Pojem se vztahuje ke způsobu, kterým analýza vymezuje kohortu pacientů pro odhad x-letého přežití. Například 5ti-leté přežití hodnocené pro období 2000-2002 je odhadováno z dat sledování pacientů diagnostikovaných zpětně v letech 1995 – 1997. Analyzovaná kohorta pacientů je tedy definována retrospektivně dle data diagnózy a vrací tak výstupy analýzy zpět, což je zvláště patrné u 10ti a více letého přežití (Obrázek 1 a 2). Výstup metody tak ne zcela dostatečně reaguje na změny v čase, např. v důsledku vývoje diagnostiky nebo léčebných možností.



Obr. 2. Metodické schéma hodnocení 5-ti letého přežití na příkladu období 1995-2004

3. Řešením více reagujícím na časově aktuálnější data může být nedávno validovaná **analýza časových period** („period analysis“) (Brenner a kol, 1996). Zatímco kohortní analýza kalkuluje x-leté přežití na kohortě pacientů diagnostikovaných x let zpětně, analýza period naopak započítává data pouze ze sledování v daném recentním období, tedy včetně posledního roku, ke kterému je přežití kalkulováno. Pro pacienty diagnostikované v roce 2000-2002 je možné odhadnout přežití 1 rok po diagnóze, pacienti z let 1998-2000 přispívají k posouzení přežití 2 roky od diagnózy atd. (Obrázek 1 2). Tato metoda může pomoci u dat, kde se přežití významně mění v důsledku vývoje diagnosticko-léčebných postupů.
4. Kompromisem mezi poněkud extrémními přístupy kohortní analýzy a analýzy period je tzv. **kompletní analýza**. Časový rámec pro výpočet zahrnuje všechny diagnostikované roky včetně těch recentních, kompletní analýza se tedy z tohoto pohledu chová podobně jako analýza period. Na rozdíl od ní, ale neomezuje časový rámec „zleva“ a zahrnuje i data z průběžného sledování dříve diagnostikovaných pacientů (Obrázek 1 a 2). Jelikož tento postup nevrací časový rámec striktně x let zpět

a zároveň zahrnuje i výsledky recentních sledování, bývá v literatuře často označován za objektivnější a přesnější než jiné postupy.

V otázce hodnocení přežití na základě populačních dat tedy není metodických pochyb. Standardní metodika dle Kaplana a Meiera může být aplikována pouze pro srovnávání přežití skupin pacientů pouze jsou-li tyto skupiny přibližně stejně velké a jsou-li sledovány po přibližně stejnou dobu. Jakmile mají být výsledky populačně zobecněny, je nezbytný odhad absolutního a relativního x-letého přežití. Odhad relativního přežití je již sám o sobě populačně standardizován a ukazuje, zda u dané skupiny pacientů nedochází ke zvýšené mortalitě oproti celkové populaci.

Rozvaha nad interpretací referenčního hodnocení přežití z různých zdravotnických zařízení

Hodnocení přežití je v současnosti diskutováno jako nástroj hodnocení výsledků a kvality péče v různých zdravotnických zařízeních. Dle výše uvedeného rozboru je možné doporučit tzv. kompletní analýzu relativního přežití a tzv. analýzu period, která umožňuje výpočet i se zapojením aktuálních dat daného kalendářního roku. Ani tyto postupy ale nejsou paušálně použitelné a mají řadu interpretačních omezení:

- Na úrovni jednotlivých nemocnic musíme přežití analyzovat vždy v rámci diagnostických skupin zhoubných nádorů. V literatuře je sice využívána i analýza onkologických pacientů jako celku, ta však slouží k pouze popisu populační zátěže demografických skupin. U nemocnic by takový přístup vedl k nekontrolovatelnému zkreslení v důsledku různé zátěže různými diagnózami.
- Charakteristiky pacientů, kteří ve vybraném zdravotnickém zařízení vstupují do referenčního srovnávání, vytvářejí tzv. „**case-mix**“. Tyto parametry musí být prověřeny, aby nedošlo k zkreslení v důsledku nereprezentativního výskytu nějakého faktoru. Jednak je nutné se přesvědčit zda kohorta pacientů odpovídá v základních charakteristikách referenčnímu souboru a dále musí být prověřen vliv jednotlivých charakteristik na přežití.
- Dalším problémem analýz uvnitř nemocnic je interpretace změn v přežití v posledních letech. Tyto změny mohou představovat fluktuace v důsledku měnícího se spektra přicházejících pacientů, mohou ale také odrážet významný kvalitativní vývoj. To se týká především zlepšování diagnostických možností vedoucí k výraznějšímu záchytu časných stadií zhoubných nádorů. Ačkoli jde o pozitivní trend, může tímto docházet ke zkreslení informací o přežití již diagnostikovaných pacientů. Dokonalejší diagnostika může ke zkreslení přispět jednak dřívějším záchytem onemocnění, aniž by se tím fakticky prodloužilo skutečné přežití pacientů, dále selektivním záchytem pomalu rostoucích nebo skrytých a nebolestivých zhoubných nádorů, které by jinak nebyly vůbec zachyceny. V literatuře jsou tyto jevy popisovány jako „led-time bias“, „length-time bias“ a „overdiagnosis bias“.
- Hodnocení relativního přežití může u některých méně nebezpečných diagnóz vést i k hodnotám > 100%, například jako důsledek zvýšené lékařské péče. Onkologičtí pacienti dále mohou vést zdravější život a přirozeně u kohort pacientů z jednotlivých nemocnic nelze vyloučit ani vliv malých čísel. Tento jev bývá ovlivňován i způsobem diagnostiky, protože ne všechny diagnostické techniky rovnoměrně zasahují celou populaci. Především záchyt malignit ve screeningových programech může být kumulován v uvědomělejší, sociálně lépe situované části populace, která se do preventivních programů více zapojuje a obecně má nižší mortalitu než celková populace.
- Populační referenční hodnoty přežití mohou být dále zkresleny i faktory souvisejícími s biologií nádorů. Proliferační schopnosti, metastatický potenciál, chemorezistence, genetická konstituce nádoru – všechny tyto faktory hrají při hodnocení konkrétních zdravotnických zařízení větší roli než na populační úrovni a se zmenšující se velikostí vzorku jejich vliv ještě narůstá. Tedy i při práci s velmi korektně nastaveným referenčním standardem, může být rozdíl v přežití určité skupiny pacientů ovlivněn rozdělením těchto prognosticky významných parametrů.

Literatura

1. Altman, D.G. (1991) Practical Statistics for Medical Research. 611p., Chapman and Hall, London.
2. Brenner H., Gefeller O. (1996) An alternative approach to monitoring cancer patient survival. Cancer, 78, 2001-2004.
3. Dušek L., Žaloudík J. (Eds.). Hodnocení zdravotnických technologií v onkologii. Klinická onkologie 17 – Supplement 2004, 104 s. ISSN 0862 – 495 X.
4. Hakulinen T., Abeywickrama K.H.(1985) A computer program package for relative survival analysis. Comput. Programs Biomed.,19, 197 – 207.

Metodika analýzy populačních onkologických dat je vyvíjena v rámci projektu SVOD podporovaného ministerstvem zdravotnictví ČR.

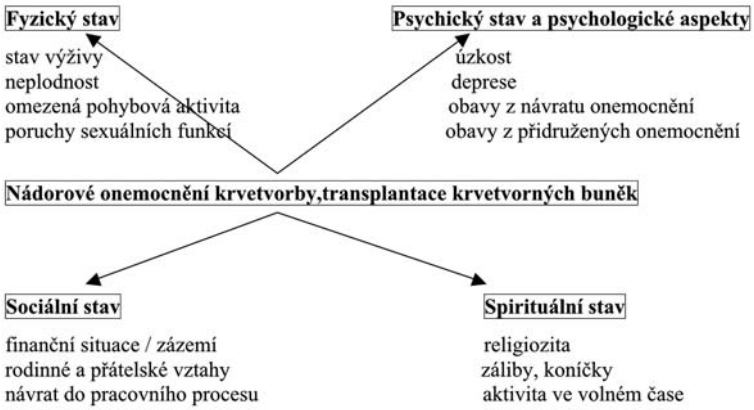
Práce je dále podpořena výzkumným záměrem MOÚ s názvem Funkční diagnostika zhoubných nádorů podporovaným MZd ČR.

51 Kvalita života onkologických nemocných: vybrané koncepční modely, možnosti hodnocení.

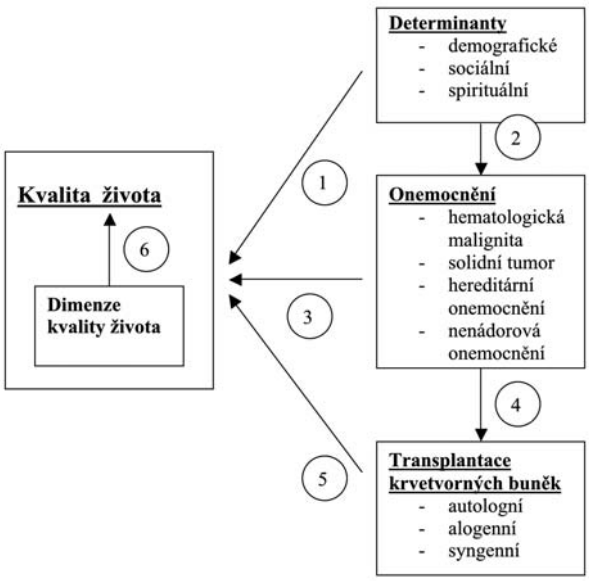
Slováček L.[1,2], Slováčková B.[3], Jebavý L.[1,2], Blažek M.[2]
1) Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové
2) II. interní klinika – Oddělení klinické hematologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové
3) Psychiatrická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK, Hradec Králové

Kvalita života nemocného (QoL) je subjektivní veličinou, kterou lze obecně definovat jako „subjektivní posouzení vlastní životní situace“. Subjektivní posouzení vlastního zdravotního stavu je označováno jako **kvalita života ve vztahu ke zdraví** (HRQoL). Definice kvality života nemocného vychází z koncepčního modelu kvality života, který je dán 4 dimenzemi plnohodnotného života jedince: 1. fyzický stav, 2. psychický stav a psychologické aspekty, 3. sociální stav, 4. spirituální aspekty (viz. obrázek 1-4).

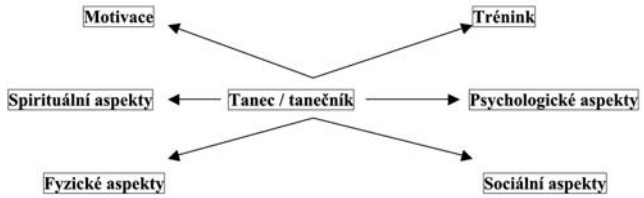
Obrázek 1.
Zdravotní a funkční stav nemocného jako subjektivní a objektivní komponenty kvality života.



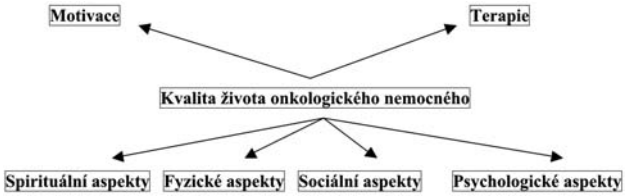
Obrázek 2.
Koncepční model kvality života nemocných po transplantaci krvetvorných buněk.



Obrázek 3.
Koncepční model kvality života nemocných po transplantaci krvetvorných buněk.



Obrázek 4.
Kvalita života onkologického nemocného aneb tanec.



Obrázek 5.
Koncepční model kvality života onkologického nemocného.

Na kvalitu života je nahlíženo jako na **vícerozměrnou veličinu** zahrnující nejen pocit fyzického zdraví a nepřítomnost symptomů onemocnění či léčby, ale v globálním pohledu též psychickou kondici, společenské uplatnění, náboženské a ekonomické aspekty apod. (viz. tabulka 1).

Faktor	Charakteristika veličiny
Fyzická kondice	Do značné míry určována výskytem různých symptomů onemocnění s event. i nežádoucími účinky aplikované terapie.
Funkční zdatnost	Zahrnuje především stav tělesné aktivity (Performace Status). Jeho posouzení je zpravidla prováděno podle stupnice Světové zdravotnické organizace (dále jen WHO) nebo stupnice navržené Karnofskym. Dále se jedná o schopnost komunikace s rodinou, se spolupracovníky, schopnost uplatnění v zaměstnání, v rodinném životě, apod.
Psychický stav	Hodnocen zejména dle převládající nálady, postoje k životu a nemoci, způsoby vyrovnání se s nemocí a léčbou, dále pak osobnostní charakteristiky, prožívání bolesti, apod.
Spokojenost s léčbou	Jde především o komplexní posouzení prostředí, ve kterém je nemocný léčen, dále pak technickou zručnost ošetřujícího personálu při provádění diagnostických a léčebných výkonů, sdílnost personálu, způsob komunikace s nemocným včetně podávání objektivních informací o zdravotním stavu nemocného.
Sociální stav	Hodnocen na základě údajů o vztazích nemocného k blízkým lidem, o jeho roli ve společenských skupinách, o jeho způsobech komunikace s lidmi, apod

Tabulka 1. Faktory ovlivňující kvalitu života nemocného.

Sociální stav Hodnocen na základě údajů o vztazích nemocného k blízkým lidem, o jeho roli ve společenských skupinách, o jeho způsobech komunikace s lidmi, apod.

Dalšími faktory ovlivňujícími kvalitu života jsou věk, pohlaví, polymorbidita, rodinná situace, preferované hodnoty, ekonomická situace, vzdělání, religiozita, kulturní zázemí, apod. Celková (globální) kvalita života je pak souhrnem výše uvedených faktorů.

Nástroji k měření kvality života nemocných jsou dotazníky kvality života, které hodnotí dopad nemoci a její léčby na běžný život pacienta. Základní oblasti vytvářející či ovlivňující kvalitu života jsou uvedeny v tabulce 2.

1. Fyzikální funkce – mobilita, soběstačnost, zrak, sluch, kontinence.
2. Emocionalita – deprese, lítostivost, pocit strachu, apod.
3. Sociální funkce – vztahy v rodině, její podpora, vztahy k okolí, náplň volného času.
4. Práce, domácí práce, nakupování, apod.
5. Bolest.
6. Spánek a jeho kvalita.
7. Příznaky specifické pro dané onemocnění.

Tabulka 2. Okruhy vyšetřované v dotaznících kvality života nemocných.

Dotazníky kvality života lze rozdělit na generické (obecné) a specifické (specifické pro dané onemocnění nebo specifický aspekt kvality života). Generické dotazníky hodnotí všeobecně celkový stav nemocného bez ohledu na konkrétní onemocnění, jsou široce použitelné u jakékoliv skupiny populace, bez ohledu na pohlaví, věk, apod. Specifické dotazníky jsou vytvořeny pro jednotlivé typy onemocnění nebo pro specifický aspekt kvality života.

V klinické medicínské praxi je běžné posuzovat zdravotní stav pacienta a úspěšnost léčby pouze v jedné medicínské rovině, nejčastěji pomocí somatických, laboratorních a zobrazovacích markerů. Trendem moderní medicíny, zjm. pak v klinické onkologii a hematoonkologii, je posuzovat stav pacienta komplexněji, za pomoci i dalších aspektů. Více dimenzionální měřítko k posouzení celé řady životních aspektů představuje kvalita života. Různé aspekty mohou být v různé fázi onemocnění a léčby rozdílně zasaženy. A právě tyto informace obohacují naše poznání o potřebách pacienta a mohou tak významně přispět ke zkvalitnění péče. Také nám mohou odhalit mechanismy, které modifikují vznik a průběh onemocnění.

Literatura:

1. Barton-Burke, M.: Fatigue and Quality of Life – A Question of Balance. In. King, C. R., Hinds, P. S.: Quality of Life from Nursing nad Pateint Perspectives – Theory – Research – Practice., Jones and Bartlett Publishers, 2nd Edition, 2003, 345-78
2. Ferrans, C.: Quality of Life Index – Cancer Version. In. King, C. R., Hinds, P. S.: Quality of Life from Nursing nad Pateint Perspectives – Theory – Research – Practice., Jones and Bartlett Publishers, 2nd Edition, 2003, 451-4
3. Kolářová, R.: Kvalita života z pohledu klinických studií. In.: Vodvářka, P. a kol.: Podpůrná léčba v onkologii 2003: podpora výživy, léčba komplikací chemoterapie, bolest, kvalita života, genetika. Praha, Galén, 2004, 183-9
4. Křivohlavý, J.: Psychologie nemoci. Praha, Grada, 2002, 162-83
5. Slovacek, L., Slovackova, B., Jebavy, L.: Global quality of life in patients who have undergone haematopoietic stem cell transplantation: a transversal and retrospective study. Exp Oncol 2005, Sept. 27 (3): 238-242.

52 Sexualita jako jeden z aspektů ošetřovatelské péče u nemocných s onkologickým onemocněním.

Burkertová H.
Katedra ošetřovatelství, Zdravotně sociální fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

Sexuální zdraví je důležitou součástí života každého člověka, sexualita je základní lidskou potřebou. Diagnóza každého onkologického onemocnění a jeho léčba mohou mít významný potencionální dopad na sexualitu pacientů s onkologickým onemocněním. Ignorování tohoto dopadu je stejné jako bychom přehlíželi jiné vedlejší účinky protinádorové léčby např. nauzeu, zvracení nebo únavu. Sestra by měla být schopna vhodnou formou při zachování určitých pravidel provádět edukaci u pacientů i v oblasti sexuality, např. jaké komplikace může očekávat v souvislosti s určitou protinádorou léčbou (chemoterapií, radioterapií, hormonální léčbou, chirurgickou léčbou).

Klíčové sexuální problémy vyvolané protinádorovou léčbou: změny tělesného vzhledu, snížení sexuální touhy, méně výrazné zvlhčování pochvy, zmenšení velikosti pochvy, ztráta pohlavních funkcí, bolestivý pohlavní styk, potíže s dosažením vyvrcholení, poruchy nebo vymizení menstruačního cyklu, riziko neplodnosti.

Ošetřovatelská diagnostika (NANDA – International, taxonomie II.)

Ošetřovatelským diagnózám, které jsou standardním pojmenováním ošetřovatelských problémů ve schopnosti zapojovat se do sexuálních aktivit je určena třída Sexuální funkce, ošetřovatelským diagnózám, které jsou standardním pojmenováním ošetřovatelských problémů v oblasti lidské reprodukce je určena třída Reprodukce.

Do třídy Sexuální funkce spadají diagnózy Sexuální dysfunkce – 00059 a Neefektivní sexuální život – 00065. Při stanovení ošetřovatelské diagnózy Sexuální dysfunkce by sestra měla zaměřit na zjištění, zda se u klienta nevyskytuje alespoň jeden z následujících znaků – změna v sexuálním zájmu o sebe, konflikt komplikujících se hodnot, neschopnost dosáhnout žádoucího uspokojení, verbalizace problému, změna ve vztahu s blízkou osobou, změna v dosahování sexuálního uspokojení, současná nebo dřívější omezení navozená nemocí nebo terapií, dožadování se potvrzení o žádoucnosti, změna v plnění dřívější sexuální role. Neefektivní sexuální život je standardizovaný název ošetřovatelského problému člověka, který vyjadřuje starost o svoji sexualitu (pohlavní, sexuální život).

Proč některé sestry váhají začlenit problematiku sexuality jako součást holistické péče?
Co by měla sestra vědět před tím než začne (otevře) diskusi na téma sexualita?
Jaké dovednosti by měla mít sestra pro zahájení rozhovoru týkající se vlivu nemoci a její léčby na sexualitu pacienta/tky?

Modely hodnocení (ALARM, BETTER) a model intervencí v oblasti sexuality (PLISSIT)

Literatura

1. Annon, J.S. (1976) The PLISSIT Model: a proposed conceptual scheme for the behavioural treatment of sexual problems. *Journal of Sex Education Therapy*. 2, 2, 1-15, cited in Cartwright-Alcarese, F. Addressing sexual function following radiation therapy for a gynaecological malignancy. Oncology Nursing Forum. 1995; 22, 8, 1227-1232.
2. Gates, RA et al. *Oncology nursing secrets: Questions and answers about caring for patients with cancer.* Philadelphia: Hanley and Belfus, INC, 2001. 608 p. ISBN 1-56053-477-X.
3. Mature Sexuality Clinical Proceedings – Communicating About Sexua lity [on line] [cit 2007-27-1] Dostupné z < http://www.arhp.org/healthcareproviders/cme/onlinecme/maturecmecp /communicating.cfm?ID=37 >.
4. Krebs L. What should I say? Talking with patients about sexuality issues. *Clin J Oncol Nurs*. 2006;10:212-215
5. Katz, A. The Sounds of Silence: Sexuality Information for Cancer Patients [on line] [cit 2007-27-1] Dostupné z < http://www.jco.org/cgi/content/full/23/1/238?etoc*p*>.
6. Marečková, J. *Ošetřovatelské diagnózy v* NANDA *doménách.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2006. 264 s. ISBN 80-247-2399-3.
7. Vodvářka P. *Poznámky k* bio-psycho-sociální *problematice onkologie*. 1. vyd. Ostrava: Repronis, 1997. 169 s. ISBN 80-7042-314-5.
8. Tschuschke V.: *Psychoonkologie – Psychologické aspekty vzniku a zvládnutí rakoviny*. Praha: Portál, 2004. 1. vyd. 216 s. ISBN 80-7178-826-0

53 Pohlavní život žen po léčbě maligních onemocnění malé pánve a prsu.

Müllerová J., Neumanová R., Nováková R., Knéslová A., Beňová V., Farná K.
Fakultní nemocnice, Porodnice, Obilní trh, Brno

V současnosti se na pohlavní život pohlíží jako na něco, co se týká spíše mladých, zdravých jedinců. Sexuální přitažlivost je posuzována na základě fyzické krásy, bez ohledu na duševní kvality člověka a jeho vyzrálost.

Jestliže pak tento člověk prodělá léčbu nádorového onemocnění, jeho sebeúcta výrazně utrpí.

V prvních chvílích, po zjištění onkologické diagnózy přemýšlí pacient o tom, jaké jsou jeho šance na přežití, jak rychle může být vyléčen a kdy a do jaké míry se může vrátit ke svému osobnímu a pracovnímu životu. Otázkou pohlavního života se dříve nebo později začne zabývat většina pacientek.

Krátký pohovor o pohlavním životě a jeho ovlivnění léčbou by proto měl být součástí léčby každé pacientky. To však bývá často opomíjeno a to nejen z důvodů časových, ale svou roli zde hraje i určitý stud a pocit, že se aktuálně jedná o podřadné záležitosti.

Vedlejší účinky ozařování malé pánve mohou mít vliv na celkový stav pacientky.

Při radikálním ozáření pánevní oblasti dojde u premenopauzální pacientky k radiační kastraci a umělé menopauze, která je doprovázena náhlými změnami charakteru, návaly horka, pocením, suchostí poševních sliznic, svěděním a psychickou nestabilitou.

Pokud byla žena před ozařováním již po menopauze, nemusí na sobě pozorovat téměř žádné změny, protože její vaječníky přestaly produkovat hormony již dříve.

Ozařování pánevní oblasti, zejména zevních rodidel a pochvy má nesporný vliv na stav tkání a především sliznic pohlavních orgánů. Poševní sliznice mohou zarudnout, prosáknout a žena může cítit pohlavní styk i delší dobu po skončení radioterapie jako nepříjemný. Ženy si též mohou po pohlavním styku všimnout mírného krvácení, ačkoliv během styku necítily žádnou bolest. Při odeznívání akutní postradiační reakce může docházet k jizvení tkání. Stěny pochvy tak mohou zvazivovatět a stát se rigidními.

Tato případná postradiační fibrotizace může vést ke zúžení vagíny či tvorbě sinechií, což u některých žen může vyústit až k znemožnění pohlavního styku. Pochva ztrácí svoji elastičnost a snižuje se sekrece poševních žlázek zodpovědných za zvlhčení sliznice během pohlavního styku.

Z toho vyplývá, že vedlejší účinky radioterapie mohou při nedostatečné prevenci výrazně omezit až znemožnit pohlavní život ženy v budoucnosti. Naší snahou je těmto problémům předcházet a proto je kladen důraz na potřebu základního poučení pacientky a nformovanost zdravotnického personálu.

Jedním ze způsobů jak může žena nežádoucím účinkům předejít je udržování pravidelného pohlavního styku. Ženy, které nemají sexuálního partnera mají možnost využít poševní dilatátor.

Další pomůcky, jako jsou lubrikační gely a kondomy jsou doporučovány zejména po odeznění akutní reakce, kdy je sliznice náchylnější k mechanickému podráždění a tím ke vzniku infekce, která by mohla zkomplikovat další průběh hojení.

Pohlavní styk v průběhu léčby ozařováním není běžně doporučován a žena by ho měla eventuelně konzultovat se svým ošetřujícím lékařem. Po ukončeném ozařování není pohlavní styk v současnosti již zakazován, ale naopak při dodržování zásad hygieny a při ohledu na celkový stav pacientky spíše doporučován.

Ženy se často obávají přenosu onemocnění na partnera a rizika vzniku recidivy způsobené mechanickým drážděním. V tomto případě je poučení a vysvětlení patřičných souvislostí lékařem zcela nezbytná.

Rovněž zjištění nádorového onemocnění prsu představuje pro ženu šok. V naší kultuře má prs velký význam pro tělesný obraz, sebeúctu, a sexuální symboliku. Jeho operace nebo případná amputace vyvolá pocit sexuální méněcennosti, neatraktivnosti, deprese a strach z odmítnutí. Většinou se ženám doporučuje mluvit o onemocnění s partnerem, brzy mu ukázat jizvu a obnovit sexuální život. Tělesný handicap způsobený léčbou může ovlivnit partnerský vztah, protože ženy často přehnaně sledují chování partnera a běžným projevům přikládají jiný význam. Pocit ztráty atraktivity může vést až k vyhýbání se a odmítání partnera. Také partner může mít obavy, že by intimní kontakt mohl být trapný a nevhodný. Důležitost promluvy s partnerem a konzultace s lékařem je na místě. Rady lékaře a nabídka pomůcek pro operované ženy je nedílnou součástí pooperační péče. Mezi pomůcky řadíme silikonové mamární epitézy, úplné, korekční a pooperační. K tomu pak speciální podprsenky s bavlněným obalem pro uložení epitézy. Jejich nošení nejenže zabrání případným bolestem zad, ale především významně posílí sebevědomí ženy, protože operovaný prs je u oblečené pacientky k nerozeznání od zdravého. Epitézu je vhodné každé dva roky měnit. Na podprsenku pak pojišťovna přispívá 1x ročně.

Daleko výrazněji po psychické stránce pomůže ženě rekonstrukce prsu provedená plastickým chirurgem. Ta ale není možná u všech pacientek. Svou roli zde hraje stadium nádorového onemocnění, stav jizvy po operaci a po ozařování ztráta elastičnosti tkání prsu.

Případnou rekonstrukci musí žena konzultovat se svým ošetřujícím lékařem a následně s plastickým chirurgem. Dříve se rekonstrukce prsu běžně prováděly s odstupem až 2 let po skončení léčby onkologem. Nyní se provádí podstatně dříve a v západních zemích je dokonce běžné provádět rekonstrukci souběžně s chirurgickým odstraněním části nebo celého prsu.

Lidé s omezenými vědomostmi o onkologické diagnóze často předpokládají, že se jedná o onemocnění vždy smrtelné. Nemocnému člověku je upíráno právo na sexuální touhy, ačkoliv tyto pocity může mít každý, a to i ve chvílích značně oslabeného zdraví.

Svou roli hraje i obava ženy z pohlavního styku, psychická nestabilita a pocit ztráty ženskosti. Také některé kulturní, sociální a psychologické vlivy mohou měnit postoj k sexualitě během a po ukončení léčby onkologem.

Někteří boj s touto nemocí předčasně vzdávají právě proto, že jim chybí blízkost milované osoby. Když je nádorové onemocnění velmi pokročilé, touha po citu, náklonnosti a dotecích nemizí, ale naopak se stává ještě silnější.

Partneři onkologických pacientek by proto neměli zapomínat na důležitost fyzického kontaktu, přestože pohlavní styk může být pro ženu již příliš velkou zátěží.

Nádorové onemocnění nemůže ohrozit harmonické soužití mezi mužem a ženou, pokud je tento vztah opravdový a pevný. Největší překážkou v tomto směru však bývá mlčení a nedostatek kvalitních informací.

VII.
Dispenzární onkologická péče

54 Dispenzarizace osob s hereditárním rizikem malignit – Onkogenetická pracovní skupina ČOS a SLG.

Foretová L.[1], Eckschlager T.[2], Hajdúch M.[3], Kleibl Z.[5], Křepelová A.[2], Minárik M.[4], Novotný J.[5], Plevová P.[6], Pohlreich P.[5]
1) Masarykův onkologický ústav
2) UK 2. LF a FN Motol
3) FN Olomouc
4) Genomac Int.
5) 1 LF a VFN Praha, 6FN Ostrava

Úvod

Každoročně je v naší republice testováno pro podezření na dědičnou dispozici k nádorům několik stovek pacientů a jejich příbuzných. Předpokládá se, že 5-10% nádorových onemocnění může mít monogenní hereditární příčinu. Nejčastěji testované jsou rodiny s podezřením na hereditární syndrom nádorů prsu a/nebo ovaria a hereditární nepolyposní kolorektální karcinom. Každá testovaná osoba musí projít genetickým poradenstvím a před testováním podepsat informovaný souhlas. Molekulárně genetické laboratoře umožňují v naší republice testovat nejčastější syndromy, možnosti testování a kvalita vyšetření se neustále zvyšují. Pro potřebu standardizace indikací, genetického poradenství, testování a především klinického sledování rizikových nosičů mutací byla vytvořena „onkogenetická pracovní skupina ČOS a SLG“.

Hlavní úkoly pracovní skupiny

1. Definovat indikace k vyšetření klinickým genetikem a ke genetickému testování
2. Standardizace postupů genetického testování a příprava jednotných požadavků na kvalitu molekulárně genetických vyšetření jednotlivých syndromů.
3. Návrh vytvoření dispenzarizačních center pro hereditární nádorové syndromy při KOC
4. Standardizace komplexní preventivní péče a jednání se zdravotními pojišťovnami o úhradě této péče.

Pracovní skupina vytvořila týmy k řešení jednotlivých úkolů. Závěry a doporučení budou publikovány v časopise Klinická onkologie a v jiných lékařských časopisech. Bude prosazovat vznik specializovaných dispenzarizačních center pro možnost komplexní preventivní péče zdravých rizikových osob a bude iniciovat konzultace odborníků, kteří se danou problematikou prevence budou zabývat.

Dalším úkolem bude vytvoření databáze hereditárních nádorových syndromů, která by měla obsahovat i data o výsledcích preventivní péče, nových nádorových onemocněních a umožnila hodnotit výsledky preventivní péče.

Preventivní péče u dědičně disponovaných osob je organizačně složitá, vyžaduje součinnost více odborníků a využití nejmodernějších vyšetřovacích metod. Proto nelze rizikové osoby ponechat v péči praktických lékařů, primárních gynekologů nebo v péči malých nemocnic. Z našich šetření vyplývá, že pokud nejsou pacienti sledováni ve specializovaných centrech, jejichž náplní je péče o rizikové osoby, nelze zajistit kvalitní prevenci. Onkogenetická skupina prosazuje, aby klinická péče byla v rukou onkologů specialistů na hereditární problematiku.

Dispenzarizační centra s dedikací hereditárním malignitám v ČR neexistují ani ve většině fakultních nemocnic. Pro mnoho nově diagnostikovaných rizikových zdravých osob je velký problém si zajistit komplexní preventivní péči. Proto je nutné vytvořit systém dispenzarizačních center pro hereditární rizika malignit, která jsou jako High-Risk Clinics běžnou součástí onkologických pracovišť v západní Evropě.

Je důležité prohlubovat znalosti onkologů, dalších specialistů i praktických lékařů v oblasti genetiky nádorových onemocnění. Je také nutné vytvořit pro rizikové osoby dostatek informačních materiálů, na základě kterých se mohou rozhodovat o dalším postupu v oblasti jak primární tak sekundární prevence.

O závěrech a doporučeních pracovní skupiny je možné se informovat na www.linkos.cz.

55 Dispenzarizace pacientů s vícečetnými malignitami.

Vítová V., Vítová H., Navrátilová M., Foretová L.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Úvod

Z výsledků analýzy dat NOR ČR vyplynulo, že cca 6% nahlášených případů připadá na pacienty s vícečetnými malignitami (VM). Z toho 90% má metachronní vývoj. Má se za to, že etiologie maligního bujení je multifaktoriální. Avšak u některých typů malignit jsou považovány některé faktory za dominantní, například mutace určitých genů u některých hereditárních malignit, kouření u „smoking – related cancers“, jsou známy sekundární malignity podmíněné protinádorovou chemo a radioterapií. U paci-

entů s VM, u nichž se uvedené etiologické činitele uplatnily, je poměrně typické složení participujících zhoubných nádorů (ZN) a do jisté míry i očekávatelný vývoj jejich nemoci. Těchto poznatků lze využít v rámci dispenzáře onkologických pacientů. U onkologických pacientů s některými hereditárními formami nemoci (Lynchův syndrom, FAP, nádory prsů a vaječníků podmíněných mutací BRCA1, 2) je již sofistikovaná dispenzární péče prakticky prováděna.

CÍLEM práce je upozornit na benefit pro onkologické pacienty plynoucí z racionální dispenzární péče – rozšířené o sledování rizikových topik sekundárních malignit – prováděné v onkologických centrech.

REFERUJEME několik kasuistik pacientů s VM, u nichž nedocenění problematiky vícečetných malignit ze strany onkologů, nespolupráce pacienta nebo dosud neznámý důvod znamenaly významné komplikace ve vývoji jejich zdravotního stavu.

KASUISTIKA č. 1.
Muž, narozen 1940, (66,5 roků), tč. normosthenik.

Rizikové faktory: původně **obezita** cca 130 – 135 kg, **kouření:** od 22 do 52 let kouřil v průměru 50 cigaret denně, s maximem 80 cigaret denně.

1) Primární ZN: (v 63 letech) Ca tonsillae l. sin. (C 09.0) cum meta coli l. sin., T4 N3 M0. Histologie: nízce diferencovaný spinocelulární ca. Terapie: rozšířená tonsilektomie vlevo s blokovou resekcí krčních uzlin vlevo. Provedena radioterapie na oblast hltanu, krku a nadklíčků. Následně léčen pro lymfedém hlavy a krku.

Za 2 roky bez předcházející známé příčiny vznikl protrahovaný febrilní stav s vysokými hodnotami CRP (120 … 60mg/l) s podezřením na bronchopneumonii (dle rtg plic). Empiricky přeléčen za hospitalizace na onkologickém oddělení antibiotikem (Amoksiklav). Po poklesu teplot odeslán do domácí péče s tím, že je nutno vyčkat výsledků vyšetření protilátek proti borréliím, i když dle vyjádření infektologa onemocnění lymeskou nemocí nezvyšuje hodnoty CRP, ani nevyvolává febrilní stavy. Pacient měl doma postupně narůstající teploty, do 4 týdnů opět teploty kolem 39°C, pocit nevůle v oblasti plic bazálně vpravo, ztížené dýchání, dle kontrolního rtg plic progrese zánětu plic. Z lymfologické ambulance odeslán na TRN, kde bylo provedeno bronchoskopické vyšetření a prokázán.

2) Sekundární ZN: (v 66 letech) Ca plic (C 34.3) – dolní lalok pravé plíce, T2 N0 M0. Histologie: špatně diferencovaný spinocelulární ca plic.

RES: Jde o **„tobacco related cancers“**. Vůdčím klinickým příznakem byly pravděpodobně paraneoplastické teploty trvalého charakteru – kolísající od subfebrilií k hodnotám kolem 39°C a údaj o významném rizikovém faktoru – silném kuřáctví. Na rtg plic byl zaznamenán vývoj pravděpodobně zánětlivých změn.

KASUISTIKA č. 2.
Žena, narozená 1954, (52,5 let).

Rizikové faktory: **četný výskyt a úmrtí na maligní nádory v** rodině: otec zemřel v 45 letech na malignitu (ZN kolorekta, leukémie), sestra v 51 letech na ZN dělohy, strýc v 70 letech na ZN plic, děda na ZN kolorekta, 1x úmrtí dítěte v kojeneckém věku na ZN ledviny.

Genetické testování: zjištěna patologická mutace genu *MLH1, exon 8, c.677G>T (Arg226Leu)*, potvrzen Lynchův syndrom, dědičná forma nádorů kolorekta a dělohy. Na základě tohoto vyšetření doporučena přesná náplň dispenzární péče pro onkologa, gynekologa a gastroenterologa.

1) Primární ZN: (v 37 letech) TU intestini tenui (C 17.9), s recidivou v 39 letech, histologie: nízce diferencovaný adenoca, bez postižení uzlin. Terapie: resekce nádoru, provedena 2x chemoterapie (CFA + 5 – FU, FAM), (léčba mimo Masarykův onkologický ústav (MOÚ) Brno).

2) Sekundární ZN: (v 44 letech) Adenoca coeci (C 18.0), T3 N1 MX. Histologie: středně diferencovaný adenoca. Terapie: pravostranná hemikolektomie, chemoterapie: FU – FA, radioterapie (léčba v MOÚ Brno).

3) Terciární ZN: (v 48 letech) TU corporis uteri II a (C 54.9). Histologie: středně diferencovaný adenoca, infiltrace více než 1/2 myometria, endocervikálních žlázek (zčásti léčena mimo MOÚ Brno).

Odeslána z extramurálního pracoviště ke konziliárnímu vyšetření do MOÚ. St.p. hysterektomii abdominální s adnexektomií oboustrannou, omentektomií, appendektomií a lymfadenektomií.

Gynekolog MOÚ poznamenává: „…opět pacientka s diagnózou abdominálního ca u nás gynekologicky nikdy nebyla kontrolována !!“

RES: hereditární malignita – Lynchův syndrom potvrzená genetickým testováním. Vůdčími údaji k zajištění úplné a racionální dispenzární péče mělo být již samo zjištění ZN střeva v mladém věku a pozitivní rodinná zátěž.

KASUISTIKA č. 3.
Žena, narozena 1945, (62let).

Rizikové faktory: matka zemřela v 31 letech na gynekologický ZN, otec na ZN prostaty, sestra zemřela v 54 letech na myelom, děda v mladém věku na ZN žaludku, teta na nádor prsu v 34 letech, strýc na nádor plic – kuřák. Pacientka měla 3 porody a 4 interrupce.

1) Primární ZN: (v 38 letech) Ca mammae l. dx. (C 50.9). Histologie: invazívní duktální ca prsu. Terapie: chemo a radioterapie, kompletní remise 23 let.
2) Sekundární ZN: (v 48 letech) Ca endometria I a (C 54.9). Terapie: abdominální hysterektomie a adnexektomie.

Genetické testování: zjištěna patologická mutace genu *BRCA 1 /exon 20/ c.5385dupC*, která je příčinou dědičné dispozice k nádorům prsu a ovaria.

Na základě výsledku genetického vyšetření byly mimo jiné stanoveny *náplň dispenzární péče* a *intervaly vyšetřování po půl roce*. Ač byla podrobně seznámena s charakterem onemocnění, *tak často prováděné vyšetření odmítla*. K vyšetření se dostavila *až za 2 roky s* lokální *recidivou nádoru prsu vpravo T4b N2 M0.*

RES: Ca endometria I a. St.p. hysterektomii a adnexektomii. Ca mammae l. dx s pozitivitou BRCA 1. St.p. CHT a RT. Lokální recidiva T4b N2 M0.

I přes poučení lékařem nedodržela termín kontrolních vyšetření, recidiva zachycena již v pokročilém stadiu.

KASUISTIKA č.4.
Žena, narozená 1966, (40 let).

Rizikové faktory: **rodinná zátěž:** matka zemřela v 36 letech na ZN prsu, otec v 51 letech na ZN žaludku, babička na leukémii v 76 letech, teta v 52 letech na nádor.
Užívala hormonální antikoncepci, 1x interrupce.
Genetické testování: byla zjištěna patologická mutace genu *BRCA1 /exon 11/ c.1719C>T/Q534X*, která je příčinou dědičné dispozice k nádorům prsu a ovaria.

1) Primární ZN: (v 32 letech) **synchronní duplicita:**
ca mammae l. sin. (C 50.4), T1c N0 M0 G2 a ca mammae l. dx. (C 50.4), T1 N0 M0 G1, histologie: infiltrující duktální karcinom, středně diferencovaný. Terapie: parciální mastektomie s disekcí axily, chemoterapie (FAC) a radioterapie.
Od roku 2003 bylo v rámci dispenzáře v MOÚ prováděno v půlročních intervalech i gynekologické vyšetřování včetně vaginálního UZV, neboť před tím bylo zjištěno, že od ukončení onkologické léčby nikam nechodí. V roce 2005 *přesně v* termínu se dostavila ke gynekologickému vyšetření. Subjektivně pouze zhubla 4 kg, zjištěn
2) Terciární ZN: (v 39 letech) Ca ovarii (C 56) T3 N0 M1, histologie: nediferencovaný karcinom ovarií G3 s penetrací na povrch. Zasažené levé parametrium, rektovaginální septum, mikrometastázy v omentu.

RES: zjištěna hereditární forma VM prs/prs/ovarium s pozitivitou BRCA 1 u ženy v mladém věku. Přestože byla u pacientky dispenzární péče prováděna lege artis, byl terciární ZN zjištěn ve vysokém stadiu, s obtížnou kurabilitou. **Má spíše charakter „intervalového“ karcinomu.**

KASUISTIKA č. 5.
Žena, narozená 1943, (63 let).

Rizikové faktory: nádor prsu zjištěn u matky, sestry (v 32 letech), tety a sestřenice. 1x interrupce.
Genetické testování: detekována patogenní mutace BRCA 1 genu */exon20/ 5385-5386insC*, která je odpovědná za dědičnou dispozici k nádorům prsu a ovaria.

1) Primární ZN: (v 50 letech) Ca mammae l. dx. (C 50.9). Terapie: parciální mastektomie s disekcí axilly, radioterapie – léčena mimo MOÚ. *Zpráva nepředána.*
2) Sekundární ZN: (v 62 letech) Ca mammae l. sin. (C 50.9), T1 N0 M0.

RES: hereditární forma karcinomu prsu se zjištěnou pozitivitou mutace BRCA1, v důsledku lege artis prováděné dispenzarizace zjištěna následná malignita včas. Bylo by *velmi vhodné předání kompletní onkologické zdravotní dokumentace* extramurálním pracovištěm do MOÚ za účelem snazšího přístupu k další onkologické péči.

DISKUSE. S rozvojem diagnostiky, léčby a preventivních programů v onkologii, ale též s přetrváváním některých nežádoucích faktorů životního stylu (kouření) se dá u přežívajících onkologických pacientů předpokládat zvyšování incidence VM. Autoři (*Vítová, Foretová a kol.*) ve svých dřívějších sděleních upozornili na významně zvýšené relativní riziko některých typů následných malignit v české populaci i na možnost výskytu nádorové multiplicity u některých forem hereditárních malignit. *Levi a kol.* zařadili do skupiny *„smoking – related cancers“* ZN dutiny ústní, pharyngu, pankreatu, laryngu, plic, ledvin a močového měchýře, do skupiny *„smoking – associated cancers“* ZN jícnu, jater, čípku děložního a leukémii. Námi uvedené kasuistiky ukazují, že ač je velmi správná a žádoucí snaha soustřeďovat péči o onkologické pacienty do onkologických center, stále ještě jsou následné malignity diagnostikovány pozdě nebo nejsou diagnostikovány vůbec, z čehož nelze vinit pouze pacienty, protože se z jakýchkoliv důvodů nedostaví k doporučenému vyšetření nebo kontrole (což není výjimkou). Je však realitou, že lékařské týmy pečující o onkologické pacienty plně nevyužívají poznatků a zkušeností s diagnózou VM. U tzv. „intervalových“ karcinomů bude třeba dalším výzkumem zjistit důvod jejich časnějšího vývoje nebo rychlejšího růstu. I když jsou známy i v zahraniční literatuře, může jít o určitou specifickou genetickou výbavu české populace nebo jiný, zatím neznámý faktor, týkající se některých jednotlivců (včetně psychických vlivů). Podobné zkušenosti, jak jsou uvedeny v našem sdělení, mají s ovariálními karcinomy i pražští onkologové. Naše kasuistiky ukazují, že pro vývoj následné malignity u onkologických pacientů je významná dobrá znalost historie jejich nemoci včetně možnosti uplatnění rizikových faktorů (rodinná zátěž, možné vlivy životního stylu, předcházející protinádorová léčba), a to všemi členy onkologických týmů včetně konziliárních lékařů (například z oboru interní medicíny, lymfologie, atd.), ale i praktických lékařů. Z tohoto pohledu je významné povědomí o možnosti vývoje VM a předávání vyčerpávajících informací o pacientech mezi zainteresovanými lékaři.

Závěr

Pro prevenci a včasný záchyt následné malignity u onkologických pacientů:

1) je významné a žádoucí soustřeďování péče o onkologické pacienty do onkologických center,
2) všichni členové lékařských onkologických týmů by měli mít v povědomí možnost vývoje a znalost příslušných rizikových topik následných malignit a v rámci dispenzární péče tyto sledovat,
3) významným přínosem by bylo předávání vyčerpávajících informací o pacientovi mezi zainteresovanými lékaři.

Podporováno VZ č. MZO 00209805

56 Vícečetné malignity – jeden z důvodů trvalé dispenzarizace onkologicky nemocných.

Novák J., Bednaříková M.
KKOP, Masarykův onkologický ústav, Brno

Cílem sdělení je podat přehled o vícečetných zhoubných nádorech, zejména metachronních, u pacientů v České republice.

Prezentované výsledky vycházejí z dat Národního onkologického registru (NOR) České republiky z období 1976-2004. Přes 1,4 milionu záznamů o zhoubných nádorech (ZN) -včetně nádorů kůže (basaliomů) bylo zpracováno pomocí sw nástroje Business Objects.

Je podán přehled počtu pacientů se dvěma, třemi, resp. více ZN, uvedeny jsou nejčastější kombinace vícečetných malignit a analýza kombinace basaliomu v mladším věku (do 55 let) se ZN jiné lokalizace ve věku pozdějším. Pozornost je věnována rovněž skupině nemocných s relativně kurabilními ZN (vybrané malignity hematologické, nádory dětského věku a testikulárními tumory), kde může být riziko metachronní malignity zvýšeno mj. v souvislosti s prodělanou chemoterapií a/nebo radioterapií.

Výsledky dokladují míru rizika vzniku a rozvoje následného zhoubného nádoru u pacienta s již diagnostikovaným (resp. vyléčeným) zhoubným nádorovým onemocněním, a jsou tedy jedním z argumentů pro dodržování zásady trvalé dispenzarizace onkologicky nemocných.

57 Užití nádorových markerů ve follow-up po radikální operaci pro kolorektální karcinom.

Levý M.[1], Lipská L.[1], Visokai V.[1], Topolčan O.[2], Kormunda S.[2]
1) Chirurgická klinika 1. LF UK a Fakultní Thomayerovy nemocnice Praha
2) II. interní klinika Fakultní nemocnice Plzeň

Úvod

Léčba KRCa je komplexem předoperačního stagingu, adekvátní radikality při operaci s cílem dosáhnout kurativního výkonu, adjuvantní a neoadjuvantní terapie a v neposlední řadě dlouhodobého sledování (follow-up) s léčbou symptomatického i asymptomatického relapsu.

Precizní předoperační staging je základem pro strategii chirurgického výkonu, nekompletní staging vede k nekompletní léčbě a špatným výsledkům. Aktivní pooperační dispenzarizace pomáhá zlepšit resekabilitu případného relapsu. K upřesnění stagingu, prognozy a jako součást dispenzárních programů se využívají biomarkery.

EGTM (European Group on Tumour Markers) doporučuje použití CEA k monitoraci pacientů s verifikovaným KRC. Pro diagnózu relapsu kolorektálního karcinomu má CEA udávánu senzitivitu kolem 80% (rozpětí 17-89%) a specificitu cca 70% (rozpětí 34-91%). Studie ukazují že pravidelné měření CEA může detekovat relaps 4-10 měsíců před jeho klinickými projevy. Interval mezi jednotlivými měřeními nebyl jednoznačně stanoven, nejčastěji je první 2 roky po diagnóze KRC CEA měřeno každé 3 měsíce. Zatímco použití CEA je obligatorní, další markery jako CA 19-9, CA 242 a cytokeratiny (TPA, TPS) jsou ve stadiu zkoumání.

European Society for Medical Oncology (ESMO) ve svých doporučeních ohledně sledování nemocných po operaci pro karcinom rekta žádné markery nedoporučuje. Po operacích pro karcinom tračníku ESMO doporučuje z markerů sledovat pouze CEA.

Američan Society for Clinical Oncology (ASCO) doporučuje sledovat pouze pravidelně CEA, u ostatních biomarkerů není dostatek podkladů pro jejich rutinní použití.

Cíl studie

Zjistit význam vybraných biomarkerů (CEA, CA 19-9, CA 242, TK, TPS, TPA, ICAM-1, VCAM-1, IGF-1, adiponektin, leptin) u pacientů sledovaných po radikální operaci pro kolorektální karcinom.

Materiál a metody

Do studie bylo zahrnuto 158 pacientů, věkové rozmezí 35 – 89 let.

Pacienti po radikální operaci dle standardního protokolu – viz níže. Přiřazeni byli také pacienti odeslaní k operaci recidivy onemocnění po primární operaci v jiných zařízeních. U těchto byl proveden kompletní restaging dle našeho protokolu. Vzorky periferní krve byly odebírány během follow-up spolu se standardně odebíranými vzorky k vyšetření CEA a CA 19-9.

	n
Muži	93 pacientů
Ženy	65 pacientů
Karcinom kolon	84 pacientů
Karcinom sigmatu a rekta	74 pacientů

Tabulka č. 1 Charakteristika souboru

Radikální operace s kurativním záměrem:

Pacienti byli operováni na základě standardů Chirurgické kliniky 1. LF UK a FTN – radikální operace s lymfadenektomií jdoucí ke kořeni vyživující arterie postiženého úseku střeva. U nádorů dolního rekta byla provedena totální mezoraktální excize, u nádorů středního a horního rekta subtotální mezorektální excize která by měla být 5 cm pod dolním okrajem tumoru. Distální linie resekce u nádorů rekta by neměla být menší než 1 cm od dolního okraje tumoru. Lokálně pokročilý karcinom s invazí do okolních struktur resekován enbloc multiorgánovou resekcí včetně pelvické exenterace. Perioperační ultrasonografie jater je považována za obligatorní, synchronní jaterní metastázy, pokud jsou resekabilní, jsou většinou operovány synchronně s primární resekcí. Plicní metasázy jsou operovány ve druhé době.

Histologické vyšetření bylo prováděno na Patologickém oddělení FTN, lymfatické uzliny byly odebírány z nativního preparátu chirurgem.

Staging byl prováděn dle UICC TNM klasifikace, ke stanovení N stadia použito minimálně 12 vyšetřených uzlin, jinak hodnoceno jako NX. Protokol předoperační vyšetření zahrnuje totální koloskopii (event. irrigografii), biopsii tumoru, UZ břicha, PET/CT (nešlo-li o akutní výkon), CT břicha a pánve (nebylo-li provedeno PET/CT), RTG S+P, odběr na CEA a CA 19-9.

Follow-up byl prováděn dle níže popsaného protokolu.

	Měsíce po operaci														
	3	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	72	84	96, 120	108, 144, 166
Anamnéza	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Klinické vyšetření	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CEA, CA19-9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SONO břicha	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CT			X		X		X		X		X	X	X	X	X
Koloskopie			X		X		X		X		X	X	X	X	X
RTG S+P					X				X			X		X	
PET, PET/CT	Pokud jsou elevovány markery a ostatní vyšetření negativní anebo před indikací k reoperaci														

Tabulka č. 2 Protokol follow-up

Relaps byl prokázán u 11 pacientů resekcí lokální recidivy či metastáz, u 7 biopsií bez operace, u 5 pomocí PET/CT a u 2 pomocí CT.

Analýza vzorků

Byla odebírána periferní krev z kubitální žíly, po centrifugaci bylo sérum zamraženo na -70 st C. Markery byly stanovovány v Imunohistochemické laboratoři Fakultní nemocnice Plzeň za použití komerčních kitů:

CEA a CA 19-9 (MEIA, AxSYM Abbott), TPA (IRMA, Byk Sangtec), TPS (IRMA, Beki), TK (REA, Immunotech), CA 242 (ELISA, CanAg Diagnostics AB). ICAM-1 a VCAM-1 za použití multiplexové analýzy (LUMINEX, Linco Research), Adiponectin, Leptin a IGF-1 pomocí isotopických metod.

Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programu S.A.S, verze 6.12 a programu Statistica. Porovnání skupin podle kriterií bylo provedeno pomocí Wilcoxonova testu. Jako signifikatní byly považovány hodnoty rovny či menší než 0.05. Data byla také analyzována použitím Spearmanova korelačního koeficientu.

Výsledky:

Marker	N	Median	Lower Quartil	Upper Quartil	Minimum	Maximun
CEA	25	10,70	4,40	50,50	1,20	466,00
CA 19-9	25	26,80	11,40	106,20	0,60	370,90
CA - 242	22	25,00	8,30	60,99	0,30	150,00
TK	19	5,50	3,80	11,00	2,70	101,50
TPA	19	114,00	49,00	246,00	0,00	1045,00
TPS	19	133,00	35,00	268,00	16,00	708,00
ICAM	12	129,50	114,50	162,50	92,00	259,00
VCAM	12	1083,50	522,00	1293,50	182,00	1523,00
Adiponectin	18	19,80	12,60	30,00	7,00	52,60
Leptin	18	8,90	6,10	18,30	2,50	28,40
IGF 1	28	226,30	202,55	269,15	106,10	436,60

Tabulka č. 3: Hodnoty sledovaných markerů u stádia relaps

Marker	N	Median	Lower Quartil	Upper Quartil	Minimum	Maximun
CEA	114	2,35	1,40	3,30	0,20	17,50
CA 19-9	114	10,85	6,50	21,20	0,60	428,30
CA - 242	52	5,65	2,20	10,50	0,00	22,30
TK	42	7,30	5,50	9,90	1,80	79,20
TPA	42	32,50	16,00	55,00	0,00	111,00
TPS	42	30,50	13,00	66,00	0,00	221,00
ICAM	4	151,50	126,50	186,00	121,00	201,00
VCAM	4	406,50	317,00	962,50	228,00	1518,00
Adiponectin	31	30,80	16,80	38,20	9,50	114,30
Leptin	31	10,90	6,10	17,90	1,70	75,80
IGF 1	108	231,95	188,00	292,35	105,80	632,10

Tabulka č. 4: Hodnoty sledovaných markerů u stádia remise

Marker	Statistická significance
CEA	**0,0001**
CA 19-9	**0,0007**
CA - 242	**0,0003**
TK	0,2204
TPA	**0,0004**
TPS	**0,0007**
ICAM	0,5145
VCAM	0,2573
Adiponectin	0,0638
Leptin	0,7807
IGF 1	0,9550

Tabulka č. 5:
Porovnání stádia relaps a remise

Marker	**CEA**				
CA 19-9	0.50231				
	0.0105	**CA 19-9**			
CA 242	0.55452	0.92665			
	0.0074	<.0001	**CA 242**		
TK	-0.17244	0.35667	0.22462		
	0.5231	0.1751	0.4209	**TK**	
TPA	0.33701	-0.02355	0.11300	-0.17363	
	0.2018	0.9310	0.6884	0.4772	**TPA**
TPS	0.30294	0.20000	0.16129	0.22134	0.70588
	0.2541	0.4577	0.5658	0.3625	0.0007

Tabulka č. 6
Spearman Correlation Coefficients
u stádia relaps

Marker	**CEA**				
CA 19-9	0.41739				
	<.0001	**CA 19-9**			
CA 242	0.29386	0.72705			
	0.0215	<.0001	**CA 242**		
TK	-0.05915	-0.06359	-0.08386		
	0.7243	0.7005	0.6118	**TK**	
TPA	0.16830	0.23668	0.15243	0.00409	
	0.3125	0.1469	0.3542	0.9795	**TPA**
TPS	0.13852	0.38008	0.19623	-0.04083	0.72591
	0.4069	0.0170	0.2901	0.7974	<.0001

Tabulka č. 7:
Spearman Correlation Coefficients
u stádia remise

Statisticky signifikantní rozdíly hladin markerů byly prokázány mezi stadii remise a relapsu u CEA, CA19-9, CA242, TPA a TPS.

Diskuze

Užití CEA a CA 19-9 je u KRC všeobecně uznáváno a výsledky naší studie jejich používání v dispensarizaci toto potvrzují. Ve follow-up se ukazují tři nezávislé skupiny biomarkerů 1) CEA, 2) CA 19-9 a CA 242, 3) TPA a TPS. Mezi CA 19-9 a CA 242 a mezi TPA a TPS je vysoká statistická korelace a proto mohou být zaměňovány.

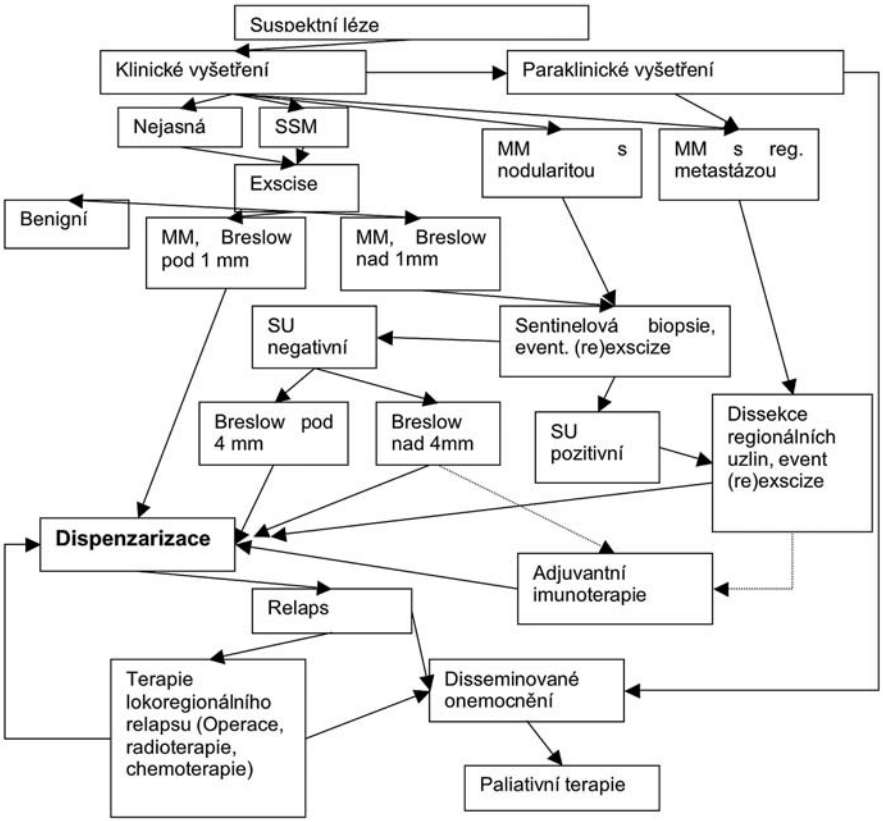
Závěr

Pro follow-up se zdá být optimální užití CEA a CA19-9 nebo CA242 a TPS nebo TPA.

58 Dispenzární model maligního melanomu na základě prognostických faktorů včetně stavu sentinelové uzliny.

Fait V., Kocák I., Chrenko V., Krejčí E.
Masarykův onkologický ústav v Brně

Nedílnou součástí onkologické péče je kromě samotné terapie i dispenzarizace pacientů po terapii, ale i pacientů s důvodným podezřením na možný vznik malignity. Model dispenzarizace by měl být dostatečně účinný, ale současně by neměl znamenat zbytečné plýtvání, jak nadbytečně častými kontrolami, tak vyšetřeními s malou pravděpodobností záchytu patologie.



Obrázek:
Diagnostickoterapeutický algoritmus u maligního melanomu

Ideální možností by byla přesná kvantifikace rizika jednotlivých událostí, a podle tohoto individuální úprava plánu. Tento postup by byl ovšem poměrně obtížný a v praxi obtížně realizovatelný. Vhodné je tedy rozdělení pacientů do skupin dle míry rizika relapsu, a nastavení určitých schémat v těchto skupinách.

Na základě dat našich pacientů se sentinelovou biopsií dokumentujeme sílu jednotlivých klasických prognostických faktorů maligního melanomu a předkládáme schéma sledování pacientů na základě těchto faktorů.

Naše data jsou v souladu s literárními nálezy a dokumentují, že nejsilnějším prognostickým faktorem je stav sentinelové uzliny, při její pozitivitě jsou ostatní prognostické faktory již nepodstatné, v případě negativní sentinelové uzliny pak nejsilnějším prognostickým faktorem zůstává tloušťka melanomu dle Breslowa.

Schéma dispenzarizace v MOÚ

Melanomy se zanedbatelným a velmi nízkým rizikem relapsu
Melanomy in situ
Melanomy s tloušťkou do 0,5 mm
Klinické vyšetření: místo prima, palpace uzlin, pátrání po transitorních a intranzitních metastázách, především vyšetření dalších kožních eflorescencí. Interval vyšetření 12-24 měsíců, vzhledem k maximu rizika ve vzniku dalšího melanomu de novo, sledování s výhodou na dermatologické ambulance.

Melanomy s nízkým rizikem relapsu
Klin. st. IA,
- tenké melanomy (do 1,0 mm), Clark II nebo III, bez ulcerace: pT1a

Klinické vyšetření:
místo prima, palpace uzlin, pátrání po transitorních a intranzitních metastázách, kožní eflorescence – každé 3-12 měsíců.

Melanomy se středním a vysokým rizikem relapsu
Klin. st. IB – III,
- melanomy do 1 mm s přítomností rizikových faktorů, Clark IV, V, nebo s ulcerací: pT1b
- dále melanomy nad 1,0 mm tloušťky a tzv. tlusté melanomy (nad 4,0 mm)
- uzlinové metastázy, u většiny pacientů objevené na základě sentinelové biopsie

Možno přihlédnout k dalším rizikovým faktorům:
- výskyt spontánní regrese
- nepřítomnost lymfocytární infiltrace

Obsah sledování:
- Klinické vyšetření: místo prima, palpace uzlin, pátrání po transitorních a intranzitních metastázách, kožní eflorescence.

Interval	1.-3. rok	4.- 5. rok	6. a více
Klinické vyšetření	3-6 měsíců	4-12 měsíců	1 x ročně

Při suspektním palpačním nálezu v uzlinové oblasti sono vyšetření spádové lymfatické oblasti.
Rtg plic, sono břicha, LDH, biochemie, KO každé 3-12 měsíců.

Při klinických příznacích vzdálených metastáz nebo abnormalitách zachycených vyšetřeními výše, odpovídající vyšetření (rtg, CT, sono, PET aj).

59 Vybrané aspekty dispenzární péče pacientů s tumory varlat po kurativní terapii.

Tomášek J.[1], Kiss I.[1], Řehák Z.[2], Halámková J.[1], Mechl M.[3], Andrašina T.[3]
1) Oddělení klinické onkologie FN Brno, Brno
2) Oddělení nukleární medicíny + Centrum PET, MOU, Brno
3) Radiologická klinika FN Brno, Brno

Testikulární germinální nádory tvoří přibližně 1% všech mužských malignit, incidence je mírně narůstající (7,4/100 000 obyvatel v roce 2003). Jejich specifikem je výskyt u mladých jedinců (70% ve věku 20-40 let) a vysoká kurabilita. Prognóza nemoci je dána histologií nádoru, rozsahem onemocnění a hodnotou nádorových markerů. Hladina nádorových markerů je kromě parametrů TNM důležitým faktorem, kterým je dáno zařazení do klinického stádia nemoci. Prognostické skupiny pro seminomy a neseminomy jsou definovány podle International Germ Cell Cancer Collaborative Group.

Schéma dispenzarizace po kurativní léčbě musí zohledňovat zařazení do prognostické skupiny (riziko relapsu nízké, střední nebo vysoké), provedenou léčbu a klesající pravděpodobnost relapsu v časovém odstupu od kurativní léčby. Přibližně 90% relapsů se objevuje do 2 let od ukončení léčby, většina v 1. roce.

Při zvažování frekvence vyšetření zobrazovacími metodami je nutné brát v úvahu významnou radiační zátěž jednotlivých vyšetření. Jde především o CT. Vlastní dispenzarizace by neměla v dlouhodobé prognóze výrazně ovlivňovat riziko vzniku sekundárních malignit, které je zvýšeno již primární protinádorovou léčbou.

Doporučení pro použití zobrazovacích metod v dispenzarizaci nejsou jednotná. Podle NCCN (1.2007) je pro pacienty s neseminomem I. klinického stádia, kteří jsou po orchiektomii pouze sledováni, doporučeno v 1. roce provedení RTG S+P každé 1-2 měsíce, v 2. roce každé 2 měsíce, ve 3. roce po 3 měsících, ve 4. roce po 4 měsících, v 5. roce po 6 měsících a dále po roce. CT břicha a pánve je doporučováno provádět v 1. roce po 2-3 měsících, v 2. roce po 3- 4 měsících, v 3. roce po 4 měsících, ve 4. roce po 6 měsících a od 5. roku pak 1x ročně.

V doporučení ESMO je RTG S+P v 1. roce každý měsíc, ve 2. roce po 2 měsících, ve 3. roce po 4 měsících a pak po 6 měsících do 5 let. CT břicha a pánve doporučeno provádět v 3., 6., 9. a 12. měsíci.

Na ASCO 2006 byla prezentována velká randomizovaná studie (abst. 4519) zaměřená na pacienty I. klinického stádia s neseminomem po orchiektomii bez další terapie. V jednom rameni byli pacienti (n=247) přešetřeni CT hrudníku, břicha a pánve 3., 6., 9., 12. a 24. měsíc, v druhém rameni (n=167) pak jen 3. a 12. měsíc. V dalších dispenzárních parametrech se obě ramena nelišila. Relaps onemocnění byl zachycen celkově v 70 případech. 37 případů bylo zachyceno v rameni s 5 CT, 33 v rameni s 2 CT.

Rozměr relabujícího tumoru byl v průměru 2,1 cm v rameni s 2 CT a 2,2 cm v rameni s 5 CT. Po chemoterapii pro tento relaps pak zůstalo reziduum v 35% případů v rameni s 2 CT a v 36% v rameni s 5 CT. Ve studii neměl po chemoterapii pro relaps žádný pacient aktivní onemocnění, po léčbě relapsu se stav pacientů v obou ramenech nelišil (medián sledování 40 měsíců). Autoři této studie doporučují u pacientů s neseminomem I. klinického stádia s dobrou prognózou CT vyšetření jen 3. a 12. měsíc po orchiektomii.

Pro pacienty po kurativní chemoterapii nebo po RPLND doporučuje NCCN provádět RTG S+P po 2-3 měsících první 2 roky, 3. a 4. rok po 4 měsících, 5. rok po 6 měsících a dále po roce. CT břicha a pánve je doporučeno v 1. roce po 6 měsících, v 2. roce po 6-12 měsících a pak po roce do 5 let, následně pak po 12-24 měsících. Doporučení ESMO jsou u této skupiny pacientů opět volnější. RTG S+P je doporučeno provádět v 1. roce po 2 měsících, 2. rok po 3 měsících a pak po 6 měsících do 5 let. CT břicha a pánve je prováděno jen pokud je to klinicky indikováno. Je nutné zdůraznit, že ESMO doporučení jsou koncipována jako nezbytné minimum pro běžnou praxi.

Vzhledem k tomu, že většina mužů s neseminomem I. klinického stádia je vyléčena již orchiektomií, je snaha co nejpřesněji identifikovat ty nemocné, kteří se mohou bez rizika vyhnout adjuvantní chemoterapii. Vyšetření PET dokáže detekovat pozitivní uzliny, které jsou v CT obraze negativní a tím predikovat riziko relapsu. Cílem studie autorů z Velké Británie (ASCO 2006, abst. 4520) bylo prokázat, že na základě PET vyšetření lze určit, které pacienty s neseminomem I. klinického stádia je možné pouze sledovat. Do studie byl zařazeno 111 pacientů s histologicky verifikovaným neseminomem I. klinického stádia s vaskulární invazí. Pacienti s negativním PET byli jen sledováni, při pozitivním nálezu byli léčeni chemoterapií. Studie byla předčasně ukončena pro vysoké riziko relapsu u pacientů s negativním PET vyšetřením. V této indikaci tedy nelze PET jako rozhodující faktor pro volbu terapie použít.

U velké části pacientů s reziduálním infiltrátem po kurativní chemoterapii nejsou již po jeho resekci nalezeny viabilní nádorové buňky. Tito pacienti jsou zbytečně zatíženi rizikem, které z tohoto výkonu vyplývá. Doposud nebyl nalezen diagnostický postup, jak tuto skupinu nemocných odlišit. Jistě se nabízí pro tuto diagnostiku využít PET. V německé studii (ASCO 2006, abst. 4521) bylo zařazeno 141 pacientů s reziduálním infiltrátem germinálního nádoru po primární léčbě nebo po léčbě relapsu. Tato studie prokázala, že PET nedokáže dostatečně přesně určit povahu infiltrátu a proto by měl být každý reziduální infiltrát resekován.

Dosud není jednoznačně stanoven přínos PET v rámci dispenzarizace testikulárních nádorů v širokém použití. Dosavadní zkušenosti, vázané na jeho indikaci v individuálních případech, však tento diagnostický přínos naznačují. V přednášce bude proveden rozbor radiologických diagnostických metod v rámci dispenzarizace testikulárních nádorů, jak z hlediska radiační zátěže, tak i z pohledu ekonomického, ve vztahu k dosud známým, studiemi ověřeným, skutečnostem.

Literatura

1. ASCO 2006: abstr. 4519:
   Medical Research Council trial of 2 versus 5 CT scans in the surveillance of patients with stage I non-seminomatous germ cell tumours of the testis. *G.M. Mead, G.J. Rustin, S.P. Stenning, P. Vasey, N. Aass, R. Huddart, M. Sokal, S. Kirk; Mount Vernon Cancer Centre, Middlesex, United Kingdom; Royal South Hants Hospital, Southampton, United Kingdom; Medical Research Concil Clinical Trials Unit, London; Beatson Oncology Centre, Glasgow; Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway; Royal Marsden Hospital, Sutton, United Kingdom; Nottingham City Hospital, United Kingdom*
2. ASCO 2006: abstr. 4521:
   [18F]-FDG-PET in germ cell tumors following chemotherapy: Results of the German multicenter trial. *M. De Wit, M. Hartsmann, W. Brenner, L. Weissbach, H.Amthauer, C. Franzius, S. Kliesch, S. Krege, R. Heicappell, R. Bares, C. Bokemeyer; UK Eppendorf, Hamburg; Military, Hospital, Hamburg; Urban Hospital, Berlin; Charité, Berlin; University Hospital, Muenster; University Hospital, Essen; University Hospital Tübingen, Germany*
3. ASCO 2006: abstr. 4520:
   A prospective study of 18FDG PET in the prediction of relapse in patients with high risk clinical stage I (CS1) non-seminomatous germ cell cancer (NSGCT): MRC study TE22. *R. Huddart, M. O'Doherty, A. Padhani, G. Rustin, G. Mead, J.K. Joffe, P. Vasey, S. Hain, S.J.Kirk, S.P. Stenning, National Cancer Research Institute Testis Cancer Clinical Studies Group; Institute of Cancer Research, Sutton; Guy's and St Thomas' Hospitals, London; Paul Strickland Scanning Centre, Northwood; Southampton General Hospital, Southampton; Calderdsale and Huddersfield NHS Trust, Huddersfield, United Kingdom*

VIII.
Podpůrná a ošetřovatelská péče

60 Užití G – CSF na základě doporučení EORTC z roku 2006.

Richter I.
Komplexní onkologické centrum, Krajská nemocnice Liberec

Častý následek protinádorové léčby je myelosuprese, kam patří neutropenie, trombopenie a anémie. Tyto komplikace jsou spojené s potenciální mortalitou, morbiditou, zhoršením kvality života pacientů. Z hlediska ekonomického je také nezanedbatelná skutečnost nákladné podpůrné péče.

Febrilní neutropenie patří mezi nejčastější komplikace protinádorové chemoterapie. Mezi její důsledky z hlediska krátkodobého patří infekční komplikace, nutnost hospitalizace, potřeba nákladné antibiotické a antimykotické terapie, zhoršení kvality života. Z dlouhodobého hlediska dochází při neutropenii k redukci, případně odložení dávky chemoterapie se snížením účinnosti léčby. Toto je dobře zdokumentováno v práci Bonadonniho a kol., BMJ, 2005, kde při sledování adjuvantní chemoterapie u karcinomu prsu je přežití pacientek při poklesu dávkové intenzity pod 85% stejné jako v kontrolní skupině bez terapie.

Riziko vzniku neutropenie lze minimalizovat užitím G – CSF. Filgrastim a pegfilgrastim patří mezi skupinu těchto látek. Jde o glykoproteiny, které regulují tvorbu a uvolňování neutrofilů z kostní dřeně. Pegfilgrastim je pagylovaná forma filgrastimu s prodloužením doby účinku díky snížením renální clearance.

Historie doporučení pro užití G – CSF se datuje od 1994, kdy ASCO definovala první pravidla. Pro doporučená užití G – CSF v krajinách EU vyšly v roce 2006 inovované postupy v rámci EORTC. Nejvýznamnější změny se týkají:

- snížení prahu rizika febrilní neutropenie pro indikaci ze 40% na 20%
- sekundární profylaxe pomocí G – CSF po první epizodě febrilní neutropenie
- zaměření na odhad celkového rizika vzniku febrilní neutropenie při rozhodování o užití G – CSF.

Jak již bylo řečeno, primární profylaxe G – CSF je doporučena u pacientů, kde je riziko vzniku febrilní neutropenie větší než 20%. V případě rizika 10-20% je potřeba zvážit primární profylaxi G – CSF v závislosti na chemoteraupetickém režimu, na rizikových faktorech pacienta (s vyšším rizikem vzniku febrilní neutropenie je spojen věk nad 65 let, špatný performance status dle ECOG, předchozí epizoda výskytu febrilní neutropenie, pokročilé onemocnění, přítomnost komorbidit, cytopenie v důsledku infiltrace kostní dřeně tumorem, špatný nutriční stav, otevřené rány, infekce, kombinovaná chemoradioterapie), faktorech léčby, zvážit skutečnost, kde odložení nebo redukce chemoterapie při neutropenii je spojená s horší prognózou onemocnění. V případě rizika vzniku febrilní neutropenie pod 10% není primární profylaxe G – CSF doporučena.

Z hlediska teraupetického užití G – CSF je vhodné rozdělit febrilní neutropenii na nekomplikovanou a komplikovanou. K tomu existuje mnoho skórovacích systémů, z nichž je nejčastěji používané MASCC skóre.

Cílem posteru je připomenout nové doporučení užití růstových faktorů G – CSF dle EORTC z roku 2006, dále budou uvedeny kasuistiky nemocných a užití růstových faktorů v praxi na Onkologickém oddělení Krajské nemocnice Liberec.

61 Možnosti ambulantního podávání kontinuálních infúzí cytostatik a analgetik.

Mrkvičková P., Moravcová D.
VFN, Onkologická klinika, Praha

V posledních letech byla mnoha klinickými studiemi prokázána výhoda kontinuálního podávání 5-fluorouracilu oproti bolusovým režimům. Takto aplikovaná léčba je účinnější a zároveň méně toxická. V mnohých režimech je podání 5-fluorouracilu nejen několikadenní, ale i několikatýdenní. Ambulantní podávání šetří významně náklady na hospitalizaci nemocného. Na našem pracovišti také využíváme ambulantní kontinuální aplikaci analgetické léčby při analgezii u terminálních stavů. I zde je prokázáno, že kontinuálně aplikovaná analgezie je výrazně účinnější.

Podmínkou ambulantní aplikace je zajištění centrálního žilního přístupu, tj. zavedení intravenózního portu a spojení tohoto portu s přenosným infuzorem.

Přenosným infuzorem může být:

- přenosná elektronická pumpa CAAD-1, její nevýhodou je velmi vysoká pořizovací cena (asi 160 000 KČ) a složitost obsluhy pro technicky méně zdatné pacienty.
- nízkoobjemový přenosný elektronický dávkovač, obsahující 20ml stříkačku. Tento dávkovač nevyhovuje právě pro malý objem stříkačky.
- jednorázové přenosné infuzory Baxter

Venózní porty pro Onkologickou kliniku VFN zavádí ambulance bolesti na Klinice anestesie a resuscitace VFN. Zavedení probíhá jako ambulantní výkon v lokální anestesii a ještě týž den je možno zavedený port využít pro aplikaci chemoterapie.

Sestry na Onkologické klinice VFN jsou proškoleny, aby při práci s infuzorem a při aplikaci do venózního portu zachovávaly následující nutná pravidla:

- výběr správného typu infuzoru
- infuzor je výhradně na jedno použití, při opakovaném použití pryžový balónek již nezaručí 100% přesné dávkování
- používání 5% glukózy k přípravě roztoku 5-fluorouracilu, použití fyziologického roztoku totiž zvyšuje průtokovost o 10%
- správný výpočet konečného objemu léku
- pokojová teplota infuzoru s roztokem (při nízké teplotě se průtok snižuje, při vysoké teplotě se naopak zvyšuje)
- v infuzoru ani v přívodní hadičce nesmí být přítomen žádný vzduch
- dodržování všech pravidel sterility při plnění infuzoru
- kontrola před napojením na žilní přístup, že se roztok z infuzoru dostal až do konektoru na hadičce
- používání pouze speciálních jehel určených k aplikaci do portů
- dokonalá fixace portové jehly
- při ukončení aplikace zajištění další funkčnost portu heparinovou zátkou

Pracovní postup

Před použitím infuzoru je nutné, aby infuzor měl pokojovou teplotu. Po vyjmutí infuzoru ze sterilního sáčku naplníme sterilní 60ml stříkačkou bez jehly přes plnící port zásobník infuzoru potřebným množstvím léku. Dbáme na přesné dodržení množství příslušného roztoku a pamatujeme na 3 ml reziduálního objemu, který v infuzoru zůstává i při jeho vyprázdnění. Plnící port uzavřeme čepičkou. Uvolněním distribuční hadičky dojde k samovolnému smršťování balónku a tím k naplnění hadičky roztokem. Zkontrolujeme, že se roztok dostal až do konektoru na hadičce, v konektoru se objeví kapka. Takto připravený naprosto uzavřený systém kryjeme sterilním víčkem. Po napíchnutí žilního přístupu odstraníme víčko a infuzor napojujeme na žilní řečiště.

Na Onkologické klinice používáme k ambulantní aplikaci kontinuálních infúzí přenosné infuzory Baxter. Jsou to jednorázové spotřební prostředky zdravotní techniky, jejich elastomerické zařízení zajišťuje naprosto bezpečnou infúzní terapii v ambulantní péči. Škála infuzorů a jejich průtoků umožňuje aplikaci v rozsahu jednoho, dvou, pěti a sedmi dnů.

Podávání 48hodinových i delších infuzí je umožněno tím, že koncentrát je fyzikálně chemicky stabilní při pokojové teplotě až 42 dní.

Výhodou použití těchto přenosných infuzorů je především jednoznačné zlepšení kvality života nemocného, protože umožňují léčbu v domácím prostředí. Nízká hmotnost a malý objem infuzoru zaručuje velmi diskrétní použití. U infuzoru Baxter je využito mechanického systému, ne elektronického, jeho použití je tudíž bez zvukových efektů, nevyžadují žádnou další obsluhu od nemocného, jako je třeba výměna baterie u elektronických pump, lze je tedy dávat i starším nemocným bez technického talentu.

Nemocné poučujeme o optické kontrole ubývání roztoku v infuzoru. V případě jakékoli nejistoty doporučujeme kontrolu aplikace na ambulanci kliniky, nebo na našem lůžkovém oddělení. Komplikace při dodržování všech pravidel výše popsané léčby jsou velmi ojedinělé a spokojenost nemocných s ambulantní léčbou značná.

62 Monitorování žilních vstupů.

Sýkorová Z., Kocourková J.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Sdělení přináší praktické informace o způsobu, jak jsou v MOÚ ošetřovány a dokumentovány průběhy žilních kanylací.

Pro poskytování jednotné správné komplexní ošetřovatelské péče o žilní vstupy je nezbytné vymezit v daném zdravotnickém zařízení kompetence v souladu s nadřízenými legislativními dokumenty. Na základě těchto dokumentů pak MOÚ koncipoval vlastní vnitřní řídící dokumenty – standardy ošetřovatelské péče související s přípravou a edukací pacienta před zavedením periferního nebo centrálního žilního katétru (na našem pracovišti také dlouhodobého tunelizovaného centrálního žilního katétru – portu), dále s vlastním zavedením a následným používáním a ošetřováním žilního vstupu.

Důraz je kladen na prevenci infekčních komplikací a zachování funkce – průchodnosti žilního katétru. Systémová opatření mají mimo jiné za cíl také to, aby o žilní vstupy pečovali výhradně kompetentní pracovníci.

Sdělení krok po kroku prezentuje cíle péče, evidenci proběhlé i plánované péče v ošetřovatelské dokumentaci i v nemocničním informačním systému Greyfox.

Jsou demonstrovány správné formulace zápisů do ošetřovatelské dokumentace, praktické používání přehledů pacientů se zavedenými žilními vstupy k plánování převazů, manažerské výstupy z modulu. Manažerské výstupy podávají odpovědným vedoucím pracovníkům přehled o celkovém počtu a druzích zavedených žilních vstupů ve sledovaném období, důvodech zavedení žilních vstupů, materiálu použitém k převazům, délce kanylací u jednotlivých druhů žilních vstupů a o důvodech ukončení – případně komplikacích kanylace.

Součástí sdělení je také seznámení s kritérii k provedení vnitřního auditu podle kterých byl vytvořen kontrolní list a jeho hodnocení.

Při provádění vnitřního auditu používáme také fotografickou dokumentaci – umožňuje nám aktuálně doložit správně ošetřené a označené žilní vstupy a pomáhá odhalit, argumentovat a napravovat drobné nedostatky.

63 Implantabilní infuzní pumpy v léčbě nádorové bolesti.

Houdek M., Gabryš M.
Neurochirurgická klinika, Olomouc

U nemocných s farmakologicky refrakterní nádorovou bolestí je jednou z léčebných možností intraspinální aplikace opioidů. Různá technická zařízení, která tuto dlouhodobou aplikaci umožňují označujeme zastřešujícím názvem IDDS (Implantable Drug Delivery System). Zahrnují malé porty – rezervoáry (Salmon, Rickham), anesteziologické porty a technicky nejdokonalejší implantabilní infuzní pumpy. Implantabilní infuzní pumpy programovatelné a s konstantním průtokem tekuté látky umožňují dlouhodobou intratékální aplikaci opioidů. Aplikace medikamentů do blízkosti drah bolesti umožňuje výrazné snížení dávky při zachované analgézii.

Technické možnosti obou uvedených pump (programovatelné a s konstantním průtokem), indikace a kontraindikace, jejich výhody a nevýhody při léčbě nádorové bolesti jsou náplní této přednášky.

64 Naše zkušenosti s audity ošetřovatelské péče.

Navrátilová D., Vorlíčková H. Kocourková J., Zálešáková P, Šebesta R.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Pojem kvalita jako stupeň úspěšnosti, se kterým jsou plněny požadavky pacientů, v našem zařízení se stal běžnou součástí slovní zásoby zdravotníků. To co pro jednoho znamená dobrou péči, správný postup, pro druhého může být naprosto nedostačující. Stanovením standardu, jeho prezentací a jeho dodržování dosáhneme nejen kvality ošetřovatelské péče, ale spokojenost našich pacientů. Vlastním auditem uzavřeme kruh představující standard, zda je dobře nastaven, zda je v praxi proveditelný a hlavně dodržován.

Audity jsou nezbytnou součástí dobrého fungování organizace. Potvrzují dobrou praxi a vyzdvihují oblasti, které je třeba dále rozvíjet. Audit je systematický, nezávislý a dokumentovaný proces získávání důkazů z auditu a jeho objektivního hodnocení s cílem stanovit rozsah splnění kritérií auditu.

Systematický proces probíhá
- dle předem stanovených pravidel s předem definovanými zdroji
- musí mít předem definovaná kritéria (vůči čemu se srovnává shoda-norma, standard)
- musí mít stanoven rozsah (podle toho jaký audit je prováděn – celá nemocnice, proces, prvek)
- musí mít stanoven způsob (studium dokumentace, audit na místě, pohovor…)

Nezávislý proces
- musí zaručovat nezávislost a objektivitu auditorů
- musí mít stanovena pravidla, která zabrání střetu zájmu(ne auditor z daného pracoviště
- musí být ošetřeny případné antipatie a úmysly prokázat neshodu za každou cenu
- musí být zajištěna nestrannost

Dokumentovaný proces
- musí probíhat dle předem schválených dokumentovaných postupů
- musí zajistit prokazatelné formalizované výstupy z auditu

Existují dva typy auditů
- **Interní** – prováděný interními zaměstnanci organizace nebo externí firmou na základě smlouvy. Výsledky auditu využívá pouze auditovaná organizace
- **Externí** – prováděné vždy externí akreditovanou firmou. Výsledky auditu využívají i jiné organizace

V MOÚ je vytvořena skupina interních certifikovaných auditorů, která se zabývá vnitřními audity v ústavu podle aktuální potřeby. Před provedením auditu jsou vytvořeny tzv. kontrolní listy, které slouží jako podklad pro provedení samotného auditu.

Cílem sdělení je seznámení s metodikou, vyhodnocováním a výsledky těchto auditů

IX.
Terminální péče

65 Tělesný diskomfort umírajících a možnosti jeho mírnění.

Sláma O.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Slovo komfort se postupně zabydlelo v českém jazyce. Znamená „ pohodlí, bezpečí a zajištěnost“, „příjemné a libé vjemy“, někdy také „luxus“, „ nadstandard“, „dostatek všeho“, po čem zatoužíme. Co máme na mysli, když hovoříme o komfortu při umírání? Může být umírání „komfortní“? Opakovaně jsme se přesvědčili, že nezdravotníkům, blízkým příbuzným umírajících pacientů, zní slovo „ komfort“ v souvislosti s umíráním nesrozumitelně. Proto je třeba ho užívat opatrně. Nelze automaticky předpokládat, že máme stejnou představu o obsahu slova „komfort“ jako pacient a jeho blízcí. Ze zahraničních průzkumů vyplývá, že umírající považují za důležité následující oblasti:

- aby netrpěli nesnesitelnou bolestí a dalšími tělesnými problémy (dušnost, nevolnost),
- aby měli pokud možno „jasnou mysl“, tedy aby nebyli zmatení nebo příliš utlumení,
- pocit, že mohli dokončit rozdělané „projekty“ (výchova a zajištění dětí, finanční závazky, ukončení důležitých vztahů – rozloučení s přáteli atd.),
- nalezení duševního a duchovního pokoje a klidu.

Dalo by se říci, že „komfort při umírání“ znamená naplnění potřeb ve všech výše popsaných oblastech. Je jasné, že komfortu v takto ideální podobě dosáhneme pouze zřídka. Důvodů je celá řada na straně pacienta, jeho rodiny ale i na straně pečujících zdravotníků. Všechny uvedené oblasti jsou při umírání „rozehrány“ neoddělitelně a velmi se navzájem ovlivňují (např. léčba bolesti bez snahy o ovlivnění úzkosti a strachu ze smrti obvykle není úspěšná a vede pouze k nutnosti rychlého zvyšování dávek opioidů, které pacientovu „ celkovou bolest“ stejně nemírní, ale pouze jej zatěžují nežádoucími účinky). V rámci každodenní rutiny na lůžkovém oddělení na takovouto komplexní péči není dostatek času. Zkušenost z hospiců však ukazuje, že takováto péče je personálně, časově a finančně náročná, ale že je možná. Je to z velké části otázka motivace, organizace a celkové atmosféry péče o umírající. Pokud je umírání na daném oddělení vnímáno jako organizační „nedopatření“ („ pacienta jsme bohužel nestihli včas přeložit někam jinam, např. na sektorovou internu), je ideál péče usilující o “ komfort při umírání„ vystaven silnému protitlaku. Hospice nastavily laťku vysoko. Přesto i v ostatních zdravotnických zařízeních, kde pacienti prožívají závěr svého života jsou různé prvky této komplexní péče uskutečnitelné.

Slovo komfort má svůj opak. Tím je diskomfort- chápaný jako nepohodlí, strádání, utrpení. Jako zdravotníci zvyklí v rámci poskytované péče pracovat s uchopitelnými klinickými problémy, máme spíše sklon o umírání uvažovat jako o fázi, kdy je pacient ohrožen diskomfortem v různých oblastech. Rolí zdravotníků a ostatních profesionálů je tyto různé projevy diskomfortu mírnit.

Některé časté projevy tělesného dyskomfortu a možnosti jejich mírnění

Bolest

- Pravidelné hodnocení bolesti po 1-2 h a to způsobem, který je pacientovi srozumitelný
- Podávání analgetik vhodným způsobem (kontinuální opioidy mají méně NÚ než pravidelné bolusové podání)
- Snaha o ovlivnění psychosociálních souvislostí bolesti (úzkost, vztek, strach ze smrti)

Dušnost

- Malé dávky morfinu, syntophyllin, oxygenoterapie
- Benozidazepiny
- Při výrazném dechovém diskomfortu (při dušení) farmakologická analgosedace

Celková utlumenost

- Zhodnocení, zda je žádoucí a přispívá ke komfortu
- Vyloučení ovlivnitelných příčin (nevhodné lékové kombinace, příliš velké dávky opioidních analgetik)
- Edukace rodiny, že únava, ospalost až spavost jsou normální projevy umírání

Imobilita

- Pohodlné lůžko, dobrá matrace
- Katetr, plena
- Frekvence polohování závisí na prognoze. U bezprostředně umírajících není rutinní polohování indikované!!

Suchost sliznice dutiny ústí

- Pravidelné svlažování (po 30 minutách, nikoliv pouze 5x denně!!!)
- Cumlání kostek ledu nebo mražených nápojů
- Parenterální hydratace obvykle na stav sliznic umírajících nemá žádný vliv
- Péče o rty

66 „Komfort při umírání“ – víme o čem mluvíme?

Drdová M., Čížkovská L., Petráková L.
ÚOP na Pleši, onkologické oddělení

Komfort, v dnešní době často používané slovo, ke kterému můžeme přiřadit různé přívlastky. Komfortní bydlení, komfortní zaměstnání, komfortní auto… atd. Ve slovníku najdeme rovnítko ke slovu komfort = přepych. Nemyslím však, že cokoli co se týká umírání můžeme nazvat přepychem (pohodlím).

To, že je klient (pacient) udržován v čistotě, suchu a jsou mu zajištěny jeho fyziologické potřeby považujeme samozřejmě za standardní. Že je mu věnovaná maximální možná péče lékařů a sester je také samozřejmostí. S rozvojem paliativní medicíny a především léčby bolesti dochází k výraznému posunu v možnostech zkvalitnění péče. Stále však nejde hovořit o komfortu.

Ke zkvalitnění péče o pacienta v terminální fázi života, mimo možnosti onkologické léčby zásadně přispívá vznik paliativních center. Takové centrum jehož garantem je ESMO(European Society for Medical Oncology) je v naší republice zatím jen jedno, a to VFN Karlovo náměstí + ÚOP na Pleši. Základní ideou paliativního centra je myšlenka kontinuity péče a tzv. „neopuštění “ pacienta. Jedná se o „nadstandardní“ sociální a psychickou podporu. Paliativní centrum by mělo mít vazbu na kontinuální péči v terénu (tj. na občanská sdružení, hospice, Liga proti rakovině, Cesta domů, Amélie…) Tuto vazbu by v nemocnicích měla zajišťovat především sociální pracovnice. Není v kompetenci a časových možnostech lékaře a běžné sestry tato sdružení kontaktovat. Je totiž velmi časově (a nejen) náročné pro tyto klienty (pacienty) zajistit umístění. A často i spolupráce s rodinou je velmi náročná. Místo běžné sestry je u lůžka!!!!!

Jednou z mnoha výhod paliativního centra je nepřetržitá možnost rodiny a klienta (pacienta) toto centrum kontaktovat (24 hodin denně, 7 dní v týdnu). Toto lze již tak trochu nazvat nadstandardní službou.

Rovněž hospicová péče přispívá ke zkvalitnění péče, zejména individuálnějším přístupem ke klientovi (pacientovi) i rodině. Což jak víme v nemocnicích není v možnostech personálu. Vzhledem k tomu, že jak všichni víme nejedna nemocnice trpí výrazným nedostatkem sester. V péči o umírající (a nejen) je velmi důležitý lidský zájem, osobní zodpovědnost, empatie a korektnost, a také v neposlední řadě profesionalita. Není možné, abychom terminální a umírající „odstavili’ na druhou kolej, protože je již neuzdravíme. Našim cílem je dát těmto lidem možnost kvalitního života a možnost důstojného umírání. Neboť i umírající má svá práva. V naší republice byla v roce 1999 přijeta parlamentem doporučení Rady Evropy č. 1418/1999 tzv. „Charta práv umírajícího“ z které bych ráda citovala.

„Prodloužení života by nemělo byt jediným cílem medicínské praxe, která se musí současně zabývat i úlevou od utrpení“.

„Povinnost respektovat a chránit důstojnost všech nemocných a umírajících osob je odvozena z nedotknutelnosti lidské důstojnosti ve všech obdobích života“.

„Respekt a ochrana nacházejí svůj výraz v poskytnutí přiměřeného prostředí, umožňujícího člověku důstojné umíraní“.

„Výslovná přání nevyléčitelně nemocné nebo umírající osoby týkající se určitých léčebných postupů budou respektována bez ohledu na zásadní terapeutickou zodpovědnost lékaře, pokud nejsou v rozporu z jeho lidskou důstojností“.

„Nemocná nebo umírající osoba má právo na pravdivou, úplnou, ale citlivě podanou informaci o jejím zdravotním stavu a přitom aby bylo respektováno přání jedince, který nechce být informován“.

„Pacient má rovněž právo, aby nezemřel osamocen, má právo zemřít v klidu a důstojně a má právo očekávat, že neporušitelnost lidského těla bude respektována i po jeho smrti“.

Jak sami všichni dobře víme v praxi je péče o terminálního a umírajícího pacienta velmi psychicky náročná. Je třeba se chovat empaticky a nadmíru profesionálně. I kontakt s příbuznými musíme považovat za péči o umírající. Příbuzní hledají často u zdravotnického personálu nejen profesní pomoc, ale také slova útěchy a podpory.

V dnešní době se snažíme o to, aby měl umírající soukromí, možnost duchovní péče (kněz, psycholog) a zároveň, aby měl možnost kontaktu s rodinou. Jelikož ne vždy je v možnostech rodiny se o takto nemocného starat v domácím prostředí, ať už z finančních či psychických důvodů.

A na závěr jedna kazuistika:

Pacient: C. M.
Věk: 66 let
Dg.: C 34 T3N2M0 meta ad CNS

Tento pacient byl dlouhodobě léčen v našem ústavu chemoterapeutickou léčbou. Poté byl přijat k paliativnímu ozáření CNS. Vzhledem k pokročilému stádiu onemocnění došlo ke zhoršení klinického stavu natolik, že bylo přistoupeno k symptomatické léčbě. Pro velké bolesti terapie zaměřena na léčbu bolesti, která byla úspěšná. Na žádost pacienta i rodiny byla pacientovi umožněna stálá přítomnost manželky u lůžka, což evidentně přispívalo psychické pohodě pacienta.

Po 14 dnech pan C. M umírá v klidu ve spánku v kruhu svých nejbližších. Snad jen to lze nazvat „komfortem“ při umírání.

Medicína by měla být rozvážná a zdrženlivá. Zápas s chorobou by měla vyvažovat vědomím, že její úlohou není učinit tělo nesmrtelným, ale pomocí prožít omezený počet let co nejdravěji !!!!!

Použitá literatura: Hnutí pro život, Doporučení Rady Evropy č. 1418/1999, Cesta domů, www.umírání

67 Péče o pacienta v terminálním stavu.

Lustyková E., Fukarová P.
Nemocnice ve Svitavách, chirurgické oddělení

Člověk přichází na svět se zaťatými pěstmi, jako by říkal: „Celý svět je můj.“
Odchází z něho s nataženými dlaněmi, jako by pravil: „Podívejte se, nic si s sebou neberu!“

— *Talmud*

Umírání a smrt, je velké lidské téma.
Je to úděl každého člověka.
Obojí nás v budoucnu čeká a nemine.
Tato zneklidňující jistota je zahalena do nejistoty: nikdo z nás neví, kdy ani jakým způsobem se tak stane.
Přejeme si, aby smrt přišla „za dlouho“ a aby umírání bylo rychlé a bezbolestné.
Většina lidí touží po tzv. něžné smrti ve spánku – opustit život a neprožívat útrapy svízelné nemoci.

Téma smrti:

Mladí lidé nemají čas na smrt myslet, jejich den je řízen úplně jinými starostmi a radostmi. Smrt se jich netýká, protože se zdá být v nedohlednu.

Lidé středního věku většinou prožívají vrchol svého pracovního a osobního života a od případných diskusí na téma smrt se odvracejí. Nechtějí vědět, nechtějí slyšet a doufají, že na tyto úvahy je čas a že to patří ke stáří.

S odvrácenou tváří vstupují lidé do stáří a utvrzují sebe i okolí, že to ještě není tak zlé, že prožívají teprve ranné období, a že až později, ve vyzrálém stáří, bude ten správný čas myslet na poslední věci člověka.

Tímto zjednodušeně popsaným způsobem lidé moderní doby vytěsnili umírání a smrt ze své mysli, ale nemohou ji vytěsnit ze svého života. Ve 20. století došlo k detabuizaci sexu a tabuizaci smrti. Sex evokuje v prožitku slast, smrt naopak strach. Každý člověk ví, že zemře, a protože si současně dost dobře nemůže představit, že nebude, žije tak, jako by měl žít věčně.

Umírání dříve a dnes.
Minulost.

Dříve pečovala o umírající rodina. Nemocný se mohl rozloučit, rozmlouvat s knězem, dostal poslední pomazání. Z generace na generaci přecházely zkušenosti o péči o umírající, ale také prožitek co je to umírání a smrt z blízka. Umírající měl jistotu, že nezemře sám a věděl jak fáze umírání bude probíhat.

Umírání a současnost:

- lidé neumírají tak mladí jako dříve,
- zároveň vědí, že medicína je na vysoké úrovni, ale zapomínají, že není všemocná,
- většina lidí umírá v nemocnicích,
- aktivní účast rodiny zde chybí,
- podmínky nemocnic ani nemohou často účast rodiny tolerovat / ARO, JIP,…),
- pacient je pak zcela odkázán na péči zdravotníků.

Thanatologie, nauka o smrti a jejích aspektech.

- terminální stav – in finem,
- synonymem pojmu umírání je v medicíně terminální stav. Terminální stav je faktické umírání,
- začíná tehdy, vejde li v odbornou i laickou povědomost,
- je nutno včas zahájit psychologickou a lidsky hřejivou péči o nemocného,
- nesmíme dopustit, aby pacient zemřel dříve psychicky a sociálně, než fyzicky,
- často se zdravotnický personál, ale i příbuzní podvědomě brání kontaktu s umírajícím,
- brání se pocitu úzkosti,
- je ironií, že v případě největší potřeby sociální a emoční podpory se jí nemocným dostává nejméně,
- jde o nepřipravenost a nedostatečný výcvik v psychoterapeutickém přístupu všech zdravotníků,
- mnohdy je složitější komunikace s rodinou umírajícího než se samotným nemocným.

Deset důležitých bodů pro komunikaci s umírajícím:

1. Umožněte nemocnému vedle projevů naděje a přání také emoční projevy negativního charakteru jako jsou starosti a obavy.
2. Nechte nemocného projevovat i sebesilnější emoce, neměňte je, tolerujte výkyvy nálad, agresivitu. Tyto projevy nejsou namířeny proti vám osobně, jsou projevem zoufalství.
3. Podporujte ochotu nemocnému svěřovat se. Pozorně poslouchejte a projevte porozumění, buďte empatickou bytostí.
4. Vyhněte se kritice toho co je v prožívání správné a normální.

5. Neutěšujte nemocného přehnaně a nezlehčujte jeho trápení, jinak ztratíte jeho důvěru. Chovejte se k němu jako k dospělé osobnosti, respektujte ho. Hovořte s ním na jeho úrovni chápání a myšlení.
6. Podporujte u nemocného aktivní spolupráci. Zvláště oceňte jeho podíl zodpovědnosti v léčbě.
7. Podporujte nemocného v jeho životních aktivitách, snažte se mu pomáhat hledat nový smysl života a hodnotovou orientaci, nehledejte hotová řešení za něho.
8. Pátrejte po tom, co stojí za prosbou či stížností nemocného, oč mu skutečně jde. Většinou sděluje stížnost z hlediska druhého, neřekne přímo to, co skutečně potřebuje.
9. Neutíkejte od umírajícího – každé vaše upřímné slovo či dotyk jsou pro pacienta významným lékem.
10. Nikdy neberte nemocnému novou naději a plány do budoucna, i kdyby byly z vašeho pohledu zcela nereálné. Nemusíte věřit, že se nemocný uzdraví, ale jste povinni připustit, že se uzdravit může.

V terminálním stavu je nejdůležitější:
NADĚJE, LASKAVÝ DOPROVOD A POSILOVÁNÍ ADAPTAČNÍ SCHOPNOSTI

Adaptační schopnost znamená pomoct nemocnému vyrovnat se s změněnou osobní situací, posilovat ho v aktivním úsilí a zápasu o vlastní život.

Medicína musí být schopná nemocnému pomoci zemřít v komfortu a důstojnosti.

Lidský život je vymezen zrozením a smrtí.

V čase mezi nimi se realizuje jedinečný lidský život, odehrávající se způsobem, za který je každý z nás odpovědný.

Nekonečný život není pro smrtelníky ani šťastný, ani možný…

Nelituj se a neplač, že tvé dny jednou skončí.
Raduj se, že ještě nějaké máš a moudře s nimi zacházej.

Použitá literatura

1. Časopis Onkologická péče, 1/2002,
2. Příloha časopisu Florence
3. Z. KALVACH, A. ONDERKOVÁ, Stáří, vydavatel Galén, 2006. ISBN 80-7262-455-5
www.florence.cz [29.11.2006]

68 Důstojná smrt pouze pro vyvolené?

Macková J.
Nemocnice Šumperk

Paliativní péče je jednou z prioritních oblastí rozvoje zdravotnictví a sociální péče. Také rozsáhlá studie vydaná v USA v roce 2003 respektovaným Institute of Medicine of the National Academies (Doyle, 2004), klade rozvoj paliativní péče mezi šest nejdůležitějších prioritních okruhů zdravotní péče v prvních desetiletích 21. století. Samotná definice paliativní péče prošla za 12 let významnou změnou. V roce 1990 definice WHO ještě zdůrazňuje význam paliativní péče pro pacienty, jejichž nemoc neodpovídá na léčbu zaměřenou na vyléčení, definice z roku 2002 již klade důraz na to, že kurativní a paliativní léčba se musí již od časných stádií onemocnění doplňovat. Zároveň se za vážná onemocnění již nepovažují pouze onkologická onemocnění, ale veškerá onemocnění, která současná lékařská věda neumí vyléčit. Podle této definice z roku 2002 tedy na paliativní léčbu mají nárok i lidé trpící chronickými onemocněními různých systémů.

Jaká je však realita? Lidé se dožívají stále vyššího věku. Tento fakt s sebou nese nárůst chronických onemocnění a tím pádem i pacientů potřebných paliativní péče (Macková, 2006 a). V současné době máme v České republice k dispozici 8 hospiců a další jsou ve výstavbě. Tyto zařízení však pokryjí necelé dvě procenta všech úmrtí. Jinak řečeno, pravděpodobnost, že zemřete v zařízeních hospicového typu je velmi nízká. Většina pacientů a zejména pak chronicky nemocných pacientů umírá v nemocnicích nebo v zařízeních pro dlouhodobě nemocné.

Domnívám se, že budování dalších a dalších zařízení hospicového typu tento fakt nezmění. Rychlejším a efektivnějším řešením se zdá zavádění hospicové filozofie i do jiných zařízení. Jak totiž ukazují výsledky různých šetření v zahraničí (Spilker, 1990; Kaye, 2002; Dobríková, 2005) i u nás (Macková, 2006 b) pacientům ani tak nezáleží na prostředí, jež je při umírání obklopuje, jako spíše na lidských vztazích. Na prvním místě jako svoji prioritu pacienti neudávají vlastní léčbu a vlastní kvalitu života. Ta je až na druhém místě. Na prvním místě pacientům jde o pohodu jejich blízkých. Z vlastní praxe sestry na jednotce intenzivní péče mohu potvrdit, že nejdůležitějšími hodnotami tváří v tvář blížící se smrti jsou láska, pochopení, hřejivé lidské slovo.

Důstojná smrt se tedy může stát realitou nejen pro hrst vyvolených, ale i pro širší veřejnost, pokud budeme sami chtít. K tomuto cíli nám mohou pomoci například různé edukační akce, které jsou zaměřeny na filozofii hospicového hnutí, odborné stáže

v hospicích nebo jen prostá lidskost ve vztahu k umírajícímu. I my jednou totiž budeme umírat a nemůžeme spoléhat na to, že pro nás se místo v hospici najde.

Literatura

1. Dobríková, P. *Výskum kvality života v paliatívnej starostlivosti.* Tretí ročník medzinárodnej konferencie hospicovej a palitívnej starostlivosti. FzaSP TU, Trnava, 16. Apríl 2005.
2. Doyle, D. at al. *Oxford Textbook of Paliative Medicine.* 3rd edn. Oxford: Oxford University Press, 2004. 1244 p. ISBN 0-19-851098-5.
3. Kaye, P. *Symptom control in hospice and palliative care.* Maine, USA, Hospice education institute, 2002.
4. Macková, M. *Guardien Angel.* In Selected Journal of Successful Hospice Palliative Care from the 16 th International Congress on care of the Terminally Ill. Toronto: Legacies Inc., 2006 b.
5. Macková, M. *Paliativní péče o seniory.* In Sborník celostátního kongresu X. gerontologické dny Ostrava a Dny seniorů. Ostrava: Dům techniky Ostrava, s.r.o., 2006a., ISBN 80-02-01850-8.
6. Spilker, B. *Quality of life assesment in clinical trials.* New York, Raven Press, 1990.

69 Umírání – poslední týdny a dny.

Ryšánková V., Polášková M.
Oddělení klinické a radiační onkologie FN u sv. Anny v Brně

I přes veškerou péči a snahu zdravotnického personálu se stává, že léčba nemocných není vždy úspěšnou a může se stát, že pacient umírá – buď ve zdravotnickém nebo jiném zařízení a nebo doma.

A právě v této nelehké situaci musejí jak zdravotníci tak i blízké okolí vědět, jak o umírajícího pečovat, aby mu pomohli zpříjemnit a ulehčit poslední týdny a dny jeho života.

Je zapotřebí nebát se i o tomto tématu hovořit. Dodnes je tabuizováno. Vždyť i smrt je součástí našeho života, je důsledkem našeho narození a nikdo se jí nevyhneme.

70 Jak hodnotit a jak mírnit psychický diskomfort umírajícího pacienta.

Kabelka L.[1], Sláma O.[2], Prokop J.[1]
1) Hospic sv. Josefa, Rajhrad u Brna
2) Masarykův onkologický ústav, Brno

Úvod

Je dlouhá cesta pacienta a jeho blízkých od sdělení diagnózy k závěrečné fázi života. Pacient i doprovázející blízcí, resp. příbuzní jsou často ve velkém stresu, psychickém i fyzickém vypětí, zažívají množství převážně negativních emocí (strach, úzkost, hněv, bezmoc, pocity viny, vyčerpání, nedůvěru, nejistotu, frustraci, zoufalství a mnoho dalších). Většina blízkých pociťuje k nemocnému hluboké citové pouto, občas však bývají nevyřčené nedořešené rodinné problémy či tabu. K negativnímu prožívání tíživé situace přispívá většinou i zhoršení sociální situace rodiny, nutnost zajištění normálního chodu domácnosti a života, předchozí zkušenosti se zdravotnictvím, strach a osobní postoj ke smrti apod. Postoj k umírajícímu ovlivňuje také psychická a spirituální zralost členů rodiny.

Co si všichni zúčastnění (i členové MDT – multidisciplinární tým) přináší:

- Celý dosud prožitý život, s rodinou, sociálními vztahy
- Po léta se utvářející osobnost, postoje k prožívání zátěžových situací, k nemoci, umírání a smrti samotné, osobní zkušenost (i se zdravotnictvím) a zkušenosti druhých
- Z toho vyplývající představy o dalším průběhu nemoci
- Vlastní spiritualitu- životní postoje k hodnotám, smyslu životních etap, také vztah k náboženské víře, nevyřešené vztahy a životní vítězství i prohry, pocity viny
- Jedinečnost, důstojnost své lidské individuality, kterou je zapotřebí vnímat a respektovat

Úzkost a deprese, zmatenost

U konkrétního pacienta je užitečné si položit následující otázky

- Je příčinou nějaký tělesný problém, který je třeba řešit? (bolest, dušnost, močová retence, zácpa aj.)
- Je úzkost a neklid obrazem mozkové dysfunkce (demence, delirium, hypoxie mozku)
- Je úzkost výrazem, že pacientovi je daná situace nesrozumitelná ?(nejasnost ohledně diagnózy, prognózy.)

- Je úzkost a neklid projevem strachu z umírání a smrti? (strach z očekávané bolesti a utrpení, z neznáma, z odloučení od blízkých, smutek z nedokončených životních projektů, obavy o osud pozůstalých, malých dětí atd.)
- Je úzkost a neklid projevem nevyřešených problémů ve vztazích s rodinou, s jinými lidmi, s Bohem?

Nejdůležitějším léčebným opatřením je a vždy zůstane autentická lidská blízkost rodiny a zdravotníků. Ve farmakologické léčbě jsou v popředí antidepresíva s anxiolytickým účinkem (dosulepin, trazodon) v kombinaci s řešením spánkových poruch a terapií anxiolytiky (alprazolam).

Spirituální bolest

Je především třeba, aby si všichni, kdo o umírajícího pečují, byli vědomi, že psychologická a spirituální témata jsou pro umírajícího minimálně stejně důležitá jako otázka tělesných symptomů. Celková atmosféra péče a způsob komunikace by měly vycházet z toho, co pacient považuje v dané chvíli za důležité, co chce „řešit“ a co reálně je řešit možné. Pravdou je, že blízkost rodiny a pro nemocného tak povětšinou deklarovaná smysluplnost celého života, jsou významnou složkou v doprovázení a také pomocí nám zdravotníkům ve snaze o zachování důstojnosti nemocného tváří v tvář smrti. Teprve dosažení určitého smíření a akceptace v oblasti psycho-spirituální (vůči konci života, ale i životu samotnému) může dát umírání a smrti charakter události, která je smutná, někdy tragická, ale přesto důstojná a hluboce lidská.

Péče o pozůstalé

Vlastní okamžik smrti není cílem, ale je příležitostí důstojně zakončit doprovázení a plynule přejít do podpůrné péče o pozůstalé. Z pohledu pozůstalých je důležitá možnost důstojného rozloučení (místnost pro rozloučení, kaple, samostatný pokoj), podpora a účast v projevení emocí, účast duchovního (je-li možná) je mnohdy pozitivně přijímána i lidmi bez náboženské víry.

Samotné truchlení lze přirovnat k hojení rány. Jde o dlouhodobý psychosociální i spirituální proces, mnohdy s psychosomatickou reakcí, i fyziologicky trvající řadu měsíců. Jde o přirozenou reakci na ztrátu- **bez truchlení není vyrovnání**! Samozřejmě věk, příbuzenský poměr a další psychosociální a spirituální souvislosti modifikují individuální reakce.

71 Praktické tipy pro komunikaci s rodinou umírajícího.

Mišoňová A.
Domácí hospicové sdružení Cesta domů, Praha

Nový život odnepaměti začíná v rodinném kruhu. Zrození nového života je v rodinách očekáváno s nadějí a radostí a nový človíček byl vítán nejen v kruhu nejbližších, ale později je představen i přátelům a celé komunitě. Lidský jedinec pak v rodině a v sociálním prostředí vyrůstá, získává zkušenosti do vlastního života, zakládá svoji vlastní rodinu, a v tomto sociálním prostředí pak také stárne a umírá. Umřít mezi svými blízkými je ideál, který si mnohý z nás přeje, ale jen minimálnímu počtu z nás se vyplní. Nesmírným pokrokem vědy a medicíny žijeme déle, ale mnohdy za cenu delší nemohoucnosti a utrpení. Naše moderní doba řeší tento stav institucionalizací dlouhodobé péče o nemocné lidi, kteří pak často umírají osamoceni.

Málokterý mladý člověk zažil, že by se v rodině pečovalo o starého nemocného člověka a tím by převzal a tzv. „odkoukal“ svoji roli, až bude potřeba se postarat o své rodiče nebo životního partnera. „Na to tady jsou přece zařízení typu LDN, domovů důchodců.“

Rodina ale i přátelé pro většinu z nás znamenají určitou jistotu a bezpečí. Když ztratím práci, mám starosti, jdu se poradit se svými nejbližšími, kde hledám pomoc a podporu.

A co se stane, když problémem je ortel nevyléčitelné nemoci? Nebudu se zde zabývat fázemi prožívání nemoci jak je popsala Elizabeth Kübler-Ross, chtěla bych se věnovat důležitosti otevřené komunikace s umírajícím a jeho blízkými.

Nejdříve bych ráda na příkladech uvedla, **jakou důležitost přikládají nemocní svým blízkým**.

- Pan Norbert: *„Rakovinu musíš přijmout, aby ses s ní naučil žít. Teprve teď si uvědomuji, jak může být život krásný.“* Pak se otočí k manželce, která ho doprovázela na ozařování: *„Tvoje láska mi dodává sílu!“*
- Pan Bedřich *„Mám fantastickou manželku, která při mně stojí. Přesto je mi jasné, že s rakovinou se musím vypořádat sám.“*
- Paní Gabriela *„Moje nemoc s sebou přinesla i něco pozitivního, více si všímám pozornosti, péče a lásky mého manžela a syna.“*

Při komunikaci s nemocnými musíme mít na paměti celistvost lidské bytosti se svoji individuální historií, interními vztahy a jejich historii, tělesnou – duševní – duchovní jedinečností a individuálním místním sociálním a společenským kontextem.

Pokud, je člověk v své úplnosti někde zraněn, potřebuje naléhavě:
- RESPEKT
- POZORNOST
- PODPORU
- LASKAVOST

Potřeby členů rodiny jak je dr. Albert a dr. Zech popisují v učebnici Paliativní medicíny:
- být s umírajícím
- být umírajícímu nápomocen
- mít jistotu, že se umírajícímu daří dobře
- být informován o stavu umírajícího
- být informován o blížící se smrti
- moci projevit city
- mít útěchu a podporu od ostatních členů rodiny
- obdržet uznání, podporu a útěchu od „profesionálů“

Z toho vyplývá, že předmětem zájmu u lidí s nevyléčitelnou chorobou nesmí být jen pacient sám, ale stejnými fázemi boje a přijetí prochází i jeho rodina a blízcí přátelé. I ti prožívají strach, obavy, nejistotu, možná někdy i větší než sám nemocný. Tedy i jim musíme poskytnout prostor pro verbalizaci toho, čeho se bojí i toho co prožívají.

Zde uvádím příklady otázek, které můžeme použít při komunikaci jak s nemocnými tak i s rodinou:
- S čím k nám přicházíte?
- Jaké to pro vás je?
- Jak se s tím vyrovnáváte?
- Co to znamená pro váš každodenní život?
- Jak vám můžeme nejlépe pomoci?
- Co konkrétního pro vás můžu teď udělat?
- Co vás nejvíce zatěžuje?
- Když se stav zhorší, čeho se obáváte?
- Co si v žádném případě nepřejete?
- Co si váš blízký nepřeje?

Má-li rodina veškeré potřebné informace a podporu a ocenění nás profesionálů:
- jsou schopni se správně rozhodovat
- jsou schopni pečovat
- dokáží maximálně využít zbývající čas
- jsou schopni se vyrovnat se ztrátou blízkého

Ze strany nás, profesionálů, samozřejmě není vůbec snadným úkolem doprovázet umírajícího a jeho blízké. Předkládám zde i několik důvodů, proč se toho možná tolik bojíme.
- obavy, že vyvoláme negativní pocity
- obavy, že sami neudržíme vlastní emoce
- obavy z obvinění ze selhání
- soucit s nemocným
- konfrontace s vlastní smrtelností

Paliativní péče počítá s efektivní komunikací se všemi zúčastněnými, a zároveň i s velkým emocionálním zatížením. Zároveň však může mít velmi konkrétní a uspokojující přínos jak profesionální tak i osobní.

72 Komfort pri umieraní – hospicová starostlivosť.

Prandlová S., Mišániová R.
Onkologické odd. FNsp F. D. Roosewelta Banská Bystrica, SR

„Súčasťou života je aj umieranie.
Má sa však rozprávať o smrti a utrpení?“

Pri svojej práci a starostlivosti o umierajúceho pacienta pozorujeme, že najväčším želaním týchto pacientov je – nezomierať sám, netrpieť bolesťou, zomrieť doma alebo v blízkosti svojich najbližších.

Niekto nad týmito požiadavkami možno nechápavo pokrúti hlavou, ale pokúsme sa predstaviť si sami seba v roly umierajúceho a zamyslime sa nad tým, čo by sme chceli my!? Nie všetci pacienti však majú možnosť zomierať v známom prostredí. Niekto si to nemôže dovoliť preto, lebo žije sám, niekedy sa príbuzní boja, či to doma zvládnu. Títo ľudia sú potom odkázaní na starostlivosť zdravotníckych pracovníkov na paliatívnych oddeleniach, ktorých je žiaľ veľmi málo a chýba na nich pocit domova a spolupatričnosti. Veľkým krokom vpred pre takýchto pacientov bol vznik

„Hospicového hnutia“ – je to ucelený systém pomoci umierajúcim a ich rodinám, ktorý sa snaží o svoju vlastnú identitu v terajšom systéme tzv.víťaznej medicíny. Do starostlivosti o chorého zapája aj rodinu chorého a snaží sa o zlepšenie kvality života umierajúcich.

Termín **„HOSPIC“** je odvodený od latinského slova hospitium, čo znamená pohostinnosť, tiež prejavy pohostinnosti aj dočastný pobyt. Chápe sa ako špeciálne zdravotnícke zariadenie kde sa vykonáva hospicová starostlivosť.

HOSPIC – chorému garantuje že nebude trpieť bolesťou, bude vždy rešpektovaná jeho ľudská dôstojnosť a v posledných chvíľach nezostane osamotený.

Čo je na hospici zvláštne? Bez ohľadu na vek a stav pacienta sa zameriava na komplexnú starostlivosť v terminálnom štádiu, kde cieľom nie je vyliečenie ale liečenie. Snaží sa o odstránenie utrpenia s dôrazom na kontinuálnu kontrolu bolesti, upredňostňuje kvalitu života v čo najviac možnej fyzickej, duševnej a psychickej pohode so sústredením sa na plné prežívanie života. Chorí sú motivovaní, aby zostali aktívni tak, dlho pokiaľ sú schopní zúčastňovať sa činností, ktoré obľubujú, učiť sa robiť niečo, po čom túžili, zameriavať sa na zvýšenie kvality života. Program poskytuje úľavu pre tých, ktorí sa starajú o svojich blízkych a pritom zanedbávajú svoje vlastné potreby.

Z uvedeného vyplýva, že HOSPIC je pre zomierajúceho pacienta a jeho rodinu veľkým komfortom.

Hospicová starostlivosť – je centrálne riadený program paliatívnej starostlivosti, cielene zameraný na zmiernenie symptómov choroby u terminálne chorých, u ktorých je prognosticky stanovené pravdepodobné prežívanie v maximálnom rozsahu 6 mesiacov (definícia WHO).

Formy hospicovej staostlivosti:

Domáca (Home Based) – pre chorého ideálna, ale nie vždy dostačujúca. Predpokladá určitú úroveň rodinného zázemia, ktoré často chýba, alebo sa dlhou službou chorému členovia domácnosti unavia, alebo je ošetrovanie touto formou pre rodinných príslušníkov príliš náročné.

Stacionáre – denné pobyty sú obvykle súčasťou hospicov. Pacient je prijatý najčastejšie ráno alebo odpoludnia a večer sa vracia domov. Tento spôsob prichádza do úvahy len u chorých z blízkeho okolia hospicu, ak u nich nepostačuje domáca starostlivosť.

Inštituciovaná – ložková hospicová starostlivosť – aktuálna je vtedy, ak vyššie spomenuté formy starostlivosti nestačia, alebo nie sú vôbec k dispozícii. V prípade zlepšenia stavu chorého a ak je možnosť postarať sa o chorého v domácej starostlivosti je možný jeho návrat domov.

Mobilné hospice – návštevná služba lekára, sestry a podľa potreby ďalších zdravotníckych pracovníkov v domácom prostredí pacienta s nevyliečiteľným ochorením alebo umierajúceho pacienta.

Optimálny počet lôžok v hospicovej starostlivosti je 15-25. Súčasťou vybavenia je spoločenská miestnosť a pietna miestnosť.

Hospicový team tvoria:

- samotný pacient a jeho rodina
- lekár, lekár so špecializáciou
- sestry, sestry so špecializáciou
- asistenti výživy
- zdravotnícky asistenti
- maséri

- sanitári
- sociálny pracovník
- psychológ
- duchovný
- dobrovoľníci

Žiaľ hospicov u nás je veľmi málo a vzniku nových bránia predsudky ľudí, nedostatok informácií, nezáujem...
K najznámejším hospicom na Slovensku patrí:
Mobilný hospic sv. Kataríny Labourne – Bratislava,
Hospic Bardejovská Nová Ves,
Hospic Milosrdných sestier – Trenčín,
Hospic Trstice,
Hospic sv. Alžbety,
Detský hospic Plamienok.

II. Etické a právne aspekty umierania.

Umieranie je postupné a nezvratné zlyhávanie životne dôležitých orgánov s následkom smrti. Je to časovo dlhší úsek, nie jeden okamih.
Môžeme ho rozdeliť na tri fázy:
pre finem – dlhá fáza, trvá mesiace až roky. Človek prechádza zmierovaním s chorobou, stratou zamestnania, poklesom v ekonomickej oblasti a modifikácii interpersonálnych vzťahov.
in finem – ritualizácia smrti – poriadok obradu.
post finem – starostlivosť o mŕtve telo, starostlivosť o pozostalých, komercionalizácia smrti.

Viaceré teoretičky **(E:Kubbler – Rossová, Haškovcová)** vo svojich štúdiách ktoré získali na základe pozorovania a rozhovorov s pacientmi poukazujú na to, že v etape zomierania prechádza človek tzv**. „dráhou smrti“-** určitými fázami prežívania. Poukazujú aj na to, že dôležité sú tiež reakcie opatrujúceho človeka v jednotlivých fázach umierania.
1. fáza – je to reakcia umierajúceho na osud, prežíva to ako šok, najmä ak ide o náhodné odhalenie alebo podozrenie niekoľkodňových obáv. Správanie je často impulzívne, nekontrolovateľné, je zvýšené riziko samovraždy.
Reakcie opatrujúceho:
- rešpektovať pacientovo popieranie, nepodporovať ilúziu pacienta, akceptovať a chápať jeho správanie, musíme byť úprimní a na nič sa nehrať, vedieť čakať, chápať chorého a akceptovať ho, aj keď sa nezhodujeme s jeho názormi, pomáhame pacientovi spracovať negatívnu správu.

2. fáza – začínajúce sa vyrovnávanie, zmierovanie sa pacienta s osudom. Môže sa navonok prejavovať agresivitou. Umierajúci sa bráni vzniknutej situácii, výbuchy zlosti sa obracajú voči okoliu a blízkym ľuďom. Pacient je nespokojný so starostlivosťou, pochybuje o liečbe, je neprívetivý na svojich blízkych. Hnev umierajúceho sa často obracia dovnútra – sklon k sebatrýzneniu, sebatrestaniu.
Reakcie opatrujúceho:
- nemá sa cítiť osobne napadnutý, má akceptovať pacienta, chápať emocionálne výbuchy hnevu a chápať to ako „volanie o pomoc“ a pochopiť, že vyvierajú z bezmocnosti človeka odsúdeného na smrť. Vôbec tu nemá miesto agresivita. Je potrebné strážiť si svoje reakcie, ovládať svoje vystupovanie. Dôležité je pozdvihnúť pacientovu sebaúctu, ukázať mu, čo všetko ešte môže urobiť. dôležité je vedieť povedať a dať mu pocítiť, že sme s ním.

3. fáza – blúdenie umierajúceho medzi nádejou a istotou. Umierajúci človek pozná nezvratnosť svojej situácie ale ešte stále si tento fakt nepripúšťa. Snaží sa dávať si sľuby do budúcnosti, kontroluje svoju liečbu len aby si zachoval „dlhší život“.
Reakcie opatrujúceho:
- správať sa s pochopením, ale nesúhlasiť s pacientovými špekuláciami. Umožniť mu získať pocit vlastnej hodnoty v očiach lekárov, sestier a príbuzných.

4. fáza – závisí od telesného stavu pacienta. Ak ho opúšťajú telesné sily skôr pochopí nezvratnosť osudu. Vzdáva sa nereálnych nádejí a výhovoriek. Môže sa objaviť depresia, ktorá vyvoláva smútok nad tým, čo musí opustiť, ale zároveň sa začína lúčiť s ľuďmi, ku ktorým mal nejaký osobný vzťah. Pacient sa uvoľňuje, odpútava od svojich väzieb a depresívna nálada ho núti, aby požiadal o ukončenie utrpenia.
Reakcie opatrujúceho:
- pomôcť pacientovi vyrovnať sa s osudom a správne reagovať na jeho požiadavky.

5. fáza – akceptácie, neprežívajú ju všetci pacienti.

Našim cieľom by malo byť dosiahnuť u umierajúceho fázu zmierenia – akceptácie. Nie je to nemožné, ale nepodarí sa to dokázať u každého. Chorí sa nezbavili strachu ale prijali konečnosť svojho života.

Fázy aj keď sú rozdelené sa nemusia vyskytovať v takom poradí ako sme opísali. Môžu sa opakovane vracať, striedať a prelínať sa navzájom. Pacienti, ktorí prijali svoj kríž, získavajú veľmi osobitý výraz vyrovnanosti a pokoja.

Pri svojej práci si musíme uvedomiť, že aj umierajúci pacient má svoje práva, ktoré sú zahrnuté v **Charte práv pacientov čl. 8 – „Starostlivosť o nevyliečiteľne chorých a umierajúcich**".

Pacient má právo na:
- úľavu a zmiernenie bolestí, spôsobmi ktoré zodpovedajú súčastným vedomostiam a možnostiam zdravotnej starostlivosti o umierajúceho,
- na humánnu starostlivosť,
- aby ho v posledných chvíľach života sprevádzala osoba podľa jeho želania,
- na dôstojné umieranie,
- nebyť klamaný,
- na nádej a nezáleží na tom, že sa mení jeho životná perspektíva,
- vyjadriť svoje pocity a emócie týkajúce sa starostlivosti o neho,
- na dôsledné rešpektovanie písomnej žiadosti nebyť resuscitovaný alebo odmietnuť aplikáciu liečebných zákrokov a postupov.

Etika starostlivosti o umierajúceho pacienta rešpektuje 4 základné etické princípy:
AUTONÓMIA, BENEFICIENCIA, NEŠKODIŤ, SPRAVODLIVOSŤ.

autonómia – rešpektovanie indivídua, právo sebaurčenia, samorozhodovania, právo na pravdu, právo robiť rozhodnutia a konať.
beneficiencia – princípom je, že zdravotník je zodpovedný za dobro pacienta.
neškodiť – zdravotnícky pracovníci sa musia vyhnúť všetkému, čo pacienta ohrozuje a chrániť ho pred tým – pacienta nevystavujeme zbytočnému utrpeniu,
spravodlivosť – rovnaká možnosť na starostlivosť u všetkých pacientov bez rozdielu.

III. Ošetrovateľská starostlivosť o umierajúceho **pacienta**.

Pri starostlivosti o umierajúceho pacienta musíme uspokojovať všetky jeho potreby – primárne, sekundárne, ale musíme najmä pamätať na holistický prístup k pacientovi. Priorita potrieb sa v priebehu choroby mení. Úlohou ošetrujúceho personálu je, aby sám zistil aká potreba je pre pacienta v dannej chvíli prioritná.

Ošetrovateľská starostlivosť je zameraná na uspokojovanie:

1. Biologických potrieb:
- pravidelná hygiena
- predchádzanie zápachu
- polohovanie, prevencia preležanín
- podávanie stravy a tekutín – strava teplá, esteticky upravená, zvlhčovať ústa, pravidelná hygiena dutiny ústnej
- zabezpečenie parenterálnej výživy, ak nemôže prijímať ústami
- sledovanie vyprázdňovania
- zabezpečenie kvalitného spánku – zabezpečí zmiernenie bolesti, úprava prostredia, odstránenie rušivých vplyvov
- zabezpečenie komfortu a pohodlia
- zabezpečenie súkromia pri ošetrovaní

2. Psychických potrieb:
- zamerané na zmierňovanie, odstránenie bolesti
- dodržiavame zásadu chorému psychicky neuškodiť a čo najviac mu záver života uľahčiť
- ubezpečiť pacienta, že jeho bolesť zvládneme, bude rešpektovaná jeho dôstojnosť a že ho v nijakom prípade neopustíme
- primeraná komunikácia – verbálna aj neverbálna

3. Potrieb lásky a spolupatričnosti:
- zabezpečenie návštev, prítomnosť priateľov a blízkych, prítomnosť osoby, ktorú má pacient najradšej
- zaistenie náhradných väzieb

- odhaliť rizikovú osobu, ktorá pacienta rozruší a spôsobí zhoršenie jeho zdravotného aj psychického stavu
- láska, nádej, smiech

4. Kultúrnych potrieb:
- zamerané na estetiku prostredia, teplotu, vlhkosť, vetranie, odstránenie ruchov prostredia
- zabezpečenie sledovania TV, počúvanie rozhlasu, čítanie dennej tlače – všetko závisí od momentálneho stavu pacienta

5. Sociálnych potrieb:
- zmiernenie sociálnej izolácie, účinná komunikácia s pacientom
- zabezpečenie sociálnych kontaktov

6. Potrieb istoty a bezpečia:
- tieto potreby medzi umierajúcimi dominujú

7. Duchovných a spirituálnych potrieb:
- duchovné potreby nie sú len o návšteve kňaza a o poskytovaní sviatostí, ale sú najmä zamerané na:
- hľadanie zmyslu,
- pocit odpustenia,
- potrebu lásky,
- potrebu nádeje

– je potrebné, aby sme sa vyvarovali ignorovaniu duchovných potrieb ale aj ich vnucovaniu.
Chorých nesmieme obracať, ale milovať:
„ **Kedysi som si myslela, že musím ľudí obracať. Dnes viem, že ich musím milovať a obracať si ich bude Pán!“**
— Matka Tereza

Starostlivosť o nevyliečiteľne chorých by mala byť komplexná, pretože zomieranie je multidimenziálna a multifaktoriálna skúsenosť pre človeka, ktorého život sa chýli ku koncu a našou snahou by malo byť zabezpečenie čo najvyššej kvality života.

K otázke, aký má byť či nemá byť zdravotnícky pracovník, sa dokáže vyjadriť každý. A práve starostlivosť o umierajúcich pacientov je intímne spojená s požiadavkami na sebautváranie a sebaformovanie osobnosti sestry. Len sestra dokáže počúvať, potešiť a uľahčiť v tom najťažšom období choroby – v jej konečnej fáze. Umierajúceho pacienta nezaujímajú naše odborné vedomosti, ale naše správanie a náš postoj.
Ak má byť starostlivosť o umierajúceho pacienta správna a etická, musí byť úplná. Realizuje sa v troch rovinách.
- biologická rovina terminálnej starostlivosti,
- psychologická rovina terminálnej starostlivosti,
- sociálna rovina terminálnej starostlivosti.

Sestra musí byť:
Autentická – to znamená, že sa nebude skrývať za profesionálne postoje a predstierať emócie ako radosť, optimizmus napriek zhoršujúcemu sa stavu pacienta, ale bude úprimná so svojimi slabými stránkami a osobitosťami. Otvorene hovorí o svojich pocitoch neistoty a úzkosti, čím pacienta povzbudí, aby o svojich obavách hovoril otvorene. Pacient má cítiť záujem o seba.
Úprimná – pacientovi má hovoriť vždy pravdu, aj keby to mala byť len neúplná pravda. V prípade podrobných informácií mu odporučiť rozhovor s lekárom. Je diskutabilné, či povedať pacientovi pravdu, alebo nie. Spôsob podania pravdy musí byť taktný a šetrný – musí akceptovať pacienta takého aký je. Nesmie pacienta poučovať a hodnotiť jeho reakcie ale tolerovať ich.
Trpezlivosť, úctivosť a láskavosť sú ďalšie predpoklady ktoré by mala mať sestra. Umierajúci pacient má veľa otázok na ktoré treba odpovedať, trpezlivo ho počúvať aj keď nepoznáme osoby alebo príbehy o ktorých hovorí. Samozrejmosťou by mal byť pozdrav pri vstupe a odchode z izby pacienta.
Musí zaobchádzať s pacientom **ako s** partnerom – rešpektuje jeho individualitu, osobnú autonómiu a intimitu. Umožniť mu, aby rozhodoval o niektorých detailoch svojho života. Nikdy ho nesmie zosmiešňovať alebo obracať na žart jeho výroky a problémy.
Empatická a asertívna
Na záver mi dovoľte, aby som sa Vám prihovorila prosbou umierajúceho pacienta:
- keď ku mne prídete aj napriek tomu, že viete, čo všetci vieme – že umieram,
- keď ku mne prídete, aj keď reprezentujete profesie, ktoré zlyhali v zabezpečení môjho uzdravenia,
- keď ku mne prídete a veríte vo mňa, uzdravenie – neuzdravenie,
- keď so mnou trávite čas, hoci Vám to nemôžem vrátiť,
- keď ma beriete ako individualitu,

- keď si spomeniete na maličkosti, ktoré ma potešia, keď si spomeniete aj na mojich blízkych,
- keď sa zaujímate o moju minulosť a dokážete hovoriť o mojej budúcnosti,
- keď sa nesústredíte na moje nálady, ale na mňa ako na osobu,
- keď počujem svoju rodinu, ako pekne o Vás hovorí a raduje sa, že sme spolu,
- keď sa dokážete smiať a byť šťastní uprostred vašej ťažkej práce.

„Vtedy sa cítim vo vašich rukách bezpečný a nadobúdam **istotu, že zvládnem aj okamih smrti,keď ku mne príde.“**

73 Diskomfort umírajících a možnosti duchovní služby.

Prokop J. M.
III. LF UK Praha, DLBsH Rajhrad

„Duch muže snáší nemoc svou, ducha pak zkormouceného kdo snese?“ — *Přísloví 18,14*

V průběhu léčby a péče o pacienty, kteří umírají na onemocnění, které je dlouhodobě poutá na nemocniční lůžko, se pro nemocné otevírá možnost pro hlubší vnímání nemoci a všech doprovodných komplikací. Právě onen „volný“ čas dává pacientů prostor, jež při neustálém zápolení o uzdravení, neměli. Díky tomu je umožněno o pacientův komfort dbát ve zvýšené míře i oblastech, které nemohly být postihnuty v průběhu akutní péče v nemocnici. Tento čas věnuje pacient i mimo jiné přemýšlení nad sebou, o tom, jaká je jeho situace, co prožívá, co bude následovat. Myšlenky se vracejí, přehrávají se mu v mysli rozhovory, které vedl s lékaři a sestrami. Mnohdy dochází k tomu, že jsou ty to rozhovory desinterpretovány. Pacient tak začíná díky potlačení tělesných symptomů jako jsou zejména bolest, závratě, zvracení, komplikace trávícího traktu atd. pociťovat bolesti duchovního rázu – strach z toho, co bude a jak „to“ bude vypadat; úzkost z reakcí rodiny; odmítání toho, že musí zemřít; nudu. Tyto, a mnoho jiných pocitů, v sobě nese pacient, který žije při vědomí blízkosti smrti. Ze samotné podstaty našeho lidství, které je založeno na lásce člověka k člověku a oběti, plyne snaha pomoci člověku při zvládání těchto posledních chvil života.

Příčiny diskomfortu umírajícího pacienta z hlediska starosti o jeho psychicko-spirituální oblast mohou být rozličné. Nelze přesně vést mezi nimi jasnou hranici, protože člověk je vždy bytostí komplexní a hledat diference v důvodech jeho prožívání lze jen čistě teoreticky. Základní otázka péče o terminální pacienty (i z hlediska duchovní služby) je: Co skutečně umírající člověk chce? Při orientačním průzkumu, který je prováděn v rámci diplomové práce Ošetřovatelská péče v souvislosti s potřebami umírajících Bc. Magdalénou Pavlovou (ZSF JU), se objevují zajímavé výsledky. Pacient hledá především lidskost! Přehnaná „sterilnost“ vztahů vůči umírajícím není chápána pozitivně, zároveň touží po pozornosti, přítomnosti, účasti a projevu lidského citu ze strany zdravotníků. To jsou věci, které se dají jen velice těžko naučit a zdravotník k nim musí být systematicky veden, ale i k nim osobně dorůst. Splnění této základní podmínky lidskosti může výrazně usnadnit komunikaci o psycho-spirituálním diskomfortu pacienta. Pacient se cítí být přijatý a snadněji se otevírá se svými „bolestmi“, které jsou podložené skutečnou výpovědí pacienta, nikoliv pouze domněnkou zdravotníků. Duchovní služba je v tomto kontextu povolaná ke třem základním oblastem úkolů v péči o terminálně nemocné pacienty: má sloužit v existenciálních, spirituálních a náboženských oblastech trpícím a těm, kdo o ně pečují. Toto je základní vymezení duchovní služby podle Evropských standardů pro kaplanství ve zdravotnictví (2002). To, že duchovní služba má být prospěšná i zdravotníkům, kteří v nelehkých podmínkách vykonávají velmi fyzicky i psychicky namáhanou práci, ponechme stranou a soustřeďme se na ony tři oblasti péče – existenciální, spirituální a náboženskou. Jaký diskomfort může pociťovat pacient a jak na něj reagují samotní zdravotníci nebo pracovníci duchovní služby?

Existenciální potíže – existenciální otázky pacienta jsou primárně tázáním po smyslu nemoci, utrpení a smrti. Táže se po příčině svého onemocnění – proč zrovna on; čím to zavinil; nemoc je nespravedlnost, protože nikdy nikomu neublížil; atd. Také hledá vysvětlení utrpení, které mnohdy pro něj nemá žádný smysl a tudíž jej neakceptuje. Často se objevuje strach ze smrti – člověk nechce zemřít, nepřijal smrt jako součást života, snaží se jí za každou cenu vyhnout. Často je touto myšlenkou tak paralyzován, že prakticky nemá možnost prožívat jiné události svého současného života, myslí jen na smrt. Role duchovní služby se zde rozšiřuje na všechny pacienty, ať jsou nebo nejsou tzv. „věřící“. Hlavní úkol je v naslouchání a v akceptaci (přijetí) člověka, který je zmatený ve své současné situaci – dát mu pocítit, že je někdo, kdo chce slyšet jeho stesky, pochybnosti, strachy. V aktivní rovině intervence se snaží pacienta vést k pochopení a přijetí stávající situace a pomáhá mu vyrovnávat se s novým prostředím jak vnějším (nemocnice a její režim), tak i s rozkladem dosavadních představ a cílů života. Zdaleka se však tento cíl nedaří dosahovat u každého pacienta. Hlavní podmínkou je, že pacient musí sám chtít změnit své duchovní nastavení a pohled na svůj život, což je často nepřekonatelná překážka.

Spirituální diskomfort – je velice těžké definovat, co všechno může být spirituálním diskomfortem. Pochopitelně se spirituální oblast překrývá s existenciální a náboženskou. Prakticky se snažím zařadit do této kategorie pocity a prožitky spojené s transcendentnem každého jedince. Spiritualita jako neuvědomělá i uvědomělá složka lidskosti hledá nejen vnitřní kontinuitu v podobě důvodů/příčin a následků – kauzality a smyslu, ale i navázání člověka na přesažnost (transcendenci) pouhé pozemské existence. Konkrétní otázky pacienta: co bude „po tom“; čím jsem komu ublížil (i sobě) a jak to mohu napravit, když již prakticky nemohu nic udělat; cítí se být ukřivděný/někdo mi ublížil a já mu nechci odpustit; atd. Úkol duchovní služby je jasný. Cílem je, aby byl člověk smířený sám se sebou a se světem. Je třeba podnítit v člověk touhu po tomto usmíření, protože je to jediný způ-

sob, jak získat do své duše klid. Je to klid (vnitřní vyrovnanost), který je podkladem pro tzv. dobré umírání. Metody práce volí každý člověk, který se účastní duchovní služby, individuálně. Jsou odvislé od školení, duchovního života a osobnosti jedince.

Náboženské překážky – vyskytují se u pacientů, kteří praktikují konkrétní náboženství a nebo k němu hledají cestu. Většinou jsou to problémy pramenící z nesprávného pochopení nauky jednotlivých náboženských směrů, případně z porušení vnitřních pravidel a norem daného náboženství. Konkrétní otázky – mohu dosáhnout spásy, když jsem rozvedený a žiji v druhém manželství; jak se připravit na svátost smíření, když jsem již léta nepraktikoval; není pokrytectví vracet se k Bohu ve chvílích krize, když jsem jej celý život „nepotřeboval“ atd. Duchovní služba v tomto případě zasahuje do náboženských otázek jednotlivých denominací. Je třeba pečlivě rozlišovat mezi náboženstvími a držet se tradice, kterou pacient vyznává. Cílem není přesvědčování na „jinou víru“, ale začlenění se do pacientovy náboženské představy, prohlubovat ji a v ní s ním spolupracovat. Velkou roli hraje náboženská edukace – vysvětlování rituálů, příprava na ně, atd. (vše je časově závislé na vývoji onemocnění). Finální podobou je zprostředkování náboženských úkonů od duchovních vlastního náboženství. Podle povahy náboženského úkonu věřící trvá a nebo netrvá na duchovním vlastní náboženské obce. Vždy to záleží na domluvě s pacientem případně s příbuzným, jestliže pacient není schopen se vyjádřit.

Duchovní služba v nemocnici, zejména u umírajících pacientů, je nutnou součástí komplexní onkologické péče. Nelze si představit kvalitní dlouhodobou léčbu bez spirituálního rozměru. Pacientům pomáhá na několika úrovních psycho-spirituálního vyrovnávání, tím usnadňuje a zaštiťuje proces umírání. Neopomenutelné je i odstraňování některých diskomfortů somatické léčby. Nelze však očekávat, že by každý pacient prostřednictvím této služby dosáhl smířeného úmrtí.

74 Lze standardizovat postupy v péči o umírajícího pacienta?

Beránková B., Beděrková I., Vaňásek J.
Komplexní onkologické centrum, Krajská nemocnice Pardubice

Úvod

Zamyslet se nad problémem umírání znamená zamyslet se nad tak důležitými vlastnostmi jako je etika, lidství, důstojnost i individuální kvalita každého člověka. Proto by úkolem zdravotnického pracovníka měla být spolupráce s nemocným v zápasu s jeho chorobou.

Lidé v těžkém úskalí choroby vystřídají typické způsoby chování. Ale i Ti, kdo jsou jim nablízku, prožívají podobné pocity a také se i podobně chovají.

Složité a především psychicky vysoce náročné jsou setkání s nemocnými v terminálních fázích choroby a jen ten, kdo z nás zdravotníků dokáže pomoci v tomto těžkém období podpoří pacienta v jeho složitém boji a bytí, jen ten, kdo nebude kolem něj pospíchat, je profesionálem.

Charakteristika terminálních fází nemoci

A/ Období prae finem

Jde o časově neomezené období od stanovení základní diagnózy, která však člověka ohrožuje na životě. V této době se setkáváme buď se všemi, nebo jen s některými fázemi nemoci. Avšak v tomto údobí je nejpodstatnější předcházet smrti psychické a sociální před smrtí biologickou.

Standardní navržené postupy:

1) Podporovat členy rodiny a blízké, aby nezanedbávali dosud existující vztahy
2) Naslouchat nemocnému
3) Registrovat a akceptovat vyjádřené emoce a dešifrovat jeho sdělení
4) Povzbuzovat nemocného a podporovat jeho naději
5) Být autentičtí a empatičtí
6) Vést nerušený a nedirektivní rozhovor
7) Povzbuzovat nemocného při vyjadřování lítosti, beznaděje
8) Umožnit kontinuálně návštěvy blízkých i přátel
9) Zprostředkovat kontakt s duchovním na přání klienta
10) Dodržovat Kodex práv pacienta

B/ Období in finem

V tomto období jde o stav, kdy hovoříme především o tzv. bezprostředním umírání, týkající se celého okolí, nejen nemocného. Jakýmsi standardem by mělo být zprostředkování přítomnosti příbuzných u lůžka často i trvale. Je třeba umožnit nemocnému zbavit se strachu, osamělosti, deprese, udržovat sebedůvěru, sebeúctu i důstojnost a především pak zabezpečovat fyzickou i psychickou pohodu.

Jde o období podpory lásky a naděje s poskytováním sociální, emocionální a duchovní potřeby i podpory nemocnému.

Standardní navržené postupy:
1) Zprostředkování přítomnost příbuzných u lůžka nemocného často případně trvale
2) Věnovat více času nemocnému, nepoučovat jej
3) Umožnit zbavení strachu, osamělosti, deprese
4) Zabezpečit fyzickou i psychickou pohodu
5) Podporovat potřebu lásky a naděje
6) Poskytnout sociální, emocionální a duchovní potřeby
7) Poskytnout emocionální podporu příbuzným
8) Zajistit kulturu umírání, nerušenost a kultivovanost prostředí
9) Dodržovat Kodex práv pacienta

Nutit nemocného ke konverzaci za každou cenu je zcela nevhodné.
V této fázi je důležité mít na zřeteli pozitivní sílu ticha a realizování tiché asistence v blízkosti umírajícího.

C/ Období post finem
Volání po důstojném umírání a důstojné smrti je přiměřenou reakcí na neutěšenou situaci těch, kteří se nacházejí na konci své životní cesty. Umírající stále méně hovoří, protože slova ztrácejí důležitost.

Diskuse a závěr
Styk s umírajícím pacientem, styk s jeho strádající rodinou představuje pro zdravotníka ty nejtěžší okamžiky.
Projev úcty hrdinnému výkonu, heroickému činu – statečný boj nemocného s chorobou, je naší morální povinností. Setká-li se bojující pacient s někým, kdo vzdor všemu vidí v jeho statečném boji s nemocí projev hrdinství, může mu takový projev úcty být pomocí a povzbuzením ve chvíli beznaděje.
Je třeba zdůraznit, že na rozdíl od jiných oborů, kde je pacient vyléčitelný prakticky téměř ve všech případech, pak my v oboru onkologie musíme považovat za úspěch, pokud u generalizovaných stavů můžeme život prodloužit, byť jen o určitý časový úsek, avšak nikdy ne na úkor kvality života.

Báseň i život se nehodnotí podle délky, ale podle kvality.
— Seneca

Seznam použité literatury

1. Vorlíček, J., Adam, Z., et al1.: Paliativní medicína, Grada Publishing, Praha, 1998
2. Kolierová, B., et al: Ošetřovatelství, Osveta, Martin,1995
3. Haškovcová, H.: Lékařská etika, Galén, Praha,1994

75 Spisovatel Jan Zábrana – z deníku onkologického pacienta.

Holub N., Přikrylová M.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Významný český básník, prozaik a překladatel Jan Zábrana (1931 – 1984) onemocněl ve svých třiapadesáti letech karcinomem pankreatu, kterému brzy po stanovení diagnózy podlehl. Zábrana si od roku 1970 vedl soustavně deník a pokračoval v jeho psaní i za hospitalizace v Motole a na Karlově náměstí. První nemocniční zápis pochází ze 17. května 1984, poslední záznam si Zábrana učinil koncem července 1984, měsíc před smrtí. Tento deník byl autorem zamýšlen především jako literární dílo a dokumentární artefakt, nikoli jako nástroj léčebného dialogu s potenciálním psychologem nebo psychiatrem, jak je tomu zvykem v psychoterapii.
Zápisky z nemoci ukazují mimo jiné dobu, kdy se infaustní diagnózy nemocným většinou nesdělovaly [1], nicméně inteligentní pacient si z různých náznaků a indicií mohl vytvořit svůj vlastní obraz choroby.

Laparoskopie proběhla celkem dobře. Samozřejmě. to, co mi říkají, že zjistili, nemusí být to, co zjistili. /./ Tady se říká umírajícím pacientům: „Za tři dny půjdete domů. To je jen taková přechodná slabost.“ Když to vidím a slyším, nejsem nějak s to *se nadchnout nad sdělením, že ta včerejší laparoskopie dopadla dobře, rozptýlila jejich obavy, že jsou tam jen nějaké srůsty po dávné operaci žlučníku, jen nějaké nezávažné věci.* [2]

Přestože pacientovi nebyla explicitně sdělena diagnóza neléčitelného maligního onemocnění, sám intuitivně vycítil podle svých tělesných příznaků, že onemocnění je velmi vážné:

(…) *A jestli je načase umírat, spánembohem. Když už život je jen k* pozorování, *když je jen věčné ubývání, co s* ním. [3]

První zápis po převozu k Ripkovi. *Špatné dny. Bolesti. Odpor k* jídlu. *Absolutní zesláblost. Jestli v* tom *do týdne, do deseti dnů nenastane nějaký obrat k* lepšímu, *chtě nechtě to budu muset vzdát: nebudu prostě mít sílu bránit se dál.* [4]

Umírající pacient senzitivně vnímá rušící prvky:
Já, člověk jako já si představuje peklo jako místnost plnou lidí, ve které je neustále zapnutý televizor a z níž *je na jediný okamžik zakázáno odejít.* [5]

Publikované deníky J. Z. také ukazují, jak je důležité mluvit s nemocným co nejsrozumitelněji a nezahlcovat ho odbornými termíny:
Ráno na vyšetření u docenta Friče (rcf) (…) [6]

Uváděná zkratka *rcf* bude bezesporu znamenat ERCP, tj. endoskopickou retrográdní cholangiopankreatografii, tedy vyšetření indikované právě při diagnostice onemocnění slinivky.

Svou roli při interpretaci některých záznamů bude hrát i fenomén přenosu, neboť Zábranův podvědomý postoj k lékařům byl přinejmenším ambivalentní. Tato rozporuplnost vycházela z tragédie, která se odehrála v Zábranově dětství: jeho mladší sestra zemřela při narození v humpolecké nemocnici, což nemohlo nezanechat trýznivé stopy v rodinné atmosféře a přinejmenším narušilo důvěru v lékaře obecně.

Při čtení Zábranových deníků z nemocnice musíme brát v úvahu i básníkovo předchorobí: několik prodělaných depresivních epizod posléze zchronifikovalo v trvalou depresi [7], jež ovšem nebyla diagnostikována. Vstupoval tedy do těžkého období umírání již apriorně smutný, unavený, pesimistický, rozhněvaný a nesmířený. Deprese, ať již premorbidní nebo reaktivní v rámci příslušné čtvrté fáze dle Kubler-Rossové [8], mohla ovlivnit i jednu z pozdních reflexí:

Peklo je víc nekonečná beznaděj než nekonečná bolest. [9]

Poslední, preterminální záznam, zoufale vulgární dvouverší *Kdepak, to není ono. / Hovno je vždycky jenom hovno.* [10], je nutno brát v kontextu předchozí Zábranovy umělecké tvorby, zároveň je i srdceryvným výkřikem předčasně umírajícího člověka.

Literatura

1. Haškovcová H.: Thanatologie, Galén 2000, 46
2. Zábrana J.: Celý život, TORST 2001, 1030
3. Tamtéž, 1032
4. Tamtéž, 1039
5. Tamtéž, 1045
6. Tamtéž, 1045
7. Holub N.: „Na bolest myslel jsem a našel na ni lék“, in Bítov 99, Petrov 2000
8. http://www.hospice.cz/hospice1/data/_hospic_umeni.html
9. Zábrana J.: Celý život, TORST 2001, 1046
10. Tamtéž, 1046

X.
Onkologická rizika

76 Potencionální riziko vzniku nádoru – radiační zátěž při diagnostickém ozařování v ČR.

Válek V., Borek P.
Fakultní nemocnice, Brno

Ze zákona (§63 odst. 1 vyhlášky č. 307/2002 Sb.) musí mít každé radiologické pracoviště „ Místní radiologický standard“ a to pro každý výkon a každý RTG přístroj zvláště. Vyšetření by pak na pracovišti měla být prováděna od 1.1.2005 podle tohoto standardu. Na základě této standardizace se pak dá vypočítat dávka a posoudit, zda vyšetření bylo standardně provedeno. Cílem pracoviště by mělo být dávku při diagnostickém ozáření snižovat na nezbytné minimum a pravidelně porovnávat s místními a národními radiologickými standardy. Na pracovišti by mělo probíhat porovnávání zaznamenaných veličin s diagnostickými referenčními úrovněmi (DRÚ) (podle vyhlášky č. 307/2002 Sb.).

Tyto místní standardy (pokud je vůbec pracoviště má) vykazují celou řadu nedostatků a v podstatě nejsou použitelné. V případě soudního sporu by odborně naprosto neobstály.

Pracoviště mají dále za povinnost zaznamenávat hodnoty (vyhláška SÚJB 307/2002 Sb. ve znění vyhlášky č. 499/2005) a na základě kterých na pracovišti vypočítávají dávku. Většina pracovišť ale zaznamenává pouze některé údaje. K výpočtu dávky (ať již efektivní dávky nebo dopadající kermy) je nutné znát další např. hmotnost a výšku pacienta, vzdálenost ohnisko – kazeta, stůl – kazeta.

Místní standardy by měli odrážet návrhy a doporučení národních radiologických standardů. Ty prošly rozsáhlým připomínkovým řízením. Byly projednány na výboru RS ČLS JEP a schváleny na mnoha úrovních a prověřeny během klinických auditů.

Byť vše výše uvedené by mělo být postupně realizované od 1.1.2005, je smutnou skutečností, že:

1) Místní standardy nejsou k dispozici v použitelné formě téměř na žádném pracovišti. Lze očekávat, že většina RTG pracovišti v ČR včetně soukromých ani netuší, že od 1.1.2005 tuto povinnost mají.
2) RTG přístroje umístěné mimo radiologická pracoviště jsou často ovládané nezaškolenými pracovníky (v podstatě laiky) bez odpovídající kvalifikace, kteří ozařují nemocné bez jakýchkoliv omezení a podobně jako někteří lékaři před 200tě lety ani netuší, že může být pro nemocného záření škodlivé.
3) Klinická odpovědnost za ozáření nemocného je chápaná (a v legislativně formulovaná) na různých místech legislativy zcela odlišně. Pouze na RTG pracovištích, kde je 24 hodin denně přítomen radiolog je tato odpovědnost vnímaná jako povinnost radiologa kontrolovat správnost indikací vyšetření, místo RTG výkonů doporučovat nerentgenová vyšetření (ultrazvuk, magnetická rezonance), kontrolovat, zda nedochází k opakování vyšetření a zbytečnému ozařování nemocných.
4) Nejen toto vede k tomu, že ochrana nemocných před zářením, snaha minimalizovat dávku a omezit zbytečná vyšetření je i v přímo řízených zdravotnických zařízeních považovaná velmi často za naprosto zbytečnou.
5) Velký problém je, že v ČR nikdo nekontroluje a nesleduje, jaký je rozdíl v ozáření nemocných mezi nemocnicemi (jako např. počet komplikací u výkonů). MZ ČR s výjimkou této akce za předchozích vedení na tuto činnost zcela rezignovalo.
6) Vyšetření jsou pouze výjimečně standardizovaná a proto existují velké rozdíly mezi kvalitou a náklady na stejná vyšetření (např. použití kontrastních látek). Výsledek je, že nemocný za stejné pojištění dostává naprosto rozdílnou kvalitu vyšetření.
7) Stejně tak je při srovnání nemocnic u stejných vyšetření až několikanásobně rozdílná dávka.
8) Rozdíly mezi počty RTG vyšetření na počty pacientů jsou mezi jednotlivými nemocnicemi značné.
9) Zdá se, že je v ČR na jedné straně nadbytek skiagrafických přístrojů, na druhé straně nedostatek CT a MR přístrojů. To vede jak ke zvyšování radiační zátěže populace, tak k vyhazování prostředků z veřejného pojištění. Morální zastaralost mnoha skiagrafických přístrojů je enormní.

Toto chmurné shrnutí stavu reflektuje text: Berrington de González A., Darby S.: Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and14 other countries. Lancet, 2004, 363, s. 345 – 351. Po tomto článku vyšly mnohé další a to jak v Evropě, tak USA, které potvrzují část údajů uveřejněných v roce 2004. Závěry lze shrnout do těchto bodů:

- nízkoenergetické záření není bezpečné
- neexistuje systematická snaha (ani v USA, ani v EU) snižovat počty RTG vyšetření a zátěž obyvatelstva
- diagnostické RTG záření může mít za následek vznik rakoviny a to až u několika procent z celkového počtu nádorů
- nové screeningové programy (celotělové CT, CT kolonografie) mohou mít i velká rizika
- je nutné sledovat radiační úrovně, osobní dávky a kontinuálně se snažit dávky snižovat
- nové RTG metody neznamenají snížení dívky, často je tomu zcela naopak. Tedy nové metody zvyšují riziko vzniku rakoviny vyvolané diagnostickým ozařováním

Autoři ve svém sdělení hodlají diskutovat tuto problematiku ve světle legislativy ČR

77 Riziko vzniku sekundárních malignit u pacientů léčených pro Hodgkinovu nemoc.

Petráková K., Vyskočil J., Komolíková L., Novák J., Vyzula R.
Masarykův onkologický ústav. Brno

Úvod

V České republice se Hodgkinova nemoc (dg. C81) podílí na všech zhoubných nádorových onemocněních necelým 0,5%. Incidence čítá kolem 300 nových případů ročně, což představuje 2,9/100 000 mužů a 2,4/100 000 žen (r. 2003). V kontextu Evropy se incidence (věkově standardizovaná) pohybuje mírně nad průměrem. Podobně jako v ostatních evropských zemích má věkově specifická incidence dvouvrcholový obraz – s maximy u mladých nemocných (ve věku 15-34 let, kde je jednou z nejčastějších malignit) a u pacientů nad 65 let. Úmrtí na Hodgkinovu nemoc (necelých 100 případů ročně) tvoří 0,3% všech úmrtí následkem zhoubného nádoru. Trend incidence i mortality v ČR má po období stagnace nyní mírně klesající charakter.

V roce 1963 prohlásil Easson Hodgkinovu nemoc za vyléčitelnou. Za posledních dvacet let bylo dosaženo velkých pokroků v léčbě Hodgkinovy nemoci. Pětileté přežívání pacientů v klinickém stádiu I. a II. bez negativních prognostických faktorů je 90-100%, v III. a IV. klinickém stádiu 50-70%. Se zlepšením výsledků léčby Hodgkinovy nemoci a prodloužením doby přežívání nabývají na důležitosti dlouhodobé nežádoucí účinky léčby. Součástí léčebných protokolů jsou radioterapie (RT) a kombinovaná chemoterapie (CHT) za použití alkylačních látek. V důsledku léčby můžeme u pacientů s odstupem času pozorovat sekundární malignity a vyšší výskyt onemocnění srdce a plic. Mortalita v důsledku nežádoucích účinků léčby za 12 až 15 let po léčbě může tak převýšit mortalitu v důsledku Hodgkinovy nemoci u pacientů v klinickém stádiu I. a II.

Příčina úmrtí při dlouhodobém sledování

Hodgkinova nemoc	33 – 41%
Sekundární malignity	26 – 35%
Kardiovaskulární nemoci	16 – 18%
Jiné příčiny	17%

Kumulativní mortalita v důsledku sekundárních malignit při době sledování 20 let je 20%, v důsledku kardiovaskulárních onemocnění 1,5% a v důsledku plicních onemocnění 2%.

Nejčastěji pozorovanými sekundárními malignitami jsou leukémie, non-Hodgkinské lymfomy, bronchogenní karcinomy, karcinomy prsu, žaludku, štítné žlázy a sarkomy. V současnosti umírá jeden z 6 pacientů léčených pro Hodgkinovu nemoc

v důsledku pozdních komplikací onkologické léčby.

Metody: Cílem naší retrospektivní studie byla kvantifikace relativního rizika vzniku sekundárních malignit u dlouhodobě přežívajících pacientů léčených pro Hodgkinovu nemoc na našem pracovišti a nabídnutí optimálního sledování. V letech 1956-1999 bylo v MOÚ léčeno celkem 886 pacientů, z toho 507 mužů a 388 žen. Pouze radioterapií (RT) bylo léčeno 354 pacientů, pouze chemoterapií (CHT) 324 pacientů, kombinací CHT a RT 208 pacientů s mediánem sledování 12 let. Medián věku pacientů v době diagnózy byl 34 let, medián věku v době diagnózy sekundárních malignit byl 54 let. V souboru jsme zaznamenali celkem 113 sekundárních malignit. 316 pacientů zemřelo v důsledku Hodgkinovy nemoci, 71 pacientů v důsledku sekundární malignity, což byla druhá nejčastější příčina úmrtí a 18 pacientů v důsledku ICHS, což byla třetí nejčastější příčina úmrtí.

Nejčastěji pozorované malignity

Karcinom prsu	16
Karcinom plic	25
Karcinom kolorekta	12
Karcinom žaludku	9
NHL	15

Relativní riziko (RR) pro jednotlivé skupiny jsme počítali jako počet SM na počet pacientů s RT/ počet pacientů bez RT.

RR pro vybrané skupiny

SM	RR
Karcinom prsu	4,55
Karcinom plic	1,26
Karcinom tlustého střeva	8,76
NHL	3,01

Závěr

Na základě sledování našeho souboru doporučujeme u všech pacientů po léčbě pro Hodgkinovou nemoc pravidelné dlouhodobé sledování. Pacientky léčeny původně RT metodou mantel, radioterapií na oblast axil nebo mediastina mají vyšší rizik vzniku karcinomu prsu a proto je doporučujeme zařadit do intenzivního screeningu (vyšetření pomocí zobrazovacích metod jednou ročně) nejpozději za 10 let od radioterapie. U pacientů léčených RT metodou obrácené Y, nebo RT na oblast břicha, doporučujeme pravidelné vyšetření haemokultem jednou za rok, eventuálně kolonoskopií, u žen navíc pravidelné screeningové gynekologické vyšetření. Pacienti po RT na oblast štítné žlázy by měli mít jednou ročně klinické vyšetření včetně sledování hladin TSH a fT4, eventuálně ultrazvukové vyšetření štítné žlázy a krku. V případě vzniku karcinomu prsu doporučujeme radikální výkon vzhledem k nemožnosti léčby pooperační radioterapií.

78 Zhoubné nádory ledvin v souvislosti s životním stylem a pracovním prostředím.

Navrátilová M., Vítová V., Vítová H., Marečková J., Babičová V., Boris P., Jarkovský J., Pavlík I., Foretová L.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Česká republika zaujímá incidencí zhoubných nádorů ledvin u dospělých osob výrazně první místo nejen mezi evropskými státy, ale i celosvětově. Nádory ledvin tvoří 4,3% všech zhoubných nádorů u mužů a 2,9% u žen. Incidence stále vzrůstá, hrubá incidence na 100000 obyvatel je u mužů 31,31 (standardizovaná 22,25), u žen 19,5 (standardizovaná 10,86).

Pro posouzení vlivů možných rizikových faktorů na vznik nádorů ledvin byla uskutečněna retrospektivní epidemiologická studie případů a kontrol.

Výsledky naší studie byly zahrnuty do mezinárodní multicentrické epidemiologické studie Central/Eastern Europe Case-Control Study of Kidney Cancer organizované IARC.

Do studie byli zařazováni pacienti s nově diagnostikovaným zhoubným nádorem ledvin hospitalizovaní v Masarykově onkologickém ústavu a ve FN U sv. Anny v letech 2000-2002. Diagnóza všech pacientů zařazených do studie byla stanovena histopatologickým vyšetřením.

Kontrolní skupinu tvořily osoby hospitalizované pro neonkologické onemocnění.

Řízeným rozhovorem byly od pacientů i kontrolních osob získány údaje o životním stylu a o zaměstnání. Údaje byly zaznamenávány tazatelem do jednotných dotazníků.

Soubor se skládá ze 165 pacientů s karcinomem ledvin (z toho je 109 mužů a 56 žen) a 169 kontrolních osob (z toho je 109 mužů a 60 žen).

Průměrný věk mužů při diagnóze byl 66,1 roku, u žen činil průměrný věk při diagnóze 69,0 roku.

Pacienti měli vyšší průměrnou **tělesnou hmotnost** ve věku 20 let než kontrolní osoby. U mužů byl rozdíl statisticky významný, u žen na hranici statistické významnosti. Průměrná tělesná hmotnost v době 2 roky před stanovením diagnozy nádorového onemocnění v souboru pacientů a kontrol se naopak nejeví jako významná.

Jako statisticky významná se jeví **hypertenze** u žen, prodělaná **renální kolika a zánět** ledvin u mužů.

Časté užívání **analgetik** zvyšuje riziko nádoru ledvin u žen téměř dvojnásobně.

Přesto, že **kouření** je považováno za zásadní rizikový faktor pro vznik nádorových onemocnění ledvin, nepodařilo se v našem souboru tuto skutečnost statisticky prokázat. Celkově v kontrolním souboru bylo dokonce více kuřáků než v souboru pacientů. Neprokázal se ani vztah mezi pasivním kouřením a karcinomem ledvin.

Spotřeba **alkoholu** byla zřetelně vyšší u pacientů, a to u mužů i žen, statistická významnost byla potvrzena u konzumace destilátů u mužů a jakýchkoli alkoholických nápojů u žen.

Z potravin se jeví jako významné **červené maso** a **mléko a mléčné výrobky**, obě skupiny potravin však překvapivě v dobrém slova smyslu, kdy jejich pravidelná konzumace snižuje v našem souboru riziko karcinomu ledvin na polovinu, stejně jako **zelenina** a **ovoce**. Ostatní sledované potraviny nevykazovaly statistickou významnost.

Při hodnocení expozice faktorům pracovního prostředí se ukázala jako statisticky významná **expozice emisím benzínových motorů, naftových motorů a dýmů ze spalování nafty**. Těsně nad hladinou významnosti zůstala expozice asfaltu a dýmů z černouhelného dehtu.

Pro závažnou rodinnou anamnézou bylo u 2 pacientů indikováno molekulárně genetické testování VHL genu. U jednoho z nich byl potvrzen von Hippel-Lindau syndrom.

79 Nespecifické záněty střevní jsou významnou a podceňovanou prekancerózou.

Šerclová Z., Antoš F.
Chirurgická klinika, FN Na Bulovce, Praha, přednosta: prof. MUDr F. Antoš, CSc

Kasuistická sdělení o možnosti vzniku střevního karcinomu v terénu nespecifického střevního zánětu (IBD) se v literatuře objevují více než 80 let. V roce 1925 byl poprvé popsán B.B. Crohnem karcinom rekta u nemocného s ulcerózní kolitidou. Dlouholeté trvání chronického střevního zánětu je obecně považováno za zvýšené riziko vzniku střevních malignit. Na závažnost tohoto rizika a přístup zejména k prevenci rozvoje pokročilých malignit u IBD se však názory chirurgické a především gastroenterologické mění.

Stejně jako u jiných střevních karcinomů je i u IBD primární terapií radikální chirurgická resekce a frekvence dlouhodobého přežití je závislá na stadiu maligního onemocnění. Střevní karcinom, včetně pokročilých stadií, se však u nemocných s IBD vyskytuje v mnohem mladším věku než v běžné populaci. Pro malignitu jsou indikováni k operaci pouze 2% nemocných, většina malignit u IBD je náhodným operačním nálezem.

Karcinom tenkého střeva u Crohnovy nemoci se vyskytuje vzácně, nicméně 17-27 x častěji než u nemocných bez IBD (Jess, 2005). Většinou se však jedná o velmi rozsáhlé nádorové onemocnění, pooperačně přežívá 5 let méně než 5% nemocných. Tuto špatnou prognózu nelze příliš ovlivnit preventivními vyšetřeními. Doporučuje se však odebírat histologické vzorky peroperačně z míst strikturoplastik, neponechávat z pasáže vyřazené zánětlivé úseky střeva a především v případě nejasného nálezu včas indikovat operační revizi i z diferenciálně diagnostických důvodů.

Velmi vzácně vychází karcinom z chronických píštělí při Crohnově nemoci. Též se většinou jedná o velmi pokročilé a pozdně zachycené inoperabilní onemocnění. Z těchto důvodů se doporučuje pravidelný odběr biopsií z traktů chronických píštělí v celkové aneste-zii, což má opět význam i diferenciálně diagnostický (Ficari, 2005).

Frekvence výskytu kolorektálního karcinomu (KRK) v kolitidě ulcerózní či Crohnova typu je průměrně asi 2- 3x vyšší než u nemocných bez IBD a vzrůstá u pacientů s pankoliti-dou, stenózou tračníku, PSC a s délkou trvání choroby. U nemocných s anamnézou UC do 30 let je výskyt KRK 18% (Eaden, 2006). Předpokládá se, že KRK vzniká přímo z dyplazie, kterou je třeba považovat za premaligní či lokální maligní stav. Dysplazie však není možné dobře posoudit v terénu floridního zánětu, což ztěžuje bezpečnou dispenzarizaci. Extenzivní dispenzární programy s odběrem mnohočetných etážových biopsií se v praxi neosvědčily, více se očekává od cílené endoskopické diagnostiky pomocí moderních metod.

Není tedy novinkou, že nemocní s IBD mají zřetelně zvýšené riziko vzniku střevního karcinomu, čemuž odpovídají pravidla dispenzarizace s cílem včasného záchytu. Přesto se chirurg, věnující se IBD, relativně často setkává s malignitami u těchto nemocných.

Na našem pracovišti bylo od roku 2003 do konce roku 2006 operováno celkem 6 nemocných s karcinomem v terénu IBD, z nichž pouze jeden byl starší 60 let a u 3 nemocných byl nález již inoperabilní s infaustní prognózou. Všichni tito pacienti byli před doporučením k chirur-gické konzultaci pravidelně sledováni a kontinuálně konzervativně léčeni (2-16 let), přesto byli většinou odesláni k chirurgické terapii opožděně s fatálními důsledky. 3x se jednalo o kolorektální karcinom, 1x o karcinom v perinálních píštělích, 1x o karcinom anální.

Ve stejném období byli na naše pracoviště doporučeni 4 nemocní s IBD, též delší dobu sledováni a léčeni, u nichž jsme zjistili, že se nejedná o zánět střevní, ale o karcinom primárně. 1x se jednalo o karcinom anu s metastatickou nemocí, 1x o verukózní karcinom perinea, u další pacientky perineální fistulce způsobil rozsáhlý karcinom děložního čípku, 1x se jednalo o karcinom tenkého střeva.

Střevní karcinom je u nemocných s IBD druhou nejčastější příčinou zvýšené mortality. Vyskytuje multifokálně, má mucinózní charakter a nádorové onemocnění se objevuje u mladších nemocných, kteří jsou nezřídka indikováni k operaci ve velmi pokročilém stadiu choroby. Domníváme se, že je třeba se v mnoha případech více obávat vzniku karcinomu a chirurgické řešení indikovat včas. Dále je nutné z diferenciálně diagnostických důvodů na nádorové onemocnění pomýšlet a kde to lokalizace umožňuje provádět histopatologická vyšetření.

80 Význam identifikace rizikových pacientů v oblasti výživy.

Hrbková D.[1], Hamrová M.[1], Krčmová L.[1], Hanušová M.[1], Andrášková V.[1], Zatloukalová H.[1], Urbancová H.[1], Anteková J.[2], Tomíška M.[3]
1) Oddělení léčebné výživy, FN Brno
2) Interní gastroenterologická klinika, FN Brno
3) Interní hematoonkologická klinika, FN Brno

Úvod

Diagnostika rizika vzniku malnutrice je vhodným podkladem pro diferencovaný přístup k aplikaci včasné a vhodné nutriční podpory. Snahou zdravotnických zařízení v posledních letech je zavádět screeningové postupy v oblasti výživy do rutinní praxe a přispět tak zabezpečení optimální léčby nemocných.

Cíl

Prezentace ukazuje výsledky naší vlastní modifikace dvoustupňového modelu nutričního rizikového screeningu NRS 2002, doporučeného Evropskou společností parenterální a enterální výživy (ESPEN) pro hospitalizované pacienty.

Metoda

V rámci primárního šetření vkládá zdravotní sestra na oddělení do počítačové databáze hodnoty aktuální tělesné hmotnosti, původní tělesné hmotnosti, tělesné výšky a anamnestického odhadu příjmu stravy. Z uvedených hodnot je automaticky kalkulováno procento zhubnutí, BMI a skóre primárního screeningu. Definitivní hodnotu rizika podvýživy (ve škále 0-6 bodů) stanoví nutriční terapeutka při návštěvě u lůžka u těch nemocných, kteří mají zvýšené skóre primárního screeningu, přičemž k ověřeným údajům přidává vliv rizika základní choroby. U všech nemocných se skóre 3 body a vyšším je do dokumentace pacienta vložen nutriční dekurz s navrženým nutričním plánem.

Výsledky

V roce 2006 bylo v naší nemocnici tímto způsobem zdravotními sestrami provedeno celkem 14620 primárních vyšetření. Ve 3460 případů bylo zjištěno zvýšené skóre a následně provedena návštěva nutriční terapeutky se založením nutričního dekurzu. Práce uvádí spektrum navržených opatření nutriční podpory, včetně procenta skutečně realizovaných postupů.

Závěr

Hodnoty primárního screeningu zdravotních sester přinášejí cenné informace o stavu výživy pacientů při první i opakovaných hospitalizacích. Umožňují včas zjistit zvýšené riziko podvýživy, zabezpečit odpovídající nutriční podporu, monitorovat nutriční stav nemocného a v případě potřeby umožňují i předání pacienta do následné ambulantní péče. Naše dosavadní zkušenosti a výsledky práce ukazují, že včasnou identifikací pacientů s rizikem malnutrice je možné předejít vážným komplikacím s vyššími náklady na léčbu. To může být přínosem nejen pro pacienta, ale také pro ekonomiku nemocnice.

81 Zhoubné nádory – součást metabolického syndromu.

Patera J.[1], Dvořák K.[2], Patera J. jr.[1]
1) Privátní mammologická ordinace, Brno
2) FN, Brno

Už několik let jsou zkoumány vztahy obezity, diabetu 2. typu, dyslipoproteinemie, hypertenze a dalších onemocnění ke kancerogenezi. Nejprve byly studovány souvislosti jednotlivých nenádorových onemocnění a nádorů. Často byly prezentovány jako komorbidita komplikující léčbu a ovlivňující prognózu nemocných (6,11). Později se začalo uvažovat o etiologické souvislosti a v poslední době se ukazuje jako nejpodstatnější to, že uvedené choroby jsou součástí metabolického syndromu (12,13). Několik pracovních skupin začalo analyzovat vzájemné vztahy součástí metabolického syndromu a možné souvislosti s kancerogenezí (4,5,7,9,10,14). Mimo jiné – od roku 2002 jsme přednesli na celostátních akcích v ČR a SR 12 přednášek zabývajících se touto problematikou. Příčinné souvislosti mezi metabolickým syndromem a vznikem nádorů byly nalézány u stále většího počtu nádorových onemocnění. Nejprve byly tyto vztahy potvrzeny u nádorů mammy, kolorekta a prostaty. Dále byly popsány u nádorů ORL oblasti, jícnu, žaludku, jater, pankreatu, ledvin, moč. měchýře, endometria a ovarií (1,2,3,7,8,15). Z uvedeného výčtu je zřejmé, že **jde o obecný princip, který závažným způsobem mění náhled na podstatu vzniku nádorů.**

Do současnosti byly nejznámější příčinou vzniku nádorů především vrozené mutace dosud známých onkogenů a supresorových genů, které vysvětlovaly vznik tzv. hereditárních typů a částečně i tzv. familiárních typů nádorů. Obecně se však jednalo maximálně o 10-15% případů u jednotlivých nádorových onemocnění. Ostatních 85-90% případů bylo označováno jako tzv. nádory sporadické. Ty byly dávány do souvislosti např. s reprodukčními rizikovými faktory, vlivy zevního prostředí aj. Jejich podstatou měly být především somatické mutace. Bylo však už delší dobu zřejmé, že tento pohled je v současnosti neudržitelný a zastaralý.

Genetická podstata metabolického syndromu je předpokládána u 45-50% obyvatel světa, prevalence klinického projevu metabolického syndromu je udávána Světovou zdravotnickou organizací v hodnotách okolo 25%. Téměř ve všech dosud publikovaných studiích, zaměřených na tuto problematiku, je nalézán **vyšší výskyt součástí metabolického syndromu (hypertenze, diabetes 2. typu, obezita, nízké hodnoty HDL cholesterolu, aj.) v osobní a rodinné anamnéze u osob s nádory oproti osobám bez nádorů.**

Existuje několik vysvětlení podstaty vztahu metabolického syndromu a vzniku nádorů. Jedním z nich je přímé působení pozměněných hladin hormonů, cytokinů a jiných látek na buňky různých tkání. Další cestou jsou poruchy určitých genů, které mohou vést současně k nenádorovým a nádorovým chorobám. Další a zřejmě nejzávažnější možností je působení základního principu metabolického syndromu na tkáně vnímavé na základě genetické výbavy jedince ke kancerogenním vlivům. Co je základním principem metabolického syndromu? Je to multisytémová dysfunkce organismu spojená s narůstajícím omezováním negativních zpětných vazeb na mnoha úrovních regulace různých systémů. Převaha pozitivních zpětných vazeb tak roztáčí spirálu selhávání mnoha systémů důležitých pro homeostázu organismu. Tak se postupně vyvíjejí předpoklady pro genetické a epigenetické poru-

chy, dále změny signálních cest zodpovědných za základní funkce buněk. Důsledkem je zvýšená četnost transformačních dějů v mnoha tkáních a zvýšená možnost vysmeknutí určitého počtu buněk z normálních regulačních vlivů a změny v buňky nádorové. S přihlédnutím na současně probíhající omezování účinnosti lokální i celkové specifické i nespecifické imunitní ochrany (vlivy souvisejícími s rozvojem a důsledky metabolického syndromu) je možnost vzniku a progrese nádorů vysoká.

Z pohledu molekulární biologie je pozoruhodné, jak často jsou nalézány stejné poruchy určitých signálních cest u rozvoje nádorů určitých tkání a současně u vzniku základních složek metabolického syndromu. Z toho je zřejmé, že **nádory nejsou jen pouhým důsledkem patologických změn provázejících metabolický syndrom, ale jsou jeho součástí**. Jinak řečeno určité specifické poruchy buněčných regulací mohou vést následně, nebo i současně ke vzniku nenádorových i nádorových onemocnění. Závisí jen na okolnostech, na stavu a působení vnitřního a zevního prostředí a na komplexu genetických vloh, které nemusí souviset jen s vrozenými mutacemi. Mnohdy „pouhá“ souhra působení polymorfismů různých genů, nebo epigenetické vlivy mohou vést k postupným a nenápadným změnám regulací, což ve svém důsledku může směřovat k rozvoji metabolického syndromu, včetně nádorových onemocnění.

Avšak od šedé teorie k praxi. Co tyto skutečnosti znamenají, jaké je jejich klinické využití?

1) Změna pohledu na to – *co je a co není závažný rizikový faktor*. Dosud byly některé rizikové faktory přeceňovány a mnohé naopak byly ignorovány. Jako příklad si uveďme nádory prsu. K těm přeceňovaným patří velká část tzv. reprodukčních faktorů, často a ne vždy opodstatněně, spojovaných s působením estrogenů. Přitom se jedná většinou o rizikové faktory druhého, nebo třetího řádu, tedy takové, které jen modifikují vliv primárních rizikových faktorů (nitroděložní vývoj a podmínky narození, počet porodů, věk prvního porodu, kojení, indukované aborty, psych. vlivy, působení zevního prostředí), nebo jde o rizikové faktory odvozené, tedy nepřímé, dané především genetickou výbavou jedince (inteligence, výška, krevní skupiny, věk menarche, spontánní aborty, věk menopausy a další). Mezi primární rizikové faktory patří dosud nejuznávanější výskyt určitých nádorů v rodinné anamnéze. Avšak jak je známo, familiární formy tvoří jen malou část celkového počtu případů. K naprosto podceňovaným primárním faktorům patří svou četností mnohem významnější výskyt hypertenze, diabetu 2. typu, obezity a dále závažných metabolických a hormonálních poruch v rodinné anamnéze. To platí ovšem i o výskytu uvedených součástí metabolického syndromu v osobní anamnéze. Proto **je potřeba při odebírání osobní a rodinné anamnézy soustředit dotazy i na choroby spojené s metabolickým syndromem a nespokojit se jen s výčtem nádorů**.
2) Existuje *několik různých patogenetických cest vzniku nádorů*, které lze od sebe na základě nových skutečností dosti zřetelně odlišit, a které souvisí s biologickými charakteristikami nádorů, včetně prognózy. **Podstatná anamnestická data lze, vedle už zavedených klinických a patologických údajů, využít v plánování léčby, predikci vedlejších účinků léčby a také v strategii terciální prevence.** Velká skupina osob s nádory a s pozitivní rodinnou anamnézou chorob spojených s metabolickým syndromem (tedy s předpokládanou specifickou genetickou výbavou) má agresivní typy nádorů a špatnou prognózu podobně jako podstatně méně početná skupina osob s hereditárními typy nádorů.
3) Pochopení souvislostí kancerogeneze s multisystémovým selháváním, nejčastěji spojeným s metabolickým syndromem, vede k *využití nových možností primární prevence*. Jednou z cest je zabraňovat rozvoji metabolického syndromu. Postupy jsou dlouhodobě známy a používány, na druhé straně je pravdou, že účinnost není vždy dostatečná. Základních příčin je několik. Za prvé – lidé, i když jsou o hrozícím nebezpečí vzniku součástí metabolického syndromu informováni, podceňují možnost onemocnění. Za druhé – léčba jednotlivých onemocnění není dostatečná, což postupně vede k rozšiřování spektra poruch různých systémů, rozvoji metabolického syndromu a jeho negativním dopadům na organismus, včetně vytváření podmínek pro kancerogenezu. Za třetí – úsilí onkologů se soustřeďuje spíše na sekundární prevenci (diagnostiku časných forem nádorů) a na léčbu. Minimum úsilí a prostředků se věnuje možnosti skutečné primární prevence, jejíž mechanismy jsou v současné době už dosti známy, ale laická i odborná veřejnost jí nedůvěřuje, nebo místo ní používá neúčinné metody. Tomuto postoji často napomáhají i „vědecké“ studie, které analyzují preventivní účinnost jednotlivých látek často s negativními výsledky. Podstatou problému je zde ignorování podstaty účinné prevence (ale také léčby už vzniklých nádorů), a tou je komplexnost, neboli současný vliv několika opatření (látek) na různé úrovně regulačních systémů. Je však důležité si uvědomit – pokud se podaří vyřešit tyto základní problémy – pak **většina solidních zhoubných nádorů je preventabilní**. A to do jisté míry platí i u forem hereditárních, či familiárních. Genetický základ je zde sice již dán, ale mnohdy stačí jen k iniciaci nádorových změn. Vliv multisystémového selhávání, spojeného nejčastěji s rozvojem metabolického syndromu, se v tomto případě může projevit ve fázi promoce. Jinak řečeno, pokud se omezí promoční vliv uvedených faktorů na již pozměněné buňky, nemusí dojít ke klinickému projevení nádorové choroby, nebo alespoň k omezení rychlosti rozvoje nádorů.

Literatura

1. Augustin LS, Polesel J, Bosetti C, Kendall CW, La Vecchia C, Parpinel M, Conti E, Montella M, Franceschi S, Jenkins DJ, Dal Maso L (2002) Dietary glycemic index, glycemic load and ovarian cancer risk: a case control study in Italy. Ann Oncol 14: 78-84
2. Barnard RJ, Aronson WJ, Tymchuk CN, Ngo TH (2002) Prostate cancer: another aspect of insulin-reistance syndrome? Obes Rev 3: 303-308
3. Bershtein LM, Gamaiunova VB, Kvachevskaia IuO, Tsyrlina EV, Kovalenko IG (2000) The nature of hyperinsulinemia (insulin resistance) in endometrial carcinoma of plasma levels of insulin and C-peptide. Vopr onkol 46: 191-195

4. Del Giudice ME, Fantus IG, Ezzat S, McKeown-Eyssen G, Page D, Goodwin PJ (1998) Insulin and related factors in premenopausal breast cancer risk. *Brest Cancer Res Treat* 47: 111-120
5. Furberg AS, Jasienska G, Bjurstam N, Torjesen PA, Emaus A, Lipson SF, Ellison PT, Thune I (2005) Metabolic and hormonal profiles: HDL cholesterol as a plausible biomarker of breast cancer risk. The Norwegian EBBA Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 33-40
6. Grossman E, Messerli FH, Goldbourt U (2002) Carcinogenity of antihypertensive therapy. *Curr Hypertens Rep* 4: 195-201
7. Komninou D, Ayonote A, Richie J, Rigas B (2003) Insulin resistance and its contribution to colon carcinogenesis. Exp Biol Med (Maywood) 228: 396-405
8. Laukkanen JA, Laaksonen DE, Niskanen L, Pukkala E, Hakkarainen A, Salonen JT (2004) Metabolic syndrome and the risk of prostate cancer in Finnish men: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13: 1646-1650
9. Lorincz AM, Sukumar S (2006) Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13: 279-292
10. Nagata C, Shimizu H, Takami R, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K (2000) Relations of insulin resistance and serum concentrations of estradiol and sex hormone-binding globulin to potential breast cancer risk factors. *Jpn J Cancer Res* 91: 948-953
11. Peeters PH, van Noord PA, Hoes AW, Frachebound J, Gimrare CH, Grobbee DE (2000) Hypertension and brest cancer risk in a 19-year follow study (the DOM cohort). Diagnostic investigation into mammarian cancer. *J Hypertens* 18: 249-254
12. Reaven GM (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37: 1595-1607
13. Reaven GM, Litgell L, Landsberg L (1996) Hypertension and associated metabolic abnormalities – the role of insulin resistance and sympathoadrenal system. *N Engl J Med* 334: 374-381
14. Sinagra D, Amato C, Scarpilta A, Briganda M, Amato M, Saura G, Latteri M, Caimini G (2003) Metabolic syndrome and breast cancer risk. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 6: 55-59
15. Wang YY, Lin SY, Lai WA, Liu PH, Sheu WH (2005) Association between adenomas of rectosigmoid colon and metabolic syndrome features in a Chinese population. *J Gastroenterol Hepatol,* 20: 1410-1415

XI.
Dětská onkologie

82 Poruchy imunity jako pozdní následky protinádorové léčby u dětí.

Eckschlager T.[1], Radvanská J.[1], Hladíková M.[2], Jašinská J.[1], Moravcová L.[1], Saudská A.[1], Průša R.[3], Radvanský J.[4]
1) Klinika dětské hematologie a onkologie
2) Ústav informatiky
3) Ústav klinické biochemie a patobiochemie
4) Klinika tělovýchovného lékařství, UK 2. LF a FN Motol, Praha

Narůstající počet dlouhodobě vyléčených jedinců, kteří byli léčeni v dětství pro zhoubný nádor přináší nové problémy. Vyvíjející se dětský organismus je stále úspěšnější ale i intenzivnější léčbou snadno poškozen a proto stoupá počet pozdních komplikací. V současné době je věnována velká pozornost vztahu mezi poruchami imunity a nádory. Literární údaje i naše výsledky ukazují, že u většiny pacientů se solidními nádory nebývá porucha humorální ani buněčné imunity příliš častá (Lissoni a kol, 1990; Eckschlager, 1995). Všechny tři hlavní modality užívané v léčbě nádorů (operační léčba, aktinoterapie a chemoterapie) působí na imunitu negativně. Nejvíce se na vzniku sekundárních defektů imunity podílí chemoterapie, protože všechna cytostatika mají imunosupresivní účinek. Změny imunity po nekomplikované operaci většinou nebývají závažné a brzy se spontánně upraví. Při aktinoterapii závisí stupeň imunosuprese hlavně na rozsahu a lokalizaci ozařovaného pole. Při protinádorové léčbě je nejvíce postižena nespecifická imunita (snížený počet polymorfonukleárů) a specifická buněčná imunita (pokles počtu lymfocytů zvláště CD4+ a B-lymfocytů), imunita humorální je postižena méně protože protilátky přetrvávají relativně dlouho, omezena je však tvorba protilátek proti novým antigenům.

Na rozdíl od poměrně bohatých znalostí o akutních následcích protinádorové léčby na imunitu je minimálně údajů o jejich přetrvávání po ukončení léčby. Proto jsme se zabývali změnami imunity u osob, které byly v dětství léčeny pro zhoubné nádory.

Cíl studie: Zjistit výskyt změn lymfocytárních subpopulací a hladin imunoglobulinů u skupin osob léčených v dětství pro Hodgkinovu chorobu a pro nefroblastom.

Metoda: U 229 osob vyléčených z Hodgkinovy choroby a 57 vyléčených z nefroblastomu (nejméně 5 let po ukončení terapie, beze známky recidivy a bez infekce). Jako kontrolu jsme použili skupinu dárců krve. Sérové hladiny IgG, IgA a IgM jsme vyšetřovali imunoturbidimetricky (analyzátor ADVIA 1650) a hladiny IgE sendvičovou imunoesejí (analyzátor ADVIA Centaur). Zastoupení lymfocytárních subpopulací: CD3+ (celkové T lymfocyty), CD4+ (pomahačské T lymfocyty), CD8+ (cytotoxické a supresorové T lymfocyty), CD19+ (celkové B lymfocyty) a CD3-CD16+CD56+ (NK buňky) jsme zjišťovali průtokovým cytometrem (protilátky Immunotech, cytometr FACS;Calibur).

	Počet	Zvýšené IgE	sniž CD4/CD8	Sniž celk T	sníž NK
Nefroblastom	57	5,3	3,6	1,8	0
Mb.Hodgkin	229	54,8	26,2	18,8	2,2

Tabulka 1. Nejčastější změny imunity u osob vyléčených z nefroblastomu a z Hodgkinovy choroby. Výsledky jsou uvedeny v procentech.

Základní onemocnění	Terapie	Recidiva/ sekundární malignita	Výsledky imunologického vyšetření
3. histopatol. typ, kl. st. IIIA	ABVD/CVPP + RT celého lf. systému	recidiva 8,5 let po ukonč. ter.	4,5 roku před recidivou snížení CD4/CD8, IgE 290,4 U/l
2. histopatol. typ, kl. st. IVB (infiltrace plic)	CVPP+ RT celého lf. systému a plic	fibrisarkom malé pánve 9,5 let po ukonč. ter.	2 roky před sekundární malignitou snížení CD4/CD8
2. histopatol. typ, kl. st. IIA	ABVD/CVPP + RT nad bránicí	duktální Ca mamy 15 let po ukonč. ter.	3 roky před sekundární malignitou: snížení CD3
2. histopatol.typ, kl. st. IA mb. Recklinghausen	CVPP+ RT nad bránicí	kolorektální karcinom 23 let po ukonč. ter.	4,5 roku před sekundární malignitou: snížení CD3

Tabulka 2. Pozdní recidivy a sekundární malignity u osob vyléčených z Hodgkinovy choroby, z vyléčených z nefroblastomu se pozdní recidivy ani sekundární malignity nevyskytly.

Výsledky

Nejčastější byly odchylky imunity u vyléčených z Hodgkinovy choroby, změny u vyléčených z nefroblastomu byly velmi vzácné viz tabulka 1. Nenalezli jsme vztah mezi zvýšenými hladinami IgE a výskytem alergií. U Hodgkinovy choroby nebyl vztah mezi histopatologickým typem, klinickým stadiem, použitým protokolem ani výskytem recidivy.

Snížené zastoupení CD3+ a/nebo CD4+ jsme nacházeli u osob po ukončení terapie pro Hodgkinovu chorobu s opakovanými infekcemi.

U tří vyšetřených po ukončení terapie pro Hodgkinovu chorobu vznikla sekundární malignita a u jednoho pozdní recidiva viz tabulka 2. U osob po ukončení terapie pro nefroblastom se po imunologickém vyšetření zatím sekundární malignita ani pozdní recidiva nevyskytly. U všech pacientů se sekundární malignitou i pozdní recidivou byla nalezena nějaká porucha buněčné imunity (snížený poměr CD4/CD8 nebo snížení celkových T lymfocytů).

Diskuse a závěry: Naše výsledky získané u osob vyléčených z nádorů potvrzují literární údaje, že zvýšení IgE u pacientů s Hodgkinovou chorobou není ve vztahu k alergii, ale je podmíněno dysfunkcí supresorových lymfocytů (Amlot a kol, 1981). To, že u osob vyléčených z nefroblastomu se prakticky nevyskytovaly poruchy imunity, nasvědčuje tomu, že poruchy buněčné imunity nalezené po ukončení léčby po terapii pro Hodgkinovu chorobu jsou patrně podmíněny vlastním onemocněním či genetickou predispozicí než terapií. Prokázali jsme, že změny imunity nacházené u pacientů s Hodgkinovou chorobou přetrvávají u řady z nich i po vyléčených. Naše výsledky naznačují vztah poruch buněčné imunity k opakovaným infekcím a možná dokonce i ke vzniku sekundárních malignit.

Práce vznikla za finanční podpory IGA (grant č. NR/87/96-3) a MŠMT (VZ č. 0021620813).

Literatura

1. Amlot PL a kol: Int Arch Allergy Appl Immunol, 64: 138- 145, 1981
2. Eckschlager T: Klinická onkologie, 45- 48, 1995
3. Lissoni P a kol: Eur J Cancer, 26: 767- 787, 1990

83 Vliv chemoterapie na kognitivní funkce u dětí a dospívajících – srovnání výsledků po prvním roce od zahájení chemoterapie.

Pavelková K.[1], Vlčková I.[1], Pilát M.[2], Bajčiová V.[1], Kepák T.[1], Štěrba J.[1], Dembická D.[1]
1) Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno
2) Oddělení dětské psychiatrie a klinické psychologie FN Brno
K. Pavelková (pavelkova.k@seznam.cz), M. Pilát (mpilat@fnbrno.cz)

Úvod

Problematika kognitivních změn v důsledku onkologické léčby vychází z celosvětového trendu v dětské onkologii, kterým je sledování pozdních následků léčby a snaha o zvýšení kvality života během léčby i po ní. Cílem výzkumu započatého v r. 2005 je zjištění míry postižení kognitivních funkcí u dětských a dospívajících pacientů v závislosti na druhu a množství podaných cytostatik a relevantních komplikacích léčby.

Metodika

Koncepce projektu spočívá v opakovaném vyšetřování kognitivních funkcí a osobnosti u prvně onkologicky léčených pacientů ve věku 7 až 20 let včetně. Do výzkumu nejsou zařazeni pacienti s nádory CNS, pacienti léčení radioterapií na oblast CNS a pacienti s akutní leukémií léčení vysokodávkovou nebo intrathékálně aplikovanou chemoterapií. První vyšetření probíhá jako součást vstupní diagnostiky ještě před zahájením léčby. Totéž vyšetření proběhne v časovém odstupu 12 a 24 měsíců. V oblasti kognitivních funkcí se zaměřujeme na zkoumání *inteligence, sluchové a vizuální paměti, pozornosti, exekutivních funkcí a grafomotoriky.* Jako možné významné intervenující proměnné sledujeme *míru depresivity, osobnost a rodinné zázemí* a *relevantní komplikace léčby.*

Výsledky

Na základě statistického zpracování bude možné zjistit signifikantní rozdíl mezi výsledky prvního, druhého a třetího vyšetření, a tak sledovat možné změny kognitivních funkcí v čase.

Z důvodu problematické homogenity výzkumného souboru budou zjištěná data zpracována a interpretována též pomocí kvalitativní analýzy. K dnešnímu dni bylo iniciálně vyšetřeno 65 pacientů, z nichž u 52 byla zahájena chemoterapie, 48 nadále zůstává ve sledování. Věkový průměr pacientů ve studii je 14,5 roku, poměr chlapců a dívek je 26:22. Pacienti jsou podle diagnóz a léčebného schématu rozděleni do skupin, v rámci nichž predikujeme srovnatelnou neurotoxicitu. Z diagnóz jsou nejvíce zastou-

peni pacienti s dg. Hodgkinův lymfom (15), osteosarkom (9), Ewingův sarkom (8), sarkomy měkkých tkání (6), germinální nádory (5), NH lymfom (3) a hepatocelulární ca (2).

Závěr

Výzkum kognitivních funkcí v závislosti na typu protinádorové léčby, představuje pilotní projekt v rámci ČR svou metodou vyšetření před započetím léčby a po jejím ukončení. Dříve realizované studie se zaměřovaly až na pacienty po ukončené léčbě. Autoři prezentují první srovnání a analýzu výsledků vyšetření před zahájením chemoterapie a po jednom roce od zahájení léčby.

84 Polymorfismus genu pro apolipoprotein E u dětských nádorových onemocnění. Výsledky u pacientů Kliniky dětské onkologie Brno.

Kepák T.[1], Mazánek P.[1], Pilát M.[2], Vlčková I.[1], Kozák L.[3], Jarkovský J.[4]
1) Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno
2) Oddělení dětské psychiatrie a psychologie FN Brno
3) Centrum molekulární biologie a genové terapie – Interní hematologická klinika LF MU v Brně a FN Brno
4) Centrum biostatistiky a analýz LF a PřF MU
tkepak@fnbrno.cz

Východiska

Negativní následky chemoterapie a radioterapie v oblasti kognitivních funkcí postihují zejména paměť, koncentraci a exekutivní funkce. Dobře známá je negativní role radioterapie a intenzivní chemoterapie s následnou transplantací krvetvorných buněk v ovlivnění neurokognitivních funkcí po onkologické léčbě, a to zvláště u dětí předškolního věku. Méně známá je dosud oblast geneticky podmíněné individuální variability v následcích antineoplastické terapie. Polymorfismus genu pro apolipoprotein E (Apo E), který je klíčovým regulačním proteinem v metabolismu cholesterolu a lipoproteinů, by mohl být jedním z faktorů, které nežádoucí neurokognitivní následky léčby ovlivňují. Negativní efekt přítomnosti alely E4 (jejíž četnost v populaci je přibližně 17%) byl již prokázán u nemocných s Alzheimerovou chorobou, u nemocných po úrazech CNS a po koronárních bypassech. Studie od dospělých nemocných (s maligními lymfomy a karcinomem prsu) naznačují roli polymorfismu Apo E i v neurobehaviorální odpovědi na protinádorovou léčbu. Role polymorfismu genu pro apolipoprotein E u dětí s nádorovými onemocněními zatím není známa a je předmětem výzkumu.

Metody

V rámci výzkumného projektu byla od roku 2005 analýza pro určení genotypů ApoE provedena u více než 200 dětí léčených na Klinice dětské onkologie FN Brno a LF MU chemoterapií pro nádorové onemocnění. Ze vzorku periferní krve byla izolována DNA a metodou PCR/RFLP byla provedna přímá analýza genotypů e2, e3 a e4 v genu pro lidský apolipoprotein. Neurokognitivní funkce byly v průběhu léčby a po jejím ukončení hodnoceny pomocí standardní baterie psychologických testů, a to v následujících oblastech: intelekt, paměť, pozornost, exekutivní funkce, grafomotorika. Dále byly sledovány možné intervenující faktory (např. míra depresivity, osobnostní charakteristiky, rodinné prostředí) a relevantní klinická data (zejména neurologické potíže v průběhu léčby, resp. po jejím ukončení – poruchy vědomí, stavy zmatenosti apod.).

Z hodnocení byly vyloučeny děti s primární či sekundární malignitou CNS a děti s akutní leukémií, součástí jejichž léčby je podání intrathekálních cytostatik a/nebo radioterapie na CNS. Do analýzy jsme také nezahrnuli děti s anamnézou specifických poruch učení.

Výsledky

U 65 dětí a mladistvých jsme máme k dispozici vyšetření neurokognitivních funkcí před zahájením chemoterapie a s odstupem po ukončení léčby. U dalších dětí je longitudinální prospektivní studie založena. Dosavadní data ukazují, že změny v oblasti neurokognitivních funkcí u dětí léčených chemoterapií jsou multifaktoriálně podmíněny. Z našich dat nemůžeme roli polymorfismu apolipoproteinu E v střednědobém ovlivnění neurokognitivních funkcí potvrdit. K přesnému určení role ApoE u této populační skupiny však bude potřeba delší sledování a větší kohorta pacientů.

Práce je částečně podpořena grantem GAČR č. 406/07/1384.

Literatura

1. Ahles TA, Saykin AJ, Noll WW, Furstenberg CT, Guerin S, Cole B, Mott LA: The relationship of APOE genotype to neuropsychological performance in long-term cancer survivors treated with standard dose chemotherapy. Psychooncology, 12(6), 612-9, 2003
2. Blackman JA, Worley G, Strittmatter WJ: Apolipoprotein E and brain injury: implications for children. Dev Med Child Neurol., 47(1):64-70, 2005.

3. Saykin AJ, Ahles TA, McDonald BC: Mechanisms of chemotherapy-induced cognitive disorders: Neuropsychological, pathophysiological, and neuroimaging perspectives. Seminars in Clinical Neuropsychiatry, 8, 201-216, 2003.
4. Schatz J, Kramer JH, Ablin A, Matthay KK: Processing speed, working memory, and IQ: A developmental model of cognitive deficits following cranial radiation therapy. Neuropsychology, 14, 189-200, 2000.

85 Kvalita života dětí s nádorovým onemocněním: vývojový přístup. Výsledky pilotní studie projektu QOLOP.

Kepák T.[1], Blatný M.[2], Vlčková I.[1], Pilát M.[3], Mazánek P.[1], Kárová Š.[4], Jelínek M.[2], Múdry P.[1], Hrstková H.[5], Štěrba J.[1]
1) Klinika dětské onkologie FN Brno a LF MU
2) Psychologický ústav Akademie věd ČR
3) Oddělení dětské psychiatrie a psychologie FN Brno
4) Ústav lékařské psychologie LF MU
5) I. Dětská klinika FN Brno a LF MU
tkepak@fnbrno.cz

Východiska

Dlouhodobých remisí dnes dosahuje více než 75% dětí léčených pro nádorové onemocnění.

Paradigma v dětské onkologii se díky tomuto faktu změnilo ve smyslu dnešního očekávání „vyléčení“ a přežití do dospělosti. Dětské nádory jsou dnes (na rozdíl od dřívějška, kdy platily za nevyléčitelná onemocnění) vnímány spíše jako chronická onemocnění s potřebou specializované péče i po dosažení remise a ukončení aktivní protinádorové léčby. Tato potřeba dlouhodobé péče se opírá zejména o poznání, že dvě třetiny přeživších po léčbě nádorového onemocnění dětského věku trpí minimálně jedním ze závažných pozdních následků onkologické léčby. Měřítkem léčebného úspěchu se tak dnes místo parametrů samotného přežití (OS, EFS) stala i (a zejména) **kvalita přežití**.

Výzkum v oblasti kvality života u dětí čelí v současné době zejména metodologickým problémům vyplývajícím z nedostatku vhodných metod měření, a také nedostatku longitudinálního designu studií.

V roce 2006 byla na Klinice dětské onkologie FN Brno a LF MU ve spolupráci s dalšími klinickými pracovišti a Akademií věd ČR založena a realizována pilotní studie v rámci projektu **qolop** (the **q**uality **o**f **l**ife longitudinal study in **o**ncology **p**aediatric patients). V rámci této studie byla vytvořena baterie testů konstruovaná specificky pro potřebu populace přeživších po léčbě dětských nádorových onemocnění.

V návaznosti na tuto pilotní studii byla založena longitudinální studie. Metodologickým cílem studie je vytvořit takovou metodologii měření kvality života, která by reflektovala změny percepce kvality života v průběhu vývoje jedince. Výzkumným cílem studie je pak identifikovat oblasti, ve kterých je kvalita života po léčbě nádorových onemocnění snížena, a to jak v objektivní rovině (mobilita, smyslové funkce, sociální integrace), tak i v subjektivní rovině (nálady a pocity, životní spokojenost).

Metody

Identifikace cílových oblastí je založena na srovnání tří populací (zdravých dětí, děti s nenádorovými chronickými onemocněními a dětí s anamnézou nádorového onemocnění).

Během 4letého projektu předpokládáme participaci minimálně 300 dětí v dlouhodobé remisi nádorového onemocnění dětského věku a srovnatelné velikosti kontrolních skupin. Výsledky projektu budou průběžně analyzovány s cílem tvorby vhodných preventivních a intervenčních strategií, které povedou ke zlepšení kvality života této specifické populace dětí a mladých dospělých. Důležitým výstupem projektu bude tvorba edukačních materiálů pro přeživší, jejich rodinné příslušníky a další zainteresované strany (zdravotníky, vzdělávací pracovníky atp.).

Výsledky

V rámci pilotní studie projektu **qolop** byla vytvořena originální testovací baterie pro odlišné věkové skupiny dětí, která byla v rámci validizační studie administrována prvním 30 pacientům v remisi nádorového onemocnění ve věku 7-19 let a jejich rodičům/opatrovníkům. Na BOD 2007 prezentujeme první zkušenosti z pilotní studie a představujeme odborné veřejnosti celý longitudinální projekt.

Literatura

1. Barrera M, Shaw AK, Speechley KN, Maunsell E, Pogany L.: Educational and social late effects of childhood cancer and related clinical, personal, and familial characteristics. Cancer, 104(8):1751-60, 2005.
2. Bhatia, S., Jenney, M.E.M., Bogue, M.K., Rockwood, T.H., Feusner, J.H., Friedman, D.L., Robison, L.L., Kane, R.L.: The Minneapolis-Manchester Quality of Life Instrument: Reliability and Validity of the Adolescent Form. J Clin Oncol, 20, 4692-4698, 2002.

3. Bhatia, S., Jenney, M.E.M., Bogue, M.K., Rockwood, T.H., Feusner, J.H., Friedman, D.L., Robison, L.L., Kane, R.L.: The Minneapolis-Manchester Quality of Life instrument: Reliability and validity of the Youth Form. J Pediatr.,145(1):39-46, 2004.
4. De Clercq, B., De Fruyt, F., Koot, H.M., Benoit, Y. (2004). Quality of Life in Children Surviving Cancer: A Personality and Multi-Informant Perspective.
5. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA, Kawashima T, Hudson MM, Meadows AT, Friedman DL, Marina N, Hobbie W, Kadan-Lottick NS, Schwartz CL, Leisenring W, Robinson LL; Childhood Cancer Survivor Study: Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. N Engl J Med.,355(15):1572-82, 2006.
6. Upton P, Eiser C.: School experiences after treatment for a brain tumour. Child Care Health Dev. 32(1):9-17, 2006.

Další informace mohou případní zájemci nalézt na internetové adrese projektu: www.qolop.eu.

Práce je podpořena grantem GAČR č. 406/07/1384.

86 Dlouhodobé trendy (1991-2006) diagnostiky a léčby akutní lymfoblastické leukémie u dětí z pohledu olomouckého hematoonkologického centra.

Mihál V.[1], Pospíšilová D.[1], Novák Z.[1], Stejskalová I.[1], Jarošová M.[2], Holzerová M.[2], Radová L.[3], Hajdúch M.[3]
1) Onkohematologické oddělení – Dětská klinika LF UP a FN Olomouc
2) Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc
3) Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc

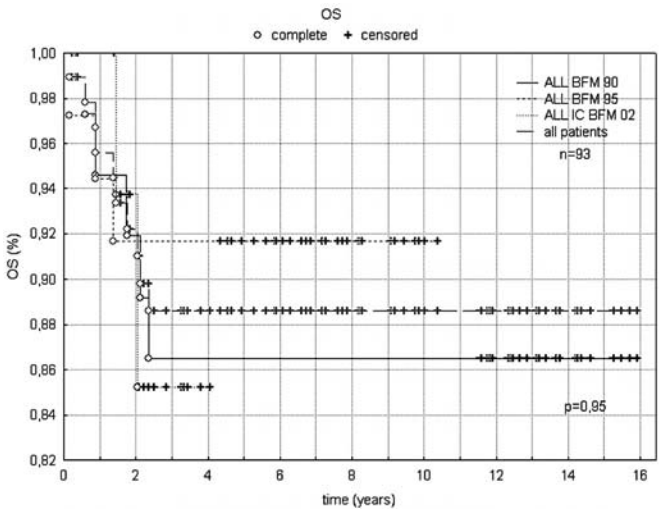
Úvod

Za posledních dvacet let bylo dosaženo nejenom pozoruhodného pokroku v léčbě dětské leukémie, ale i v pochopení její biologie.

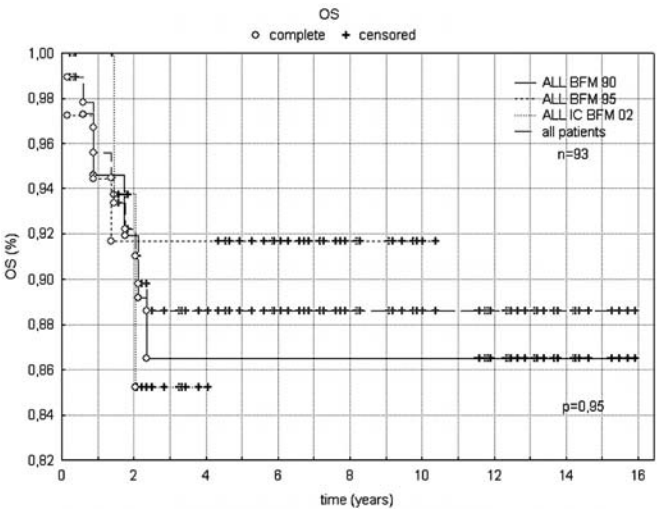
Popis studie a výsledky

Autoři předkládají dlouhodobý vývoj (1991-2006) diagnostiky a léčebných výsledků z pohledu jednoho republikového centra ČR. Devadesát tři dětí s akutní lymfoblastickou leukémii byly v tomto období léčeno protokoly: ALL BFM 90 (37 dětí), ALL BFM 95 (36) a ALL IC BFM 2002 (20). Bylo dosaženo pozoruhodných výsledků, které byly hodnoceny obvyklými statistickými parametry (EFS, OS).

I když celkové přežívání pacientů (OS) nepřineslo statisticky významné rozdíly, ale postupně dochází ke snižování kumulativní toxicity chemoterapie: ALL BFM 90=87%, ALL BFM 95=92%, ALL IC BFM 2002=85% (obr. 1).



Obr. 1: Celkové přežití 93 dětských pacientů s ALL v olomouckém centru, léčených protokoly ALL BFM v letech 1991-2006



Obr. 2: Celkové přežití bez události 93 dětských pacientů s ALL v olomouckém centru, léčených protokoly ALL BFM v letech 1991-2006

Zvláštní pozornost je zaměřena na komplexnost diagnostiky, zejména cytogenetickou klasifikaci. Zaznamenali jsme ale vzestupný trend v úspěšnosti cytogenetické klasifikace: ALL BFM 90=76%, ALL BFM 95=83% a ALL IC BFM 2002=100%.

Autoři se ve svém sdělení dále věnují některým specifickým diagnostickým přístupům, které jsou s ohledem na hledání nových prognostických znaků/faktorů dlouhodobě a systematicky prováděny při diagnostice nádorů krvetvorní tkáně u dětí *(in vitro* stanovení resistence na léčbu, trepanobioptické vyšetření, hodnocení časné clearance blastů a další).

Závěr

Poslední pokrok v molekulární genetice a proteomice umožnil v úsilí o zlepšení léčebných výsledků a snížení celkové toxicity podpořit použití více selektivní, cílené léčby. Další zlepšení léčby ALL povede určitě cestou „šit léčebných protokolů na míru“ a to převážně na základě prognosticky významných biologických vlastností nádorového klonu.

87 Výsledky léčby dětí s de novo ALL na KDO FN Brno v letech 2001-2004, hodnocení léčebné odpovědi s minimálně dvouletým odstupem po ukončení léčby.

Mendelová D.[1], Růžíčková P.[1], Gregorová V.[1], Mentzlová D.[2], Hrušák O.[3], Štěrba J.[1]
1) Klinika dětské onkologie FN Brno
2) Oddělení lékařské genetiky, FN Brno
3) Ústav imunologie 2. LF UK Motol, Praha

Od počátku roku 2001 do konce roku 2004 bylo na KDO léčeno celkem 85 dětí s akutní leukemií ve věku 0-18let. Z nich bylo 61dětí s de novo ALL, 11 dětí s relapsem ALL, 12 dětí s de novo AML a tři dětí s relapsem AML.

Dětí s de novo ALL byli léčení dle standardních protokolů ALL-BFM95, ALL-IC 2002 a Interfant 99.

Podle protokolu ALL-BFM95 bylo léčeno celkem 21 dětí (12 chlapců a 9 dívek). Poměr chlapců k dívkám byl 1,33:1. Podle imunofenotypického zařazení bylo 12 common ALL (57%), 4 prae-B ALL (19%), 1 pro-B ALL (5%), 2 hybridní ALL(9%), 2 T-ALL (9%). Rozdělení podle rizikových skupin bylo: 7x SR (33%), 13x MR(62%) a jeden pacient s HR- ALL (5%).

Cytogeneticky a pomocí metody FISH byla 5x nalezena translokace TEL/AML1 (23%), 8x hyperdiploidní ALL (38%). U jednoho pacienta (5%) byla přítomná pozitivní translokace BCR/ABL a z kongenitálních syndromů byl přítomen v jednom případě Downův syndrom.

Bez relapsu onemocnění žije celkově 85,7% všech léčených dětí, ve skupině SR 100% (O/7), MR 84,6% (2/13) a HR 0% (1/1). 4-6-ti lety event free survival (EFS) a overall survival (OS) je 76%. Pacient ze skupiny vysokého rizika měl přítomnou translokací BCR/ABL a zemřel po alogenní transplantaci kostní dřeně jako non-responder.

Podle protokolu Interfant byl léčen pouze jeden pacient.

Podle protokolu ALL-IC 2002 bylo od konce roku 2002 do konce roku 2004 léčeno 29 dětí, (13 chlapců a 16 dívek). Poměr chlapců k dívkám byl 1:1,23. Rozložení do rizikových skupin podle protokolu bylo 13x SR (45%), 14x IR (48%), 2x HR (7%). Imunofenotypické rozložení: 18x common ALL (62%), 6x prae-B ALL (21%), 1x hybridní ALL (3%), 4x T-ALL (14%).

Cytogeneticky a metodou FISH byla nalezena translokace TEL/AML1 13x (45%), hyperdiploidní klon 9x (31%); 7 pacientů (24%) neměli prokazatelnou genetickou aberaci patologických buněk.

Relaps onemocnění se vyskytl u jednoho pacienta, který dosáhl pomoci druhotné léčby 2. CR a byl následně alogenně transplantován od příbuzného dárce. Bez relapsu onemocnění žije 96,5% všech léčených dětí, ve skupině SR 92% (1/13), MR 100% (0/14), HR 100% (0/2). 2-4 lety overall survival je 100%.

Je uvedena analýza všech případů onemocnění a diskutovány faktory s možným ovlivněním léčebné odpovědi.

88 Časná odpověď na indukční léčbu jako nejvýznamnější prognostický faktor dětské akutní lymfoblastické leukémie.

Mihál V.[1], Pospíšilová D.[1], Novák Z.[1], Jarošová M.[2], Holzerová M.[2], Hajdúch M.[3]
a pracovní skupina pro dětskou hematologii ČR
1) Onkohematologické oddělení – Dětská klinika LF UP a FN Olomouc
2) Hemato-onkologická klinika LF UP a FN Olomouc
3) Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice LF UP a FN Olomouc

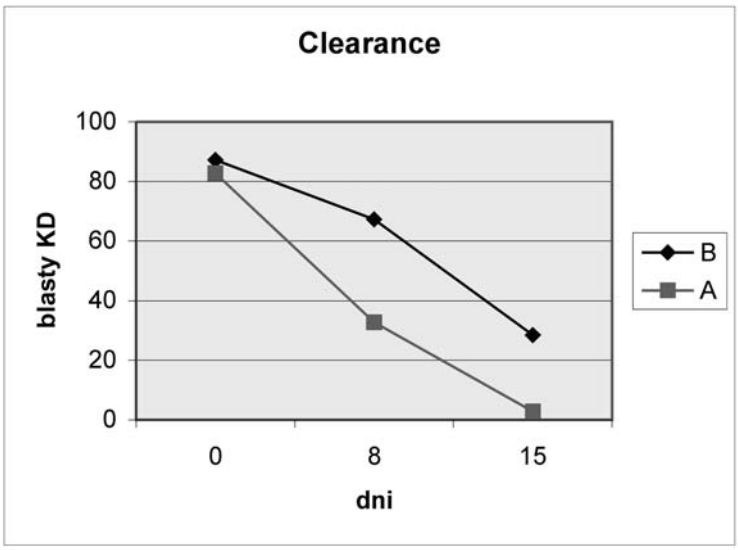
Úvod

Rychlá odpověď na léčbu u akutní lymfoblastické leukémie (ALL) u dětí závisí na mnohých faktorech, mezi které zahrnujeme klinicko-biologické znaky onemocnění, dávku chemoterapie a její vzájemné působení (interakce) a schopnost individuálního pacienta metabolizovat protinádorové léky. Přesné stanovení včasné odpovědi na léčbu poskytuje účinný nástroj pro lepší přizpůsobení léčebné intenzity. Trvale používaným prognostickým indikátorem, který reflektuje celkový dopad těchto proměnných faktorů je **leukemická cytoredukce,** definovaná jako stupeň clearance leukemických buněk v průběhu indukční chemoterapie.

Například průkaz > 1000 blastických buněk v periferní krvi po týdenní léčbě s kortikoidy a jedné dávky MTX i.th. je označovaný jako špatná odpověď na prednison (prednisolone poor response – PPR) a je asociovaná se zvýšeným rizikem pro recidivu onemocnění (relaps). Hodnocení léčebné odpovědi na molekulární úrovni detekcí tzv. minimální reziduální nemoci (MRN) umožnilo v devadesátých letech lépe definovat časnou odpověď na léčbu a přesněji charakterizovat skupinu pomalých responderů ohrožených relapsem. Metody, které dovolují detekovat submikroskopickou hladinu leukemických buněk jsou spolehlivým prognostickým indikátorem a univerzální aplikace MRD by bylo vysoce žádoucí. Jeho širší klinické uplatnění brzdí zatím vysoká cena stanovení MRD, ale i určitá komplikovanost provedení. Pui a spol. cytometrickým měřením prokázali u prekurzorové B-ALL, že přítomnost blastů s koexpresí CD19, CD10 a CD34 u dětí 19 dnů od zahájení indukční léčby má statisticky vyšší pravděpodobnost pro recidivu onemocnění ($p<0.003$). Předchozí BFM studie prokázaly, že morfologická detekce leukemických buněk v kostní dřeni v den 15 (>16% blastů v KD) je prognosticky významným faktorem.

Popis studie a výsledky

Cílem projektu bylo v rámci nového léčebného protokolu ALL Intercontinental- BFM 2002 – ALL IC-BFM 2002 hodnocení časné odpovědi na léčbu nejen poklesem blastů < 1000/μl v periferní krvi 8. den prednisonové předfáze, ale i analýzou prognostického významu aspirace kostní dřeně prováděné den 8 a den 15. Morfologická diagnostika léčebné odpovědi v krvi a dřeni byla prováděna ve dvou referenčních laboratořích – OKH FN Motol v Praze a Hemato-onkologické klinice FN v Olomouci. V období listopad 2002 – duben 2006 byla kostní dřeň den 8 provedena u 183 diagnostikovaných pacientů. 163 dětí (90%) bylo s dobrou odpovědí na prednisonovou předfázi (prednisolone goud response-PGR) a 20 dětí (10%) se špatnou (PPR). Skupinu dětí s PGR jsme rozdělili na dvě podskupiny podle počtů leukemických buněk v KD den 15: skupinu A s <16% blasty tvořilo 139 dětí (76%) a skupinu B s > 16% blasty tvořilo 24 dětí (13%). Průměrné hodnoty leukemických buněk v KD den 8 u dětí skupiny A byly 33% a ve skupině B 67% ($p<0.0001$).



Obr. 1: Clearance blastů KD (%) den 8 u dětí s ALL ve skupině A a B

Závěr

Morfologická detekce leukemických buněk v kostní dřeni v den 8 u pacientů s časnou clearance lymfoblastů (PGR) by se v budoucnu mohla zohlednit při charakterizaci skupiny dětí s dobrou prognózou, která by nemusela být zatížená vysokou kumulativní dávkou cytostatik. Parametr KD den 8 <33% by se mohl začít používat jako další pomocný znak časné odpovědi na indukční léčbu ve skupině dětí s PGR.

89 Akutní lymfoblastická leukémie u dívky s kompletní delecí SHOX genu.

Mihál V., Zapletalová J.
Onkohematologické oddělení – Dětská klinika LF UP a FN, Olomouc

Úvod

SHOX gen je lokalizován v PAR1 na distálním konci krátkého raménka obou pohlavních chromozomů (Xp22, Yp11). Jeho haploinsuficience je příčinou malého vzrůstu (případně i kostních odchylek) u pacientů se syndromem Léri-Weill (LWS), u dívek s Turnerovým syndromem a u 2,4% pacientů s idiopatickým malým vzrůstem. Typickým příznakem je přítomnost Madelungovy deformity (MD) předloktí.

Popis případu

Rodiče pacientky byli malého vzrůstu: matka 149 cm (její matka 150 cm), otec 160 cm, její růstová křivka byla trvale v pásmu –2,5 SDS. Ve věku 5 let byla u dívky zjištěna akutní lymfoblastická leukémie (ALL) (c-ALL, MRG, PGR, 46,XX[12], 46,XX, del(X)(q12), t(12;21)(p13;q22)[8]). Byla úspěšně léčena podle protokolu ALL-BFM 95. Při hodnocení kostní zralosti po ukončení léčby byla jako vedlejší nález popsána MD. Na základě rtg vyšetření a přítomnosti klinických příznaků (gotické patro, krátké bérce a předloktí, svalová hypertrofie) bylo vysloveno podezření na LWS. Z izolované DNA bylo provedeno molekulárně genetické vyšetření na zahraničním pracovišti a prokázána kompletní delece SHOX genu. Vzhledem k přítomnosti podobné symptomatologie u dívčiny matky (dysproporcionální malý vzrůst, přítomnost MD) je pravděpodobné, že i ona je nositelkou delece SHOX genu. Výsledek molekulárně genetického vyšetření není dosud znám. Pacientka je 90 měsíců v dlouhodobé kompletní remisi, měla časnější nástup puberty s menarché před 12. rokem věku a minimálním postmenarchálním růstem. Dosáhla dospělé výšky 147,7 cm.

Závěr

Uvádíme vzácnou kombinaci LWS a ALL, která nebyla dosud v literatuře popsaná. Byly podány důkazy, že exprese SHOX genu v chondrocytech vede k zástavě buněčného cyklu a k apoptóze a má tedy přímou roli v regulaci buněčné diferenciace. V PAR1 byl rovněž lokalizován gen pro cytokinový receptor (*rGM-CSF*), jež hraje důležitou roli v procesu hematopoézy.

Podporováno granty IGA MZ ČR NB/ 7409-3 a NC7495-3/2003

90 Sledování farmakodynamických ukazatelů terapie asparaginasou u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií a s non-Hodgkinskými lymfomy.

Růžičková P.[1], Mendelová D.[1], Valík D.[2], Mikušková A.[3], Štěrba J.[1]
1) Klinika dětské onkologie, LF MU a FN Brno
2) Oddělení laboratorní medicíny, MOÚ Brno
3) OKBH FN Brno

Klíčová slova: asparaginasa – asparagin – ALL – NHL – deplece asparaginu v plazmě – alergická reakce

Asparaginasa je jednou ze základních komponent terapie akutní lymfoblastické leukémie (ALL) a non-Hodgkinských lymfomů (NHL) u dětí. Je to enzym, který hydrolyzuje aminokyselinu asparagin na kyselinu asparagovou a amoniak. Asparagin je pro lymfoblasty esenciální aminokyselinou (nedostatečná aktivita asparagin-synthetasy), ty jsou tedy závislé na dodávce asparaginu z vnějšího prostředí. Po podání asparaginasy dochází k depleci asparaginu v plazmě a tím přes sníženou tvorbu proteinů a nukleových kyselin k indukci apoptózy lymfoblastů.

Podání asparaginasy je spojeno s ne příliš vzácnými vedlejšími účinky. Je to tělu cizí protein, tedy u pacientů může dojít k alergické reakci (až u 70%). Alergická reakce je nejčastějším limitujícím faktorem podání asparaginasy. Tvorba protilátek (IgG nebo IgE třídy) závisí na více faktorech. Protilátky neutralizují aktivitu asparaginasy, tím snižují její hladinu, snižují délku deplece asparaginu a tím i účinnost asparaginasy. Dalšími nežádoucími účinky asparaginasy jsou: hepatotoxicita, koagulační abnormity, akutní pankreatitida, sekundární diabetes a poškození CNS.

Při léčbě dětí se používají různé druhy asparaginasy. Asparaginasa je bakteriální protein izolovaný ze 2 druhů bakterií. Jednak E.colli (Elspar, Medac, Kidrolase) a Erwinie (Erwinase). U dětí, které vyvinuly alergickou reakci na některou z těchto asparaginas je používána pegylovaná asparaginasa (PEG-Asp). Ta je méně alergizující, má delší poločas rozpadu a prodlouženou aktivitu.

Cíl

Plazmatická hladina asparaginu je farmakodynamickým ukazatelem efektu terapie asparaginasou.

Monitorování hladin asparaginu v plazmě po podání jednotlivých preparátů asparaginasy v průběhu indukční a reindukční fáze léčby dětí s ALL a NHL a srovnávání jejich účinnosti (inter a intraindividuální variabilita) během léčby, sledování změn v koagulačních parametrech, vliv tvorby protilátek na hladiny plazmatického asparaginu a případné ovlivnění hladin plazmatického asparaginu po podání substituční léčby plnou krví, mraženou plazmou, fibrinogenem nebo antitrombinem III. Terapie probíhá podle evropských protokolů ALL-IC BFM 2002 a NHL BFM 95.

Metodika

Před podáním infuze asparaginasy a dále v přesně určených intervalech odběr 2 ml periferní krve. K měření hladin asparaginu je použita metoda iontově výměnné chromatografie a spektrofotometrie.

Soubor pacientů

Celkem je do souboru zařazeno 24 dětí léčených na Klinice dětské onkologie FN Brno v intervalu od začátku ledna 2005 do konce ledna 2007 s diagnosou ALL nebo NHL. Z toho je 10 dívek a 14 chlapců. 23 dětí bylo nebo je léčeno dle protokolu ALL-IC BFM 2002 (10 dívek, 13 chlapců) a 1 chlapec podle protokolu NHL BFM 95. Od začátku indukce je do souboru zařazeno 17 dětí s ALL (u 2 pacientů t.č. indukce probíhá) a 1 pacient s NHL a od reindukce 5 dětí s ALL.

Výsledky

Ze souboru pacientů mělo v průběhu léčby 12 dětí klinickou alergickou reakci, u 5-ti dětí probíhá reindukce, 4 děti nejsou zatím randomizovány (z toho 1 pacient s alergickou reakcí) a 4 děti v průběhu celé léčby alergickou reakci neměly. U 3 pacientů byla zaznamenána alergická reakce na preparát Elspar, u 2 pacientů na preparát Kidrolase a u 7 dětí na preparát Medac. Nejčastěji se alergická reakce v našem souboru projevila při zahájení reindukční fáze léčby, u 1 pacientky D+30 Protokolu I (zpoždění 7 dní v indukci) a u 1 pacienta hned D+12 Protokolu I. U 6/10 pacientů, u nichž se projevila alergická reakce na asparaginasu, došlo k depleci asparaginu v reindukci po kratší dobu. U 1 chlapce bez klinických známek alergické reakce dochází v průběhu reindukce ke zkrácení doby deplece asparaginu v plazmě (tzv. „silent inactivation“).

V našem souboru byly pacientům podány 3 druhy preparátů asparaginasy: Elspar (medián doby deplece asparaginu v plazmě 8 dní, interkvartilový rozsah 3-10 dní), Medac (medián doby deplece asparaginu v plazmě 12 dní, interkvartilový rozsah 12-14 dní), Oncaspar (medián doby deplece asparaginu v plazmě 14 dní, interkvartilový rozsah 9-23 dní).

Při sledování změn v koagulačních parametrech v průběhu léčby asparaginasou byl potvrzen v případě nedostetčné deplece asparaginu v plazmě vzestup antithrombinu III nad 120% a to v 7/12 případů (aniž by byl antithrombin III substituován).

Závěr

1. ve sledovaném souboru jsme pozorovali významné diference v mediánu navození a trvání deplece asparaginu
2. další akvizice dat pokračuje
3. pilotní data neukazují, že by substituce plné krve, AT III, fibrinogenu nebo čerstvé mražené plazmy ovlivňovala plazmatickou hladinu asparaginu
4. získaná data by mohla přispět k individualizaci léčby, k maximalizaci terapeutického účinku a k minimalizaci nežádoucích vedlejších účinků

91 Výsledky léčby dospívajících a mladých dospělých s nehodgkinskými lymfomy na Klinice dětské hematologie a onkologie v Praze.

Kabíčková E.[1], Sumerauer D.[1], Drahokoupilová E.[1], Gajdoš P.[2], Čumlivská E.[3], Kodetová D.[4], Kalinová M.[4], Kodet R.[4], Starý J.[1]

1) Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF, Praha
2) Státní zdravotní Ústav, Praha
3) Klinika zobrazovacích metod UK 2. LF, Praha
4) Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2. LF, Praha

Úvod

Nehodgkinské lymfomy (NHL) jsou heterogenní skupinou onemocnění lymforetikulárního systému, u dětí a adolescentů patří ke skupině vysoce maligních lymfomů. Představují 8-10% nádorů dětí a dospívajících. V Evropě a USA tvoří polovinu lymfomy Burkittova typu, třetinu lymfoblastické lymfomy a zbytek lymfomy velkobuněčné. NHL jsou nejrychleji rostoucí dětské nádory, časně leukemizují, infiltrují meningy, centrální nervový systém a jiné extralymfatické tkáně. Často se manifestují pod obrazem život ohrožující příhody – obstrukcí dýchacích cest, syndromem horní duté žíly, akutním renálním selháním (nejčastě-

ji na podkladě urátové nefropatie při současné infiltraci ledvin). Nebezpečná je i rychle postupující infiltrace plicního parenchymu lymfomem (1). Staging vypracovala americká pracovní skupina v St. Jude Hospital a je používán celosvětově (2). Nejvhodnějšími zobrazovacími metodami jsou rentgenový snímek hrudníku, sonografické vyšetření břicha a malé pánve, CT vyšetření hrudníku a břicha. Při podezření na CNS infiltraci provádíme MRI vyšetření mozku a páteřního kanálu. Zrychlení a zpřesnění iniciálního stagingu nabízí i pozitronová emisní tomografie s využitím fluorodeoxyglukózy (3,4).

Hlavní léčebnou metodou je intenzivní kombinovaná chemoterapie, lokální radioterapie se používá vzácně, k ošetření přetrvávajícího rezidua nádoru. Součástí léčby všech typů NHL v dětském věku je podání cytostatik do páteřního kanálu jako prevence šíření onemocnění do centrálního nervového systému. Velmi intenzivní chemoterapie je spojena s řadou vedlejších účinků, nejzávažnější léčebnou komplikací jsou těžké septické stavy s multiorgánovým selháním a krvácením. Léčba T-buněčných NHL je odvozena od léčebných protokolů pro akutní lymfoblastické leukémie (5). Trvá 1-2 roky, zahrnuje intenzivní a následně udržovací fázi. Léčebná strategie dětí se zralými B-buněčnými NHL vychází ze zkušeností předchozích francouzských a německých studií (6,7,8). Chemoterapie probíhá v pětidenních blocích s 10-14 denní pauzou a trvá 2 až 6 měsíců. Infiltrace CNS, vyšší hladina laktátdehydrogenázy a primární postižení mediastina jsou indikací k intenzivnější a delší léčbě. Klíčovými léky jsou vysokodávkovaný metotrexát a cytosin-arabinosid, cyklofosfamid, vepesid a antracykliny spolu s kortikoidy. Děti a dospívající s velkobuněčným anaplastickým lymfomem se ve většině evropských zemí léčí podle mezinárodní studie ALCL 99. Pacienti jsou rozděleni do 3 léčebných skupin podle klinického stadia a infiltrace rizikových orgánů (postižení kůže, mediastina, jater, sleziny a plic). Chemoterapeutické bloky jsou podobné blokům používaným pro léčbu zralých B-NHL, liší se pouze nižší dávkou metotrexátu a zařazením vinblastinu (9,10).

Cíl studie

Cílem studie bylo zhodnotit výsledky léčby dospívajících a mladých dospělých s nehodgkinskými lymfomy (NHL) německými protokoly BFM (Berlin-Frankfurt-Münster).

Pacienti a metody

Od ledna 1998 do prosince 2005 jsme na naší kliniku přijali celkem 86 pacientů s nově diagnostikovaným NHL, z toho 30 (35%) bylo v době stanovení diagnózy starších 14 let. V hodnoceném souboru bylo 23 chlapců a 7 děvčat, medián věku v době stanovení diagnózy byl 15.9 roku (14-20.4 let). Dvacet jedna pacientů (70%) jsme klasifikovali jako zralý B-NHL, 9 jako T-buněčný NHL. Difúzní velkobuněčný B-NHL mělo 14 pacientů, Burkittův lymfom 7 pacientů, pět T lymfoblastický NHL, 2 periferní T lymfom, 2 anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL). Čtyři nemocní byli zařazeni do klinického stadia I, 5 do stadia II, 17 do stadia III a 4 do stadia IV. Deset pacientů (33%) jsme přijímali pod obrazem náhlé příhody (7x náhlá příhoda hrudní, 2x náhlá příhoda břišní, 1x akutní renální selhání při infiltraci ledvin).

Nemocné s B-NHL a ALCL jsme v závislosti na rozsahu onemocnění léčili 2-7 cykly chemoterapie (protokol BFM 95, BFM 2004). Léčba pacientů s T-NHL zahrnovala intenzivní a následně udržovací chemoterapii (protokol BFM 95, EURO-LB 02).

Výsledky

Po ukončené léčbě žije bez známek onemocnění 24 pacientů. Čtyři pacienti (13%) zemřeli na infekční komplikace v průběhu intenzivní chemoterapie. Pouze u 2 nemocných onemocnění nereagovalo na indukční chemoterapii. I přes záchrannou léčbu (včetně autologní transplantace krvetvorných buněk) oba pacienti zemřeli na další progresi onemocnění (13 a 20 měsíců od stanovení diagnózy).

S mediánem sledování 4.7 roku (0.8-8.8 let) jsme dosáhli celkového přežití i EFS 80%. Lepší prognózu měli nemocní s B NHL (87% EFS), EFS pacientů s T NHL bylo 67%.

Závěr

Léčebné protokoly BFM nabízí dospívajícím a mladým dospělým s NHL vysokou šanci na vyléčení za podmínek časné, adekvátní diagnostiky a léčby. Intenzivní kombinovaná chemoterapie je i při odpovídající podpůrné léčbě provázena život ohrožujícími infekčními komplikacemi.

Literatura

1. Sandlung JT, Marcus KJ, Behm FR. Management of lymphoma in children. In Mauch Pm, Armitrage JO, Coiffier B, Dalla-Favera, Hartus NL. Non-Hodgkin's Lymphomas. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004; 575-599.
2. Murphy SB, Fairclough DL, Hutchison RE, et al. Non-Hodgkin's lymphomas of childhood: an analysis of the histology, staging, and response to treatment of 338 cases at a single institution. J Clin Oncol 1989;7: 186-93.
3. Kabickova E, Drahokoupilova E. Belohlavek O et al. The diagnostic and therapeutic impact of (18)F-FDG whole body PET on children, adolescents and young-adults with non-Hodgkin's lymphoma. Pediatric Blood & Cancer 2006; 46(7): 868-9.
4. Kabickova E, Drahokoupilova E, O, Stary J, et al. Prognostic value of positron emission tomography (PET) with fluorine-18 fluorodeoxyglucose ([18F] FDG) after first-line chemotherapy in childhood lymphoma. Pediatric Blood & Cancer 2006; 47(1): 357.

5. Grenzebach J, Schrappe M, Ludwig WD, et al.: Favorable outcome for children and adolescents with T-cell lymphoblastic lymphoma with an intensive ALL-type therapy without local radiotherapy. Ann Hematol 2001; 80 (Suppl 3): B73-6.
6. Kavan P, Kabickova E, Gajdos P, et al. Treatment of pediatric B-cell non-Hodgkin's lymphomas at the Motol Hospital in Prague, Czech Republic: Results based on the NHL BFM 90 protocols. Pediatr Hemat Oncol 1999; 16: 201-212.
7. Reiter A, Schrappe M, Tiemann M, et al. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. Blood 1999; 94: 3294-306.
8. Patte C, Auperin A, Michon J, et al. The Société Fran£aise d'Oncologie Pédiatrique LMB89 protocol: highly effective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. Blood 2001; 97: 3370-9.
9. Sandlund JT, Pui CH, Santana VM, et al.: Clinical features and treatment outcome for children with CD30+ large-cell non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 1994; 12: 895-8.
10. Seidemann K, Tiemann M, Schrappe M, et al. Short-pulse B-non-Hodgkin lymphoma-type chemotherapy is efficacious treatment for pediatric anaplastic large cell lymphoma: a report of the Berlin-Frankfurt-Münster Group Trial NHL-BFM 90. Blood 2001; 97: 3699-706.

Podpořeno výzkumnými záměry MZO 00064203/6713

92 Burkittův lymfom.

Weinreb M.
Klinika dětské onkologie a hematologie FN Brno

Burkittův lymfom (BL) je maligni B cell lymfoproliferace s výrazným výskytem v tropické oblasti Afriky a New Guiney, endemicky BL, s konstantně přítomným virem Epstein-Barrove (EBV) v maligních buňkách. Sporadický BL se vyskytuje v malém počtu připadů v celém světě s nizkou vazbou na EBV. Nezávisle na na původu BL, c-*myc* gen na chromosomu 8 je translokován na chromosom 14,2,22 na locus Ig genu heavy – or light-chain

Burkittův lymfom byl popsán Denisem Burkittem v Ugande před padesáti lety. Dnes platí WHO kriteria pro diagnosu Burkittova lymfomu a to: klasický histologický obraz nebo Burkitt like, $CD20^+$, $BCL6^+$, $CD10^+$, $BCL2^-$, $CD5^-$, Ki-67, >95%, IG-myc^+. Molekulární genetika posunula Burkittův lymphom blíže k diffusnimu velkobuněčnému B lymfomu, blíže ke germinalnimu centru lymfatických uzlin. Děje probihajici během transformace B lymfocytů často vedou k produkci malformovaných, deficitních lymfocytů, které mohou být zdrojem maligního klonu.

U endemického Burkittova lymfomu malarie způsobuje chronickou iritaci immunitniho systemu, vedoucí ke zvýšené aktivitě v germinalnich centrech. Navíc virus Epstein-Barrove protektuje poškozené B lymfocyty proti apoptose, Prokázana defektni aktivita T lymfocytů zhoršuje immunitni odpověď na prudce se se dělici maligni klon.

Sporadický, EBV negativni BL, zůstává etiopatogeneticky obtižně uchopitelný. Je jasné, že děje probíhající v germinalním centru lymfatické uzliny, jsou stejné jako u endemické varianty, jen presence EBV je pouze ve 20%, Musí existovat jiný mechanismus chranicí poškozené B lymfocyty před apoptosou.

93 Detekce prognosticky významných cytogenetických markerů u meduloblastomu s využitím metod CGH a I-FISH.

Nečesalová E.[1,2,3], Zitterbart K.[4], Žežulková D.[2], Filková H.[2], Pavlík T.[5], Zavřelová I.[6], Lentvorská L.[2], Vranová V.[1,2], Slámová I.[2], Pavelka Z.[4], Štěrba J.[4], Kuglík P.[1,2], Veselská R.[1]
1) Ústav experimentální biologie - Oddělení genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno
2) Oddělení lékařské genetiky, Fakultní nemocnice Brno
3) Biologický ústav, Lékařská fakulta MU, Brno
4) Klinika dětské onkologie, Lékařská fakulta MU a Fakultní nemocnice Brno
5) Institut biostatistiky a analýz, Přírodovědecká fakulta a Lékařská fakulta MU, Brno
6) Ústav patologie, Lékařská fakulta MU a Fakultní nemocnice Brno

Úvod

Meduloblastom patří mezi embryonální nádory centrálního nervového systému (CNS). Embryonální nádory představují u dětí asi 20-30% všech nádorů CNS, z čehož více než dvě třetiny připadají na meduloblastom. Jde o tumor neuroektodermální histogeneze vycházející z mozečku, diseminace onemocnění je v době diagnózy přítomna u přibližně třetiny pacientů. Incidence je udávána mezi 0,2-0,6 na 100 000 dětí, medián věku při diagnóze je 9 let (0-88 let) se dvěma vrcholy: mezi 2.-4. a 6.-8. rokem. Bývá popisována lehká predominance výskytu u chlapců (1,15 až 2,0 : 1). Navzdory agresivní terapii, která zahrnuje chirurgické odstranění primárního nádoru, radioterapii a chemoterapii, celkové pětileté přežití pacientů je pouze 50-60% [1].

U meduloblastomu bylo popsáno několik histolopatogických subtypů: klasický, desmoplastický/nodulární a velkobuněčný/anaplastický. Anaplastický meduloblastom představuje subtyp s horší prognózou, zatímco desmoplasie byla v některých studiích spojena s dobrou klinickou prognózou [2,3].

K nejčastějším cytogenetickým změnám v buňkách meduloblastomu patří částečná nebo úplná ztráta 17p, která je většinou spojená s přítomností isochromosomu 17q. Ztráta genetického materiálu postihuje dále oblasti 8, 9, 10q, 11 a 16q, naopak zisk genetického materiálu se nejčastěji týká oblastí 1, 7, 9 a 17q. K dalším charakteristickým změnám - ovšem s relativně nízkou incidencí (mezi 5-10% případů) - patří amplifikace genu MYCC (8q24-q26) a genu MYCN (2p24), které představují významné prognostické faktory v léčbě meduloblastomu, neboť jsou asociovány s agresivním průběhem onemocnění a se špatnou prognózou [3-6]. Rovněž přítomnost 17p je v některých pracích asociována s horší prognózou, prognostický význam delece 17p však není zatím zcela objasněn [3,7]. K identifikaci dosud prokázaných cytogenetických markerů meduloblastomu s prognostickým významem jsou dnes vedle klasické cytogenetiky a interfázní fluorescenční in situ hybridizace (I-FISH) využívány i metody celogenomového screeningu, zejména technika komparativní genomové hybridizace (CGH) [5].

Cílem naší studie byla detekce chromosomových změn v nádorové tkáni meduloblastomu metodou CGH a sledování případné korelace těchto změn s histologickým subtypem nádoru. I-FISH byla užita k průkazu amplifikace genů MYCC a MYCN, která je v literatuře popsána jako nepříznivý prognostický znak [3-6]. Překládaná práce shrnuje cytogenetické nálezy u jednotlivých pacientů ve vztahu ke klinickým údajům a dokumentuje přínos obou užitých metod v detekci nenáhodných cytogenetických změn v nádorové tkáni meduloblastomu.

Soubor vyšetřených pacientů

V letech 2002-2006 bylo provedeno molekulárně cytogenetické vyšetření primární nádorové tkáně u souboru 18 dětí s diagnostikovaným meduloblastomem. Poměr pohlaví těchto pacientů byl 11:7 (chlapci : dívky), věk pacientů se pohyboval v rozmezí 2-17 roků (průměrný věk 9 let). V tomto souboru pacientů byly zastoupeny všechny tři histologické subtypy meduloblastomu: klasický typ byl diagnostikován u 12 pacientů (průměrný věk v době stanovení diagnózy: 10 let), desmoplastický typ se vyskytoval u 4 dětí (průměrný věk v době diagnózy: 4 roky) a velkobuněčný typ byl potvrzen u 2 pacientů (věk v době diagnózy: 2 roky a 14 let).

Metody molekulární cytogenetiky

Výchozím materiálem pro I-FISH analýzu byly fixované otisky nádorové tkáně nebo 4 μm řezy získané z parafinových bloků. Pro detekci prognosticky významných amplifikací genů MYCC a MYCN byla použity sondy LSI N-myc/CEP-2 a LSI c-myc, CEP8 (Abbott Vysis) dle protokolů výrobce. Jako zisk (gain) byly hodnoceny případy se 3 až 9 kopiemi příslušného genu, za amplifikaci byly považovány případy s 10 a více kopiemi genu na jádro. Pro celogenomový screening metodou CGH byly odebrány 3 ng DNA izolované ze vzorku nádorové tkáně. DNA nádoru byla značena Vysis SpectrumGreen dUTP pomocí Vysis CGH nick translačního kitu, jako referenční DNA byla použita celková lidská genomová DNA zdravého člověka značená Vysis SpectrumRed dUTP (vše Abbott Vysis). Preparáty byly pozorovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus BX-61 se CCD kamerou COHU 4910. K hodnocení výsledků byly využit systém pro analýzu obrazu LUCIA G4.82 – KARYO/FISH/CGH (Laboratory Imaging, Praha).

histopatologický subtyp nádoru	n	zisk MYCC	amplifikace MYCC	zisk MYCN	amplifikace MYCN
klasický	12	4	0	3	0
desmoplastický	4	2	0	2	0
velkobuněčný	2	1	1	0	2

Tab.1.: Souhrnné výsledky detekce genů MYCC a MYCN u vyšetřovaného souboru 18 pacientů dle histopatologického subtypu nádoru (n = počet pacientů). Jako zisk byly hodnoceny případy se 3 až 9 kopiemi příslušného genu, za amplifikaci byly považovány případy s 10 a více kopiemi genu na jádro.

Výsledky

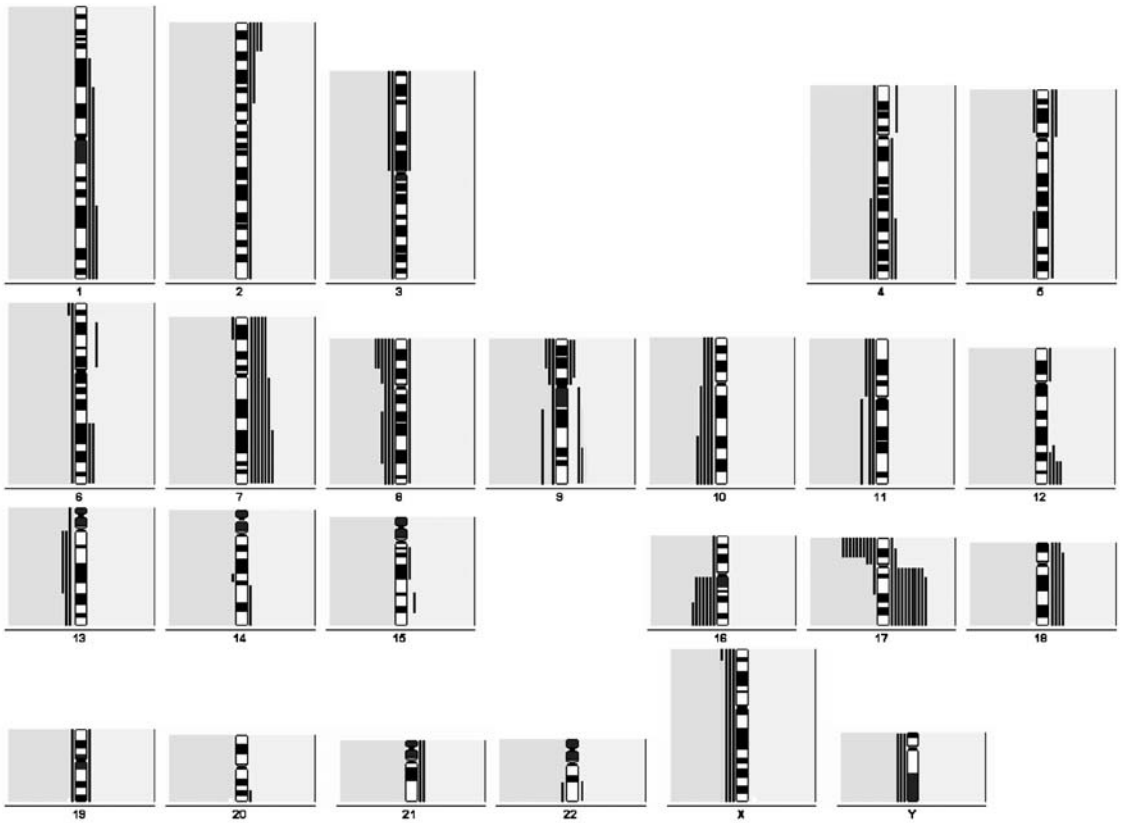
Změny v počtu kopií genů MYCC a MYCN, které byly detekovány metodou I-FISH u jednotlivých histolopatogických subtypů meduloblastomu, jsou znázorněny v Tab.1. U 12 pacientů s klasickým subtypem meduloblastomu byly nalezeny 4 případy (33%) se ziskem genu MYCC a 3 případy (25%) se ziskem genu MYCN. Amplifikace uvedených genů nebyla v případě klasického subtypu nalezena u žádného ze studovaných pacientů. V případě desmoplastického subtypu byly zisky MYCC i MYCN nalezeny u 2 ze 4 vyšetřených pacientů (50%), amplifikace však rovněž detekována nebyla. U 2 případů velkobuněčného subtypu byla nalezena amplifikace MYCC u jednoho a MYCN u obou sledovaných případů.

Analýza přežití vykazuje trend k agresívnějšímu klinickému průběhu onemocnění u pacientů se ziskem MYCC (medián EFS 16 měsíců vs. 7,5 měsíce, p=0,224, Cox's F-test) a ziskem MYCN (medián EFS 15,3 měsíce vs. 10,8 měsíce, p=0,376, Cox's F–test).

Pomocí metody CGH bylo v souboru 18 pacientů nalezeno celkem 116 změn (Obr.1). Zisky postihovaly dlouhé raménko chromozomu 17 (67% případů), celý chromozom 7 nebo část jeho dlouhého raménka (39%), chromozom 18 (22%), chromozom 2 a to převážně jeho krátké raménko (22%) a různé části chromozomu 9 (22%). Ztráty byly prokázány v oblasti 17p (56%), dlouhého raménka chromozomu 16 (39%), celého chromozomu 8 nebo jeho části (33%), chromozomu 10 (28%) a chromozomu 11 (22%). Další změny byly rovněž nalezeny na chromozomech 1, 4, 12, 13 a 21.

Zhodnocení rozsahu a stupně anaplasie představuje u meduloblastomu relativně nově definovaný histopatologický prognostický znak; střední a těžká anaplasie je ukazatelem agresivnějšího klinického průběhu onemocnění [2]. Bylo proto provedeno patologické review dostupné archivní tkáně (n=16) pacientů našeho souboru jedním patologem (I.Z.) a stanoven stupeň anaplasie na základě publikovaných kritérií [2]. Byl zaznamenán trend k vyššímu celkovému počtu změn na CGH pro středně a těžce anaplastické nádory ve srovnání s nádory s anaplasií žádnou a mírnou (medián počtu změn na CGH 9 vs. 4, rozsah 1-13 vs. 1-11; p=0,29, Mann-Whitney U-test). Rozdíl v celkovém počtu změn na CGH u pacientů s metastatickou nemocí oproti pacientům s lokalizovaným onemocněním nebyl patrný (medián 6 vs. 7,5, rozsah 2-11 vs. 1-13; p=0,91, Mann-Whitney U-test).

Vztaženo k histopatologickému subtypu meduloblastomu, medián počtu změn na CGH u klasické varianty byl 3, u desmoplastické 10 a u velkobuněčné 7. Byl prokázán statisticky významný rozdíl v počtu změn na CGH mezi klasickou a desmoplastickou variantou (n=16, rozsah 1-13 vs. 6-20; p=0,046, Mann-Whitney U-test).



Obr. 1.: Souhrnné výsledky celogenomového vyšetření chromozomových změn u souboru 18 pacientů s meduloblastomem metodou CGH: u jednotlivých chromosomů linie znázorňují detekované zisky (vpravo) a ztráty (vlevo) genetického materiálu.

Závěr

Výsledky získané metodou CGH na vyšetřovaném souboru pacientů s diagnózou meduloblastom prokázaly, že celkový počet změn byl vyšší u středně až těžce anaplastických nádorů, tento trend však nebyl statisticky významný. Signifikantní rozdíl v počtu změn byl v našem souboru zaznamenán i z hlediska hodnocení histopatologického subtypu meduloblastomu, zejména mezi klasickou a desmoplastickou variantou (medián 3 vs. 10). Naproti tomu nebyl zjištěn rozdíl mezi počtem změn u pacientů s metastatickou nemocí a u pacientů s lokalizovaným onemocněním. Analýza přežití pak potvrdila trend k agresivnějšímu klinickému průběhu onemocnění u pacientů, u nichž byly metodou I-FISH detekovány zisky MYCC a MYCN. Lze tedy shrnout, že detekce prognosticky významných cytogenetických markerů metodami CGH a I-FISH představuje důležitou součást diagnostiky meduloblastomu a umožňuje zpřesnění stratifikace pacientů z hlediska klinického průběhu onemocnění.

Literatura

1. Strother DR, Pollack IF, Fisher PG, et al. Tumors of the central nervous system. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds). Principles and practice of pediatric oncology (ed 4). Philadelphia, PA, Lippincott Williams and Wilkins 2002, 751-824.
2. Eberhart CG, Kepner JL, Goldthwaite P, Kun LE, Duffner PK, Friedman HS, Strother DR, Burger PC. Histopathologic grading of medulloblastomas: a Pediatric Oncology Group study. Cancer 94, 552-60, 2002.
3. Lamont JM, McManamy CS, Pearson AD, Clifford SC, Ellison DW: Combined histopathological and molecular cytogenetic stratification of medulloblastoma patients. Clin Cancer Res 10, 5482-5493, 2004.
4. Eberhart CG, Kratz JE, Schuster A, Goldthwaite P, Cohen KJ, Perlman EJ, Burger PC: Comparative genomic hybridization detects an increased number of chromosomal alterations in large cell/anaplastic medulloblastomas. Brain Pathol 12, 36-44, 2002.
5. Rickert CH, Paulus W: Comparative genomic hybridization in central and peripheral nervous system tumors of childhood and adolescence. J Neuropathol Exp Neurol 63, 399-417, 2004.
6. Aldosari N, Bigner SH, Burger PC, Becker L, Kepner JL, Friedman H, McLendon RE: MYCC and MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group. Arch Pathol Lab Med 126, 540-544, 2002.
7. Nicholson J, Wickramasinghe C, Ross F, Crolla J, Ellison D: Imbalances of chromosone 17 in medulloblastomas determined by comparative genomic hybridisation and fluorescence in situ hybridisation. Mol Pathol 53, 313-319, 2000.

Práce byla podpořena granty VZ MSM 0021622415 a IGA NR9125-4/2006.

94 Exprese izoforem proteinu p73 u meduloblastomu a její prognostický význam.

Zitterbart K.[1], Zavřelová I.[2], Kadlecová J.[3], Pavlík T.[4], Kratochvílová A.[2], Spěšná R.[2], Štěrba J.[1]
1) Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno
2) Ústav patologie LF MU a FN Brno
3) Oddělení lékařské genetiky FN Brno
4) Institut biostatistiky a analýz, LF MU a PřF MU, Brno

Úvod

TP73, člen genové rodiny nádorového supresoru p53, se vyznačuje nezvyklou komplexitou genového lokusu. Přepisem ze dvou promotorů a alternativním sestřihem primárního transkriptu vznikají rozdílné N-terminální izoformy: TAp73 (*full-length)* je transaktivačně kompetentní variantou proteinu p73, zatímco zkrácené (*truncated*) izoformy Np73, p73ex2, p73ex2/3, souhrnně označované jako TAp73, postrádají transaktivační (TA) doménu a funkčně vykazují k p53 a TAp73 negativní dominanci. Rovněž na C-terminálním konci proteinu p73 se setkáváme díky alternativnímu sestřihu primárního transkriptu s rozdílnými izoformami, z nichž je řetězcem v plné délce.

Byl prokázán prognostický význam detekce p73 v případě některých malignit: zvýšená exprese izoforem p73 má negativní dopad např. u pacientů s adultními gliálními nádory CNS. Na dysregulaci signálních drah nádorových buněk se podílejí především ΔTAp73 izoformy [1-6].

Za fyziologických podmínek se p73 podílí rovněž na regulaci proliferace a diferenciace ve vyvíjející se neuronální tkáni *(developmental signaling)* [7,8]. Geny, které se účastní morfogeneze, jsou aberantně exprimovány u řady neurogenních nádorů [9,10]. Na základě těchto údajů jsme stanovili pracovní hypotézu možné účasti p73 v tumorigenezi meduloblastomu.

Cíl

Studie definuje podíl N-terminálních izoforem proteinu p73 v dysregulaci signálních drah u meduloblastomu, nejčastějšího maligního nádoru CNS dětí. Bylo provedeno imunohistochemické značení p73α a ΔNp73 v nádorové i kontrolní tkáni a následná analýza jejich možného prognostického významu. Metodou real-time PCR byly detekovány transkripty TAp73 a ΔNp73 a srovnána jejich exprese ve vzorcích meduloblastomu s referenční RNA normálního cerebela.

Materiál a metody

Tkáň meduloblastomu, normální tkáň mozečku: Parafinové bloky pacientů s diagnózu primárního meduloblastomu léčených na Klinice dětské onkologie LF MU a FN Brno v letech 1998-2006 (n=29) a bloky s normální tkání mozečku byly získány z archivů patologicko-anatomických ústavů. Nativní vzorky nádorové tkáně (n=13) byly zamraženy v tekutém dusíku a uchovány při –80°C u většiny pacientů léčených v letech 2003-2006. Komerčně dostupná RNA z normálního lidského mozečku (Human Brain Cerebellum Total RNA, BD Biosciences) byla užita jako referenční vzorek nenádorové tkáně (jedná se o směsný vzorek RNA izolované z mozečku 24 mužů/žen zmírajících náhlou smrtí).

Imunohistochemické značení p73α/β a ΔNp73: Z formalínem fixované, v parafinových blocích zalité tkáně byly získány 4 μm řezy. Po standardních procedurách byly vzorky inkubovány při 4°C přes noc s primárními protilátkami: (i) myší monoklonální

protilátka anti-73α/β (klon ER-15, Lab Vision, Neomarkers; ředění 1:2000), epitop lokalizován mezi AK 380-637 lidského proteinu p73, specificky značena pouze α-izoforma [11]. (ii) myší monoklonální protilátka anti-delta-Np73 (klon 38C674.2, Imgenex; ředění 1:4000), epitop lokalizován mezi AK 2-13 lidského proteinu ΔNp73. Imunodetekce byla provedena pomocí avidin-biotinového komplexu (Vectastain *Elite ABC* Kit, Vector Laboratories) a vizualizována užitím diaminobenzidinu jako substrátu. Řezy byly dobarveny Gillovým hematoxylinem.

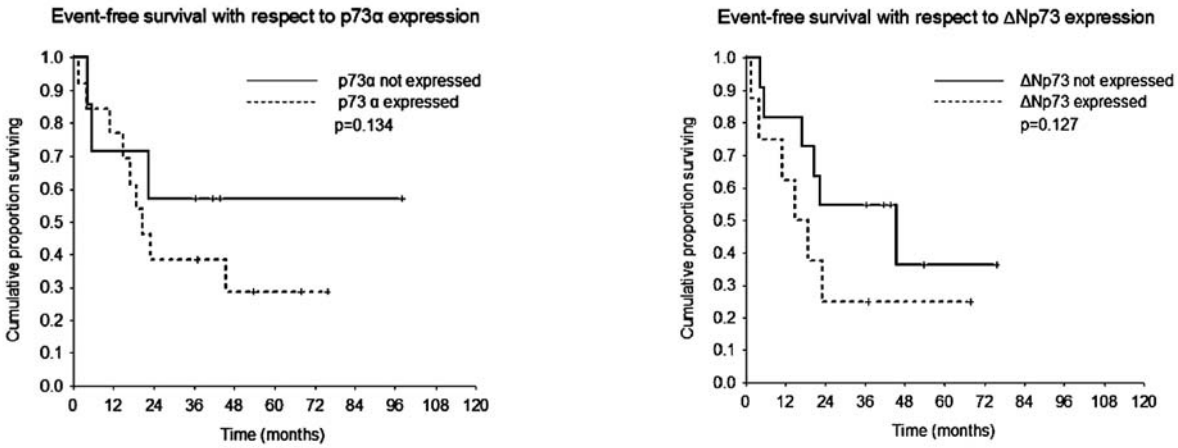
Real-time PCR detekce TAp73 a ΔNp73: Celková RNA byla izolována z nativní nádorové tkáně užitím TRIzol (Invitrogen), koncentrace byla určena spektrofotometricky. 1 μg RNA byl reverzně přepsán užitím oligo(dT) primeru a reverzní transkriptázy Transcriptor (Roche Diagostics). Vyšetření metodou real-time PCR v modifikaci TaqMan bylo provedeno na systému LightCycler (Roche Diagostics). Jednotlivé reakce probíhaly v LC kapiláře v objemu 10 μl reakční směsi, skládající se z 1 μl cDNA, 0,5 μM každého páru primerů 0,2 M TM sondy (TIB MOLBIOL), 0,25 μl uracil-DNA glykosylázy a z reakčního kitu FastStart DNA Master HybriProbe (Roche Diagostics) obsahujícího Taq DNA polymerázu, dNTP a Mg^{2+}. Sekvence primerů (KRD, TIB MOLBIOL) byly designovány dle [6]. Exprese cílových transkriptů byla normalizována k expresi β-aktinu (housekeepingový gen), k výpočtu koncentrací byla užita interpolace ze standardních kalibračních křivek.

Statistické hodnocení: Ke stanovení prognostického významu IHC pozitivity p73α a ΔNp73 byly užity standardní nástroje pro analýzu přežití (Kaplan-Maierovy křivky, Cox F-test). Wilcoxon rank sum test byl užit ke srovnání kvantifikované exprese transkriptů TAp73 a ΔNp73 v referenční RNA zdravého cerebella a v nádorové tkáni meduloblastomu.

Výsledky

Imunohistochemická detekce p73α a ΔNp73

Z celkového počtu 29 histopatologicky vyšetřených meduloblastomů bylo dle morfologických kritérií WHO klasifikováno 23 (79%) nádorů jako klasický podtyp, 5 meduloblastomů bylo desmoplastických (17%), 1 velkobuněčný. Následně byla provedena imunohistochemická detekce p73α a ΔNp73 v souboru nádorové tkáně i v archivní normální tkáni mozečku, jako pozitivní byl hodnocen výsledek, při němž došlo k požadované reakci u více než 1% buněk. Plexus choroideus byl užit jako pozitivní kontrola značení p73α i ΔNp73 [5].



Obr. 1

V normální tkáni mozečku, ze které je meduloblastom histogeneticky odvozen, nebyla v případě vzorku adultního cerebella zaznamenána žádná exprese vyšetřovaných izoforem p73. Ve snaze postihnout eventuelní vývojovou odlišnost jsme vyšetřili rovněž archivní tkáň mozečku novorozence. Překvapivě, Purkyněho buňky vykazovaly v tomto případě silnou cytoplasmatickou pozitivitu p73α i ΔNp73, zatímco buňky zevní a vnitřní granulární vrstvy a molekulární vrstvy se specificky neznačily. Toto zjištění, v souladu s dříve dokumentovanou účastí p73 v morfogenezi neuronální tkáně, nebylo doposud na základě dostupných literárních údajů zaznamenáno a svědčí o zapojení p73-signální dráhy rovněž v ontogenetickém vývoji lidského mozečku.

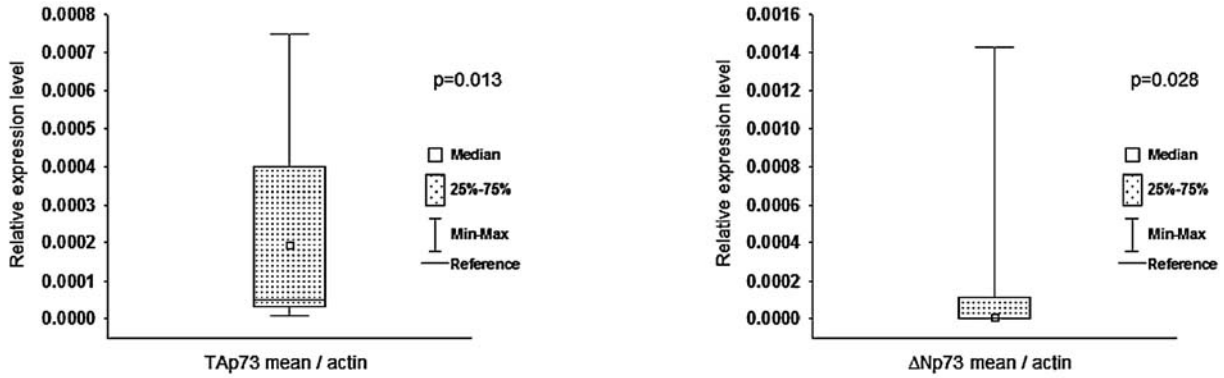
Imunohistochemická detekce p73α prokázala pozitivitu u 15 z 29 (52%) vyšetřených meduloblastomů, pozitivita dosahovala v jednotlivých případech až 50% buněk nádorové populace. U 7 (24%) případů bylo p73α-pozitivních 1-5% nádorových buněk, u 4 (14%) vzorků bylo imunoreaktivních 6-15% nádorových buněk a u dalších 4 (14%) vzorků byla pozitivita p73α u více než 16% (rozsah 20-60%) buněk nádoru. Na subcelulární úrovni převažovala v imunoreaktivitvních vzorcích souběžná jaderná i cytoplazmatická distribuce signálu.

IHC značení ΔNp73 odhalilo pozitivitu u 8 z 28 (29%) vyšetřených vzorků, převažovala cytoplasmatická lokalizace ΔNp73 proteinu. Společná exprese full-length C-terminální α-izoformy a N-terminální truncated ΔN-formy byla prokázána v 7 z 15 α–pozitivních případů. Vždy se jednalo o ΔNp73 pozitivitu v menším či stejném procentu buněk oproti α-řetězci. Toto pozorování nepřímo svědčí pro skutečnost, že jsou exprimovány i další N-terminální izoformy p73, což je zcela v souladu s výsledkem real-time PCR analýzy prokazující transkript TAp73 u většiny touto metodou vyšetřených vzorků meduloblastomu.

Dále jsme provedli pilotní analýzu možného prognostického významu IHC pozitivity p73α a ΔNp73. Z hodnocení byli vyloučeni ti pacienti, u nichž nebyl dodržen optimální léčebný plán (například odmítnutí adjuvantní radioterapie zákonným zástupcem dítěte apod.). Jak je patrno z *Obr. 1*, je dokumentován trend k horší prognóze pacientů s p73α (p=0,134) a ΔNp73 (p=0,127) imunoreaktivními meduloblastomy. Statistické významnosti nebylo dosaženo pro limitovaný počet vzorků, který vyplývá z reálné incidence tohoto nádoru v populaci. V případě adultních gliomů CNS byl prognostický význam ΔTA izoforem v literatuře dokumentován [12]. Prospektivní vyšetřování dalších případů nám umožní definitivní zodpovězení této otázky rovněž u meduloblastomu.

Real-time PCR detekce transkriptů TAp73, ΔNp73

TAp73 exprese byla detekována ve všech vyšetřených vzorcích meduloblastomu (n=13). Medián exprese cílového transkriptu v referenční RNA (Human Brain Cerebellum Total RNA) činil 0,0065% exprese β-aktinu, u meduloblastomu 0,0192% exprese β-aktinu. Bylo pozorováno signifikantní zvýšení exprese TAp73 v nádorové tkáni meduloblastomu (p=0,013). (*Obr. 2.)* ΔNp73 exprese byla detekována u 6 z 13 (46%) vyšetřených vzorků meduloblastomu, exprese v referenční RNA z mozečku byla nulová, i zde byl prokázán signifikantní rozdíl v expresi cílového transkriptu mezi nádorovou a normální tkání (p=0,028) *(Obr.2).*



Obr. 2

Závěr

Studie prokázala expresi N-terminálních izoforem proteinu p73 u meduloblastomu. Metodou real-time PCR byl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi transkriptů TAp73 a ΔNp73 mezi nádorovou tkání meduloblastomu a normální tkání mozečku, toto zjištění bylo potvrzeno rovněž imunohistochemicky. Dle autorům dostupné literatury jde o první průkaz zvýšené exprese transaktivačně deficientní ΔNp73 izoformy u tohoto onemocnění. Pilotní analýza prognostického významu odhalila trend k horší prognóze dětí s p73α ΔNp73 imunoreaktivními nádory.

Na základě těchto pozorování vyvozujeme, že exprese izoforem p73 se podílí na dysregulaci signálních drah meduloblastomu a definujeme TP73 jako vhodný kandidátní gen pro další studium jeho prognostického významu.

Práce byla podpořena granty FRVŠ 1303/05 a RASO ČOS 2005.

Literatura

1. Kaghad M, Bonnet H, Yang A et al. *Cell* 1997;90:809-819.
2. Moll UM, Slade N. *Mol Cancer Res* 2004;2:371-386.
3. Ozaki T, Nakagawara A. *Cancer Sci* 2005;96:729-737.
4. Zaika AI, Slade N, Erster SH et al. *J Exp Med* 2002;196:765-780.
5. Domínguez G, García JM, Pena C et al. *J Clin Oncol* 2006; 24:805-15.
6. Stiewe T, Tuve S, Peter M et al. *Clin Cancer Res* 2004;10:626-633.
7. Pozniak CD, Radinovic S, Yang A et al. *Science* 2000;289:304-306.
8. Jacobs BW, Kaplan RD, Miller FD. *J Neurochem* 2006; 97:1571-84.
9. Loiseau H, Arsaut J, Demotes-Mainard J. *Neurosci Lett* 1999;263:173-176.
10. Fogarty MP,,. *J Neurobiol* 2005;64:458-475.
11. Sayan AE, Paradisi A, Vojtesek B et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330:186-193.
12. Wager M, Guilhot J, Blanc JL et al. *Br J Cancer* 2006;95:1062-9.

95 Komplexní terapie meduloblastomu u dětí a dospívajících – naše zkušenosti.

Perníková I.[1], Cháňová M.[2], Tichý M.[3], Holub M.[3], Zámečník J.[4]
1) Klinika dětské neurologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha
2) Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF a FN Motol, Praha
3) Klinika dětské neurochirurgie, 2. LF UK a FN Motol, Praha
4) Ústav patol. anatomie a molekulární biologie 2. LF UK a FN Motol, Praha

Cíl

Autoři prezentují výsledky terapeutické strategie u dětí s diagnózou vysoce rizikového meduloblastomu. Práce vyhodnocuje úspěšnost včasné diagnostiky, radikality neurochirurgické operace a terapie dle protokolu SJMB 3/97.

Metoda

V období 1999-2005 byla diagnóza meduloblastomu stanovena u 17 pacientů (11 chlapců, 6 děvčat), průměrný věk v době stanovení diagnózy byl 9 let (3,3-18,2).

Prvním klinickým příznakem onemocnění byl syndrom nitrolební hypertenze (10), mozečkový syndrom (5) a syndrom kmenový (2). MRI mozku prokázala patologický nádorový proces v oblasti IV. komory (13), mozečkové hemisféře (2) a v supratentoriální lokalizaci (2). U dvou pacientů byla v době stanovení diagnózy prokázána diseminace nádorového procesu. Radikální odstranění nádoru provedeno u 10 pacientů, subtotální resekce (reziduum více jak 1,5 cm^3) u 7 pacientů. Přítomnost amplifikace c-myc onkogen byla u 10 pacientů, amplifikace N-myc onkogen byla prokázána u 3 pacientů, jiné cytogenetické abnormality u 6 pacientů.

Po neurochirurgické operaci následovala terapie dle protokolu SJMB 3/97 (převod periferních hematopoetických kmenových buněk, radioterapie s konkomitantně podávaným vincristinem.

Výsledky

Po ukončení radioterapie bylo 12 pacientů v kompletní remisi, 4 pacienti v parciální remisi, u 1 pacienta prokázána progrese onemocnění. Po ukončení chemoterapie 13 pacientů v kompletní remisi, 2 pacienti v parciální remisi, 1 pacient v progresi onemocnění, 1 pacient zemřel. Průběh terapie komplikovala u všech pacientů hematotoxicita a gastrointestinální toxicita, neurotoxicita (motorická, senzitivní II.-III. stupně) u 10 pacientů.

Over all survival a EFE (event free survival) byl 82,4%.

Kvalita života (QOL) hodnocena škálou dle Karnofského 100-90 u 12 pacientů (86%), poruchy učení a chování středního stupně u 6 (42%) pacientů.

Závěr

Terapeutický protokol SJMB 3/97 ukazuje slibné výsledky včetně závažné, nicméně zvládnutelné akutní toxicity a pozdních následků. Základem terapie nádorů CNS je chirurgická léčba, rozsah resekce je přímo úměrný prognóze. Agresivní chirurgický přístup u dětí významně prodlužuje jejich život při zachování kvality života.

Podporováno výzkumným záměrem MZ ČR a FN Motol 0000064203/6503,6712

96 Léčba dětí s neuroblastomem na Klinice dětské onkologie v letech 1998 – 2007.

Mazánek P.[1], Štěrba J.[1], Bajčiová V.[1], Kuglík P.[2], Múdry P.[1]
1) Klinika dětské onkologie, FN Brno
2) Oddělení lékařské genetiky, FN Brno

Neuroblastom (NBL) je maligní embryonální nádor dětského věku. Vychází z nezralých, nediferencovaných buněk sympatiku (z buněk primordiální neurální lišty, které v embryonální fázi vývoje osidlují sympatická ganglia, dřeň nadledviny a některé další oblasti).

Neuroblastom je nejčastější extrakraniální solidní nádor dětského věku (u dětí do 15 let představuje 8 – 10% ze všech zhoubných nádorů). V České republice onemocní každý rok neuroblastomem přibližně 20 – 30 dětí. Onemocnění je diagnostikováno v 50% u dětí do 2 let věku, v 75% do 4 let a 90% do 10 let věku. Ve věkové skupině do 1 roku je NBL nejčastější malignitou vůbec a incidence neuroblastomu u kojenců je dvojnásobkem incidence akutních leukémií v této věkové skupině.

Léčba neuroblastomu odráží individuálně stanovený stupeň rizika průběhu onemocnění, stanovený na podkladě klinických, biologických a především genetických prognostických markerů. V posledních letech jsme svědky výrazného pokroku nejen v oblasti nových genetických rizikových markerů neuroblastomu i nových technologií, které stratifikaci pacientů do jednotlivých rizikových skupin zjednodušují i zpřesňují (např. array-CGH)

Léčebné protokoly pro většinu pacientů jsou tvořeny kombinací indukční chemoterapie, operace a různě intenzivní pooperační chemoterapie či ABMT, u vybraných pacientů s neuroblastomem do 3 měsíců věku (tzv. perinatální neuroblastom) je možné pouze pravidelné sledování bez jakéhokoliv terapeutického zásahu (wait and watch).

V letech 1998-2007 bylo na Klinice dětské onkologie léčeno celkem 58 pacientů s neuroblastomem. Z toho bylo 22 pacientů hodnoceno jako neuroblastom vysokého rizika (přežívá 10), 21 pacientů s onemocněním středního rizika (přežívá 19), 7 pacientů s onemocněním nízkého rizika (přežívá 7) a 8 pacientů splnilo diagnostická kriteria tzv. perinatálního neuroblastomu (přežívá 8 pacientů).

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. NR9125-4

97 Výsledky léčby nádorů mozku mladistvých protokoly CCG A 9961 a SJMB 3/97 na klinice Dětské hematologie a onkologie v Praze.

Cháňová M.[1], Kabíčková E.[1], Perníková I.[2], Tichý M.[3], Malinová B.[4], Gajdoš P.[5], Starý J.[1]
1) Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN v Praze Motole
2) Klinika dětské neurologie UK 2. LF a FN v Praze Motole
3) Oddělení dětské neurochirurgie UK 2. LF a FN v Praze Motole
4) Radioterapeutické oddělení UK 2. LF a FN v Praze Motole
5) Státní zdravotní ústav

Cíle

Autoři přehledně informují o léčbě nádorů mozku u mladistvých pacientů. Hodnotí účinnost a použitelnost dvou léčebných protokolů určených zejména pro embryonální nádory mozku standardního (CCG A 9961) a vysokého (SJMB 3/97) stupně rizika. Protokol CCG A 9961 zahrnuje operaci, radioterapii kraniospinální osy v celkové dávce 25 Gy s boostem na místo primárního nádoru do celkové dávky 55 Gy klasickou frakcionací s konkomitantně podávaným vincristinem. Následuje chemoterapie kombinací vincristin, lomustin, cisplatina v 8 cyklech. V protokolu SJMB 3/97 po operaci následuje stimulace a separace periferních hematopoetických progenitorových buněk, radioterapie kraniospinální osy v celkové dávce 30,6 Gy s boostem na místo primárního nádoru do celkové dávky 55,8 Gy klasickou frakcionací také s konkomitantně podávaným vincristinem a submyeloablativní chemoterapie (vinkristin, cisplatina, cyklofosfamid) s podporou autologních periferních hematopoetických progenitorových buněk.

Metody

V letech 1998 – 2005 byl na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. LF a FN v Praze Motole diagnostikován nádor mozku u 299 dětí. Padesát sedm pacientů splňovalo kriteria k zařazení do léčebných protokolů pro embryolnální nádory standardního (CCG A 9961) nebo vysokého (SJMB 3/97) rizika. Z nich jsme do této práce začlenili 21 (13 + 8) mladistvých (s mediánem věku 12,1 roku (10 – 17,3), resp. 13,6 roku (10,1-17,6). Statistické hodnocení věkové kategorie 14-18 let by vzhledem k malému počtu pacientů bylo obtížné a velmi ovlivněné chybou malých čísel.

Součástí práce je přehled stanovených histologických diagnóz, autoři podrobně informují o lokalizacích nádorů, klinickém stadiu, radikalitě chirurgického výkonu a biologických znacích jednotlivých typů nádorů.

Výsledky a závěry

Autoři přehledně a statisticky shrnují léčebné výsledky a míru toxicity použitých léčebných protokolů u mladistvých pacientů s nádorem mozku u v závislosti na stupni radikality chirurgického výkonu a biologických znacích jednotlivých nádorů.

Základními prognostickými faktory nádorů mozku u dětí jsou kompletní resekce nádoru, lokalizované onemocnění, nepřítomnost leptomeningeálních metastáz a diploidní počet kopií onkogenu c-myc (zejména u nádorů embryonálního původu). Naše zkušenost potvrzuje dobrou použitelnost obou léčebných režimů a navzdory vysoké, ale zvládnutelné toxicitě navíc i slibné léčebné výsledky.

V současné době je EFS pacientů léčených protokolem SJMB 397 (n=8) 87,5%, EFS pacientů léčených protokol CCGA9961 (n=13) je 75%. OS u obou skupin pacientů je 100% – nikdo z pacientů nezemřel.

Práce vznikla s podporou MZO 00064203/6712 a 00064203/6503.

98 Výsledky léčby gliomů nízkého stupně malignity u dětí na KDO FN Brno.

Pavelka Z.[1], Zitterbart K.[1], Pavlík T.[2], Šlampa P.[3], Ventruba J.[4], Brichtová E.[4], Paleček T.[5], Jakubec J.[6], Houdek M.[7], Křen L.[8], Skotáková J.[9], Ošlejšková H.[10], Turbová T.[1], Štěrba J.[1]

1) Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno
2) Institut biostatistiky a analýz PřF a LF MU Brno
3) Oddělení radiační onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno
4) Neurochirurgické oddělení, KDCHaT LF MU a FN Brno
5) Neurochirurgická klinika FNsP Ostrava
6) Neurochirurgická klinika FN Hradec Králové
7) Neurochirurgická klinika FN Olomouc
8) Ústav patologie LF MU a FN Brno
9) Klinika dětské radiologie LF MU a FN Brno
10) Klinika dětské neurologie LF MU Brno a FN Brno

Úvod

Prognóza dětí s gliomy nízkého stupně malignity (LGG) je obecně dobrá (80-90% pacientů dlouhodobě přežívá). Léčba je volena diferencovaně v závislosti na lokalizaci, závažnosti symptomů, věku a dynamice růstu tumoru. Chirurgické odstranění je metodou volby. Adjuvantní onkologická léčba je indikována u dětí s nekompletně resekovaným nebo inoperabilním tumorem a progresí symptomů, či při inoperabilním relapsu. Pro riziko pozdních následků je lokální radioterapie rezervována pro děti nad 10 (dříve 5) let věku. U menších dětí s indikací k adjuvantní léčbě bývá podávána chemoterapie, s cílem oddálení případné radioterapie do vyššího věku pacienta. Konzervativní přístup je na místě zejména u dětí s LGG a neurofibromatózou typu 1, metodou první volby je chemoterapie.

Metodika

Autoři prezentují soubor dětí léčených na Klinice dětské onkologie FN Brno v letech 1998 – 2006 v intencích protokolu SIOP (CNS 9702), které byly referovány z různých neurochirurgických pracovišť. Léčba zářením je aplikována formou konformní radioterapie. V indikovaných případech je možno použít stereotaktickou radioterapii gama-nožem nebo X-nožem. Chemoterapeutické rameno obsahuje kombinaci vinkristin a karboplatina. Jsou zhodnocena základní epidemiologická, klinická a radiologická data, prognostické faktory a vlastní léčebné výsledky za použití obvyklých statistických ukazatelů.

Výsledky

V uvedeném období jsme sledovali 108 dětí s diagnózou LGG, s mediánem věku 5,5 let při diagnóze a převahou chlapců (58,3%). Hlavními histologickými typy v souboru byly: pilocytický astrocytom (46,3%), fibrilární astrocytom (20,4%), oligodendrogliom (5,6%), s nejčastější lokalizací zadní jáma a mozeček (28,7%). Nádory histologického grade 1 jsme prokázali v 51,9%, grade 2 v 34,3% případů. U 13,9% dětí byla diagnóza LGG stanovena na základě typického radiologického nálezu, bez histologického průkazu. Nejčastější léčebnou modalitou byl samotný neurochirurgický výkon (44,4%) a jeho kombinace s následnou chemoterapií (17,6%). V rámci celé kohorty celkové přežití (OS) činí > 0.9, přežití bez události (EFS) > 0,7. U dětí s kompletní nebo téměř kompletní resekcí dosahuje EFS 0,9, medián EFS pro děti s neradikálním výkonem je 77,4 měsíců (p 0,007). „Nepříznivé“ lokalizace představují mezimozek, metastatické postižení a lokálně pokročilé nádory s postižením více definovaných anatomických struktur, medián EFS pro tuto podskupinu je 78,8 měsíců (p 0,005). Negativní trend ovlivnění statistických ukazatelů lze najít pro nádory grade 2 (EFS 0,5) proti nádorům grade 1 (EFS > 0,8), stejně jako pro vyšší hodnotu indexu Ki 67, ovšem bez statistické významnosti. Celkem 36 dětí bylo léčeno chemoterapií, pro tuto skupinu činí EFS 0,6, přežití bez progrese (PFS) pak 0,5. Ze 108 dětí v souboru pouze 4 zemřely, 3 na progresi nebo relaps, 1 dítě zemřelo na vrozenou srdeční vadu.

Závěr

OS stejně jako EFS v našem souboru je vysoké, koreluje s jinde publikovanými daty. Identifikovali jsme 2 faktory se signifikantním vlivem na ukazatele přežití: rozsah resekce a lokalizaci. Adjuvantní chemoterapie umožňuje části dětí oddálení nebo nepodání neurotoxické radioterapie. Rizikovou skupinou, pro kterou je nutné hledat další léčebné metody, nové preparáty atd. jsou zejména inoperabilní nádory středního mozku.

99 Molekulární diagnostika Rb1 genu u dětí s retinoblastomem: od DNA k RNA diagnostice.

Kepák T.[1], Kratochvílová A.[2], Valášková I.[2], Zajíčková V., Autrata R.[3], Gaillyová R.[2], Štěrba J.[1]
1) Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno
2) Oddělení lékařské genetiky FN Brno
3) Dětská oční klinika LF MU a FN Brno

Východiska

Retinoblastom (RB) je vzácný maligní nádor oka u dětí. Vyskytuje se s incidencí 1:18.000 – 30.000 živě narozených. RB je modelovým příkladem genetické dispozice ke vzniku nádorového onemocnění. Tumor supresorový gen Rb1 hraje v tumorigenezi retinoblastomu zásadní roli. Přítomnost alespoň jedné funkční alely genu vede k normální produkci funkčního proteinu pRB, její nepřítomnost pak ke vzniku nádorového bujení. Ztráta nebo inaktivace Rb1 genu vede ke vzniku a rozvoji onemocnění. Různé formy inaktivace (zejména mutace) Rb1 genu vedou k rozdílné penetranci a expresivitě genu, a tudíž rozdílným klinickým projevům onemocnění. ***Přesná analýza a určení změn ve statusu Rb1 genu u dětí s RB proto zásadním způsobem ovlivňuje stratifikaci léčebně preventivních opatření zaměřených na pacienta s RB a jeho rodinu.***

Stávající léčebné postupy vedou ve vyspělých zemích k dlouhodobým remisím až u 99% nemocných. I když jsou léčebné výsledky stran přežití velmi dobré, stále přichází nemalá část dětí s RB o zrak, a to zejména těch, kteří mají dědičnou formu onemocnění. Čím je časnější záchyt onemocnění, tím je šance na záchranu zraku větší. Téměř polovina dětí s retinoblastomem má hereditární formu onemocnění způsobenou mutací (případně jinou inaktivací) tumor supresorového genu Rb1 na úrovni germinální buňky. Pouze 6% dětí má však pozitivní rodinnou anamnézu. U ostatních vzniká mutace na úrovni germinální buňky de novo. Penetrance hereditární formy onemocnění je přibližně 80%. U nehereditární (sporadické) formy onemocnění pak nacházíme mutace/inaktivace Rb1 genu pouze na úrovni somatických buněk sítnice. Mutace Rb1 genu je diagnostikovatelná u 95% dětí s bilaterální a 15% dětí s unilaterální formou onemocnění. Rozlišení hereditární a nehereditární formy onemocnění v době záchytu onemocnění má zásadní vliv na (i) způsob léčby a prognózu nemocného dítěte; (ii) genetické poradenství rodině s rozhodnutím o nutnosti pravidelných oftalmologických vyšetření dalších členů rodiny. ***Na přítomnost germinální mutace jsou dnes testovány všechny děti s RB.***

Jednotlivé techniky testování změn ve statusu Rb1 genu se podstatně liší v senzitivitě. Konvenční cytogenetika detekuje 8% známých změn ve statusu Rb1 genu (velké delece, translokace), FISH cca 10% (velké delece, translokace, je-li k dispozici vhodná sonda), Southern blot hybridizace 16% (delece, inserce, přestavby), PCR s následnou sekvenací detekuje 75% známých mutací (delece, inserce, krátké mutace, substituce bází), specifická metylační PCR rozliší 6% onkogenních mutací v tumoru (hypermetylace v promotoru genu). Dnes je známo více než 500 odlišných somatických nebo germinálních mutací. Molekulárně genetická analýza je schopna detekovat většinu z nich.

Metody a výsledky

Ve FN Brno jsme v roce 2006 rozpracovali metodiku mutační analýzy statusu genu Rb1 prostřednictvím DNA analýzy periferní krve. Metodika kombinuje PCR amplifikující všech 27 exonů genu RB1 s následnou sekvenační analýzou amplifikovaných fragmentů. Patognomonickou mutaci Rb1 genu jsme identifikovali v periferní krvi u 6 pacientů s hereditární formou RB. Sekvenace kódující oblasti genu je však velmi nákladná a pracná. Proto jsme v rámci urychlení a zefektivnění metodiky zavedli vícestupňovou metodiku: (i) nejprve analýzu RNA izolované z periferní krve, v případě nálezu mutace doplněné (ii) DNA analýzou a v případě negativity (iii) MLPA analýzou. K dalšímu zvýšení záchytu mutace plánujeme zavedení analýzy methylačního statusu promotoru. Mimoto to bychom chtěli realizovat populační studii k verifikaci kauzality nalezených mutací Rb1 genu, ideálně v rámci spolupráce s dalšími centry dětské onkologie.

Literatura

1. Abramson DH, Schefler AC.: Update on retinoblastoma. 2004 Dec;24(6):828-48.
2. Goddard AG, Kingston JE, Hungerford JL.: Delay in diagnosis of retinoblastoma: risk factors and treatment outcome 83(12):1320-3, 1999.
3. Lohmann DR: Rb1 gene mutations in retinoblastoma. Hum Mutat, 14, 283-288, 1999.
4. Lohmann D: Best practice guidelines for molecular analysis of retinoblastoma. European Molecular Genetics Quality Network. EMQN, 2002.
5. Nichols KE, Houseknecht MD, Godmilow L, Bunin G, Schields C, Meadows A, Ganguly A.: Sensitive multistep clinical molecular screening of 180 unrelated individuals with retinoblastoma detects 36 novel mutations in the RB1 gene. 2005 Jun;25(6):566-74.
6. Shields CL, Shields JA.: Diagnosis and management of retinoblastoma. 2004 Sep-Oct;11(5):317-27.

Práce je podpořena grantem IGF FN Brno č. 8/06.

100 Vliv onkologické léčby na endokrinní systém u dětí s nádory v oblasti hlavy a mozku.

Magnová O.[1,2], Hřivňacká J.[3], Zitterbart K.[2]
1) I. dětská interní klinika LF Mu a FN Brno
2) Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno
3) Oddělení radiační onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Úvod

Zlepšení výsledků komplexní onkologické péče u dětí přináší s sebou zvýšenou prevalenci pozdních následků léčby. Poruchy růstu a další endokrinní postižení patří k těm, které, pokud nejsou včas diagnostikovány a léčeny, vedou k trvalým následkům v oblasti somatického a sexuálního vývoje dětí. Děti s nádorovým onemocněním v oblasti hlavy a mozku patří v této oblasti k nejrizikovější skupině vzhledem k lokalizaci onemocnění a způsobu léčby, která zahrnuje mimo operačního řešení také intenzivní chemoterapii a radioterapii.

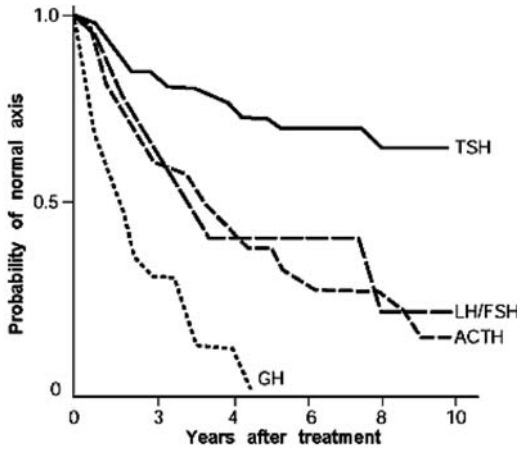
Práce presentuje vlastní zkušenosti v oblasti následků komplexní onkologické péče na skupinách pacientů léčených pro nádory v oblasti hlavy a pacientů s nejčastějším maligním nádorem mozku – meduloblastomem.

1. Radioterapie hypothalamo – hypofyzární (HH) osy

Porucha sekrece jednoho nebo více hormonů předního laloku hypofýzy může vzniknout následkem ozáření hypothalamo-hypofyzární osy, tvorba hormonů zadního laloku nebývá radioterapií ovlivněna. Účinek radioterapie závisí na dávce, frakcionaci, technice ozáření, a době trvání radioterapie, citlivější k poškození jsou děti mladší.

Existuje korelace mezi celkovou radiační dávkou a následnou poruchou hypofyzárních hormonů, typický je hormonální nedostatek, avšak u děvčat léčených v období útlého dětství se může rozvíjet předčasná puberta.

Ozáření HH oblasti:
l8-24 Gy předčasná puberta, isolovaný nedostatek růstového hormon
30-50 Gy kombinovaný deficit růstového hormonu, TSH, ACTH, LH/FSH
>60 Gy panhypopituitarismus



Pravděpodobnost zachování fyziologické fce HH osy po ozáření pro pituitární tumory v dospělosti (Littley, 1989)

Místem primárního poškození po radioterapii je hypothalamus, který je citlivější k nižším dávkám záření než hypofýza. Mechanismem vaskulárního nebo neuronálního poškození dojde k primárnímu snížení tvorby řídících (releasing) hypothalamických hormonů, jejichž následkem dochází ke snižování sekrece hypofyzárních hormonů a atrofii buněk hypofýzy. Progredující hormonální deficit je Pokračující účinek záření na buňky hypofýzy přispívá k dalšímu zhoršování hypofyzární hormonální produkce. Mimo klasického nedostatku růstového hormonu diagnostikovaného na základě nedostatečné odpovědi růstového hormonu na farmakologickou stimulaci, může RT vést k neurosekretorní dysfunkci růstového hormonu, pro který je typická zachovalá reakce po farmakologické stimulaci, ale nízká fyziologická spontánní sekrece růstového hormonu, která je zodpovědná za rozvoj růstové poruchy. Dle dostupných studií neurosekretorní dysfunkce předchází rozvoji klasického hormonálního deficitu.

Bylo potvrzena i závislost mezi celkovou dávkou radioterapie a časovým nástupem vzniku deficitu pituitárních hormonů (obr.)

2. Sarkomy v oblasti hlavy a krku

Na Klinice dětské onkologie jsou dlouhodobě sledovány celkem 4 děti s uvedenou diagnosou, jejichž léčba zahrnovala také radioterapii primárního tumoru v oblasti hlavy. Těžkým nedostatkem růstového hormonu trpí 3 z nich, kdy HH oblast byla dle radiačních plánů zasažena dávkou 40 – 44 Gy při ozařování nádoru v lokalizovaného v horní čelisti, etmoidálních dutinách a mastoidálním výběžku, u všech se růstová porucha projevila do l roku po ukončení léčby. 2 děti mají isolovaný nedostatek růstového hormonu, jedna dívka deficit kombinovaný s centrální hypothyreosou. 2 dívky s proběhlou radioterapií ve věku kolem 6 let života jsou také postiženy časným nástupem pubertálního vývoje, který může významně ovlivnit jejich dospělou tělesnou výšku.

U těchto děvčat očekáváme zlepšení dospělé výšky podáváním GnRHa (analoga gonadotropin releasing hormone), které zablokují další tvorbu gonadotropinů a oddálí nástup puberty.

3. Meduloblastom

Skupinu pacientů s meduloblastomem tvoří 9 dětí, které jsou v současné době sledovány bez známek aktivní choroby po léčbě proběhlé v letech 2000-2006. Bez ohledu na složení souboru (pohlaví, věk při diagnose, riziková skupina, intenzita radioterapie a chemoterapie) vykazují všechny dětí ztrátu v tělesné výšce vzhledem k premorbidnímu stavu v rozsahu od – 0,5 do – 2,7 SDS. Na základě růstové poruchy v odstupu 1-2 let od ukončení intenzivní terapie byl u 6 dětí klasickými metodami (test s insulinovou hypoglykémií) potvrzen nedostatek růstového hormonu a 5 z nich je léčeno substitučními dávkami růstového hormonu. U zbývajících dětí nelze vyloučit neurosekretorní dysfunkci růstového hormonu nebo poruchu růstu vlivem intenzivní chemoterapie nebo konkomitantní chemo- a radioterapie, která může zesilovat růstovou poruchu bez ohledu na dosud zachovalou sekreci růstového hormonu.

5 dětí má sníženou funkci štítné žlázy, současné vyšetřovací možnosti nám však neumožňují přesnější rozlišení poruchy centrální od periferní následkem radioterapie kraniospinální osy. Poruchy nástupu puberty (předčasná) jsme ve skupině meduloblastomů nezachytili vzhledem k věkovému složení souboru, stejně jako se dosud neprojevil nedostak gonadotropinů nebo centrální hypokortisolismus. Deficity těchto hormonů se obyčejně objevují s odstupem 5-l0 let po radioterapii.

Závěr

Nedostatečnou sekreci hypofyzárních hormonů neočekáváme jen u pacientů s středočárovým tumorem mozku, ale i u pacientů po léčbě nádorů mozku nepituitární oblasti a nádorů v oblasti hlavy. Aktivním vyhledáváním hormonálních poruch a zavedením substituční terapie můžeme předcházet klinickým potížím rizikových pacientů a v případě dětí i předcházet trvalému poškození.

Literatura

1. Gleeson HK, Shalet SM: The impact of cancer therapy on the endocrine system in survivor of the childood brain tumours, Endocrine Rel Cancer, 2004, 11, p. 589-602
2. Schmiedgelow M et al, Cranial radiotherapy od chidhood brain tumours: growth hormone deficiency and its relation to the biological effective dose of irradiaion in large population based study, Clinical Endocrinology, 2000, 53, p.191- 197
3. Ogilvy- Stuart A et al, Cranial irradiation and early puberty, J Clin Endocrinol Metab, 78, 1994, 6, p. 1282-1286
4. Šnajderová M, Zemková D et al, Late sequelae of comprehensive antineoplastic therapy in children and adolescent with solid extracranial tumours: Effect on growth, pubertal development and gonadal function, Čas Lék čes, 136, 1997, 9, s, 276-278

101 Nádorová onemocnění čelistí u dětí.

Machálka M., Bronišová D., Pavlovský Z.
Klinika ústní čelistní a obličejové chirurgie
Klinika dětské onkologie
Patologický ústav
Fakultní nemocnice Brno a Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně

Úvod

Nové poznatky o dynamice metabolických kostních procesů, možnosti zobrazovacích metod, laboratorní a genetická vyšetření umožňují přehodnotit straší diagnostické kategorie poruch tvorby a vyzrávání složek kostní hmoty, zánětlivých a nádorových změn včetně možností jejich léčení v mezioborové spolupráci.

Při léčbě nádorových onemocnění u dětí řídí léčbu onkolog, podle stanoveného protokolu. Úlohou čelistního chirurga je zajistit odběr reprezentativního materiálu k histologickým, cytogenetickým a molekulárně genetickým vyšetřením se snahou maximálně zkrátit dobu od biopsie ke stanovení adekvátní diagnózy a zahájení příslušné léčby dle individuální míry rizika. Radikální odstranění nádoru po neoadjuvantní léčbě je v rukou zkušeného čelistního chirurga.

Nejčastěji v postižení čelistí nádorem přichází k řešení Ewingův sarkom, histiocytóza, fibrosarkomy nebo rhabdomyosarkomy.

Vlastní pozorování

Demonstrujeme průběh onemocnění Ewingovým sarkomem u dvou hochů ve věku 9 let a v kosti čelisti vzácnou Rosai-Dorfmanovou chorobou.

V prvním případě byly od počátku patologické změny kosti úhlu a větve dolní čelisti vpravo. Zobrazovacími metodami byl ohraničený rostoucí tumor prokázán. Histologické probatorní vyšetření určilo Ewingův sarkom s přítomnou typickou cytogenetickou přestavbou a expresí fuzního genu EWS/FLI1. Na základě vstupního vyšetření onemocnění hodnoceno jako lokalizova-

né, objem < 200 ml, kl.st. IIB. Byla zahájena léčba dle protokolu EURO E.W.I.N.G. 99: Přešetření po 2 blocích neoadjuvantní léčby prokázalo pouze částečnou odpověď, proto změna terapie – 3.blok stimulační, následně separace periferních kmenových buněk. Provedena resekce těla, úhlu a větve s exartikulací na dolní čelisti, operace hodnocena jako marginální. Přešetření po 3 blocích chemoterapie prokazuje stacionární stav, proto podána chemoterapie 2. linie (2 bloky VCR + Irinotecan), dosaženo velmi dobré léčebné odpovědi. Následně léčba pokračuje konsolidací podáním vysokodávkované CHT s převodem periferních kmenových buněk. Přešetření po ukončení léčby prokazuje 1. kompletní remisi. Nyní 13 měsíců po ukončení léčby – trvá kompletní remise. Kostní defekt nebyl v dalším průběhu léčby nahrazován. T.č. žije hoch s matkou v Anglii a připravuje se na autotransplantaci kosti do defektu dolní čelisti.

Ve druhém případě u stejně starého hocha se jednalo o extraskletální formu Ewnigova sarkomu. Z měkkých tkání paraoseoálně u úhlu dolní čelisti jen s nasednutím na periost byl odstraněn ohraničený tumor. Operace hodnocena jako marginální, onemocnění lokalizováno, objem < 200 ml, kl.st.IIA. Léčba podle protokolu Euro-E.W.I.N.G. 99 – přešetření po 6 blocích chemoterapie – dosaženo 1. kompletní remise, bez nutnosti radikálního chirurgického zásahu do skeletu dolní čelisti. Probatorní kostní vyšetření neprokázalo přítomnost choroby. Následně 7 bloků VAI + radioterapie. Nyní 7 měsíců po ukončení léčby trvá 1. kompletní remise.

Třetím případem je onemocnění čelistí u 5-letého hocha, který prodělal v 6 týdnech života absces v anální krajině, ve 3 měsících absces tlustého střeva, abscesy kůže po očkování, mononukleózu, trpí častými infekty dýchacích cest, bez alergických projevů, sledován na imunologii pro opakovanou neutropenii a hypogamaglobulinemii.

V dutině ústní začalo onemocnění nepravým nádorem – epulidou v oblasti dočasné horní stoličky, posléze po chirurgickém odstranění dalších zubů, které již byly devitální, vyrůstala granulační tkáň z extrakčních ran. U dolní čelisti bylo perimandibulárně rozsáhlé prosáknutí měkkých tkání, hoch měl teploty a výraznou bolestivost čelisti. Stav dával významné podezření na akutní osteomyelitidu. Byly provedeny extrakce všech uvolněných dočasných zubů, revize v těle dolní čelisti, kde ve frontálním i postranním úseku vpravo byla nalezena četná ložiska granulační až tumorózní tkáně. Ta byla exkochleována a současně se odstranily neprořezané zárodky stálých zubů. Histologie nebyla jednoznačná, proto se následně provedly další odběry v různých částech postižené kosti.

Rozpaky nad histologickými nálezy po sobě následujících odběrů: v imunoreakcích se S100 proteinem a CD1a buňky vykazují fokální (někde málo přesvědčivou) plasmatickou positivitu, která diferenciálně diagnosticky připouští dg. Langerhansovy histiocyty, ze druhé biopsie – osteofibrosní dysplasie / ossifikující fibrom, ze třetí biopsie pomýšleno na osteofibrosní dystrofii / ossifikující fibrom čelisti, dif. dg. desmoidní tumor. Po dalších čteních histologických preparátů našimi předními patology byla nalezena shoda s diagnózou Rosai-Dorfmanovy choroby – přítomna emeripoléza, CD1a negativita, S100 pozitivita, postiženy jsou submandibulární uzliny, mandibula, os zygomaticum a P horní čelist. Tato sinusová histiocytóza je v čelisti nesmírně vzácná.

Od 20.11.06 zahájena léčba dle LCH III protokolu kombinací PND a Vinblastinu. Léčebná odpověď byla výborná – vymizení bolesti do 1 týdne, zmenšení otoku měkkých tkání, vymizení granulací, nové granulace se již netvoří. Přešetření po 6 týdnech léčby ukazuje značnou regresi nálezu. Vzhledem k rychlé reaktivaci nemoci při snížení intenzity léčby změna terapeutického plánu na pokračování v udržovací léčbě high risk ramenem – pulsy PND/VBL, perorálně MTX a 6-merkaptopurin. Známky akutního zánětu v oblasti dolní čelisti s elevací CRP a bolestivost kolísají ve zjevné závislosti na týdenním podání VBL, proto modifikace léčby na týdenní podávaní VBL. Při rentgenové kontrole přetrvávají na kosti změny odpovídající fibrózní dysplazii.

Závěr

Nádorová onemocnění u dětí s postižením kostí čelistí vyžadují po celou dobu léčby aktivní spolupráci onkologa s maxilofaciálním chirurgem a dalšími odborníky k posouzení vhodnosti a možnosti chirurgického výkonu, průběžnému sledování a následně k řešení trvalých následků.

102 Nasofaryngeální karcinom u dospívajících – zkušenosti s léčbou na Klinice dětské hematologie a onkologie FN Motol, Praha.

Nekolná M., Drahokoupilová E., Starý J.
FN Motol, Praha

Nasofaryngeální karcinom je vzácným maligním nádorem představujícím méně než 1% pediatrických malignit. Jeho incidence v Evropě a severní Americe je 1:100 000, zatímco v Asii představuje nejčastější zhoubné nádorové onemocnění v oblasti hlavy a krku s incidencí 15-50:100 000. Věková distribuce onemocnění je bimodální, dospívající a mladí dospělí do 30 let představují pouze 10-15% všech nemocných. V dětském věku představuje nasofaryngeální karcinom nejčastější maligní nádorové onemocnění v oblasti respiračního traktu. V etiologii a patogenezi onemocnění se uplatňuje infekce Epstein-Barrové virem (EBV), přičemž je tato asociace vyjádřena především u dětí. Klinicky významná je korelace titrů protilátek proti virovému kapsidovému antigenu (VCA) ve třídě IgA, IgG s rozsahem onemocnění i odpovědí na léčbu. Histologicky se rozlišují tři varianty onemocnění – diferencovaný dlaždicobuněčný karcinom, nekeratinizující dlaždicobuněčný karcinom a nediferencovaný karcinom, který je

vzhledem k značné příměsi lymfocytů označován rovněž jako lymfoepiteliom. Nasofaryngeální karcinom se klinicky manifestuje zpravidla ztíženou nosní průchodností, protrahovanou rýmou, často je ale prvním příznakem krční lymfadenopatie při metastatickém postižení spádových lymfatických uzlin. Základní léčebnou metodou je vzhledem k lokalizaci nádorového onemocnění radioterapie (60-70 Gy na oblast nosohltanu a přilehlé zadní části nosní dutiny, maxilárního sinu, baze lební včetně sinus cavernosus a sphenoidalis, event. krčních lymfatických uzlin při jejich postižení). Chirurgický výkon s výjimkou probatorní biopsie je s ohledem na obtížný operační přístup a časté šíření nádoru mimo oblast nosohltanu již v době diagnózy vhodný pouze v případě přetrvávání operabilního rezidua po radioterapii. U pokročilých onemocnění (stadium III a IV) je doporučována chemoterapie s využitím kombinace cisplatiny, methotrexatu, bleomycinu a 5-flurouracilu. Celkové pětileté přežití pacientů s touto chorobou je udáváno kolem 50%. Mezi pozdní komplikace léčby, zejména radioterapie, patří endokrinopatie (hypothyreoidismus, panhypopituitarismus), ale rovněž xerostomie a somatické změny (zkrácení klíčních kostí, atrofie měkkých tkání krku).

V následujícím sdělení se věnujeme našim zkušenostem s léčbou adolescentních pacientů s tímto onemocněním. V letech 1985-2005 jsme léčili na Klinice dětské hematologie a onkologie Fakultní nemocnice Motol celkem 17 dospívajících s nasofaryngeálním karcinomem, z toho bylo 12 chlapců (71%) a 5 dívek (29%) s věkovým průměrem v době stanovení diagnózy 15,3 let (median 15,6 let, rozmezí 13 – 18 let). Vstupním stagingem jsme u všech pacientů prokázali již lokálně pokročilé nebo metastatické onemocnění – dle kritérií 4. edice AJCC systému bylo u 14 pacientů potvrzeno III. klinické stadium (82,4%), u tří dospívajících IV. stadium (17,6%). Ve dvou případech IV. stadia jsme prokázali vzdálené metastázy (plíce, mediastinum) a u jedno pacienta jsme potvrdili intrakraniální propagaci primárního nádoru. Všichni pacienti byli léčeni kombinací radioterapie a chemoterapie. Celková aplikovaná dávka radioterapie na oblast primárního ložiska v nosohltanu byla 40-60Gy, na oblast postižených krčních uzlin 40-50 Gy. U dvou pacientů jsme indikovali radioterapii na oblast mediastina v dávce 40Gy. Chemoterapeutické režimy se v průběhu let měnily – v letech 1985-1987 jsme dva pacienty léčili kombinací vinkristinu, bleomycinu, methotrexatu a cyklofosfamidu, v letech 1989-1993 jsme léčili sedm dospívajících režimem PVB (cisplatina, vinblastin, bleomycin). V letech 1993-1995 byli dva pacienti léčeni chemoterapií BEP (bleomycin, etoposid, cisplatina) a v letech 1998-2005 bylo šest nemocných léčeno kombinací methotrexatu, cisplatiny a 5-fluorouracilu. Kompletní remise (CR) onemocnění dosáhlo iniciální léčbou 12 pacientů (70,5%). U tří pacientů III. stadia jsme zjistili progresi onemocnění v průběhu léčby, z toho jeden zemřel v důsledku generalizace onemocnění do skeletu a plic, dva pacienti dosáhli další léčbou 2. kompletní remise onemocnění. Dva pacienti s onemocněním IV. klinického stadia zemřeli na progresi onemocnění s generalizací do skeletu, plic a jater. Relaps onemocnění se vyskytl u čtyř dospívajících (23,5%), z toho tři nemocní byli iniciálně léčeni pro III. klinické stadium a jeden pro IV. stadium. Z této skupiny jeden pacient s generalizací onemocnění do skeletu zemřel. Deset dospívajících žije v 1. kompletní remisi (58,8%), dva pacienti ve 2. kompletní remisi (11,8%) a jeden pacient ve 4. CR, čtyři pacienti zemřeli.

Léčebné výsledky u dospívajících s pokročilým nasofaryngeálním karcinomem v našem souboru potvrzují vysokou účinnost multimodální léčby zahrnující radioterapii v kombinaci s neoadjuvantní chemoterapií, a jsou srovnatelné s výsledky zahraničních pracovišť.

Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00064203

103 Sarkomy měkkých tkání u adolescentů.

Bajčiová V.[1], Múdry P.[1], Oltová A.[2], Štěrba J.[1]
1) Klinika Dětské onkologie LF MU a FN Brno
2) Oddělení lékařské genetiky, FN Brno

Sarkomy měkkých tkání jsou nádory, které se vyskytují ve všech věkových skupinách od nejmladších dětí až po pokročilý věk. U dětí tvoří kolem 8% ze všech nádorových onemocnění. Nejčastějším a typickým pro dětský věk je rhabdomyosarkom, který reprezentuje 55 až 60% všech dětských sarkomů měkkých tkání. Tzv. non-rhabdomyomatozní sarkomy tvoří necelé 3% dětských nádorů.

Následující věková kategorie adolescentů, definovaná věkem 15 – 19 let, je však z hlediska měkkotkáňových nádorů naprosto odlišná, a to nejenom od dětí, ale liší se spektrem histologických typů, léčbou a jejími výsledky i od sarkomů dospělého a staršího věku. Převahu mají non-rhabdomyomatozní sarkomy a sarkomy tzv adultního typu, které tvoří heterogenní skupinu se širokou škálou histologických podtypů rozdílného původu a biologie. Distribuce jednotlivých typů sarkomů měkkých tkání varíruje s věkem**. Graf č. 1**

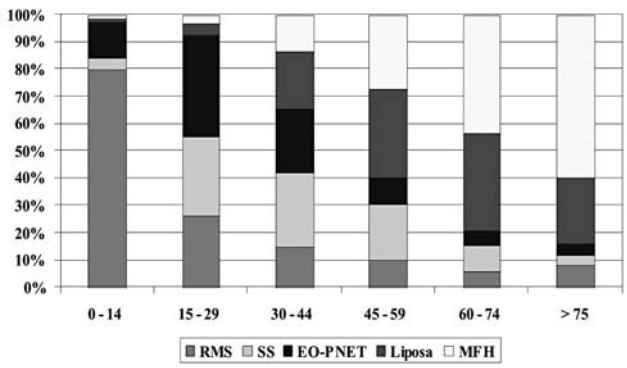
Kromě odlišného zastoupení jednotlivých typů sarkomů jsou rozdíly i v epidemiologii této skupiny nádorů. V USA je ročně diagnostikováno přibližně 1800 mladých lidí ve věku 15 až 19 let se sarkomem měkkých tkání. V České republice má incidence ve stejné věkové kategorii stoupající tendenci, podle údajů UZIS z roku 2002 byla incidence v dané věkové kategorii 0,6–0,8 :100 000. Při počtu 665 282 mladých lidí ve věku 15 – 19 let v roce 2002 lze předpokládat, že je ročně v České republice diagnostikováno kolem 8 – 10 mladých lidí se sarkomem. Ovšem tato čísla jsou zkreslená nedostatečnými a neúplnými onkologickými hlášeními do centrální databáze národního onkologického registru. Na základě počtu pacientů léčených na Klinice dětské onkologie FN Brno lze interpolovat, že reálné čísla incidence adolescentů se sarkomem měkkýcb tkání jsou vyšší a dosahují počtu přibližně 50 případů ročně.

Reální incidenci a výskyt specifických histologických typů sarkomů, a to nejenom v této věkové kategorii, je obtížné přesně určit, protože chybí epidemiologické studie s popisem výskytu jednotlivých histologických typů sarkomů měkkých tkání. Získané údaje v literatuře jsou buď monoinstitucionální, nebo maximálně víceinstitucionální. Rovněž chybí věkově specifické epidemiologické studie, což představuje pro metody a postupy komparativní onkologie problém. V České republice je zdrojem informací databáze *www.uzis.cz*, která ovšem rovněž informuje pouze o celkovém počtu, a nikoliv o specifických typech sarkomů měkkých tkání.

Další problematickou oblastí přechodného období dospívání a styčným bodem mezi dospělou a dětskou onkologií v problematice sarkomů je klasifikační systém. U dětí pod 15 let věku je v dětské onkologii používána mezinárodní klasifikace dětských nádorů (International Childhood Cancer Classification), která je založena na morfologii nádorů. V dospělé onkologii je naopak používána klasifikace založená na orgánové lokalizaci primárního nádoru (International Classification of Disease -Oncology, ICD-O).

Rovněž určení rozsahu onemocnění, tedy určení klinického stadia pro sarkomy měkkých tkání, je rozdílné u dětí a u dospělých. Dětská onkologie používá americký systém IRS, který rozděluje sarkomy do čtyř skupin dle rozsahu primární operace:u skupiny IRS I je nádor odstraněn kompletně s negativními okraji resekátu. Skupina IRS II má pozitivní okraje resekátu, s přítomností mikroskopického rezidua nádoru. IRS III skupina je skupina s makroskopickým reziduem nádoru, event. stav po biopsii nádoru. IRS IV skupina představuje nádory pokročilé s přítomností metastáz. Dospělá onkologie určuje klinické stadium nemoci na základě TNM systému.

Optimální léčba pro sarkomy u adolescentů zůstává stále předmětem diskuzí a je nejasná. Léčebná strategie se odvíjí nejenom od zkušeností léčby sarkomů v dětském věku, ale taky od principů léčby sarkomů v dospělém věku. Sarkomy u adolescentů jsou často diagnostikovány v pokročilém stadiu, biologicky se chovají velmi agresivně. Je to způsobeno jejich vysokým stupněm malignity (grade), častou asociací se specifickými chromozomálními aberacemi typickými pro daný typ sarkomu. Specifické translokace mají nejenom diagnostický, ale často i prognostický význam a chimerické produkty těchto translokací jsou předmětem zájmu jako potenciální cíle (targets) v preklinických studiích.



Graf č. 1: Distribuce histologických typů sarkomů měkkých tkání dle věku

	Děti<15 let	AYA (15-25let)	Dospělí
Incidence:	**5-8%**	**8-10%**	**2-3%**
Histol.typ:RMS	60%	25%	10%
Synoviální sarkom	3%	16%	8%
MFH	1%	5%	18%
ASPS	2%	4%	1%
liposarkom	1%	5%	25%
PNET	10%	45%	20%
Lokalizace: trup	25%	40%	38%
končetiny	17%	45%	50%
hlava a krk	35%	5%	10%
urogenitální	23%	10%	2%
Rozsah nemoci: lokalizovaná	85%	**45%**	65%
pokročilá-mts	15%	**55%**	35%
Přežívání: OS 5 let	70%	**45%**	30%

Zdroj: C Herzog, J Ped Hemat Oncol 2005
K.Albritton, Hem Onc Clin N Am 2005

Tabulka č. 1: Rozdíly sarkomů měkkých tkání dle věku

Všechny výše popsané rozdíly v incidenci, klasifikaci, hodnocení rozsahu onemocnění a léčebném přístupu mají svůj odraz v dosažených léčebných výsledcích, vysoké morbiditě a rovněž i vyšší mortalitě adolescentů se sarkomy měkkých tkání. **TAB č. 1** A tak místo léčby (pracoviště dospělé nebo dětské onkologie, případně jiné odborné pracoviště – chirurgická či ortopedická klinika) může velmi výrazně ovlivnit nejenom způsob diagnostiky, ale i léčby a tím i šanci na život a jeho kvalitu u postiženého mladého jedince. Výsledky léčby adolescentů se sarkomem měkkých tkání jsou horší než v ostatních věkových kategoriích. Zatímco za posledních 20 let se pětileté přežívání zvýšilo u dětských pacientů se sarkomy v průměru o 17%, ve skupině adolescentů to bylo pouze o 7%.

Adolescenti starší 15 let tvoří téměř 25% pacientů léčených na KDO FN Brno. Autoři ve svém sdělení prezentují soubor dospívajících pacientů se sarkomem měkkých tkání, léčených za sledované období na KDO. Soustřeďují se na analýzu histologických typů sarkomu, lokalizaci, délku anamnézy a interval od iniciálního vyšetření po zahájení efektivní léčby, klinické stadium, léčebnou strategii a její výsledky. Z analýzy navrhují algoritmus diagnosticko-léčebného postupu pro sarkomy měkkých tkání u adolescentů v podmínkách České republiky.

104 Terapie osteosarkomu a Ewingova sarkomu u dospívajících a mladých dospělých.

Mottl H.[1], Kruseová J.[1], Starý J.[1], Mráček J.[2], Kodet R.[3], Schovanec J.[2], Šmelhaus V.[2]
1) Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF UK a FN Motol, Praha
2) Ortopedická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha
3) Ústav patologie a molekulární medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

Východisko

Cílem práce je informovat o léčebných výsledcích u osteosarkomu a Ewingova sarkomu u dospívajících a mladých dospělých léčených na KDHO FN v Motole.

Metoda a soubor

V období od ledna 1997 do října 2005 bylo na KDHO léčeno celkem 42 pacientů s osteosarkomem (OS), z nich 10 (23,8%) pacientů bylo ve věku nad 15 let. Od června 2001 do listopadu 2005 bylo léčeno 43 pacientů s primárním periferním neuroektodermovým tumorem/Ewingovým sarkomem (PNET/ES), z nich 18 (41,9%) bylo nad 15 let věku. Do studie jsou zařazeni pouze pacienti nad 15 let věku v době stanovení diagnózy. Léčba PNET/ES byla prováděna protokolem EURO-E.W.I.N.G.99 a OS modifikovaným protokolem CCG-7921, POG-9351, INT-0133. Poměr pohlaví u celého souboru byl 19 mužů a 9 žen, průměrný věk 17 roků 2 měsíce (15 roků 3 měsíců – 23 roků 5 měsíců). Většina pacientů měla lokalizované onemocnění (n=19; 67,9% – PNET/ES 10/18 pacientů a OS 9/10 pacientů). Ve skupině PNET/ES převažovala extraskeletální lokalizace (n=4) a postižení žebra (n=4), zatímco u OS dominovala afekce femuru (n=4) a tibie (n=3). V histologickém obraze OS byla nejčastěji varianta osteoblastická (n=6) následovaná chondroblastickou (n=3). Radikální operační výkon u pacientů s lokalizovaným onemocněním absolvovalo 7 (77,8%) pacientů s OS a 5 (50%) s PNET/ES, kde však u dalších 3 pacientů byl radikální výkon proveden vstupně při stanovení diagnózy (celkem n= 8, 80%). Recidiva/progrese onemocnění byla prokázána u 6 (60%) pacientů s OS a u 9 (50%) pacientů s PNET/ES. Průměrná doba sledování u pacientů s OS je 3 roky 1 měsíc a s PNET/ES je 2 roka 3 měsíce.

Výsledky

Z celkového počtu 18 dospívajících s PNET/ES je 9 (50%) v kompletní remisi (CR), 1 (5,6%) pacient je léčen pro progresi onemocnění a 8 (44,4%) zemřelo na progresi základního onemocnění. Ve věkové skupině do 15 let s PNET/ES žije v CR 19 (76%) dětí a zemřelo 6 (24%). Z 10 pacientů s OS jsou 4 (40%) v CR, 1 (10%) je léčen pro progresi a 5 (50%) pacientů zemřelo na progresi onemocnění. Ve věkové skupině do 15 let dětí s OS je 20 (62,5%) v CR a 12 (37,5%) pacientů zemřelo na progresi.

Závěr

U malého souboru pacientů jsou léčebné výsledky u dospívajících méně příznivé než u mladší věkové skupiny. Zkušenosti s protokolem EURO-E.W.I.N.N.99 jsou příznivé, ale celkové hodnocení bude možné až po dokončení studie. V léčbě osteosarkomu je zřejmé, že standardní kombinace cytostatik dosáhla maxima terapeutických úspěchů a je nutno hledat nové léčebné modality cíleně působící na nádorovou populaci.

Podporováno výzkumným záměrem VZMZ 64203/6710.

105 Léčba relapsů a progredujících maligních mezenchymálních nádorů a Ewingova sarkomu dospívajících. Zkušenosti s režimem Topotecan/Cyklofosfamid v období 1997-2006 na KDHO FNM Praha.

Drahokoupilová E., Kabíčková E., Starý J.
KDHO FN Motol, Praha

Úvod

Většina typů dětských nádorových onemocnění včetně Ewingova sarkomu a sarkomů měkkých tkání odpovídá velmi dobře na podanou cytostatickou léčbu. Prognóza těchto pacientů s lokalizovaným onemocněním se v posledních dvaceti letech zlepšila, pětileté bezpříznakové přežívání se uvádí kolem 60-80%. Terapeutickým problémem zůstává skupina pacientů s primárně generalizovanými sarkomy, s onemocněním iniciálně nereagujícím na léčbu či s relapsem. Jednou z možností léčebného ovlivnění maligního onemocnění u těchto pacientů se v polovině devadesátých let stalo zařazení topotecanu, specifického inhibitoru topoizomerázy I, v kombinaci s alkylačním cytostatikem cyklofosfamidem mezi režimy systémové léčby druhé volby u této skupiny sarkomů.

V níže uvedeném sdělení prezentujeme vlastní zkušenosti s tímto režimem u dospívajících a adolescentů.

Pacienti a metody

V období od roku 1997 do 2006 jsme na našem pracovišti diagnostikovali relaps nebo progresi výše uvedených maligních onemocnění u 28 dospívajících dětí a adolescentů (13 dívek, 15 chlapců) s mediánem věku 17,5 let (rozmezí 14-23 let). Histologicky se u 10 pacientů jednalo o rabdomyosarkom, u 9 o Ewingův sarkom, u 5 o nediferencovaný sarkom, u 2 o synovialosarkom, u 1 adolescenta o maligní hemangioendoteliom a u dalšího o alveolární sarkom. Léčbu jsme zahajovali u 16 pacientů s prvním relapsem základního onemocnění, u 2 dospívajících s druhým relapsem a u 10 pacientů s onemocněním progredujícím na chemoterapii první volby, přičemž u 13 pacientů šlo o časný relaps, u 3 o pozdní a u 12 o onemocnění progredující na původní chemoterapii. U 16 adolescentů jsme léčili lokalizované onemocnění a u 12 generalizované (metastatické postižení skeletu, plic, lymfatických uzlin).

Všechny pacienty jsme léčili systémovou chemoterapií ve složení cyklofosfamid D1-5 (dávka 250 mg/m^2/den) a topotecan D1-5 (dávka 0,75-1 mg/m^2/den), event. v kombinaci s Vepesidem (dávka 100 mg/m^2/den) s průměrným počtem 4 cyklů chemoterapie (rozmezí 1-9 cyklů). Deset pacientů absolvovalo systémovou léčbu konkomitantně s radioterapií.

Výsledky

Léčebnou odpověď na chemoterapii jsme dokumentovali u 19 dospívajících (68%) našeho souboru, z nichž 12 (43%) dosáhlo kompletní remise onemocnění a 7 (25%) parciální remise. U 9 pacientů (32%) onemocnění nereagovalo na léčbu topo/CYC. Průměrná doba od stanovení relapsu (zahájení léčby Topo/CYC) do progrese onemocnění byla 9,6 měsíce, průměrné trvání kompletní remise základního onemocnění 16,5 měsíce (rozmezí 2-84 měsíce). V současné době žije 8 dospívajících (29%) z uvedeného souboru, z toho 4 v kompletní a 2 v parciální remisi základního onemocnění, 2 pacienti žijí se stabilním onemocněním. Dvacet pacientů (71%) zemřelo na další progresi onkologického onemocnění.

Během léčby jsme zaznamenali u 12 dospívajících hematologickou toxicitu grade IV, z velké většiny šlo o pacienty léčené zvýšenou dávkou topotecanu (1 mg/m^2/den) a těžce předléčené. Non-hematologická toxicita tohoto režimu byla nízká, dominovala nauzea a zvracení.

Závěr

V souladu s literárními údaji lze kombinací cytostatik Topo/CYC zajistit dlouhodobé přežití jen části dospívajících pacientů s relabujícím či progredujícím Ewingovým sarkomem a sarkomy měkkých tkání. Dle našich zkušeností patří tato léčba druhé volby k dobře tolerovaným léčebným režimům s poměrně malou, akceptovatelnou toxicitou a tudíž velmi dobrou kvalitou života pacientů.

Podpořeno výzkumným záměrem MZO 00064203

106 Molekulární charakteristika tří dětských feochromocytomů.

Vicha A.[1], Sumerauer D.[1], Procházka P.[1], Stejskalova E.[1], Jarosova M.[2], Holzerova M.[2], Puchmajerová A.[3], Křepelová A.[3], Krutílková V.[3], Hraběta J.[1], Figová K.[1], Eckschlager T.[1]
1) Klinika dětské hematologie a onkologie, 2 LF UK a FN v Motole
2) Hemato-Okologická klinika, LF Palackého Universita, Olomouc
3) Ústav biologie a lékařké genetiky, 2 LF UK a FN v Motole

Feochromocytom je nádorem vznikajícím z chromafiních buněk, které jsou původem z neurální lišty a které produkují katecholaminy. Takovéto buňky se nacházejí ve dřeni nadledvin a v sympatických gangliích. Dvacet procent všech feochromocytomů nalézáme u dětí, kde incidence je 2:10^6. Studie u dětí prokázaly, že medián výskytu je 10-13 let. Oproti dospělé populaci jsou u nich častěji nacházeny feochromocytomy multifokální a extraadrenální. Je to ve 40% případů. Významná je také skutečnost, že 25% z nich je rodině vázaných. Kolem 90% všech dětských feochromocytomů je lokalizováno intraabdominálně, ale pouze 50% vychází přímo z kůry nadledviny. Recidivy onemocnění jsou zachyceny ve 25-30% případů a častější jsou u familiárního výskytu.

Rodině vázaná onemocnění jsou diagnostikována v mladším věku a jsou spojena se šesti syndromy MEN2, VHL, NF1, PGL1, 3 a 4 u kterých prokazujeme změny v genech RET, VHL, NF1, SDHB a SDHD. Nejčastěji jsou u dětí postiženy geny RET a VHL. Multifokální feochromocytom nalézáme především u MEN 2 syndromu. Ovšem mutace RET a VHL genu je možné zastihnout také v nádorové tkáni sporadicky se vyskytujících feochromocytomů.

Nejčastějšími chromozomálními změnami popisovanými u dospělých pacientů jsou ztráty 1p, 3q a/nebo 3p, 6q, 17p, 11q a zmnožení 9q a 17q. Změny postihující 11. chromozóm byly častěji přítomny u maligních onemocnění. Studie zaměřené na sledování chromozomálních změn jsou u dětských feochromocytomů limitovány, největší práce čítá pouze 14 případů.

Histologické vyšetření neumožňuje jednoznačné rozlišení maligní a benigní formy feochromocytomu. Jsou známa některá kritéria, která naznačují maligní chování nádoru. Jsou to větší velikost nádoru, menší nádorové buňky, extenzívní nekrózy, vaskulární invaze a aneuploidie. Nicméně jedinými kritérii umožňujícími jednoznačné posouzeni malignity zůstávají extenzivní lokál-

ní šíření a přítomnost vzdálených metastáz v místech, kde se normálně nevyskytuje chromaffiní tkáň. Benigní nádory mají po resekci výbornou prognózu. Pacienti u kterých nebyla možná úplná resekce, nebo mají vzdálené metastatické postižení jsou léčeni chemoterapií. Často využívaným je léčebný protokol pro neuroblastom. Medián přežití u těchto dětí je 75%.

V naší práci jsme se věnovali průkazu chromozomálních změn pomocí komparativní geonomové hybridizace (CGH), se zaměřením na výskyt aberací, které by mohly napomoci při posouzení malignity onemocnění. CGH je technika, kde porovnáváme červeně značenou DNA zdravého dárce s DNA izolované z nádoru, která je označena zeleně. Tyto DNA smícháme a hybridizujeme k chromozomům získaným od zdravého dárce. Obě značené DNA kompetují o místo na chromozomech. V místě, kde je převaha kontrolní DNA se chromozóm obarví červeně, tato změna znamená ztrátu části DNA v nádorové buňce, naopak tam kde se chromozóm zbaví zeleně je nádorová DNA v tomto místě zmnožena nebo amplifikována. Výhodou této techniky je, že můžeme sledovat změny na všech chromozómech při jednom vyšetření a to i z archivního materiálu. Nevýhodou je, že není schopna rozpoznat balancované translokace.

Měli jsme možnost vyšetřit nádorovou tkáň od 3 pacientů. Všichni tři byly chlapci.

1. U 13 letého chlapce byl při preventivní kontrole naměřen vysoký krevní tlak 190/110mm Hg. Fyzikální vyšetření neprokázalo další patologický nález. Při UZ vyšetření břicha byly patrné nádory oboustranně v místě nadledvin a biochemické vyšetření prokázalo zvýšenou hladinu vanilmandlové kyseliny v moči při 24 hodinovém sběru na hodnotu 52,2mmol/mol kreatininu. Při vyšetření očního pozadí se prokázal kapilární angiom, který byl ošetřen laserovou koagulací. Chirurgové odstranili nádory z obou nadledvin. Histolog potvrdil přítomnost feochromocytomu v obou nadledvinách. Pooperační vyšetření včetně ^{131}I-MIBG neprokázalo přítomnost rezidua nádoru ani metastatického postižení a hladiny metabolitů katecholaminů v moči se pohybovaly v mezích normy. Chlapec je nyní 4 roky v kompletní remisi onemocnění. U pacienta byla prokázána mutace VHL genu. DNA sekvence prokázala novou heterozygotní transverzi NM 000551:c.374A>C (p.His125Pro) v exonu 2 *VHL* genu.
2. Týden před přijetím 14 letý chlapec zvracel, byl unavený, měl silné bolesti hlavy, byla zjištěna hypertenze 160/100 mm Hg. Stav se opakoval po týdnu, kdy doma vznikl náhlý kolapsový stav s pádem a trismem obličeje, s poklesem pravého ústního koutku, nereagoval na oslovení, stáčel bulby, křeče končetin však neměl. Stav trval asi 2 min. Poté byl neklidný, zmatený, nereagoval adekvátně. CT vyšetření mozku vyloučilo krvácení do CNS, ale prokázalo ischemii v oblasti hypothalamu, zároveň na UZ a CT břicha byl popsán tumorózní útvar vycházející z pravé nadledviny. Pacient byl v hypertenzní krizi s tlakem 220/140 mm Hg. Prokázali jsme zvýšené hodnoty VMA v moči (19,2 mmol/mol kreatininu). Chirurgicky byl odstraněn tumor s celou pravou nadledvinou. Histolog prokázal feochromocytom. V současné době je pacient 2,3 roku v kompletní remisi onemocnění.
3. Při 13 leté preventivní prohlídce lékařka u chlapce nalezla asymptomatická tuhou nebolestivou rezistenci v břiše nalevo od střední čáry. UZ a CT vyšetření břicha potvrdilo expanzivní proces lokalizovaný pre- a paravertebrálně vycházející z paravertebrálních ganglií. Generalizace onemocnění nebyla při vstupním vyšetřením prokázána (PET vyšetření, CT hrudníku, scinti skeletu). Neprokázali jsme zvýšení produktů metabolismu katecholaminů. Tumor byl chirurgem radikálně odstraněn a histolog potvrdil přítomnost paragangliomu. Pacient je v současné době 2,0 roky v kompletní remisi onemocnění.

Při CGH vyšetření jsme nalezli změny, které byly dříve popsány jako charakteristické pro toto onemocnění. U pacienta s mutací VHL genu jsme prokázali – gain 5q14-q21; 6q15-q16.1;Xq21.3-q23 a ztrátu 1p34-pter; 3p12-pter; 9q34.1-qter; 11p; 16p12-p13.1; 19; 22. U sporadických případů – ztrátu na chromozómech 3 a 11. Tyto výsledky byly ve většině případů potvrzeny aCGH. Naše výsledky jsou v souladu s literárními údaji (Edstrom E. et al.: Am J Pathol., 2000, 156:651). Nejčastějšími změnami jsou ztráta 3p a 11q, které byly u obou našich případů. Také většina dalších zmnožení a ztrát, které jsme prokázali u pacienta s VHL syndromem byla popsána již dříve.

Doufáme, že znalosti o genetických změnách feochromocytomu napomohou k určení prognostických znaků a přispějí tak k rozlišení mezi benigní a maligní formou onemocnění, které nelze morfologicky jednoznačně rozlišit. Stanovení biologické povahy by výrazně přispělo ke zlepšení péče o pacienty s tímto onemocněním.

Práce vznikla za podpory MŠMT VZ č. 0021620813

107 Adultný nádor obličky u 16 ročnej pacientky – kazuistika.

Puškáčová J.[1], Džatková M.[1], Polák V.[2], Wassermann O.[2], Siman J.[3], Breza J.[4], Haviar D.[5], Skubák M.[5], Kaldarárová M.[6], Makaiová I.[7], Kováčová S.[7], Belan S.[8], Plank L.[9], Hes O.[10], Arpášová M.[11], Mardiak J.[12], Šefránek V.[13]

1) Detská onkologická klinika LFUK a DFNsP
2) Urologické oddelenie DFNsP
3) Klinika detskej chirurgie LFUK a DFNsP
4) Urologická klinika FNsP ak.L.Dérera
5) Rádiodiagnostické oddelenie DFNsP
6) Detské kardiocentrum
7) Klinika nukleárnej medicíny LFUK a OúsA
8) Rádiodiagnostické oddelenie FNsP ak. L.Dérera
9) Ústav patologickej anatómie MFN Martin
10) Šikluv patologicko-anatomický ústav FN a LF UK Plzeň
11) Oddelenie nukleárnej medicíny FN, Staré Mesto
12) Národný onkologický ústav
13) NÚSCH Bratislava

Úvod

Karcinómy obličiek patria v detskom veku k zriedkavým nádorom. V prípade lokalizovaného postihnutia je prognóza dobrá, základom úspechu je vo väčšine prípadov radikálny chirurgický výkon. Adjuvantná liečba pri pokročilých nádoroch nie je dostatočne efektívna, prognóza pacientov s neresekovateľnou chorobou je zlá.

Kazuistika

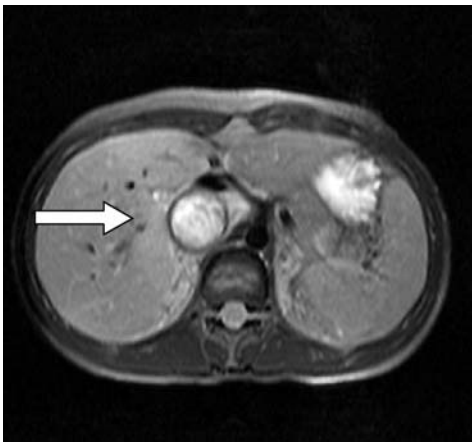
16 ročné dievča bolo prvýkrát vyšetrené nefrológom v máji 2005 pre hematúriu a renálnu koliku. Na USG sa zistila zdvojená oblička vľavo. Po antibiotickej a spazmolytickej liečbe akútne ťažkosti ustúpili, pretrvávali intermitentné bolesti v ľavom boku pri námahe a chôdzi do schodov. Pre zvýrazňovanie ťažkostí bola znovu vyšetrená v marci 2006 – na USG sa zistil rozsiahly nádor v hornej a strednej tretine ľavej obličky, s prerastaním do v. renalis vľavo, m.psoas, s metastázami do nadobličky a paravertebrálnych lymfatických uzlín (LU). CT vyšetrením sa potvrdila prítomnosť nádora veľkosti 5,8x4,5x4,2 cm a metastatické postihnutie parakaválnych LU – paket cca 8,9x2,3x3,6 cm. Dopplerova USG potvrdila parciálnu trombózu v. renalis vľavo s prominenciou do vena cava inferior (VCI). Vzdialené metastázy sa nezistili. Podľa zobrazovacích vyšetrení a vzhľadom na vek pacientky sme diferenciálne diagnosticky zvažovali diagnózu nefroblastómu versus karcinómu obličky. Vzhľadom na prerastanie nádora do okolitých štruktúr a spornú operabilitu sme indikovali predoperačnú liečbu (VCR, daktinomycín) pre nefroblastóm s cieľom chemoredukcie. V priebehu 14 dní sa však nepozorovala regresia nádora, zjavila sa makroskopická hematúria, preto sa 3.5.06 vykonala nefrektómia a epinefrektómia vľavo, extirpácia paketov parakaválnych LU, nádorového trombu z ľavej renálnej vény a VCI.

Histologicky sa potvrdil karcinóm z renálnych buniek variantu z kolektujúcich Belliniho duktov, TNM pT3bpN2pMx, grade 4. Histológiu potvrdil aj prof.Hes zo Šiklovho patologicko-anatomického ústavu v Plzni – zle diferencovaný RCC, v dif. dg. zle diferencovaný papilárny karcinóm versus karcinóm z Belliniho duktov, sarkomatoidný. Doplnené PDGFRA ukázalo e12, e14, e18-wild type, teda neboli dokázané mutácie doštičkového faktora alfa.

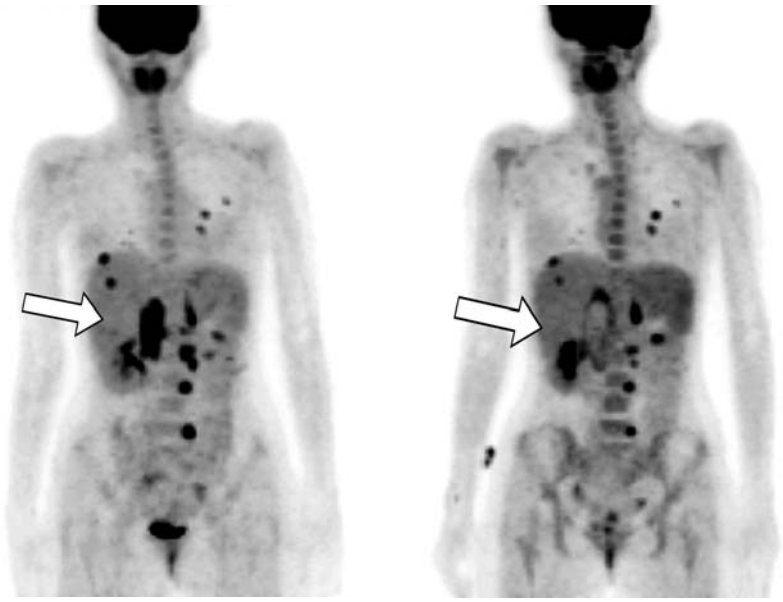
Operačný výkon sa hodnotil ako radikálny (radikálna nefrektómia, resekcia LU a nádorového trombu z renálnej vény), adjuvantná liečba nebola indikovaná. Pooperačné zobrazovacie vyšetrenia – Dopplerova USG + CT ale ukázali trombus vo VCI nejednoznačnej etiológie, podľa MR bol pôvod trombu prevažne nádorový (VCI subhepatálne, ako aj v intrahepatálnom priebehu, v kraniokaudálnom rozsahu do 6 cm).

Na odlíšenie pôvodu trombu sa urobila aj scintigrafia značkovanými trombocytmi ^{99m}Tc tromboscint, ktorá ukázala len prítomnosť 2 lineárnych ložísk projikujúcich sa do dolného okraja pečene a horného okraja pravej obličky. Mohli by svedčiť pre ložisko aktívnej trombózy, čo v korelácii s MR nálezom zodpovedá nálezu vo VCI. V priebehu ďalšieho týždňa sa už zreteľne verifikoval echogénny trombus do 5,8x2,1x2,5 cm. Začala sa antikoagulačná liečba kontinuálnym heparínom s následným prechodom na LMWH, neskôr warfarín. V priebehu mesiaca od operačného výkonu sa zistili obojstranné pľúcne metastázy, progresia útvaru vo VCI, s minimálnym tokom okolo neho a tvoriace sa kolaterály. Na ^{18}FDG-PET bolo aktívne vychytávanie v paraaortálnych LU, VCI, pečeni a pľúcach. Vzhľadom na progresiu ochorenia sme sa rozhodli po konzultácii s doc. Mardiakom z NOÚ pre adjuvantnú chemoterapiu v kombinácii: gemcitabín +5 FU +Ca Leucovorin. Pri kontrolnom USG prešetrení po 3 cykloch sa zistila veľkostná progresia trombu a ložisko v hornej tretine pravej solitárnej obličky, ktoré ale CT vyšetrenie vylúčilo. Pľúcne metastázy boli stacionárne, paraaortálne a parakaválne LU sa zmenšili (do 12 mm). Na MR bola ale progresia veľkosti trombu (3,5x4,0x8,0 cm) (obr.1), ktorý zasahoval až do v. renalis vpravo a pod jej odstup, ale už bez enhancementu (netumorózny?). Na kontrolnej ^{18}FDG-PET sa znázornilo ložisko vo VCI s centrálnym výpadom (nekrotizácia?) (Obr.2), ale pretrvávala zvýšená aktivita v LU paravertebrálne. U pacientky sa začali prejavovať známky sekundárnej chronickej tubulointersticiálnej nefritídy s poči-

atočným štádiom renálnej insuficiencie a rozvinula sa hypertenzia, s dobrou odpoveďou na kalciové blokátory a nízke dávky diuretík. Tolerancia chemoterapie bola pomerne dobrá (občas febrilná reakcia po gemcitabíne napriek premedikácii), s dobrou kvalitou života. Preto sme po konzultácii s urológmi indikovali paliatívnu extrakciu trombu z pravej renálnej vény, s cieľom zachovať funkciu solitárnej obličky. Parciálna extripácia trombu z renálnej vény vpravo a z VCI sa vykonala 23.10.2006. Histologicky sa potvrdili metastázy sarkomatoidne dediferencovaného karcinómu z renálnych buniek, varianta z kolektujúcich Belliniho duktov.



Obr. 1
MR – Intraluminárny trombus vo VCI



Obr. 2 – ^{18}FDG PET

Pred začatím chemoterapuie, rozsiahly nález s vysokou aktivitou vo VCI, ložiská v pečeni, plůcach, paravertebrárlne

Kontrola po 3 cykloch chemoterapie, pokles aktivity v centre trombu, ostatné ložiská bez podstatnej zmeny

Pooperačný stav bol dobrý, obličkové funkcie aj hypertenzia sa upravili. Pokračovala v chemoterapii, v januári 2007 po 3. pooperačnom cykle sa urobilo plánované prešetrenie. Na CT pľúc bola mierna mierna progresia metastáz, na MR regresia veľkosti trombu, na PET výrazne znížená aktivita v pečeni a pľúcach, paravertebrálne vľavo aktivita pretrváva. Performance status veľmi dobrý. Pacientka zvažuje ukončenie chemoterapie.

Diskusia

Karcinóm z renálnych buniek (RCC) sa v detskom veku vyskytuje zriedka, podľa najnovších publikovaných údajov ide v porovnaní s ochorením u dospelých o osobité ochorenie. Predstavuje približne 2-6% nádorov obličiek u detí. Kým u dospelých sa ako prvé prejavujú symptómy v súvislosti s metastatickým postihnutím alebo paraneoplastické syndrómy, u detí súvisia prvé príznaky s primárnym nádorom. V porovnaní s nefroblastómom sa RCC vyskytuje vo vyššom veku a je častejšie sprevádzaný hematúriou, nálezom abdominálnej masy, bolesťou, triáda príznakov je výnimočná. Zastúpenie chlapcov a dievčat je vo viacerých referovaných detských súboroch bez prevalencie chlapcov, v niektorých je výraznejšie v prospech dievčat. Podobne ako u dospelých incidencia stúpa.

Takmer u tretiny pacientov býva súčasne prítomné iné základné ochorenie: tuberózna skleróza, neuroblastóm, Saethreho-Chotzenov syndróm, chronické renálne zlyhávanie. Hereditárna forma nádora sa vyskytuje pri von-Hippel Lindauovej chorobe.

V detskom veku sa z histologických podtypov častejšie ako clear cell karcinóm vyskytuje karcinóm papilárny, karcinóm zo zberných kanálikov (Belliniho duktov) je raritný aj u detí. Makroskopicky býva nádor zvyčajne solídny, zriedka je s cystickými léziami súvisiacimi s krvácaním alebo nekrózou, občas s kalcifikáciami.

Najčastejšou genetickou zmenou pri konvenčnom RCC je strata krátkeho ramienka chromozómu 3, najmä strata 3p12-14, 3p21 a 3p25, pričom 3p21 je obligatórna. Väčšina papilárnych karcinómov je charakterizovaná trizómiou 17 a stratou Y chromozómu. Mutácie a straty 17p (spojené s alteráciou supresorového génu p 53) sú spojené s horšou prognózou.

Nedávne genetické štúdie odhalili tumor špecifickú mutáciu zahŕňajúcu translokáciu transkripčného faktora TFE3 t(X;1)(p11.2;q21). v určitej skupine pacientov s papilárnym RCC Vyskytujú sa prednostne u mladých dospelých a detí. Mutáciou tumor suprimujúceho génu na chromozóme 3p25-26 vzniká von-Hippel Lindauova choroba. Ide o autozómovo dominantné ochorenie asociované s rôznymi nádormi a cystami v CNS a viscerálnych orgánoch.

Sledujú sa tzv. biomolekulárne markery, prídatné prognostické faktory, ktoré poskytujú presnejšiu prognostickú informáciu. Stanovenie proliferačnej aktivity buniek – index Ki-67, t.j. percento nádorových buniek s exprimovaným proteínovým Ki-67 antigénom počas mitózy buniek je silným prognostickým znakom.

Štádium ochorenia je najdôležitejším prognostickým faktorom. Takmer 3/4 pacientov majú v čase stanovenia diagnózy lokalizovanú chorobu, vzdialené metastázy má do 10% pacientov.

Postihnutie lokoregionálnych LU u detských pacientov nemusí, v prípade neprítomnosti vzdialených metastáz, znamenať horšiu prognózu. Naproti tomu pacienti s postihnutím žíl, infiltráciou uzlín a so vzdialenými metastázami majú prognózu podstatne horšiu.

Pre liečbu RCC v detskom veku nie sú stanovená jednoznačne odporúčané liečebné postupy. Štandardnou liečbou je chirurgický výkon, radikálna nefrektómia. Je postačujúcou liečebnou modalitou pri lokalizovaných nádoroch. Vo vhodne indikovaných prípadoch sú dobré výsledky aj pri nefrón-šetriacich prístupoch. Disekcia lymfatických uzlín nezlepšuje zásadne prežívanie, aj keď u detí sa udáva jej pozitívny vplyv na prežívanie. Trombektómia nádorového trombu má naproti tomu na prežívanie jednoznačne dokázaný priaznivý vplyv. Adjuvantná liečba pokročilých štádií nie je jednoznačne definovaná.

V chemoterapii sa používajú schémy s daktinomycínom, cisplatinou, 5 FU. Kombinácia gemcitabínu a 5-FU u pacientov s metastatickým postihnutím navodila parciálnu remisiu v 17%. Imunoterapia pri RCC v detskom veku je stále experimentálnou možnosťou (Interferon alfa, IL 2).

Svetlobunkový karcinóm nadobličky ako vysoko vaskularizovaný typ nádora, s poruchou odbúravania HIF (hypoxia-inducible factor) a následnou zvýšenou transkripciou VEGF, PDGF, TGFβ (angiogénnych faktorov) sa stáva terčom pre antiangiogénnu liečbu. Skúšajú sa talidomid, bevacizumab, sorafenib, sunitinib.

Najvýznamnejším prognostickým faktorom je štádium a resekabilita. Kým 5 ročné prežívanie pri prvom štádiu presahuje 90%, pri 4. štádiu je to len okolo 10%.

Záver

Nedávno publikované údaje naznačujú, že RCC v detskom veku je rodlišnou entitou ako u dospelých, s rozdielmi v klinickej manifestácii a správaní sa, špecifickými genetickými abnormalitami i odlišnými histologickými charakteristikami. Súbory referujúce o RCC u detí sú malé, terapeutický prístup založený na poznatkoch zo štúdií u dospelých môže byť preto nevhodný. Z uvedených dôvodov je preto potrebná medzinárodná štúdia, ktorá by pomohla zohľadniť špecifiká tohto ochorenia v detskom veku v jeho liečbe.

Literatúra

1. Carlos R. Estrada, Anjali M. Suthar,Samuel H.Eaton: Renal cell Carcinoma: Children∞s Hospital Boston experience. Urology 66:1296-1300,2005
2. Masatoshi Jibiki, Takehisa Iwai, Yoshinori Inoue, Norihide Sugano: Surgical strategy for treating renal cell carcinoma with trombus extending into Inferior vena cava. J Vasc Surg 2004;39:829-35
3. Ebert A,Gravou C., Stumpfl M., Rosch WH.:Renal carcinoma in childhood. Case Report and review. Urologe A, 2003 Feb;42(2):263-8
4. Sanchez-Ortiz RF, Rosser CJ., Madsen LT., Swanson DA., Wood CG: Young age is an independent prognostic factor for survival of sporadic RCC. J Urol. 2004 Jun; 171(6pt1):2160-5
5. Geller JI, Dome JS: Local lymph node involvement does not predict poor outcome in pediatric RCC. Cancer 2004 Oct 1;101(7):1575-83
6. Selle B., Fuchtwangler R., Graf N., Kaatsch P., Bruder E., Leuschner I.: Population-based study of renal cell carcinoma in children in Germany, 1980-2005: more frequently localisated tumors and underlying disorders compared with adult counterparts. Cancer, 2006 Dec 15;107(12):2906-14

XII.
Hematoonkologie

108 Využití DNA microarrays v diagnostice lymfocytárních leukémií.

Pospíšilová Š.[1], Tichý B.[1], Kotašková J.[1], Mendelová D.[2], Štěrba J.[2], Mayer J.[1]
1) Centrum molekulání biologie a genové terapie, Interní hematoonkologická klinika, FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno; e-mail: sarka.pospisilova@fnbrno.cz
2) Klinika dětské onkologie, FN Brno, Černopolní 9, 625 00 Brno

DNA čipy (microarrays) jsou moderní technologií, která umožňuje paralelní analýzu tisíců genů, případně celého lidského genomu, a to na úrovni DNA (tzv. array-CGH), RNA (expresní čipy) i proteomu (expresní a funkční čipy). Tyto metodiky jsou v poslední době stále více využívány nejenom v biomedicínském výzkumu, ale také se začínají uplatňovat v klinické praxi. Nepochybný je význam čipových technologií v diagnostice leukémií a lymfomů, kde genové expresní profily umožnily definovat nové subtypy onemocnění nebo nalézt nové prognostické markery.

Na našem pracovišti se zabýváme analýzami genové exprese u chronické lymfocytární leukémie dospělých pacientů (B-CLL) a akutní lymfoblastické leukémie u dětí (ALL). U CLL bylo provedeno srovnání genové exprese ve zdravých a leukemických B-lymfocytech a porovnány expresní profily u různých skupin pacientů rozdělených podle dosavadních prognostických kritérií, např. mutačního statutu těžkého řetězce imunoglobulinového genu (IgVH). Tyto analýzy přinesly velmi zajímavé výsledky a umožnily definovat nové molekulární markery, které mají rozhodující význam pro prognózu a délku přežití pacienta. Získané výsledky byly verifikovány pomocí Real-time PCR a počítá se s jejich využitím v klinické diagnostice. Kromě expresních čipů jsou pro diagnostiku CLL využívány taktéž čipy pro komparativní genomovou hybridizaci (array-CGH) a čipy detekující expresi microRNA. Expresní čipové analýzy u dětských ALL pacientů potvrdily možnost využití této technologie pro klasifikaci subtypů tohoto onemocnění. Jasně se podařilo rozlišit B- a T-buněčné ALL, které mají výrazně rozdílný expresní profil, významný rozdíl jsme nalezli taktéž mezi cytogenetickými subtypy onemocnění, jako např. mezi pacienty s translokací TEL-AML1, translokací v MLL genu a pacienty s hyperdiploidním počtem chromozómů. Získané výsledky potvrdily rutinní zvládnutí nových metodických přístupů, přinesly nové originální výsledky a jasně ukazují velký potenciál čipových technologií pro onkologickou diagnostiku.

Práce byla podporována grantem IGA MZ ČR NR8448-3/2005.

109 Mitogenem aktivované proteinové kinázy (MAPK) v modelu diferenciace leukemických buněk HL-60.

Procházková J.[1,2], Hofmanová J.[1,2], Netíková J.[1], Souček K.[1], Kozubík A.[1,2]
1) Laboratoř cytokinetiky, Biofyzikální ústav AV ČR v. v. i., Brno
2) Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno

Leukemické onemocnění vzniká následkem genetické chyby, která vede k předčasnému ukončení hematopoietického diferenciačního programu. V případě akutní myeloidní anémie je možné tuto blokaci překonat pomocí látek indukujících maturaci nezralých buněk, jako je kyselina retinová nebo vitamín D3, což je základem diferenciační terapie (např. Chou et al. 2005, Jing 2004). Vedlejším efektem tohoto postupu je však selekce rezistentních klonů. Tuto rezistenci může překonat jen kombinace různých diferenciačních a cytotoxických drog nebo látek remodelujících DNA (Freemantle et al. 2003). Studium signálních drah, které posilují diferenciaci, pak může vést k nalezení potenciálních cílů budoucích antileukemických léčiv.

V našich předchozích studiích byl prokázán diferenciační efekt kombinace cytokinů s inhibitory metabolizmu kyseliny arachidonové (AA), zvláště cytokinu TNF-alfa s MK-886. MK-886 bývá primárně používán jako inhibitor vazby proteinu FLAP na 5-lipoxygenázu, čímž zabrání její aktivaci (Kozubík 1997 et al., Hofmanová et al. 1998, Štika et al. 2005). Ve snaze o další posílení diferenciačního efektu jsme k stávající účinné směsi přidali TGF-beta1. O tomto cytokinu je totiž známo, že má schopnost mírně zvyšovat diferenciaci buněk leukemického původu a jeho účinek obecně značně vzrůstá při společném působení s jinými diferenciačními látkami (Trinchieri et al. 1986, Okabe-Kado et al. 1991, Falk 1991, Cao et al. 2003, de Benedetti et al. 1990). Oproti předpokladu však po přidání TGF-beta1 došlo spíše k intenzivní aktivaci drah vedoucích k buněčné smrti a frekvence výskytu diferencovaných buněk klesla na úroveň podobnou neovlivněným buňkám. Takovéto efekty bývají obvykle spojeny se změnami aktivace MAPK, proto jsme se v této studii zabývali právě těmito signálními drahami, které zprostředkovávají expresi tzv. genů rychlé odpovědi (early response genes) na různé stresové podněty.

Buněčným modelem této studie byla myeloidní linie HL-60 derivovaná z buněk akutní promyelocytární leukémie, která byla kultivována v RPMI 1640 médiu se sníženým obsahem séra. Buňky mbyly předem ovlivněny inhibitory metabolizmu AA (5 μM MK-886) a po jedné hodině byly k této suspenzi přidány cytokiny (1 ng/ml TNF-alfa, 100 pM TGF-beta1) a to jednotlivě nebo v kombinaci. Úroveň exprese studovaných proteinů byla stanovena denzitometrickou kvantifikací Western blotů. Ke studiu aktivace těchto drah jsme využili fosfospecifické protilátky, neboť k aktivaci těchto kináz dochází pomocí fosforylační modifikace. Výskyt povrchových diferenciačních markerů CD11b a CD14 byl stanoven pomocí průtokové cytometrie. Přítomnost buněk zaniklých apoptotickou formou buněčné smrti byla hodnocena morfologicky (barvení DAPI), průtokovou cytometrií (TUNEL) nebo pomocí detekce štěpení kaspázového substrátu PARP Western blottingem.

První ze studovaných MAPK byla c-Jun N-terminální kináza (JNK), která bývá obvykle spojována s pro-apoptotickými efekty (Manna et al. 2000, Kajiguchi et al. 2003, Stadheim et al. 2002, Su et al. 2005). V buněčné linii HL-60 je konstitutivně aktivní JNK1, kdežto JNK2 je ve srovnání s JNK1 aktivována i exprimována jen velmi slabě a na tomto stavu paradoxně nic nemění ani působení žádné z našich látek.

Další z MAPK s potenciálně změněnou aktivitou je kináza p38, která bývá často také aktivována v souvislosti s iniciací apoptotického procesu (Ahn et al. 2005, Ikeda et al. 2006, Kondoh et al. 2005, Park et al. 2005, Xia et al. 2006). Již 15 minut po přidání TNF-alfa nebo kombinace TNF-alfa a TGF-beta1 k buňkám, které byly 1 hod předkultivovány s MK-886 došlo k indukci aktivace kinázy p38, ale tato aktivace je jen krátkodobá a po dalších 15 minutách již dochází k jejímu utlumení.

Signální dráha, ve které se nachází aktivní kináza p44/42 (ERK1/2) obvykle podporuje přežití buněk (Hetman and Kharebava 2006, Nyunoya et al. 2005, Ohguchi et al. 2005). Fosforylace kinázy p42 ERK2 u buněk HL-60 je konstitutivní, ale bývá posílena v prostředí, kdy jsou buňky vystaveny působení cytokinů, ale nedochází ještě k postižení viability buněčné populace. Fosforylace kinázy p44 ERK1 je velmi slabá, ale bývá zesílena v případech, kdy dochází k aktivaci ERK2. V našem modelu dochází k aktivaci této dráhy již po 15 min inkubace, ale tato aktivace je i nadále posilována v delších časových intervalech (až 120 min) u buněk diferencujících (MK-886 + TNF-alfa). K potlačení aktivace této dráhy však dochází po přidání TGF-beta1 k této kombinaci, což odpovídá zvýšení výskytu zanikajících buněk.

Jediný významný rozdíl mezi buňkami, které diferencují (ovlivněné MK-886 + TNF-alfa) a nediferencují (MK-886 + TNF-alfa + TGF-beta1) byl nalezen v signální dráze kináz p44/42 (ERK1/2), proto je možné, že cílové proteiny této kinázy aktivují nejen dráhy podporující přežití, ale také samotný diferenciační program.

Tento projekt byl podporován granty č. 524/06/P345 a 524/05/0595 agentury GAČR a AVOZ č. 50040507

Literatura

1. Ahn et al. (2005) Cancer Res, 65(11):4896-901;
2. Cao et al. (2003), Blood, 101 (2): 498-507;
3. de Benedetti et al. (1990), Blood, 75 (3): 626-32;
4. Falk (1991), Blood, 77 (6): 1248-55;
5. Freemantle et al. (2003), Oncogene, 22 (47): 7305-15;
6. Hetman and Kharebava (2006) Curr Top Med Chem., (8):787-99;
7. Hofmanová et al. (1998), Eur J Pharmacol, 350 (2-3): 273-84;
8. Chou et al. (2005), Curr Opin Hematol,12 (1): 1-6;
9. Ikeda et al. (2006) Biochem Biophys Res Commun., 342(1):280-5;
10. Jing (2004), Leuk Lymphoma, 45 (4): 639-48;
11. Kajiguchi et al. (2003) Leukemia, 17(11):2189-95;
12. Kondoh et al. (2005) Planta Med., 71(3):275-7;
13. Kozubik et al. (1997), J Leukoc Biol, 62 (2): 240-8;
14. Manna et al. (2000) J Interferon Cytokine Res., 20(8):725-35;
15. Nyunoya et al. (2005) J Biol Chem., 280(28):26295-302;
16. Ohguchi et al. (2005) Biosci Biotechnol Biochem., 69(2):353-6;
17. Okabe-Kado et al. (1991), Anticancer Res, 11 (1): 181-6;
18. Park et al. (2005) Br J Pharmacol., 146(4):506-13;
19. Stadheim et al. (2002), Leuk Res., 26(1):55-65;
20. Su et al. (2005), Carcinogenesis, 26(1):1-10;
21. Štika et al. (2005), 237(2):263-71;
22. Trinchieri et al. (1986), Blood, 69 (4): 1218-24;
23. Xia et al. (2006) J Asian Nat Prod Res., 8(4):335-43.

110 Srovnání metod CD34+ and Lin– selekce buněk ze štěpu periferních kmenových buněk pacientů s lymfomy a vyhodnocení jejich ex vivo diferenciace pomocí cDNA microarrays.

Klabusay M.[1,2], Hrabčáková V.[2], Koutná I.[3], Krontorád P.[3], Svoboda Z.[3], Kozubek M.[3], Mayer J.[1]
1) Interní hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno
2) Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno
3) Fakulta informatiky, Masarykova univerzita, Brno,

Úvod

Hematopoetické kmenové buňky (hematopoetic stem cells, HSC) jsou schopny v průběhu celého života vytvářet buňky všech krevních řad, a to při zachování schopnosti sebeobnovy a bez změn v karyotypu. Pro klinické účely jsou charakterizovány jako CD34+. Při léčbě některých akutních i chronických leukémií a lymfomů je transplantace kmenových buněk získaných z kostní dřeně nebo sběrem periferních kmenových buněk po exogenní stimulaci a po aplikaci vysokodávkované chemoterapie a radioterapie jedinou možnou kurativní léčbou. V současnosti jsou periferní kmenové buňky preferovaným zdrojem HSCs pro potřeby autologních a alogenních transplantačních režimů, a to hlavně u léčby lymfomů a leukemií. Při autologních transplantacích hrozí kontaminace štěpu HSCs maligními buňkami, proto se velká pozornost věnuje metodám izolace HSCs a jejich chováním v podmínkách ex vivo. V podmínkách in vitro kultivace je možné za pomoci cytokinů indukovat vyzrávání HSCs do žádaných buněčných linií. Tímto způsobem je možné získat expandované linie částečně nebo zcela diferencovaných buněk, které je možné aplikovat za účelem zkrácení doby neutropenie po přípravném předtransplantačním režimu a samotné transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Díky některým metodám molekulární biologie je možné také sledování genové exprese v procesu vyzrávání ex vivo kultivovaných HSCs a tyto změny korelovat s dalšími parametry. Jednou z těchto metod je genetické profilování pomocou cDNA microarrays, které umožňují v rámci jedné analýzy charakterizovat velké množství genů. V naší práci jsme se rozhodli použít tuto metodu na sledování exprese vybraných genů významných v průběhu granulocytární diferenciace, a to u dvou rozdílých systémů – u krátkodobě kultivovaných CD34+ a Lin– buněk.

Materiál a metody

Jako zdroj HSCs nám sloužily štěpy periferních kmenových buněk (peripheral blood stem cells, PBSC) od pacientů s non-Hodgkinskými lymfomy, kteří se podrobili mobilizační chemoterapii a následnou aplikací G-CSF. CD34+ a Lin- buňky byly izolovány pomocí imunomagnetické separace. Zastoupení CD34+ frakce v separované suspenzi bylo vyhodnoceno na flow cytometru. Buňky byly umístěny do kultivačních systémů s bezsérovým médiem a směsí rekombinantních cytokinů (stem cell factor, Flt-3-ligand, interleukin 3, interleukin 6, G-CSF). V den 0, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 byly z kultur odebírány vzorky na cDNA microarrays a další analýzy (colony forming assays, flow cytometrická analýza exprese povrchových diferenciačních antigenů CD13, CD33, CD34, CD36, CD65, CD116, CD117, CD123, CD124 a CD133 v den +14, celková míra expanze, expanze CD34+ buněk). RNA izolována ze vzorků byla v procesu cDNA microarrays amplifikována a hybridizována na microarray chipech. Na vyhodnocení microarrays (analýzy sklíček – skenování, fold change cut off, vizualizace dat, Z-skórování, normalizace „within-slide“ a „between-slide“) byl použit software JABS-I a JABS-N a metody normalizace LOWESS a Mean Cyclic Loess (MCL). Pomocí cDNA analýz bylo s pozitivními a negativními kontrolami srovnáno 19 000 lidských genů.

Výsledky

Čistota frakce CD34+ buněk po obou typech separací v CD34+ a Lin– suspenzi byly srovnatelné. Pomocí podrobné microarray analýzy cDNA buněk obou systémů v čase bylo možné prokázat up– a downregulaci exprese genů významných pro granulocytární diferenciaci.

Exprese antigenu CD34 byla nejvyšší na začátku kultivace a v čase výrazně klesala. Ke konci kultivace bylo jeho relativní zastoupení na buňkách v průměru 1%. Průměrná celková expanze buněk dosáhla 43-násobku, expanze CFU-GM 23.94 10.29 (průměr s.d.) pro CD34+ a 30.39 16.64-násobný nárůst kolonií pro Lin– systém. CFU-Meg z CD34+ kultury vytvořili 2.56 3.31-násobek a 1.28 1.93-násobek kolonií u kultivovaných Lin- buněk. Relativní zastoupení vybraných povrchových antigenů v den +14 od začátku kultivace je uvedeno v Tab. 1.

Dvanáct genů (pro CD10, CD11b, CD33, CD34, CD36, CD54, CD92, CD114, CD115, CD116, CD 126, HLA-DR) relevantních pro granulocytární diferenciaci buněk bylo vyhodnoceno pomocí genetického profilování. Antigen CD10 je exprimován na progenitorech B-lymfocytů, neutrofilech a subtypech blastů B-akutní lymfocytární leukemie. V našich ex vivo systémech byl upregulován od 10. dne kultivace. CD11b (integrin, Mac-1á) je spjat s diferenciací do granulocytů a jeho exprese na zralých buňkách byla nízká (ode dne 8). Antigen CD33 je exprimován na monocytech a slabě také na granulocytech a také v cytoplasmě myeloidních progenitorů – jeho exprese v průběhu kultivace klesala. CD36 (GVIP) primárně souvisí s diferenciací do megakaryocytární a erytroidní krevní linie. U subsetů CD34+ buněk je také exprimován a má význami i při raném stádiu myeloidní diferenciace. CD54 (ICAM-1) je typický pro endoteliální buňky a T a B-lymfocyty, ale také je přítomen na zralých buňkách včetně granulocytů. Na obou typech selektovaných buněk byla jeho exprese upregulována ode dne 8 až 10 diferenciace. Nejvyšší hladina exprese genu pro receptor pro G-CSF (G-CSFR, CD114) byla zaznamenána mezi dny 4 a 8 diferenciace. CD115 (M-CSFR)

kóduje receptor pro faktor stimulující kolonie makrofágů a CD116 pro alfa jednotku heterodimerického receptoru pro faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSFRα). V našich experimentech byla nejvyšší hladina exprese CD114 zaznamenána v den 6 (pro CD116 v den 8), zatímco CD115 byl downregulován. Gen pro CD126 kóduje podjednotku receptorového komplexu pro interleukin-6 (IL-6). Nárůst jeho exprese přetrvával ode dne 6 do dne 10. Antigen HLA-DR je konstitutivně exprimován na B-lymfocytech a antigen-prezentujících buňkách. Po aktivaci T-lymfocytů je také přítomen a je exprimován i na některých subpopulacích $CD34^+$ buněk. Nejvyšší exprese byla prokázána v den 4 diferenciace a minimální na jejim konci.

Tab. 1: Relativní zastoupení povrchových antigenů v den 14 kultivace $CD34^+$ a Lin^- buněk.

Den +14 $CD34^+$ separace	průměr ± s.d. [%]	Den +14 Lin^- separace	průměr ± s.d. [%]
CD13	42.85 ± 13.54	CD13	33.80 ± 6.50
CD33dim	76.64 ± 8.77	CD33	78.80 ± 8.61
CD34	1.47 ± 0.62	CD34	1.58 ± 1.50
CD36dim	83.78 ± 13.73	CD36	67.25 ± 20.75
CD65	87.79 ± 13.24	CD65	93.67 ± 6.45
CD11	60.23 ± 0.42	CD11	60.09 ± 0.08
CD11	76.50 ± 3.18	CD11	73.90 ± 2.94
CD12	30.26 ± 0.031	CD12	30.37 ± 0.47
CD12	40.14 ± 0.09	CD12	40.07 ± 0.07
CD13	30.09 ± 0.15	CD13	30.02 ± 0.05

Diskuse

Selekce HSCs a jejich další využití v podmínkách in vitro jsou poměrne novými přístupy. Izolace $CD34^+$ buněk má svoje místo při transplantacích hematopoetické tkáně, včetně metod čištění štěpu od maligních buněk, při deplecích B a T lymfocytů, experimentálně v genové terapii apod. Pořád je však nastoleno mnoho otázek souvisejících např. se samotnými $CD34^+$ buňkami. Z klinického hlediska se $CD34^+$ buňky považují za hematopoetické kmenové buňky, někteří autoři poukazují i na význam $CD34^-$, $CD34^+$ subpopulací nebo jiných buněk nacházejících se ve stromatu kostní dřeně. Dalším důležitým faktorem jsou také rozdíly mezi $CD34^+$ progenitory periferní krve a kostní dřeně.

Frakci obohacenou o HSCs je možné v podmínkách ex vivo za pomoci cytokinů spolehlivě expandovat. Svou úlohu tady hraje i typ média, počáteční koncentrace buněk, koncentrace přidaných exogenních faktorů i doba kultivace. HSCs selektované ze štěpů periferních kmenových buněk a expandované v podmínkách in vitro se pod vlivem působení cytokinů diferencují do postprogenitorů a v této formě jsou schopny významně přispět k rychlejší obnově granulopoezy po pretransplantační chemoterapii, jako i snížit riziko posttransplantačních komplikací, a to hlavně neutropenie.

Využití techniky cDNA microarrays při genetickém profilování expandovaných $CD34^+$ a Lin^- buněk nám umožnilo detailní náhled na změny na genetické úrovni v průběhu diferenciace buněk ex vivo. Porovnáním úrovně selektivní regulace exprese jednotlivých genů v čase bylo prokázáno, že rozdíly mezi systémem $CD34^+$ a Lin^- buněk jsou minimální a tyto metody selekce buněk z PBSC můžeme považovat za ekvivalentní. $CD34^+$ antigen je v nejvyšší míře zastoupen na začátku kutivace a jeho množství v průběhu kultivace neustále klesá. Antigeny granulocytární linie (např. CD11b) jsou v nejvyšší míře exprimovány ke konci kultivace. Další antigeny, které jsou významné při diferenciaci progenitorových buněk (např. CD33, CD36, HLA-DR), jako i cytokinové receptory (CD114, CD126) jsou up- a downregulovány v různém čase v procesu diferenciace buněk. Metoda Z-skórování, díky které je možné označit geny se signifikantně odlišnou hladinou exprese, reflektuje biologickou variabilitu vzorků a zaručuje důslednost vyhodnocení. Není však možné očekávat 100% shodu mezi dvěma odlišnými vzorky. V našich experimentech jsme dosáhli shodu 93%, která nám prokazuje správnost použité metody, jako i ekvivalenci metod Lin^- a $CD34^+$ izolace buněk z periferní krve pacientů stimulovaných rekombinantním G-CSF. Exprese vybraných sledovaných genů (viz výsledky) prokázala významné změny v průběhu granulocytární diferenciace.

Celkový expresní profil vybraných antigenů je ve shodě s teoretickou hypotézou. Zjištění, že metody selekce $CD34^+$ a Lin^- buněk ze štěpů PBSC jsou ekvivalentní a potvrzení pomocí cDNA microarray techniky může najít své využití při experimentálních manipulacích se štěpem při transplantacích hematopoetické tkáně, jako i při manipulacích s buňkami vykazujícími zdravý fenotyp.

Poděkování: Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR9023-3/2006.

111 Sledování exprese genu pro cyklin D1 v korelaci s proliferační aktivitou u pacientů s lymfomem z buněk pláště.

Břízová H., Mrhalová M., Kodet R.
Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha
helena.brizova@fnmotol.cz

Lymfom z buněk pláště (mantle cell lymphoma, MCL) zahrnuje 3-10% B buněčných non-Hodgkinovských lymfomů (B-NHL). Jedná se o onemocnění starších nemocných vyznačující se nepříznivou prognosou s relativně agresivním klinickým průběhem, rychlou progresí a odolností ke konvenční terapii používané k léčbě B-NHL. Medián přežití se pohybuje do 3 let, ale klinický průběh onemocnění je často variabilní.

Klinicko-terapeutický význam má nejen včasná a správná diferenciální diagnosa MCL, ale rovněž stanovení markerů v asociaci s nepříznivou prognosou onemocnění.

U MCL dochází k transkripční deregulaci genu CCND1 vedoucí k patologické expresi cyklinu D1 vlivem translokace t(11;14). Exprese cyklinu D1 nebo detekce t(11;14) je podle současných WHO kriterií nezbytnou součástí diferenciální diagnosy MCL. Hlavním prognostickým faktorem pro pacienty s MCL je up-regulace genů, které jsou asociovány s proliferační aktivitou buněk. Rozsáhlá klinickopatologická analýza European MCL Network potvrdila významnou prognostickou roli buněčné proliferace, která je lepším prognostickým parametrem nadřazeným všem ostatním histomorfologickým a klinickým kritériím. V asociaci se špatnou prognosou je u pacientů s MCL popsána exprese Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2.

Cílem práce je 1. kvantitativní stanovení exprese molekulárního markeru MCL, cyklinu D1 a 2. zavedení kvantitativní detekce mRNA proliferačních markerů Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2, jejichž exprese je popsána jako negativní prognostický faktor u pacientů s MCL.

Pomocí reverzně transkriptázové řetězové reakce v reálném čase (RT-RQ-PCR) jsme vyšetřili expresi mRNA cyklinu D1, Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2 u 79 kryostatových a/nebo parafinových vzorků MCL diagnostikovaných v době záchytu onemocnění.

Pro stanovení spolehlivého hraničního limitu pro diferenciální diagnosu MCL jsme dále vyšetřili expresi cyklinu D1 u 50 vzorků jiných B-NHL. Kontrolními vzorky byly odběry od 5 pacientů s reaktivní lymfadenopatií. Hladinu cyklinu D1 jsme rovněž analyzovali u 112 aspirátů kostní dřeně (KD) odebraných v době diagnosy a/nebo v průběhu onemocnění od pacientů s B-NHL (72x se jednalo o KD od pacientů s MCL, z nichž 36 mělo zaznamenanou infiltraci KD lymfomem). Jako kontrolní skupinu jsme vyšetřili 10 vzorků KD od zdravých dárců.

Při analýze proliferační aktivity nádorů jsme vyšetřili expresi Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2 u 37 bioptických vzorků NHL a u 4 vzorků od pacientů s reaktivní lymfadenopatií. V 7/37 případech NHL se jednalo o Burkittův lymfom (BL). BL je vysoce proliferativní onemocnění, které jsme použili jako positivní kontrolu vyšetření.

Kvantitativní vyšetření hladiny mRNA cyklinu D1 poskytlo spolehlivý nástroj diferenciální diagnostiky lymfomů. U 78/79 vyšetřených MCL jsme prokázali overexpresi cyklinu D1. U žádného z testovaných jiných B-NHL ani kontrolních vzorků jsme vysokou expresi cyklinu D1 nezaznamenali. Sledování hladiny exprese cyklinu D1 má význam pro detekci choroby v kostní dřeni, neboť jsme detekovali zvýšenou hladinu cyklinu D1 u aspirátů KD s infiltrací MCL. Navíc sledování úbytku případně nárůstu hladiny cyklinu D1 je vhodné pro sledování dynamiky onemocnění. U žádného vzorku KD z kontrolní skupiny ani ostatních B-NHL jsme nezjistili zvýšenou hladinu exprese cyklinu D1.

Zavedli jsme nový přístup objektivního hodnocení proliferační aktivity nádorů na kvantitativní úrovni pomocí RT-RQ-PCR analýzy mRNA Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2. Hladina exprese vyšetřených proliferačních markerů vzájemně silně korelovala u všech analyzovaných vzorků. Potvrdili jsme roli Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2 pro stanovení proliferační aktivity nádoru. Buněčná proliferace byla u jednotlivých nádorů v testovaném souboru pacientů variabilní. Ve skupině pacientů s MCL, jinými B-NHL i BL jsme zaznamenali nádory s vysokou, střední i nízkou proliferační aktivitou. Variabilita exprese proliferačního markeru Ki67 může odrážet heterogenní klinický obraz onemocnění jednotlivých pacientů. Celkově jsme zaznamenali rozdílnou proliferační aktivitu stanovenou pomocí kvantitativní analýzy pro jednotlivé skupiny pacientů. Podle očekávání nejvíce proliferovala skupina pacientů s BL, nejméně kontrolní skupina pacientů s reaktivní lymfadenopatií. Skupina ostatních NHL a MCL ukázala střední míru proliferace, která se statisticky významně lišila od proliferace vzorků s BL a reaktivní lymfadenopatií.

Hladina mRNA cyklinu D1 je vyšší u pacientů s vyšší proliferační aktivitou stanovenou pomocí topoisomerasyIIα a TPX2 (markery S, G2 a M fáze buněčného cyklu). Nezaznamenali jsme statisticky významnou korelaci hladiny exprese cyklinu D1 s expresí Ki67 (markerem G1, S, G2 a M fáze buněčného cyklu). Cyklin D1 má zásadní vliv během pozdní G1 fáze a v přechodu do S fáze buněčného cyklu. Korelační analýza nepotvrdila asociaci Ki67 a cyklinu D1, neboť hladina Ki67 je zkreslena frakcí buněk v G1 fázi. Cyklin D1 je v přímém vztahu k expresi molekul specifických v S, G2 a M fázi. Nalezený vztah podporuje kvantitativní model pro řízení G1/S transice.

Metoda RT-RQ-PCR umožňuje sledovat pacienty s MCL na molekulární úrovni. Z dosažených výsledků je patrné, že kvantitativní stanovení hladiny cyklinu D1 je vhodným nástrojem diferenciální diagnostiky MCL. Jak vyplývá z korelační analýzy hladiny cyklinu D1 a proliferační aktivity MCL, regulace buněčného cyklu prostřednictvím cyklinu D1 pravděpodobně probíhá více na kvantitativní než kvalitativní úrovni. Proliferace má přímý dopad na určení charakteru onemocnění MCL a napomáhá stratifi-

kaci pacientů z hlediska individuální prognosy onemocnění před zahájením léčby. Rutinní kvantitativní detekce proliferačních aktivity umožní sledovat prognostický význam proliferačních markerů na rozvoj onemocnění a zlepšit porozumění vlivu exprese proliferačních markerů v patogenezi nejen MCL. Hladina exprese Ki67, topoisomerasyIIα a TPX2 umožňuje stanovit proliferační aktivitu nádoru, kterou lze využít k predikci klinického vývoje onemocnění a individualizaci terapie podle rizika.

Projekt je podporován grantem GAUK 200055, 46/2006/C/2. LF a výzkumným záměrem MZO 00064203/6704

112 Angiogeneze u chronické lymfocytární leukémie.

Smolej L.[1], Andrýs C.[2], Benešová P.[3], Hrudková M.[1], Krejsek J.[2], Malý J.[1]
1) II. interní klinika, Oddělení klinické hematologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové
2) Ústav klinické imunologie a alergologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové
3) Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta UK a Fakultní nemocnice Hradec Králové

Úvod

Angiogeneze (AG), hraje významnou roli v patogenezi a progresi zhoubných nádorů. V posledních 10 letech došlo k mohutnému rozvoji výzkumu AG v oblasti hematologických malignit. Zvýšená AG byla prokázána u akutních i chronických leukémií, lymfomů, mnohočetného myelomu, myelodysplastických i myeloproliferativních onemocnění. Charakteristickým rysem chronické lymfocytární leukémie (CLL) je vysoká různorodost stran prognózy – třetina nemocných nikdy nevyžaduje léčbu a délka jejich přežití je prakticky shodná se zdravými vrstevníky, naproti tomu někteří nemocní s agresivním průběhem choroby žijí méně než 5 let. Dosavadní stagingové systémy dle Raie a Bineta nejsou schopny identifikovat nemocné prezentující se v úvodu nízkou nádorovou masou, kteří mají přesto velmi nepříznivou prognózu a chemorezistentní onemocnění. Proto se hledají nové prognostické faktory, které by napomohly k přesné stratifikaci nemocných dle rizika a umožnily více individualizovat intenzitu a typ léčby. Recentní publikace vyzdvihují v tomto smyslu význam AG pro progresi CLL a citlivost na léčbu. Cílem studie bylo komplexní hodnocení angiogeneze v periferní krvi i kostní dřeni u nemocných s CLL.

Metodiky

AG jsme hodnotili třemi odlišnými metodami: 1) stanovením koncentrací angiogenních cytokinů (VEGF, bFGF, sCD105, endostatin) v periferní krvi, pomocí sendvičové ELISA; 2) hodnocením neovaskularizace v kostní dřeni pomocí imunohistochemického průkazu endoteliálního antigenu vWF a stanovením tzv. mikrovaskulární denzity (MVD). U všech cytokinů měřených ELISA v periferní krvi bylo nalezeno statisticky signifikantní zvýšení v porovnání s kontrolní skupinou zdravých dobrovolníků; nejvyšší rozdíl byl zjištěn v koncentracích zásaditého růstového faktoru pro fibroblasty (bFGF). MVD byla statisticky signifikantně zvýšena u CLL v porovnání s kontrolními preparáty; zjistili jsme signifikantní zvýšení neovaskularizace ve dřeni CLL pacientů nezávisle na typu infiltrace.

Závěr

Zjistili jsme zvýšení angiogenních cytokinů v periferní krvi i zvýšenou neovaskularizaci ve dřeni u nemocných s CLL a tím potvrdili významnou úlohu angiogeneze v patogenezi CLL. Tento výzkum je důležitý nejen diagnosticky a prognosticky, ale do budoucna bude přínosný i pro volbu typu léčby, terapii, neboť již nyní se v rámci klinických studií používají preparáty s antiangiogenním působením, např. thalidomid a lenalidomid.

Podpořeno grantem č. 8373-3 IGA a výzkumným záměrem MZO 00179906 MZ ČR.

113 Plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF) and soluble endoglin (sCD105) in patients with chronic myeloid leukemia: impact of treatment with imatinib mesylate.

Smolej L.[1], Voglová J.[1], Andrýs C.[2]
1) 2nd Department of Internal Medicine, Department of Clinical Hematology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové, Czech Republic
2) Institute of Clinical Immunology and Allergology, Charles University Hospital and Medical School, Hradec Králové, CR

Introduction: Angiogenesis is nowadays considered an important factor in biology of various hematological malignancies including chronic myeloid leukemia (CML). Several studies have recently reported elevated levels of angiogenic activators such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in CML patients. However, there have been only few data on the influence of imatinib mesylate (IM) treatment on the levels of angiogenic cytokines in CML. Aims: To analyze peripheral blood levels of angiogenic activators in patients with newly diagnosed CML and during imatinib treatment. Met-

hods: We measured plasma concentrations of VEGF, bFGF and soluble endoglin (sCD105) using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 16 patients with chronic-phase CML and 80 healthy blood donors; furthemore, repeated samples during the therapy with (IM) were analyzed. Results: We found a statistically significant increase in VEGF (mean ± SD [standard deviation], 491.0 ± 365.3 vs. 64.2 ± 69.5 pg/ml, 95% CI [confidence interval] of mean, 296.4-685.7 vs. 51.0-77.5 pg/ml, p<0.0001) and sCD105 (mean ± SD, 7.0 ± 1.95 vs. 4.57 ± 1.51 ng/ml, 95% CI of mean, 5.83-8.18 vs. 4.20-4.93 ng/ml, p<0.0001) but not bFGF (p=0.606) in comparison to the control group. VEGF levels significantly decreased in 7 patients who achieved hematological remission (6 complete remissions, 1 partial remission) during therapy with IM (mean ± SD, 679.6 ± 431.5 vs. 132.7 ± 63.3 pg/ml, 95% CI, 280.6-1078.6 vs. 74.1-191.3 pg/ml, p=0.015). There was no significant change in bFGF or sCD105 (p=0.938 and 0.125, respectively). Conclusions: We found significantly elevated VEGF and sCD105 levels in CML patients. In addition, successful treatment with IM resulted in significant decrease of VEGF. These data lend further support to the importance of angiogenesis in patophysiology of CML. Further studies incorporating larger number of patients are needed to confirm our findings.
Supported by research project MZO 00179906 from Ministry of Health of Czech Republic

114 Hodnocení aktivátorů a inhibitorů angiogeneze u pacientů s mnohočetným myelomem v průběhu choroby.

Pour L.[1,2,3], Penka M.[2,3], Adam Z.[2,3], Kovářová L.[1], Kyjovská D.[1], Vidláková P.[1], Michálek J.[1,3], Vorlíček J.[2,3], Hájek R.[1,2,3]

1) Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie OKH FN BRNO
2) Interní hematoonkologická klinika FN BRNO
3) Lékařská fakulta Masarykovy univerzity Brno

Úvod

Mnohočetný myelom je prvním maligním hematologickým onemocněním, u kterého byla prokázána zvýšená míra angiogeneze. Angiogenní zvrat hraje klíčovou roli v přechodu monoklonální gamapatie nejasného významu do MM a onemocnění se dostává do tzv. vaskulární fáze. Angiogeneze je složitý děj, ve kterém je zapojeno značné množství buněk i humorálních faktorů, které se uplatňují jak angiogenním, tak i antiangiogenním působením. Stanovení koncentrací jednotlivých faktorů může mít klíčový význam prognostický a prediktivní. Podle recentních prací mají u mnohočetného myelomu z proangiogenních cytokinů největší význam VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor), bFGF zásaditý růstový faktor pro fibroblasty) a HGF (hepatocytární růstový faktor). Význam inhibitorů angiogeneze není u mnohočetného myelomu doposud zcela jasně definován. Mezi nejvýznamnější inhibitory angiogeneze patří trombospondin, endostatin a angiostatin.

Metody

Metodikou ELISA byly měřeny hladiny aktivátorů angiogeneze (VEGF, bFGF, HGF) a inhibitorů (angiostatin, trombospondin, endostatin) v periferní plasmě a plasmě kostní dřeně. Byly měřeny hladiny jednotlivých faktorů v době stanovení diagnosy a v době maximální léčebné odpovědi po autologní transplantaci, v periferní krvi u celkem 72 pacientů, v plasmě kostní dřeně u celkem 82 pacientů. Pacienti byli rozděleni na skupiny podle dosažené léčebné odpovědi na tři skupiny 1. velmi dobrá parciální remise (VGPR), 2. parciální remise (PR), 3. nedostatečná léčebná odpověď. A byly porovnány hladiny výše uvedených faktorů před a po léčbě autologní transplantací. Pro hodnocení rozdílu hodnot v době stanovení diagnosy a v době maximální léčebné odpovědi v jednotlivých skupinách byl použit neparametrický párový Wilcoxon test.

Výsledky

Statisticky signifikantní pokles po léčbě byl prokázán u parametru HGF a VEGF v periferní plasmě (p=0,014 pro HGF, p=0,016 pro VEGF) a plasmě kostní dřeně (p=0,041 pro HGF, p=0,006 pro VEGF) ve skupině pacientů s dosaženou VGPR, ve skupinách PR a nedostatečná léčebná odpověď nebyl prokázán statisticky signifikantní rozdíl. Statisticky signifikantní vzestup byl pozorován u parametru trombospondin v kostní dřeni u pacientů s dosaženou VGPR (p= 0,048). Statisticky signifikantní rozdíl v hodnotách endostatinu, angiostatinu, bFGF před a po autologní transplantaci nebyl prokázán v plasmě periferní krve ani v kostní dřeni v žádné skupině pacientů, stejně tak změna hodnot thrombospondinu v periferní plasmě nebyla statisticky signifikantní u žádné skupiny pacientů.

Závěry

Výsledky potvrdily, že klíčové aktivátory angiogeneze jsou u mnohočetného myelomu HGF a VEGF. Pokles jejich hladin po léčbě nastává pouze za předpokladu, že je léčba účinná, HGF je pro monitoring angiogeneze nejvhodnější aktivátor, protože je monitorovatelný i v periferní plazmě a jeho hodnota klesá u pacientů, kteří dobře reagují na léčbu. Důležitým zjištěním je vzestup trombospondinu v kostní dřeni u pacientů dobře reagujících na léčbu. To znamená, že po léčbě je angiogeneze více inhibována u pacientů s dobrou léčebnou odpovědí oproti pacientům, kteří na léčbu nereagují. V periferní krvi je hodnota trombospondinu ovlivněna aktivovaným endotelem a trombocyty a nelze ji použít pro hodnocení angiogeneze.

Podpořeno výzkumným projektem MŠMT LC 06027

115 Vakcinace pacientů s mnohočetným myelomem dendritickými buňkami loadovanými monoklonálním imunoglobulinem:preklinické a první klinické výsledky klinické studie fáze II.

Očadlíková D.[1], Zahradová L.[1,2], Kovářová L.[1], Smejkalová J.[1], Vidláková P.[1], Kyjovská D.[1], Novotná H.[3], Jelínková I.[4], Penka M.[1], Michálek J.[1], Hájek R.[1,2]
1) Laboratoř experimální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie, FN Brno - Bohunice
2) Interní hematoonkologická klinika, FN Brno, pracoviště Bohunice
3) Oddělení klinické biochemie, FN Brno, pracoviště Bohunice
4) Firma Genex CZ s.r.o., Brno

V roce 2004 proběhla v našem centru první klinická studie fáze II, kde byl pacientům s mnohočetným myelomem (MM) podáván monoklonální imunoglobulin (Id-protein) po konjugaci s imunogenním nosičem keyhole limpet hemocyanin (KLH). Vakcína byla použita ve skupině 12 nemocných se stabilním nebo mírně aktivním onemocněním. Výsledky naznačily, že imunitní systém nemocných je schopen reakce na podaný antigen, který však není natolik imunogenní, aby vyvolal klinickou odpověď. Proto byla v našich laboratořích připravena vakcína nové generace s využitím dendritických buněk (DB), které jsou považovány za nejúčinnější antigen-prezentující buňky. DB byly získány z periferní krve pacientů s MM a kultivovány po dobu 9 dnů za přítomnosti cytokinů IL-4 a GM-CSF. Pátý den kultivace byl přidán autologní Id-protein vyizolovaný z plazmy pacientů metodou afinitní chromatografie. Úplné dozrání DB bylo dokončeno přidáním TNF-alfa.

Devátý den kultivace jsou pacientům splňujícím kritéria pro zařazení do studie (po vysokodávkované chemoterapii s autologní transplantací kmenových buněk se stabilním nebo mírně aktivním onemocněním, u kterých nebyla indikovaná standardní terapie) podávány plně zralé DB aktivované Id-proteinem v množství vyšším než $1x10^6$ (průměr 9,52 x 10^6 DB). Kontrola připravené vakcíny byla prováděna z hlediska kvality (bezpečnostní testy na přítomnost endotoxinu, mykoplazmat a mikrobiologické vyšetření, flowcytometrický panel) a kvantity (dostatečný počet vitálních, zralých a funkčních buněk).

Od června 2006 do ledna 2007 bylo aplikováno celkem 24 vakcín 4 pacientům. Každý pacient obdržel 6 vakcín s odstupem 1 měsíce. Zralé DB loadované Id-proteinem splňovaly kritéria pro klinickou aplikaci: vitalita a počet buněk, morfologie a funkční charakteristika DB: více než 40% HLADR+CD80/CD86 pozitivních DB (50,10-99,30%, průměr 87,08% pro HLADR/$CD86^+$ DB), vyšší exprese CD80, CD83 a CD86 povrchových antigenů po naloadování Id-proteinem a in vitro dozrání DB z 5,18% to 94,83% (průměr) pro $CD86^+$ DB. Všechny vakcíny byly velmi dobře tolerovány bez jakýchkoliv vedlejších účinků a projevů toxicity. Klinická studie bude dále pokračovat po zařazení dalších vybraných pacientů s MM.

Tato práce byla podpořena grantem IGA NR 8945-4.

116 Sexualita a transplantace krvetvorných buněk: soudobé poznatky z vybraných zahraničních studií.

Slováček L.[1,2], Slováčková B.[3], Jebavý L.[1,2], Horáček J. M.[1,2]
1) Katedra válečného vnitřního lékařství, Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, Hradec Králové
2) II. interní klinika FN a LF UK Hradec Králové, Oddělení klinické hematologie
3) Psychiatrická klinika, Fakultní nemocnice, Hradec Králové

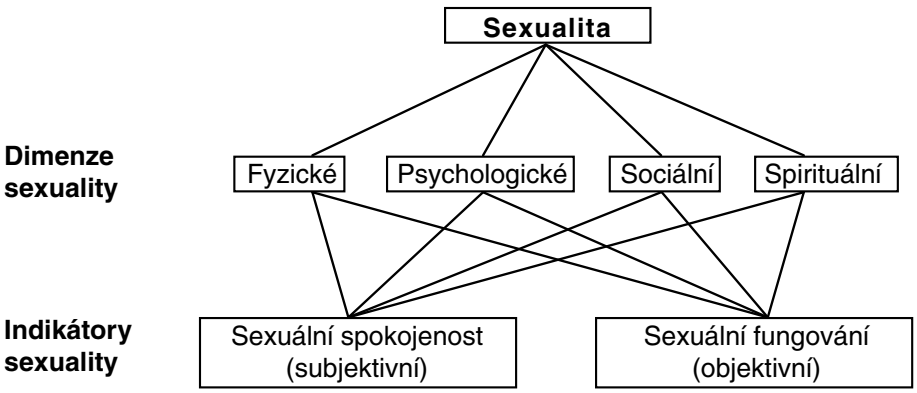
Transplantace krvetvorných buněk (TKB) je léčebná metoda používaná v terapii hematologických malignit a solidních tumorů, využívána je i v terapii nenádorových a hereditárních onemocnění. Obdobně jako jiné léčebné metody i transplantace krvetvorných buněk ovlivňuje další průběh onemocnění, a tím i kvalitu života, její jednotlivé dimenze. Jedním z velmi sledovaných aspektů kvality života nemocných po transplantaci krvetvorných buněk je sexualita.

Obdobně jako mnohé jiné léčebné metody i TKB ovlivňuje další průběh onemocnění, a tím i také kvalitu života nemocného. V průběhu 90. let 20. století bylo prováděno v zahraničí mnoho studií hodnotících kvalitu života nemocných po TKB, v neposlední řadě byl sledován vliv TKB na jednotlivé dimenze kvality života. Jedním z velmi sledovaných aspektů kvality života byla a je sexualita nemocných po TKB (viz. obrázek 1).

Sexuální zdraví (Sexual Health) je definováno Světovou zdravotnickou organizací jako výsledek integrace somatických, emocionálních, intelektuálních a sociálních aspektů sexuální existence obohacující a povyšující osobnost, komunikaci a lásku člověka. **Sexuální dysfunkce** jsou chápány jako kvantitativní poruchy sexuální výkonnosti. Behavioralistické pojetí sexuálních dysfunkcí vychází z koncepce čtyř základních komponent sexuálního chování člověka: 1. sexuální apetence, 2. sexuální vzrušení, 3. orgasmus, 4. sexuální uspokojení (satisfakce). Etiologie sexuálních dysfunkcí je velmi rozmanitá. Uplatňují se faktory konstituční, biologické, psychologické a sociální.

I. Fyzické, psychologické a sociální aspekty ovlivňující sexuální stav mužů po TKB

Fyziologické a biologické změny u mužů léčených TKB jsou dány funkcí gonád a hypothalamo-hypofyzární-gonadální osou. Fyziologické změny zahrnují zejména neurovaskulární poruchy, erektilní dysfunkci, ejaculatio praecox a infertilitu. Tyto změny mohou negativně ovlivnit jednu nebo více fází lidské sexuální motivace a mohou tak nepříznivě ovlivnit sexuální fungování a spokojenost. V průběhu předtransplantačního přípravného režimu (obvykle vysokodávkovaná chemoterapie s/bez celotělové zevní radioterapie) dochází k ztrátě či redukci sekrece mužského pohlavního hormonu, testosteronu, a to v důsledku absence negativní zpětné vazby k hypothalamu a hypofýze. Porucha gonád a porucha endokrinních funkcí (porucha na úrovní hypothalamo-hypofyzární-gonadální osy) u mužů po TKB vede k jejich následné infertilitě a potencionálním změnám v jejich sexuálním fungování. Snížená odpověď na gonadoliberiny (GnRH) může u některých mužů po TKB poukazovat na potencionální poruchu na hypothalamo-hypofyzární úrovni. Zvýšená hladina prolaktinu může u některých mužů po TKB signalizovat poruchu na úrovni hypothalamu. Hyperprolaktinémie je jednou z příčin infertility, erektilní dysfunkce a sníženého libida u mužů po TKB. Stupeň poruchy gonád a endokrinních funkcí je závislý zejména na věku, přidružených onemocněních, celkové dávce zevního ozáření, typu cytostatického přípravného předtransplantačního režimu a v neposlední řadě na typu TKB (autologní, alogenní). V transplantologii krvetvorných buněk jsou často užívanými alkylační cytostatika, jejichž zásadním nežádoucím účinkem je právě infertilita. Vlivem zevní radioterapie a chemoterapie dochází k poškození zárodečných pohlavních buněk a semenotvorných kanálků. Výsledkem tohoto poškození je azoospermie, testikulární atrofie a infertilita. Jednou z dalších příčin negativního ovlivnění sexuality u mužů po alogenní TKB je chronická reakce štěpu proti hostiteli (cGVHD).



Obrázek 1. Dimenze sexuality s objektivními a subjektivními indikátory.

Mezi **psychologické aspekty**, které mohou negativně ovlivnit lidskou sexuální motivaci u mužů po TKB patří především změny tělesného stavu, změny ve vnímání sebe samého, deprese, anxieta, snížená sebedůvěra, somatizace, obavy z návratu nemoci, zlost, zoufalství a infertilita. Zásadním psychologickým aspektem je však infertilita, jenž může být příčinou narušení již existujících lidských vztahů a to nejen v rámci rodiny, ale i v okruhu přátel a pracovním prostředí. Psychologické aspekty typu deprese a anxiety mohou významně ovlivnit jednu nebo více fází lidské sexuální motivace. Vyšší výskyt sexuálních problémů byl zaznamenán u mužů s rigidním pohledem na sexualitu, s omezeným rozsahem sexuálního chování a rovněž u mužů s pesimistickým postojem vůči jejich budoucnosti.

Nejdůležitějším **sociálním aspektem** ovlivňující mužskou sexualitu je důvěrný partner. Mezi faktory ovlivňující tento sociální aspekt patří zejména partnerova nejistota, labilita, anxieta, nespolehlivost a obtížná komunikace během léčby – během TKB. Sociální podpora nemocného v průběhu TKB a po TKB je vůbec nejdůležitějším faktorem v psychosociální adaptaci nemocných po TKB.

II. Fyzické, psychologické a sociální aspekty ovlivňující sexuální stav u žen po TKB

Fyziologické a biologické změny u žen po TKB jsou dány funkcí gonád a hypothalamo-hypofyzární-gonadální osou a estrogen-dependentními tkáněmi. Fyziologické změny zahrnují zejména poruchy menstruačního cyklu, sekundární vaginální změny související se zevní radioterapií a systémovou chemoterapií a vaginální formu cGVHD. Tyto změny mohou ovlivnit jednu nebo více fází lidské sexuální motivace a mohou tak nepříznivě ovlivnit sexuální fungování, sexuální spokojenost a potažmo i kvalitu života. V průběhu předtransplantačního přípravného režimu (obvykle vysokodávkovaná chemoterapie s/bez celotělové zevní radioterapie) může dojít k postižení ovarií a jejich funkce, čímž dochází k ztrátě či redukci sekrece ženských pohlavních hormonů, estrogenů a gestagenů. Důvodem je absence negativní zpětné vazby k hypothalamu a hypofýze. Výsledkem těchto změn jsou zvýšené hodnoty FSH (folikuly stimulujícího hormonu) a LH (luteinizačního hormonu) s projevy infertility a předčasné menopauzy. Zásadní negativní vliv na funkci ovarií mají alkylační cytostatika a zevní radioterapie vyznačující se cytotoxickými

účinky. Senzitivita ovarií na účinek zevní radioterapie a systémové chemoterapie je závislá na jejich dávce, typu systémové chemoterapie a v neposlední řadě na věku žen. Ženy starší 25 let jsou více náchylné k poškození funkce ovarií. K poškození funkce ovarií u všech žen vede vysoká dávka celotělového ozáření. Alkylační cytostatika, jako například cyklofosfamid, nitrosurea či melfalan, jsou toxická vůči ovariální tkáni, obzvláště pak jsou-li některé z nich použity jako vysokodávkované. Důsledkem poškození funkce ovárií je snížená hladina estradiolu a zvýšené hladiny FSH a LH s projevy již zmíněné infertility či předčasné menopauzy. U fyziologické menopauzy se její symptomy, vznikající v důsledku fyziologického deficitu estrogenů, vyvíjí postupně přes perimenopauzální a postmenopauzální období. Předčasná menopauza se vyznačuje symptomy z deficitu estrogenů mezi něž patří zjm. zarudnutí v obličeji, návaly horka v obličeji (do hlavy), noční pocení, insomnie, změny nálady, předrážděnost, depresivní stavy, vaginální suchost, vaginální atrofie a fibróza, pruritus, urogenitální symptomy (dysurie, strangurie, apod.), změny v kognitivních funkcích a změny vzhledu. Jednou z dalších příčin vedoucích ke snížení sexuální aktivity jsou urogenitální změny asociující s menopauzou zahrnující atrofii uretry a močového měchýře s přidruženými symptomy charakteru dysurie, strangurie, močové inkontinence a cystitidy. V neposlední řadě výše uvedené urogenitální změny doplňuje cGVHD postihující močový měchýř s projevy cystitidy.

Mezi **psychologické aspekty**, které mohou negativně ovlivnit lidskou sexuální motivaci u žen po TKB patří především změny tělesného stavu (problematika somatické identity), změny ve vnímání sebe samého, deprese, anxieta, snížená sebedůvěra, somatizace, stigmatizace, obavy z návratu nemoci, zlost, zoufalství a infertilita. Zásadním psychologickým aspektem je však infertilita, jenž může být příčinou narušení již existujících lidských vztahů a to nejen v rámci rodiny, ale i v okruhu přátel a pracovním prostředí. Infertilita u žen po TKB může negativně ovlivnit jejich smysl ženskosti a sebepovažování se. Zásadními psychologickými aspekty ovlivňujícími sexuální stav u žen po TKB jsou věk, rodinný stav a počet narozených dětí. Je nezbytně nutné více se zaměřit stran léčebné intervence právě na mladé, svobodné a bezdětné ženy.

Nejdůležitějším **sociálním aspektem** ovlivňující ženskou sexualitu je důvěrný partner. Mezi faktory ovlivňující tento sociální aspekt patří zjm. partnerova nejistota, labilita, anxieta, nespolehlivost a obtížná komunikace během léčby – během TKB. Sociální podpora nemocného v průběhu TKB a po TKB je vůbec nejdůležitějším faktorem v psychosociální adaptaci nemocných po TKB.

Jedním z velmi sledovaných aspektů kvality života nemocných po TKB je sexualita. Sexualita a její exprese jsou důležitým aspektem lidského bytí. Tento citlivý, ale velmi podstatný aspekt lidského života je bezpochyby ovlivněn diagnózou neoplázie a její léčbou. Fyzické a psychosociální aspekty TKB ovlivňující sexualitu a sexuální fungování nemocného, potažmo i jeho kvalitu života, jsou zásadními oblastmi zájmu komplexní péče o nemocného po TKB.

Literatura

1. World Health Organization. Education and Treatment in Human Sexuality. Technical Report. Geneva: World Health Organization, 1975.
2. Zbytovský, J., Balon, R., Praško, J., Seifertová, D.: Sexuální dysfunkce. In: Seifertová, D., Praško, J., Hoschl, C.: Postupy v léčbě psychických poruch, 1 vyd. Praha: Academia Medica Pragensis: 2004: 320-333.
3. Slovacek, L., Slovackova, B., Jebavy, L.: Global Quality of Life in Patients Who Have Undergone the Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Finding from Transversal and Retrospective Study. Exp Oncol 2005, 27 (3): 238-242.
4. Mumma, G.H. et al.: Long-term psychosexual adjustment of acute leukemia survivors: impact of marrow transplantation versus conventional chemotherapy. General Hosp Psychiatry 1992, 14: 43-55.
5. Dobkin, P.L. et al.: Assessement of sexual dysfunction in oncology patients: review, critique, and suggestions. J Psychosocial Oncol 1991, 9: 43-74.

XIII.
Radiologická a klinická diagnostika nádorů prsu

117 Screening nádorů prsů v České republice. Role zdravotních sester ve výchově veřejnosti k prevenci.

Skovajsová M., Svobodník A.
Mamma centrum, DTC Praha, Centrum biostatistiky a analýz MU Brno

Podle dat Národního onkologického registru (NOR) a Ústavu zdravotnických informací a statistiky (ÚZIS) se poprvé v moderní historii českého zdravotnictví zastavila a dokonce se začíná snižovat úmrtnost na rakovinu prsu.

Kde jsou kořeny tohoto úspěchu? Pokroky v léčbě jistě pomáhají snižovat průběh křivky úmrtnosti, klíčem k nižší úmrtnosti žen nemocných rakovinou prsu je však včasná diagnostika: nalezení nádoru v nejmenší zobrazitelné velikosti, především v nehmatných stadiích. U převážné většiny nádorů platí, že malý nádor znamená dobře léčitelný nádor.

Snižování úmrtnosti na nádory prsu znamená u co nejvyššího počtu nemocných žen objevit nemoc včas, ideálně tehdy, když žena nepociťuje žádné známky onemocnění: nehmatá v prsu ani v podpaždí nic podezřelého, nemá příznak vtahování kůže ani jejího zarudnutí, nemá žádné změny bradavky, tedy ani krvavý výtok.

Příkladem programu pro včasný záchyt nádorů prsu pro všechny jsou země severní Evropy, především Švédsko, kde byl zaveden screening nádorů prsu již před dvaceti lety. Ve zprávě z ledna 2006 deklarují švédští odborníci ve dvacetileté studii 40% snížení úmrtnosti na nádor prsu. Po několikaletém hledání podoby českého screeningu a po proběhlých pilotních programech, byl screening v České republice v září 2002 celoplošně spuštěn.

Český program je k ženám vstřícný. Poskytuje pravidelné bezplatné vyšetření ve dvouletých intervalech ve věku 45-69 let, což je jeden z nejdelších intervalů v Evropě. České ženy se výsledek dozvědí ihned po provedeném vyšetření nebo ve velmi krátké době, která by neměla překročit 3dny. Mamografické i ultrazvukové vyšetření v jeden den, někdy dokonce doplněné o diagnostickou core biopsii je v Evropě ojedinělý způsob preventivní péče, který je v této podobě nebo jen s mírnými odchylkami prováděn v akreditovaných screeningových centrech po celé republice.

V českém screeningu se důraz klade na kvalitu, a tím opět přeneseně na ženy samotné. Vyšetřování bezpříznakových žen se provádí pouze v centrech, která mají akreditaci, to znamená, že splnila celou řadu velmi přísných podmínek. Centra se ve dvouletých intervalech opakovaně akreditují a prokazují svoji odbornou způsobilost, přístrojovou vybavenost, ale také schopnost postarat se o ženu, které byl nalezen zhoubný nádor.

Program českého screeningu provází unikátní sběr dat. Každé z 59 center je povinno sbírat a odevzdávat data, která jsou v anonymizované podobě předávána do brněnského Centra biostatistiky a analýz Masarykovy university, kde jsou zpracovávána. Tak existují celorepubliková screeningová data z let 2003, 2004 a 2005 a brzy budou známy v hrubé podobě výsledky z roku 2006.

Přínosy českého screningového programu

Od začátku devadesátých let začal narůstat každoroční počet nemocných žen s rakovinou prsu, od roku 2002 je nárůst nutno považovat za strmý. V letech 1994-2002 se počty nově zachycených stadií postupně zvedaly přibližně od 4200 nových případů do 4600 nově nemocných. V roce 2003 to podle poslední statistiky ÚZIS bylo již 5784 nově nemocných.

Přínosem screeningu je významné zvýšení počtů nemocných žen, které jsou diagnostikovány v časném klinickém stadiu T1. Screeningovou mamografií byly objeveny u zdravých žen nádory, které byly klinicky němé. Nárůst křivky nových onemocnění v době zavedení screeningu tedy vypovídá o vychytávání malých nádorů u bezpříznakových žen, o šanci, kterou tyto ženy tímto včasným objevením dostanou, ale i o pravděpodobnosti postupného snižování úmrtnosti na karcinom prsu.

Povinný sběr a odevzdávání dat ze všech screeningových center nám dává přesné informace, kolik malých nádorů bylo objeveno. Sledují se samozřejmě všechna klinická stadia. Ve screeningovém programu, kam mají přicházet jen ženy bez příznaků se zpočátku diagnostikují i metastazující a lokálně pokročilá stadia. V počátcích program využijí i ženy, které vědí o svém onemocnění a náhle se ho rozhodnou řešit. Lékařům odesílajícím na screening také nějakou dobu trvá, než plně respektují pravidla. V prvních několika letech probíhá „čištění“ screeningu, stadia T3 a T4 se pomalu snižují a zůstávají stadia T1, která by měla dominovat a stadia T2, která by měla výrazně poklesat.

Co zásadního přinesl český screeningový program od svého spuštění v roce 2002?

Data Národního onkologického registru (NOR) ukazují, že do roku 1990 bývalo u všech nově nemocných (asi 4000 žen) jen v 10-15% stanoveno stadium T1. Převažovala stadia T2 a T3. Díky postupnému zlepšování diagnostiky a přibývání mamografů v České republice bylo v letech 1994-1997 nacházeno již 20-25% stadií T1. V pilotních programech, které proběhly v 2001-2002 bylo u 6000 vyšetřených žen zachyceno dokonce 60% malignomů ve stadiu T1. Výsledky z prvního roku screeningu 2003: ve stadiu T1 bylo zachyceno 71% nádorů, k tomu je však nutno přičíst 6% malignomů zachycených ve stadiu Tis (T0). Celkem tedy bylo v prvním kole českého screeningu zachyceno 77% včasných stadií. V roce 2004 bylo zachyceno celkem 75% včasných stadií (7% Tis, 68%T1) a v roce 2005 dalších 78% včasných stadií (8%Tis, 70%T1).

Dobré výsledky screeningu začaly ovlivňovat epidemiologické křivky. V grafech NOR (screeningové i diagnostické záchyty) je zřejmý jednoznačný pokles stadií T3, zastavení nárůstu a dokonce pokles stadií T2 ale hlavně vzestup stadií T1. Křivka klinického stadia T1 se blíží ke stadiu T2, podle současného trendu dojde k překřížení, což znamená, že by konečně v české screeningové i nescreeningové skupině žen dohromady mohlo být nejvíce nemocných zachyceno v časném stadiu T1. Tyto grafy jsou

jednoznačným dokladem dobrého fungování screeningových center a argumentem pro přísná pravidla, podle nichž centra fungují.

Pro udržení dobré kvality bude i nadále screening prováděn v akreditovaných centrech. Musí být v rukou radiologů, kteří jsou specializováni na hodnocení mamografií. Tito specialisté mají vysokou erudici jsou denně vystavováni velkému počtu vyšetření, aby si tuto erudici udrželi. U 1000 vyšetřených žen je obvykle nalezeno asi 4-7 nádorů. Pakliže pracoviště vyšetří jen 2000 žen ročně, má hodnotící radiolog „šanci“ uvidět pouze 8-14 nádorů za rok, což je nedostatečné, neboť pak není schopen odhalit jemné přímé či nepřímé známky minimálních nádorů, neboť na hledání těchto jemných změn není vycvičen praxí.

Rezervy českého screeningového programu

V České republice žije okolo 1 600 000 žen ve věku od 45let do 69let. Všechny ženy v tomto „screeningovém“ věku by měly jednou za dva roky navštívit screeningové centrum. Znamená to, že každoročně by se mělo v centrech objevit asi 800 000 žen.

Nepříznivou známkou vzdělanosti laické veřejnosti je, že screeningu zatím využívá málo českých žen. V roce 2003 přišlo na mamografické vyšetření 210 000 žen, v roce 2004 to bylo 260 000 žen a v roce 2005 téměř 313 000 žen. Přepočteno na dvouleté intervaly, návštěvnost screeningového programu se pomalu zvyšuje od 30% k 40%, jak tomu bylo v cyklu dvou let 2004 – 2005. Významné snížení mortality, jak se to podařilo ve Švédsku, se váže na 80% návštěvnost.

V České republice byla a je situace na startu screeningového programu složitější, již nejméně od roku 1994 zde existuje neorganizovaný screening (šedý, oportunní), který sice přinesl celkově zlepšení diagnostiky, ale nedokázal snížit mortalitu na nádory prsu. Současný český screeningový program trpí odlivem žen do nekontrolovaných mamografických pracovišť, kam jsou ženy odesílány specialisty ze zvyku a bez znalosti problému. Mnozí specialisté v mamárních poradnách neznají kriteria kvality screeningové mamografie. Neposkytují kvalitní servis klientkám, které se na ně léta obracejí. Chirurgové a onkologové mohou nyní nově používat kód screeningové mamografie a odesílat ženy do akreditovaných center, jejichž celorepubliková mapa a adresy jsou na www.mamo.cz.

Na neakreditovaných pracovištích bylo každoročně v posledních letech vyšetřeno okolo 20% žen, v akreditovaných výše zmíněných téměř 40% žen. Ostatních asi 40% žen ve věku 45-69let mamografii zatím nepodstoupilo. Tak hovoří data Všeobecné zdravotní pojišťovny, která můžeme brát za reprezentativní pro celou republiku… Shrneme-li, co je největší rezerva sekundární prevence – screeningu nádorů prsu v Čechách a na Moravě, je to zatím neuspokojivá účast žen.

Vzdělané zdravotní sestry jsou nezastupitelné ve schopnosti oslovit laickou veřejnost

Je věcí všech odborníků ale i laické veřejnosti kultivovat screeningový program pro vyhledávání časných stadií nádorů prsu. Přesto, že se informovanost žen zlepšuje, stále není ideální. O tom vypovídá údaj o minimálně 40% žen, které nikdy mamografii nenavštívily.

Informace „zhora“, tedy různé osvětové kampaně narazily na strop svých možností.

Nezbývá, než začít posilovat informovanost „zdola“, na kterou české ženy dobře slyší. Prvotní informace musí být přesvědčivá a pravdivá. Tímto prvotním informátorem, replikátorem přesvědčivé a pravdivé informace mohou být vedle učitelů jedině zdravotní sestry. Zdravotní sestry požívají mezi laickou veřejností vysokého kreditu. Je to navzdory nízkému finančnímu ocenění jejich práce. Zná-li zdravotní sestra všechna „pro“ a umí-li vyvrátit neopodstatněná „proti“, stává se nejlepším prvotním replikátorem, informátorem či učitelem, jakého si může český screeningový program dopřát.

Shrnutí nejdůležitějších „pro“ screeningového programu

- Mamografický screening je jedinou ověřenou cestou ke snižování úmrtnosti žen na nádory prsu
- Mamografické vyšetření někdy společně s ultrazvukovým (ultrasonografie, sonografie) je zatím jediná metoda, která dokáže ve vysokém počtu procent nalézt minimální stadium zhoubného nádoru
- Na mamografické preventivní vyšetření má nárok každá žena ve věku 45-69let jednou za dva roky a bezplatně, s doporučením od gynekologa, praktika, nově i od chirurga a onkologa
- Mamografický screening se provádí pouze v akreditovaných, kontrolovaných a auditovaných centrech (www.mamo.cz), jejichž povinností je každoročně odevzdávat data k centrálnímu vyhodnocení
- Klinicky malá stadia nalezená ideálně ještě nehmatná pomocí mamografie jsou dobře léčitelná, po ukončení léčby se žena vrací do plně kvalitního života

Vyvratitelná „proti“ screeningovému programu

- Není pravda, že mamografické vyšetření samo o sobě je schopno vyvolat v prsu zhoubné bujení
- Není pravda, že mamografie extrémně bolí. Mamografické vyšetření je trochu nepříjemné, na jeho průběhu je však možno se domluvit s radiologickou asistentkou o síle tlaku, který je zdrojem nepříjemností. Ke komfortu vyšetření přispívá i dobře zvolený termín po menstruaci, kdy jsou prsy méně bolestivé.
- Není pravda, že na zhoubné onemocnění prsu se vždy umírá. Dokladem jsou desítky tisíc žen po celém světe, které se ze svého onemocnění nalezeného v časném stadiu uzdravily a žijí zcela normálním životem.

118 Mamografický screening v ČR.

Fráňová J., Högerová M.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Úvod

V ČR onemocní karcinomem prsu každoročně více než 4600 žen a přes 2000 z nich na následky tohoto onemocnění umírá. Ve věkové kategorii 20-54 let je karcinom prsu nejčastější příčinou úmrtí u nás a incidence onemocnění stále stoupá.

Protože pravá příčina onkologických onemocnění nebyla dosud zcela objasněna, nejúčinnější metodou, jak snížit počty nemocných, jsou pravidelná preventivní vyšetření – neboli screening. Tyto preventivní programy mají za úkol zachytit přednádorové stavy a u již probíhajícího onkologického onemocnění pak diagnostikovat jeho rané stádium, pro něž je charakteristická velmi dobrá odpověď na léčbu, nízké procento recidiv a vysoká pravděpodobnost úplného vyléčení.

Včasný záchyt malignity v prsu vede v operativě k redukci ablačních výkonů, při kterých je nutné odstranit prs celý a naopak, vzrůstá podíl zákroků parciálních, u nichž je z tkáně prsu odstraněna pouze maligní léze s ochranným lemem a prs zůstává zachován. To je moment významný zejména pro psychickou pohodu nemocné ženy, která pak pooperační stav i následnou terapii absolvuje ve výrazně lépší kondici.

Totéž platí o lymfatických uzlinách, které lze odstraňovat cíleně a lymfatická drenáž a tím i plná funkčnost horní končetiny zůstává zachována.

V terapii včasná diagnostika malignit umožní snížit počty aplikací a také intenzitu cytotoxické léčby a u některých typů onemocnění může být chemoterapie nahrazena dlouhodobě podávanou hormonální léčbou.

Organizace screeningu v ČR

Od září roku 2002 se naše republika připojila k dalším patnácti evropským zemím a zahájila celoplošný mamografický screening s cílem zvýšit podíl včasného záchytu a snížit celkovou mortalitu na onkologické onemocnění prsu.

Podmínky pro zahájení preventivního programu u nás a intervaly mezi jednotlivými mamografickými kontrolami upravuje nově vyhláška MZ č. 372/2002 Sb. ze dne 31.července 2002, která mění původní znění vyhlášky č. 56/1997 Sb.

Preventivní vyšetření prsu se tedy provádí u asymptomatických žen, ve věku mezi 45 – 69 lety, jedenkrát za dva roky. Za těchto podmínek se vyšetření hradí ze všeobecného zdravotního pojištění. Je-li interval kratší, nebo jestliže případná zájemkyně nesplňuje věkový limit pro screeningovou mamografii, stává se žena samoplátcem.

V současné době je v naší republice asi 55 pracovišť, která mohou provádět preventivní vyšetření prsu. Každé nové zařízení, které žádá o zařazení do screeningového programu, musí splňovat určité podmínky. Ty stanovuje a kontroluje Komise pro mamární screening nádoru prsu MZ a Komise odborníků pro mamární diagnostiku (KOMD). K podmínkám patří: kvalitní přístrojové vybavení, které zajistí při minimálním ozáření pacientky maximální diagnostickou výtěžnost, splnění požadavků radiační ochrany (na pracovišti musí být pravidelně prováděny zkoušky provozní stálosti), dostatečná kvalifikace personálu podílejícího se na provedení a vyhodnocení mamografie (atestovaný lékař i laborantky jsou důkladně obeznámeni s mamární problematikou, pro lékaře je stanoven minimální počet 2000 vyhodnocených MG snímků za rok v posledních třech po sobě následujících letech), musí být návaznost další péče o pacientku a to jak diagnostické – po MG a UZ následuje biopsie klasická, stereotaktická či mamotomie, tak i možnost následné chirurgické a onkologické péče. Zdravotnické zařízení, které tyto možnosti nemá, je musí mít dohodnuté a nasmlouvané v jiném ústavu. Objednací doba na vyšetření by neměla přesáhnout 1 měsíc a celý diagnostický proces od příchodu klientky na vyšetření až po obdržení negativního nálezu by neměl trvat déle než 3 dny, při nutnosti následných vyšetření např. biopsii by nález měl být k dispozici nejdéle do patnácti dnů. V našem ústavu se negativní výsledek dozví klientka ihned po vyšetření, po provedené biopsii je výsledek za týden.

Důležitou podmínkou kvalitního preventivního programu je vedení datového auditu, neboli shromáždění dat v digitální podobě pomocí výkonného SW (u nás MASC) s dostatečnou ochranou osobních údajů. Např. na rodné číslo ve zdravotní dokumentaci se použije šifrovací algoritmus, který celý řetězec pozmění tak, že zpětně nelzepůvodní podobu RČ sestavit.

Screening v MOÚ

V našem ústavu provádíme MG na dvou pracovištích. Klasickém – vybaveném analogovým přístrojem, který pracuje se speciální kazetou s vysunovací fólií. Ke zviditelnění zachyceného obrazu je třeba „vyvolání kazety“ zasunutím do laserové čtečky. Druhým typem mamografu je digitální zařízení, které místo kazety s fólií užívá velkoplošný polovodičový detektor. Ten snímá záření prošlé vyšetřovaným objemem, převádí je na elektrické impulzy, ty jsou dále počítačové zpracovány a upraveny a vzniká obraz, který je uložen v paměti přístroje a po té zobrazen na speciálním monitoru s vysokým rozlišením a s možností další digitální úpravy (např. inverze z negativu do pozitivu, zvetšení apod.). Výhodou je, že provedený snímek vidí laborant téměř ihned po expozici a po konzultaci s lékařem může provést doplňující expozice na tu část prsu, která se na monitoru zobrazí buď jako nepřehledná (vzniklá sumací více objektů do jednoho místa), či obsahuje-li z patologie podezřelé okrsky ve tkáni (např. mikrokalcifikace, což jsou výpadky vápníku velikosti špendlíkové hlavičky). Další, nezanedbatelnou výhodou je časová úspora při snímkování peroperačních extirpátů, které radiolog okamžitě vyhodnotí, bez prodlevy nutné pro vyvolání konvenčních snímků. Relativní nevýhodou jsou vyšší pořizovací náklady a nutnost speciálních prohlížecích stanic pro lékaře.

Při příchodu na preventivní vyšetření prsu dostává klientka Dotazník, který mapuje výskyt malignit v rodině a především pak rakoviny prsu v přímé krevní linii. Smyslem je zjištění tvz. pozitivní rodinné anamnézy, s níž je žena odeslána do genetické ambulance a zařazena do skupiny rizikových pacientek, které jsou sledovány častěji a komplexněji, než udává screeningový protokol.

Shrnutí

Z vyhodnocení nashromážděných dat plyne, že MG screeningu se od r. 2002 účastní stále více a více žen. Dostatečný je zájem ve věkové kategorii 45-54 let, dobrá je i účast žen do 60-ti let. Po té zájem o preventivní vyšetření klesá a zcela zanedbatelný je po 69. roce věku.

Záchyt malignity se na průměrném pracovišti v republice pohybuje kolem 40-ti karcinomů na 10 000 vyšetřených, což se může jevit jako nevýznamné, je nutno si však uvědomit, že se jedná o 40 žen asymptomatických, které se dostavily pouze na preventivní vyšetření.

Velmi dobrý je záchyt raných stadií, která tvoří téměř 70% objevených malignit (stadium pT0 + pTis).

Pokročilá stadia byla v rámci screeningu diagnostikována pouze do objemu 2% (pT3 – pTx). S rostoucí kvalitou vyšetření (pracoviště procházejí tvz. akreditací a reakreditacemi a dokládají kvalitu personální i technickou), narůstá také respekt jednotlivých MG screeningových pracovišť u klientek i indikujících lékařů. Náš ústav má velmi dobrý zvuk a v síti screeningových pracovišť patří k nejnavštěvovanějším. Díky vedení datového auditu jsou výsledky za minulý rok k dispozici již letos (na rozdíl od 3-4letého zpoždění informací z NOR).

Informace pro ženy, lékaře a zdravotnické pracovníky o MG screeningu v ČR jsou na *www.mamo.cz*

119 Audit mamografického screeningu.

Pokorná Š.
Mamma centrum DTC Praha a.s.

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným onemocněním žen v České republice, jeho incidence v posledních letech mírně stoupá. Ročně onemocní přes 4500 žen a asi 1800 jich zemře. Tato choroba je celospolečenským problémem, kterým se zabýval tým odborníků při Ministerstvu zdravotnictví. Výsledkem jejich práce je celostátní program screeningu karcinomu prsu mající za cíl snížení úmrtnosti na karcinom prsu diagnostikováním minimálních či preinvazivních stadií.

V červenci 2002 vešla v platnost vyhláška č. 372/2002 Sb., která stanovuje rozsah a časové rozmezí preventivních prohlídek. Každá žena ve věku 45 až 69 let, bez příznaků nádoru prsu, má jedenkrát za 2 roky nárok na screeningovou mamografii hrazenou ze zdravotního pojištění. Na toto vyšetření jí musí odeslat lékař – gynekolog nebo praktik, do centra akreditovaného k provádění mamografického screeningu.

Kvalitní zdravotnické služby jsou charakterizovány následujícími vlastnostmi: účinnost, dostupnost a včasnost, bezpečnost, soustavnost a návaznost, přijatelnost pro pacienty, ekonomická efektivnost vznikající dodržováním jednoty medicínské a ekonomické racionality. Podmínky fungování screeningového programu karcinomu prsu České republiky tyto vlastnosti zohledňují a obsahují. V programu jsou zavedeny mechanismy sledování a hodnocení kvality poskytované péče, cestou akreditací, reakreditací a datového auditu.

Pilotní projekt VZP

Na podzim roku 2001 a jaře roku 2002 proběhly 2 pilotní studie VZP, ve které bylo vyšetřeno 6 180 bezpříznakových žen, studie se zúčastnily 3 různá pracoviště. Cílem bylo zodpovědět několik diskutabilních bodů spojených s připravovaných screeningovým programem.

Získané výsledky odpovídají výsledkům studií prováděných v jiných zemích. Bylo zachyceno 38 karcinomů, z toho 60% ve stadiu T1 (do 20 mm), většina T1 nálezů byla nehmatných. V minulých letech udával Národní onkologický registr poměr stadií T1 25%. Ve světe statistiky opakovaně prokazují souvislost snížení úmrtnosti na karcinom prsu se zachycenými minimálními stadii. Mimo prokazatelného benefitu pro ženy přináší včasná diagnostika karcinomu prsu i úsporu finanční, nárůst ceny léčby mezi stadiem T1 a T2 je 100%.

Vyšetřením žen, které se nechaly oslovit nabídkou preventivní mamografie, se potvrdilo, že tak jak je program nastaven, s důrazem na vstřícnost vůči klientce, na vysokou kvalitu péče, dlouhodobé sledování na jednom pracovišti, na kontrole kvality programu cestou datového auditu, ale hlavně na včasnou diagnózu karcinomu prsu, je sice náročný pro všechny účastníky, ale proveditelný a na světové úrovni.

Akreditace a reakreditace

Pravidla pro vstup a účast radiodiagnostických pracovišť ve screeningového programu jsou stanovena v konsensu členů Komise pro screening nádorů prsu MZ ČR a Komise odborníků pro mammární diagnostiku Radiologické společnosti ČLS JEP (KOMD) a Sdružení nestátních ambulantních radiologů.

Získání Osvědčení o způsobilosti k provádění programu mamografického screeningu pro radiodiagnostická oddělení bylo několikastupňové. Je stanoveno několik podmínek, které jsou nepodkročitelné. Žádosti o akreditaci vyhodnotí Komise pro screening nádoru prsu při Ministerstvu zdravotnictví a doporučí pracoviště ministru zdravotnictví k udělení Osvědčení, jeho získání je signálem pro pojišťovny k uzavření smlouvy na kód screeningové mamografie.

Reakreditace probíhají ve dvouletých intervalech, kontroly probíhají přímo na pracovišti třemi skupinami odborníků.

První kontrola je kontrola zástupci pojišťoven a týká se dodržování podmínek o objednávání pacientek, délce diagnostického procesu, návaznosti další péče a dodržování zásad vykazování kódu screeningové mamografie. Dalším bodem kontroly je další vzdělávání všech stupňů pracovníků.

Druhou kontrolu provádí zástupci KOMD, kontroluje se kvalita diagnostického procesu, například správné provádění mamografických projekcí.

Třetí kontrola je zajištěna Státní úřadem pro jadernou bezpečnost a týká se dodržování podmínek stanovených „Atomovým zákonem“.

Datový audit

Vedení datového auditu je podmínkou účasti radiodiagnostického pracoviště ve screeningovém programu. V Brně byl ve spolupráci Centra pro biostatiku a analýzu a Masarykova onkologického ústavu vytvořen speciální program MaSc pro shromažďování dat. Program je prostředkem přímé zpětné vazby umožňující objektivní hodnocení efektivity programu, proto mají pracoviště za povinnost odevzdávat data v určené podobě minimálně jednou ročně. Jednotný program umožňuje získání srovnatelných dat a jejich centrální vyhodnocení.

Shromažďovaná data se týkají vstupů do programu, diagnostických procesů i výstupů z programu. Zkráceně návštěvnost programu, kvalita mammodiagnostiky na jednotlivých pracovištích a diagnostikované karcinomy. Z těchto údajů jsou vypočítávány ukazatele efektivity programu jako podklady pro hodnocení programu na celostátní i místní úrovni.

Datový audit je základním prostředkem fungování screeningového programu, protože monitorace činnosti a zpětná vazba jsou nezbytné pro další fungování programu a ke zvyšování kvality zdravotní péče.

Závěr

Akreditace radiodiagnostického oddělení pro provádění mamografického screeningu je signálem, že pracoviště je kvalitní, s erudovaným personálem i kvalitními rentgenovými přístroji. Skovajsová uvádí: „Jednodenní diagnostika v případě negativních nálezů je na specializovaném pracovišti snadno proveditelná u všech klientek, úplná diagnostika s předoperační biopsií se rovněž může bez dalších obtíží stát standardem tak, jak jej vyžaduje EUSOMA /European Society of Mastology/.

Program dbá na vysokou kvalitu poskytované péče i na vysoký komfort žen, které se vyšetření rozhodnou absolvovat. Účast ve screeningovém programu je dobrovolná. Úkolem zdravotníků je informovat ženy a motivovat je k účasti na tomto programu.

I20 Diagnostika včasných stádií karcinomu mléčné žlázy ve FN Brno z období září 2002 – prosinec 2006.

Dvořák K.[1], Marečková R.[1], Kuzárová M.[1], Pačovský Z.[2], Jandáková R.[3], Neumanová R.[1]
1) Radiologická klinika FN Brno Bohunice, mammodiagnostické pracoviště Obilní trh
2) Chirurgické oddělení GPK FN Brno Bohunice, Obilní trh
3) Oddělení patologie FN Brno Bohunice, Obilní trh
4) Oddělení radiační onkologie FN Brno Bohunice, Obilní trh

Předkládáme soubor 39 550 žen vyšetřených mammograficky z období září 2002 – prosinec 2006. V souboru bylo prokázáno 514 karcinomů mléčné žlázy, z tohoto počtu bylo 72 karcinomů in situ (14%). Počty prokázaných včasných stádií karcinomu mléčné žlázy v roce 2002 představovaly 26,1%, v roce 2003 36,9%, v roce 2004 43,7%, v roce 2005 46,1% a v roce 2006 48,1%.

I. Základní charakteristika souboru

1. Počty jednotlivých vyšetřovacích modalit, punkcí (core biopsií)jsou uvedeny v Tab. 1.

2. Věková analýza souboru

Ve skupině žen ve věkové kategorii do 45 let věku bylo vyšetřeno 28,4%, ve screeningové skupině žen bylo vyšetřeno 47,7% žen a ve věkové skupině žen starších 70 let bylo vyšetřeno 23,9% žen. Detailní analýza je uvedena v Tab. 2.

3. Výsledky provedených core biopsií u žen souboru jsou uvedeny v Tab. 3.

ŽENY < 45 LET		ŽENY > 45 LET a < 70 let		ŽENY >70 LET		Σ
Mammografie	11 690	Mammografie	18 480	Mammografie	9 451	**39 550**
Sonografie	5 338	Sonografie	2 265	Sonografie	351	**7 792**
Biopsie	412	Biopsie	501	Biopsie	189	**1 102**
Dopl. MG	0	Dopl. MG	0	Dopl. MG	0	**0**
Klinické vyšetření	355	Klinické vyšetření	32	Klinické vyšetření	62	**449**
N C 50	97	N C50	264	N C50	153	**514**
RECALL RATE	44,8	RECALL RATE	8,12	RECALL RATE	7,63	**20**
Σ	17 795	Σ	21 278	Σ	10 053	49 427

Tab. 1.

VĚK	N	%	VĚK	N	%	VĚK	N	%
20-24	48	0,4	**45-49**	4428	23,9	**70-74**	4974	52,7
25-29	55	0,5	**50-54**	4269	23,1	**75-79**	2869	30,3
30-34	213	1,8	**55-59**	4437	24	**80-84**	1172	12,5
35-39	925	7,9	**60-64**	3184	17,2	**85-89**	385	4
40-44	10 449	89,4	**65-69**	2162	11,8	**90-94**	51	0,5
Σ	11690	100	Σ	18480	100	Σ	9451	100

Tab. 2.

ŽENY < 45 LET			ŽENY > 45 a < 70 LET			ŽENY >70 LET			Σ
BENIGNÍ	**N**	**%**	**BENIGNÍ**	**N**	**%**	**BENIGNÍ**	**N**	**%**	
FA	**91**	**22,1**	FA	**81**	**16,3**	FA	**2**	**1,1**	*174*
ADH	**101**	**24,5**	ADH	**89**	**17,9**	ADH	**21**	**11,1**	*211*
ALH	**45**	**10,9**	ALH	**61**	**12,2**	ALH	**4**	**2,1**	*110*
PAPILOM	**17**	**4,1**	PAPILOM	**3**	**0,5**	PAPILOM	**1**	**0,5**	*21*
FIBROZA	**61**	**14,8**	FIBROZA	**3**	**0,3**	FIBROZA	**8**	**4,3**	*72*
C 50	*97*	*23,6*	*C 50*	*264*	*52,8*	*C 50*	*153*	*80,9*	*514*
Σ	**412**	**100**	Σ	**501**	**100**	Σ	**189**	**100**	*1102*

Tab. 3.

VĚK	HISTOLOGICKY TYP KARCINOMU N = 514								
	DUKTÁL	KOMEDO	LOBULÁR	APOKRINNÍ	A MEDUL	SMÍSENY	TIS	Σ	%
20-29	1	1	0	0	1	0	3	*6*	*1,2*
30-34	3	4	0	0	1	3	5	*16*	*3,1*
35-39	12	6	1	1	1	3	5	*29*	*5,7*
40-44	19	14	1	1	2	2	7	*46*	*8,9*
45-69	159	25	12	3	6	21	38	*264*	*51,4*
70-74	22	3	12	0	0	2	10	*49*	*9,5*
75-79	16	3	22	0	1	1	3	*46*	*8,9*
80-84	15	7	8	0	0	2	1	*33*	*6,4*
85-94	12	11	2	0	0	0	0	*25*	*4,9*
Σ	259	74	58	5	12	34	72	*514*	*100*

Tab. 4.

Vysvětlivky použitých zkratek v Tab. 4:
duktál = invazivní duktální karcinom, *komedo = komedonová varianta invazivního duktálního karcinomu, l*
obulár = invazivní lobulární karcinom, *amedul = atypický medulární karcinom,*
smíšený = duktální + lobulární invazivní karcinom, *TIS = karcinom in situ*

II. Výsledky

1. Lokalizace karcinomů mléčné žlázy dle WHO

Centrálně bylo prokázáno 81 (15,8%), v mediálním horním 16 (3,1%), v mediálním dolním 8 (1,6%), na rozhraní horních kvadrantů 21 (4,1%), na rozhraní mediálních kvadrantů 7 (1,3%), v zevním horním kvadrantu 338 (65,8%), v dolním zevním kvadrantu 31 (6%) a na rozhraní dolních kvadrantů 12 (2,3%) z 514 prokázaných karcinomů mléčné žlázy.

2. Histologické typy prokázaných karcinomů mléčné žlázy jsou uvedeny v Tab. 4.

Invazivní duktální karcinom mléčné žlázy byl průkazný 50,3%, komedonový karcinom ve 14,5%, invazivní lobulární karcinom v 11,4%, apokrinní karcinom v 0,9%, atypický medulární karcinom ve 2,3%, smíšený karcinom v 6,6%. Karcinom in situ byl prokázán ve 14%.

3. Velikost karcinomů mléčné žlázy

podle jednotlivých věkových skupin uvádí Tab. 5. Ve skupině velikosti karcinomů od 4-9 mm bylo prokázáno 8%, ve skupině 10-14% 17%, ve skupině 15-19 mm 27,6%, ve skupině 20-24 mm 30,5% a ve skupině karcinomů 25 mm 16,9%.

3. Grade

Grade 1 byl zaznamenán v 17,1%, Grade 2 ve 39,9% a Grade 3 ve 43% prokázaných karcinomů.

4. Steroidní status

Oba pozitivní steroidní receptory byly stanoveny u 201 (39,1%) karcinomů, pozitivní estrogenový receptor u 162 (31,5%) karcinomů, pozitivní progesteronový receptor u 36 (7%) karcinomů. Oba negativní steroidní receptory byly stanoveny u 115 (22,4%) karcinomů mléčné žlázy.

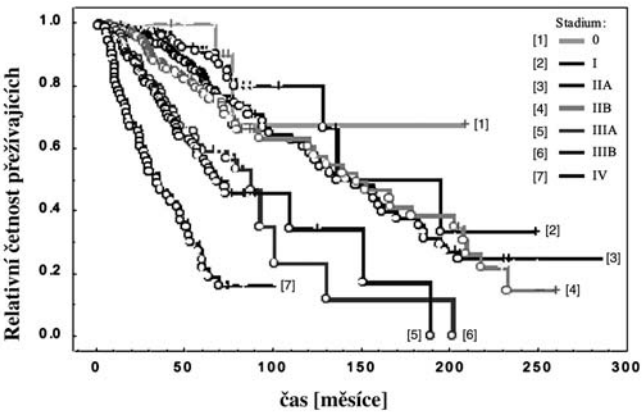
5. Staging

Staging karcinomů mléčné žlázy podle věkových skupin a počtu prokázaných karcinomů je uveden v Tab. 5.

6. Stratifikovaná analýza přežití je uvedena v Graf 1:

VELIKOSTI KARCINOMŮ DLE VĚKOVÝCH SKUPIN						
VĚK	4-9 mm	10 - 14 mm	15 -19 mm	20-24 mm	25 + mm	Σ
	N	N	N	N	N	
20-24	0	1	1	0	0	2
25-29	1	1	1	1	0	4
30-34	2	3	7	3	1	16
35-39	4	11	10	2	2	29
40-44	7	13	10	10	6	46
45-49	8	12	14	12	1	47
50-54	7	10	15	15	3	50
55-59	6	14	18	22	12	72
60-64	3	7	13	18	2	43
65-69	2	8	17	20	5	52
70-74	1	4	15	12	17	49
75-79	0	3	15	16	12	46
80-84	0	0	2	16	15	33
85-89	0	0	3	8	6	17
90-94	0	0	1	2	5	8
Σ	41	87	142	157	87	514

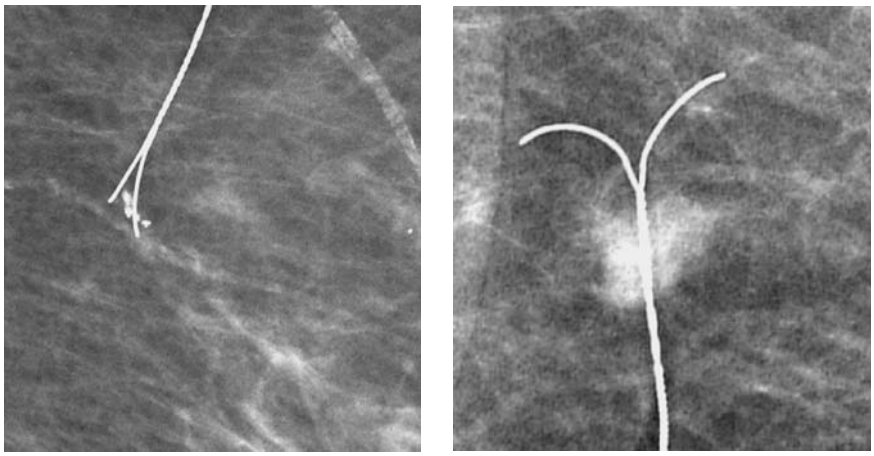
Tab. 5.



Graf 1.

STAGING					
VĚK	< 45	45-69	> 70	Σ	%
TIS	20	38	14	*72*	*14*
T1a N0	21	31	12	*64*	*12,4*
T1b N0	25	16	11	*52*	*10,1*
T1b N1	17	18	24	*59*	*11,5*
T1c N0	4	36	13	*53*	*10,4*
T1c N1	3	22	16	*41*	*8*
T2a N0	2	56	26	*84*	*16,3*
T2a N1	4	45	26	*75*	*14,6*
T4	1	2	11	*14*	*2,7*
Σ	97	264	153	*514*	*100*

Tab. 6.



Ukázka stereolokalizace nehmatných karcinomů (oba non komedo DCIS)

Stratifikovaná analýza přežití (OS) souboru 3 492 pacientek s karcinomem mléčné žlázy

III. Závěr

Počet prokázaných včasných stádií karcinomu mléčné žlázy na našem pracovišti má kontinuálně zvyšující se tendenci, tedy současně se zvyšuje počet OS (přežití) pacientek (vide Graf 1). Na druhé straně počty pokročilých stádií karcinomu, typické pro ženy s pozdním mammografickým prvovyšetřením, ve všech věkových skupinách jsou výzvou k oslovení pacientek všech věkových kategorií. Podle našeho názoru by se jednalo o nejschůdnější cestu k naplnění cíle = dále zvyšovat počty včasných stádií karcinomu mléčné žlázy.

121 Detailní lokalizace nádoru v prsu jako kvalifikovaný základ spolupráce radiologa, chirurga, chemoterapeuta a patologa.

Skovajsová M.
Mamma centrum, Praha

V akreditovaném screeningově-diagnostickém oddělení, které pracuje od roku 1994 pod názvem Mamma centrum a kde vyšetřuje mamograficky ročně nejméně 30 000 žen s každoročním záchytem 400-450 karcinomů prsní žlázy je detailní lokalizace nádorů prsu součástí diagnostického protokolu.

0d počátků zavedení metody do praxe bylo takto označeno nejméně 5000 hmatných i nehmatných malignomů. Metoda je užívána rovněž u sledování efektu neoadjuvantní chemoterapie. Takto byla využita nejméně u 300 nemocných s primárně neoperovatelným nádorem prsu.

Nové pojetí značení mamárních ložisek před chirurgickým výkonem

Označování okrajů hmatných i nehmatných lézí má zcela zvláštní postavení mezi intervenčními výkony. Je jedním z nejdůležitějších spojovacích můstků mezi prací rentgenologa a chirurga. **Dříve prováděné značení či spíše navigace chirurga k** nehmatné **lézi se může změnit v** nejmodernějším **pojetí doslova ve vymezování operačního pole**. Vícebodové označování patologického ložiska s jeho bezpečným lemem, neboli vymezení operačního pole, je tak zcela novou kvalitou. Je známkou společné řeči mezi odborníky různých, avšak spolupracujících oborů.

Potřeba značit nehmatná ložiska přišla spolu s rozvojem konzervativní chirurgie prsu. Přesné označení a následné vyjmutí podezřelého místa nebo místa diagnostických rozpaků by mělo být společnou snahou radiologa i chirurga. Cíleně a bezpečně provedená **tumorektomie (nebo lobulectomie) minimálního nehmatného karcinomu**, nejsou-li jiné kontraindikace jako třeba multicentricita ložiska, je v chirurgii prsu z onkologického hlediska zcela adekvátní výkon.

Značení Frankovou jehlou

Metoda **značení Frankovou jehlou** je postupem, kterým můžeme lokalizovat nehmatnou lézi v prsu jak za kontroly mamografické pod stereotaktickým zaměřením, tak i z volné ruky v ultrazvukovém zobrazení. Nevýhodou této metody je, že **označujeme jen jeden bod ložiska**, přičemž u shluku mikrokalcifikací nemusí být zcela jasné, v které části ložiska konec lokalizačního drátu leží. Často dojde k zakotvení koncové části drátku pouze v blízkosti ložiska, což se zjistí až při rentgenové kontrole jeho uložení. O hranici léze se při užití této metody chirurg nedozví nic. Dalším nedostatkem této dosud hojně užívané metody je požadavek na **minimální časový interval mezi značením a operací.**

Značení pigmentem. Spolupráce chirurga a radiologa.

Metoda **značení pigmentem (carbo adsorbens – 4%)** je jiná nejen užívaným materiálem, ale celou filosofií metodiky. Vložením pigmentu do zdravé tkáně v okolí ložiska totiž **vymezujeme přímo operační pole**. Bolus pigmentu zůstává na svém původním místě **bez časového omezení** a bez významnější fagocytární reakce organismu. Umožňuje **vícebodové značení**. Ložisko pravidelného tvaru i s bezpečnostním lemem může být vymezeno dvěma body, ložisko nepravidelného tvaru pak více bolusy, obvykle třemi nebo čtyřmi.

Způsoby značení pigmentem se jistě budou mezi pracovišti lišit, neboť budou vycházet z konkrétní **domluvy mezi označujícím radiologem a operatérem**. Metoda vyznačování operačního pole je kapitolou vysoké školy mamodiagnostiky, ne-li přímo nejvyšší. Na práci radiologa, pakliže se na ní chirurg spolehne, závisí dva zásadní momenty:

1. Jistota vyjmutí celé patologické struktury s řezem vedeným ve zdravé tkáni
2. Kosmetický efekt výkonu

Hodnocení skutečné velikosti ložiska. Okraj bezpečnosti

Vymezení skutečné velikosti ložiska a vyhodnocení co nejpravděpodobnějšího okraje bezpečnosti je zásadním úkolem, s nímž se musí radiolog umět bezchybně vypořádat. Podhodnocení velikosti vyústí v nedostatečný rozsah chirurgického výkonu a vede k další operaci. Nadhodnocení velikosti ložiska se může stát překážkou estetického výkonu.

Při porovnávání radiologem určené velikosti nádorů s měřením patologa při definitivní histologii dochází standardně k 10%-15% podhodnocení velikosti ložisek. Tato odchylka je prakticky nevýznamná.

Vymezení okolního bezpečného lemu je jen technickou záležitostí. Z onkologického hlediska se možná pojem „lem bezpečnosti“ bude zdát mechanistickým, když pomyslíme na možné cirkulující mikrometastázy. Medicína je však jen uměním možného, což v tomto případě platí více, než jinde. Bezpečnostní lem chápeme jako 10 -15mm pruh sonograficky a mamograficky „zdravé“ tkáně obkružující ložisko za jeho hranicí. Na okraje lemu pak umístíme depa pigmentu, chirurg vede operační řez rovněž laterálně od pigmentových dep, čím se bezpečnostní zóna ještě mírně rozšíří.

Technika značení pigmentem

Po vyhodnocení velikosti ložiska a lemu bezpečnosti přijde úvaha, kam pigmentové bolusy umístit. U **ložisek tvarově pravidelných, koncentrických** vkládáme pigment na dvě místa. Jsou na obvodu pomyslného kruhu opisujícího zevní hranici zóny bezpečnosti, jehož střed je současně středem ložiska a pigmenty na čísle 12 a 6. **U nepravidelných ložisek** je vhodné vložit tři i čtyři pigmentová depa. Ke každému může vést samostatný vpich, někdy lze z jednoho vpichu uložit i dva bolusy vzdálené od sebe 1-2 cm prostým přepolohováním jehly v podkoží. Místa uložení pigmentu přesně zakreslíme a ještě **popíšeme do protokolu**, který jde s pacientkou až na operační sál. Jako velmi praktické se ukázaly tyto protokoly vytištěné na žlutém papíře. Viditelně zasvítí mezi ostatní dokumentací ženy, ujasní chirurgovi uložení nehmatné léze, či tvar a velikost léze hmatné, ukáže, kde jsou depa pigmentu, v jakém počtu a z kolika přístupů byla vpravena.

Komplikace značení. Carbom

Při více než 5000 provedených označení pigmentem nebyly v našem Mamma centru zaznamenány žádné bezprostřední významné komplikace. Občas je v definitivní histologii hlášena makrofagická reakce v okolí pigmetového bolusu, nemá však klinický korelát ve formě jakýchkoli potíží.

Pozdní velmi zřídkavou komplikaci pigmentování, reakci „na cizí těleso“, která má zcela typický mamografický i sonografický obraz, nazýváme carbom. Z klinického hlediska není zdrojem současných, ale ani budoucích obtíží. Nezkušenému radiologovi může přinést diagnostické obtíže, může být považován za maligní ložisko. Problém řeší jako obvykle core biopsie. Jedinou prevencí carbomu je úplné vyjmutí depa pigmentu během výkonu.

Značení a velikost značených ložisek

Označování **nehmatných lézí** nebo podezřelých okrsků žlázy, kde z nejrůznějších důvodů nemůže diagnostika přinést konečné informace o povaze léze, je logické a nevedou se o něm spory.

Diskutabilní se může zdát značení **hmatných lézí**. Zde bude záležet na nalezení konsenzu radiologa a operujícího chirurga. Někteří operatéři oceňují vyznačení bezpečnostního lemu i v těchto případech, protože jim umožňuje jednoznačnější rozhodování o rozsahu výkonu. Je totiž nutno myslet i na diskrepanci mezi pohmatovým nálezem, kterým se chirurg řídí, a skutečnou velikostí ložiska. Ví se, že u některých existujících lézí může být pohmatový nález zdánlivě menší než skutečné ložisko. Jindy naopak pohmatové vyšetření nález nadhodnocuje, a to už všeobecně známo není. V prvním případě jde o ložiska měkká, difúzní, v druhém případě přidává na skutečné velikosti okolní lymfostáza. Vymezení bezpečnostní zóny pomůže chirurgovi k rozvaze o reálnosti bezpečné tumorektomie a k minimalizaci rizika ponechání části nádoru. které přinášejí tumorózní čepy v okraji resekátu. Volba metody se zde vzhledem k očekávanému přínosu nutně zužuje pouze na značení pigmentem pod ultrazvukovou kontrolou.

Značení okrajů u primárně neoperovaných tumorů

Označování okrajů primárně neoperovaných tumorů **před nasazením neoadjuvantní léčby** je unikátní možností využití této metody. Značky přetrvávající celou dobu léčby, informují operatéra o hranici původního bezpečného lemu okolo ložiska. Ať už se děje uvnitř od pigmentové hranice působením neoadjuvantní chemoterapie, hormonoterapie či již zřídka neoadjuvantně používané radioterapie s ložiskem cokoli (koncentrické zmenšování, rozpad ložiska apod.), rozdělení tkáně na původně zdravou a postiženou přetrvává. Při dobrém efektu chemoterapie je pigmentování pod ultrazvukovou kontrolou základem pro eventuální konzervativní výkon.

U značení primárně neoperovaných nádorů se musí dbát na dostatečný objem bolusu ve žláze i na dobré viditelnosti pigmentových stop na povrchu kůže.

Značení jako základ pro vyhodnocování efektu neoadjuvantní léčby

Při měnícím se ultrazvukovém obraze ložiska působením chemoterapie, se stávají pigmentové značky i pro radiologa důležitým opěrným bodem pro **vyhodnocování efektu chemoterapie**. **Průběžné monitorování odpovědi primárně neoperovaného malignomu na léčbu radiologem** je zdrojem cenných informací pro terapeuta podávajícího chemoterapii.

Při sonografické kontrole po každé dávce chemoterapie, nejlépe v den podání další léčebné dávky se radiolog vyjádří v procentech nebo podle domluvených kriterií ke stavu maligního ložiska. Obvykle jsou provedeny čtyři sonografické kontroly před plánovaným chirurgickým výkonem. Toto vyhodnocování může provádět jen velmi zkušený radiolog, který je schopen v sonografickém obraze detekovat i minimální změny a hlavně je porovnat s nálezem předchozím. Srovnávání se provádí ve standardizovaných sono-projekcích.

Chemoterapeut může léčbu modifikovat podle odpovědi karcinomu na dosavadní léčbu. Mnohé malignomy mají tak dobrou odpověď na léčbu, že se jejich detekce v sonografii i v mamografickém obraze postupně stává zcela nemožnou a jen původní depa pigmentů ukazují v sonografickém obraze, kde byl nádor původně uložen. V případě, že by nebylo nádorem infiltrované pole označeno permanentním pigmentem, nemohl by být pacientce, přes nesporný efekt chemoterapie dopřán chirurgicky konzervativní výkon, na který by měla z onkologického hlediska nárok.

Značení jako vodítko pro nalezení a hodnocení zbytkových nádorových mas při významné odpovědi na neoadjuvantní léčbu

V mnoha případech mohou pigmentové bolusy sloužit jako jediné a proto cenné vodítko pro hodnocení patologa. Je to zejména při velmi dobré nebo úplné odpovědi na léčbu, kdy patolog podle pigmentových dep může směřovat cíleněji své diagnostické řezy.

122 Postupy detekce nehmatných lézí prsu.

Retková L.[1], Vrabcová A.[1], Hoferka P.[1], Sečkařová D.[2]
1) Fakultní Thomayerova nemocnice, chirurgická klinika, přednosta doc. V. Visokai PhD.
2) Fakultní Thomayerova nemocnice, radiodiagnostické oddělení, primář MUDr. J. Urbanová

keywords: *nehmatná léze – detekce – stereotaxe – sono značení – ROLL – RSL*

Úvod

problematika časného záchytu karcinomu prsu je de facto vyřešena zavedením screeningu. Skutečný záchyt časného karcinomu prsu /stadia in situ až II. stadia/ je závislý na kooperaci žen a na bdělosti odpovídajících lékařů, kteří by tyto ženy ke screeningovému vyšetření měli odesílat.

Metodika

problémem není tedy diagnostika, ale **detekce** – značení nehmatné léze. Zde opět podtrhujeme mezioborovou spolupráci a to nejen při předoperační diagnostice, tak i při peroperačním mammografickém vyšeření odebrané tkáně – **sample**, či **specimen**. V indikační rozvaze používáme na našem pracovišti sono značení od r. 1995 a sterotaktickou automatickou jednotku mammografu od r. 1997. Při sonem navigovaném značení používáme lokalizační drátek (kovový vodič), či suspenzi carbo adsorbens. Při stereotaktické detekci opět lze použít obě metody. Při stereotaxiužíváme zaměření pomocí lokalizačního drátku, carbo adsorbens – tetovací barva je upředňostňována při navigaci sono značením. Obě metody tetováž i drátek pak lze dobře kombinovat při obou metodách navigace. Obě metody mají své výhody i nevýhody:

SONO:	**STEREO:**
+ až týdny před výkonem	– minuty před výkonem
+ vleže	– vsedě, vleže
+ délka značení - 5 min.	– délka značení 15-20 min.
– bez samplu	+ sample – peroperačně

Novou metodou značení nehmatných lézí je metoda ROLL /Radioguided Occult Lesion Localisation/, kterou používáme od roku 2004, kdy naše pracoviště získalo gama scintilační sondu, která snímá intenzitu emitovaného záření. Principielně je tato metoda podobná vyšetření samotné sentinelové uzliny, rozdílem je pouze ve větší retence radionuklidem značeného koloidu v místě intratumorální aplikace. Po instilaci Tc 99 značeného kolidu se v případě detekce sentinelové uzliny v jedné době následně na oddělení nukl. medicíny provede dynamická lymfoscintigrafie a označí se na kůži její projekce. Na našem pracovišti používáme jednodenní protokol – aplikace radionuklidu a lymphoscintigrafie a následně operace. V případě předchozí histologické verifikace nádoru použijeme metodu ROLL k detekci maligní nehmatné léze s exstirpací sentinelové uzliny jako definitivnímu chirurgickému výkonu.

Metodu navigace nehmatné léze titanovým zrnem označeným izotopem I 125 nazýváme RSL (Radioactive Seed Localisation) Rentgen kontrastní titanové zrno je zaváděno do ložiska pod mammografickou kontrolou. Vzhledem k poločasu rozpadu je možno načasovat chirurgický výkon do 5 dnů od označení.

Diskuze

Při mammografickém skreeningu se u 100 vyšeřených pacientek najde 1-2% podezřelých lézí. Následně provedená core cut biopsie pod sono kontrolou či stereotakticky, či otevřená chir. exstirpace prokáže malignitu ve 25-35% případů. Při suspekci na malignitu, zejména při mammografickém vyšetření BIRADS 4-5 řešíme 2 základní otázky – je možno provést histol. verifikaci? Jaké značení použijeme? Na našem pracovišti u lézí větších než 5 mm používáme standartně core cut biopsii se značením pod sono kontrolou či stereotakticky, u lézí nedosahujících 5 mm /pro možnost „rozstřelení“ tumoru/ či u difusních mikrokalcifikací používáme chirurgickou exstirpaci po předchozím označení. V tomto případě by byla metodou volby vakuová biopsie, kterou na našem pracovišti „zatím“ k dispozici nemáme.

V našem souboru 175 pacientek s benigním, či maligním onemocnění prsu v roce 2006 jsme operovali pro nehmatnou lézi v 48%, z toho 63% lézí značeno pod sonem, 32% stereotakticky s peroperačním vyhodnocením /sample/ a 5% pacientkám jsme před operací označili nehmatnou lézi metodou ROLL, z toho 2 pacientky již před značením měly histologicky verifikovanou malignitu, ve smyslu IDC, proto byla v jedné době detekována a exstirpována i sentinelová uzlina.

Závěr

V době organizovaného screeningu se neobejdeme bez značení nehmatných lézí prsu jednou z výše uvedených metod. Na našem pracovišti preferujeme sono značení carbo adsorbens pro komfort pacientky a lepší timing značení versus operace. Pacientky dobře tolerují i stereotaktické značení, u něhož nespornou výhodou je možnost peroperačního vyhodnocení specimenu. Neopomínejme ani nové metody ROLL a RSL, se kterými na našem pracovišti začínáme. Mají v době miniinvazivní chirurgie svoje opodstatněné místo, zejména s přihlédnutím k možnosti synchronní detekce sentinelové uzliny. Vyžadují zázemí odd. nukleární medicíny a jsou spojené s větší cenou a vyžadují erudici chirurga.

123 Úloha magnetické rezonance v diagnostice mikrokalcifikací prsní žlázy dle BI-RADS 4 a 5.

Houserková D.[1], Švach I.[3], KučerováL.[2], Dušková M.[2], Bučil J.[1], Šišola I.[1], Zlámalová N.[3], Švébišová H.[4]
1) Radiologická klinika FN a LFUP Olomouc, Olomouc
2) Ústav patologické anatomie FN a LFUP Olomouc
3) Chirurgická klinika FN a LFUP Olomouc
4) Onkologická klinika FN a LFUP Olomouc

Úvod

Magnetická rezonance prsů (MR-Mamografie, MRM) je součástí zobrazovacích metod používaných v mamodiagnostice. Hodnocení MRM by mělo být v rukou radiologa, který již má určitou zkušenost s ostatními zobrazovacími metodami užívanými v mamodiagnostice. Správné hodnocení malých změn prsní žlázy při MRM je možné provádět pouze v kontextu s mamografií, event. ultrazvukovým vyšetřením.

MRM má svoje jasné indikace a její užití by mělo být mamodiagnostikem pečlivě zvažováno. V žádném případě by toto vyšetření nemělo nahrazovat mamografii nebo ultrazvukové vyšetření, či eliminovat jasnou indikaci k provedení diagnostické intervence.

Cílem naší práce bylo ověřit význam magnetické rezonance prsů pro stanovení diagnózy u mikrokalcifikací prsní žlázy dle BI-RADS 4 a 5.

Materiál a metodika

U 35 pacientek ve věku 34 – 72 let s nálezem maligních nebo suspektních mikrokalcifikací (BI-RADS 4 a 5) na mamografii (MG) jsme provedli kontrastní dynamickou MRM. Vyšetření jsem provedli na přístroji Symphony firmy Siemens 1,5 Tesla při použití bilaterální prsní cívky.

Důvodem k doplnění MRM byl především denzní, méně přehledný typ prsu, kde bylo obtížné při nálezu mikrokalcifikací vymezit rozsah postižení žlázy a vyloučit multifokalitu nebo multicentricitu event. malignity.

Protokol vyšetření tvořily nativně sekvence T2 v transverzální rovině, STIR v koronální rovině a dynamická kontrastní studie s jednou nativní a 6 postkontrastními T1 FLASH 3D sekvencemi v transverzální rovině. Použitou kontrastní látkou byl u všech žen Prohance v množství 0,1 mmol/ kg váhy. Součástí vyšetření byl postprocessing s tvorbou subtrahovaných obrazů z jednotlivých postkontrastních sekvencí a tvorbou MIP obrazů.

U všech pacientek byla provedena následně stereotaktická vakuová biopsie prsu. Pacientky s nálezem malignity či atypické duktální hyperplazie (ADH) byly operovány.

LÉZE S PATOLOGICKÝM ENHANCEMENT PŘI MRM		31 PACIENTŮ
VELIKOST MIKROKALCIFIKACÍ		21 (68%) STEJNÝ ROZSAH PŘI MRM A MG
		10 (32%) VĚTŠÍ VELIKOST PŘI MRM VE SROVNÁNÍ S MG
MULTIFOKALITA	3	6 (19%)
MULTICENTRICITA	3	
BILATERALITA	1	1 (3%)

Tab. 1.
Srovnání rozsahu mikrokalcifikací na MRM a MG, hodnocení multifokality, multicentricity a bilaterality karcinomu

31 MIKROKALCIFIKACÍ S ENHANCEMENT			MORFOLOGIE ENHANCEMENT	
			VZOR 1 NODULÁRNÍ, TEČKOVITÉ, HETEROGENNÍ 21 (68%)	
			VZOR 2 DUKTÁLNÍ, LINEÁRNÍ 10 (32%)	
ADH		1	DUKTÁLNÍ, LINEÁRNÍ, HETEROGENNÍ	1
DCIS	LOW GRADE	4	DUKTÁLNÍ, LINEÁRNÍ, HETEROGENNÍ TEČKOVITÉ, HETEROGENNÍ	2 2
	INTERMEDIATE	9	DUKTÁLNÍ, VĚTVÍCÍ SE, HETEROGENNÍ NODULÁRNÍ, TEČKOVITÝ, HETEROGENNÍ	3 6
	HIGH GRADE	7	NODULÁRNÍ, HETEROGENNÍ NODULÁRNÍ, HOMOGENNÍ DUKTÁLNÍ, VĚTVÍCÍ SE, HETEROGENNÍ	3 2 2
DCIS S MIKROINVAZÍ		10	NODULÁRNÍ, SKVRNITÝ, HETEROGENNÍ NODULÁRN, TEČKOVITÝ, HETEROGENNÍ LINERNÍ, DUKTÁLNÍ, HETEROGENN	2 6 2

Tab. 2. Morfologie patologického enhancement

DEFINITIVNÍ HISTOLOGIE 35 MIKROKALCIFIKACÍ		ENHANCEMENT	MRM – INTENZITA ENHANCEMENT			MRM – TIME TO INTENSITY KŘIVKY		
			NÍZKÁ	STŘEDNÍ	VYSOKÁ	TYP I	TYP II	TYP III
BENIGNÍ	2	–	–	–	–	–	–	–
MALIGNÍ	32	30 (94%)	2 (6%)	8 (27%)	20 (67%)	1 (3%)	20 (67%)	9 (30%)
ADH	1	1 (100%)	–	1	–	–	1	–

Tab. 3.
Charakteristika enhancement mikrokalcifikací při MRM vzhledem histopatologii lézí

DEFINITIVNÍ HISTOLOGIE 35 PACIENTEKEN			ENHANCEMENT	MRM-INTENZITA ENHACEMENT			MRM-TYP KŘIVKY		
				NÍZKÁ	STŘEDNÍ	VYSOKÁ	TYP II	TYP II	TYP III
BENIGNÍ		2	BEZ ENHANCEMENT	–	–	–	–	–	–
ADH		1	ENHANCEMENT	–	1	–	–	1	1
DCIS	LOW GRADE	6	BEZ ENHANCEMENT 2 ENHANCEMENT 4	– 1	– 3	– –	– 1	– 3	– –
	INTERMEDIATE	9	ENHANCEMENT	1	3	5	–	7	2
	HIGH GRADE	7	ENHANCEMENT	–	1	6	–	4	3
DCIS S MIKROINVAZÍ		10	ENHANCEMENT	–	1	9	–	6	4

Tab. 4.
Charakteristika enhancement mikrokalcifikací při MRM vzhledem k histopatologii lézí

GRADE DCIS		MRM – NTENZITA ENHANCEMENT			MRM -TYP KŘVKY		
		NÍZKÁ	STŘEDNÍ	VYSOKÁ	TYP II	TYP II	TYP III
LOW GRADE DCIS	4	25%	75%	–	25%	75%	–
INTERMEDIATE GRADE DCIS	9	11%	33%	56%	–	78%	22%
HIGH GRADE DCIS	7	–	14%	86%	–	57%	43%
HIGH GRADE DCIS S MIKROINVAZÍ	10	–	10%	90%	–	60%	40%

Tab. 5.
Charakteristika enhancement DCIS vzhledem k histopatologickému gradu

Cílem práce bylo:
1) zjistit sensitivitu MRM pro stanovení diagnózy u mikrokalcifikací prsu dle BI-RADS 4 a 5
2) porovnat rozsah postižení prsní žlázy u mikrokalcifikací na MG a při MRM
3) ověřit význam MRM pro stanovení multifokality a multicentricity, event. bilaterality karcinomu.
4) zjistit morfologii enhancement u mikrokalcifikací a stanovit parametry enhancement při MRM z kvantitativního a kvalitativního hlediska
5) porovnat parametry enhancement u DCIS s různým histopatologickým gradem.
6) zjistit význam MRM u mikrokalcifikací pro následnou chirurgickou terapii

Výsledky

U 31 pacientek stanovila předoperační biopsie diagnózu DCIS, u dvou pacientek byla zjištěna atypická duktální hyperplazie (ADH), u dvou žen byl histologický nález z biopsie benigní. Definitivní histologie zjistila DCIS u 32 žen, u 10 žen byla prokázána navíc mikroinvazivita DCIS, u 2 žen byl potvrzený benigní nález, u jedné pacientky potvrzena ADH; u druhé pacientky s ADH z vakuové biopsie prokázala definitivní histologie DCIS.

U 10 (32%) žen byl rozsah postižení prsní žlázy větší na MRM při srovnání s MG. U 6 (19%) žen byla prokázána multifokalita nebo multicentricita DCIS a v jednom případě byl prokázaný bilaterální karcinom.

Pokud jde o enhancement při MRM byl prokázaný v místě mikrokalcifikací u 94% žen s DCIS či ADH; pouze u dvou pacientek s low grade DCIS jsme nenalezli v místě mikrokalcifikací enhancement. U dvou žen s benigním histologickým nálezem z vakuové biopsie jsme rovněž neprokázali v místě mikrokalcifikací enhancement.

Zaznamenali jsme dva základní morfologické obrazy enhancement u DCIS – nejčastěji se vyskytoval nehomogenní tečkovitý a mikronodulární vzhled enhancement a méně často lineární a duktální nehomogenní typ sycení.

U 67% pacientek s DCIS jsme zjistili vysokou intenzitu enhancement (nad 100%), u 27% střední a jen u 6% nízkou intenzitu enhancement. Pokud jde o kvalitativní hodnocení enhancement pomocí „time to intensity“ křivek u 30% DCIS jsme zjistili 3. typ křivky (wash out), u 67% 2. typ křivky (plateau) a u 3% pacientek 1. typ křivky. Při porovnání parametrů enhancement byl nalezený statisticky významný rozdíl u low- a high grade DCIS (resp. high grade DCIS s mikroinvazí).

Závěr

Senzitivita MRM pro detekci malignity (DCIS) u mikrokalcifikací v našem souboru pacientek byla 94%. MRM měla zásadní význam pro stanovení multifokality, multicentricity a bilaterality karcinomu. U 26% pacientek byl výsledek MRM rozhodujícím pro konverzi záchovné operace na mastektomii.

124 Využití MRI v časné diagnostice ca prsu – kasuistiky.

Nechvátal [1], Červinka [1], Šťastný [1], Havlíček [1], Jiříčková [2]
1) Chirurgická klinika KN Pardubice
2) Radiodiagnostické odd. KN Pardubice

Kasuistika 1

65 letá žena dne 2.11.06 podstoupila pravidelnou mamografickou kontrolu, při které zjištěny známky výrazné mastopatie, proto proveden UZ prsů popisující ložisko v levém prsu na č.3 a vpravo na č.6.

Ložiska nejsou hmatná proto doplněna MRI dne 8.11.06, kde jsou popisována ložiska v DZQ vlevo a v DQ vpravo s patologickou křivkou, dále benigní ložisko v hloubce levého prsu. Doplněny UZ břicha a RTG plic, které negativní.

Dne 23.11.06 zavedeny vodiče k suspektním ložiskům, které vyšetřeny patologem peroperačně, patolog nalézá v levém prsu ložisko DCIS, proto provedeno vyšetření sentinelové biopsie a provedena parciální mastektomie levého prsu. Definitivní histologie potvrzuje nález 5 mm ložiska DCIS G2-3, vpravém prsu popisována dysplasie

Kasuistika 2

Jedná se o 55 letou ženu, která si vyhmatala ložisko při okraji dvorce levého prsu. Dne 1.11.06 provedena mamografie. V levém prsu jsou popisovány dysplastické změny, vpravo na rozhraní HQ ložisko mikrokalcifikací 14mm. Typ Tabár 4. Doplněn UZ prsů popisuje ložisko mikrokalcifikací vpravo velikosti 10mm v HZQ, jasné ložisko nenalezeno, naopak v HVQ 8mm formace benigního vzhledu a v DVQ benigní ložisko 9mm. Vlevo v DVQ 11mm ložisko a v DZQ 10mm ložisko, obě hodnoceny jako fibroadenom, nakonec v HZQ susp. Ložisko velikosti 25mm.

Vzhledem k nálezu na UZ a mamografii doplněna MRI prsů dne 15.11.06. Při vyšetření nalezeno vlevo v DZQ 8mm ložisko s maligní křivkou, dále v DVQ 10mm benigní ložisko. Vpravo v DZQ 10mm ložisko benigního vzhledu.

23.11.06 zavedeny vodiče k suspektním ložiskům popsaným při předchozích vyšetřeních. Patolog peroperačně určuje ložisko DCIS v pravém prsu, vlevo dysplastické změny, proto provedena parciální mastektomie a dissekce axilly. V definitivní histologii potvrzeno jednak ložisko DCIS, ale také 10mm ložisko DCIS s počínající invazí.

125 Dispenzarizace benigních lézí prsu.

Macková D., Palácová M., Schneiderová M.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Dispenzarizace benigních nálezů v oblasti prsů probíhá nejčastěji v mamárních poradnách při onkologických pracovištích.

Benigní lese lze rozdělit na **palpovatelné, nepalpovatelné a benigní poruchy ductálního sytému.**

1) palpovatelné lese:
- *solidní útvary*
- *cysty*

Solidní útvary:
- fibroadenom
- juvenilní fibroadenom
- hamartom
- hematom

Cysty:
- prosté cysty solitární
- prosté cysty mnohočetné
- zahuštěné podezřelé cysty
- intracystické útvary

Floridní adenosa:
- zmnožení žlázek + ductulů normální struktury

Doporučené schéma sledování fibroadenomů:

Biopticky ověřit vždy v případě nejisté benignity nálezu či na přání pacientky možné i exstirpovat.

Solitární fibroadenom po exstirpaci UZ kontrola po 6 měsících a bude-li bez nálezu, zařadit do běžného screeingu (věk na 45 let). U mladších pacientek možno bez dalších kontrol.

Odmítne-li pacientka exstirpaci, tak lze provádět kontroly již jako samoplátce a v případě progrese doporučit exstirpaci.

Mnohočetné fibroadenomy se souhlasem pacientky indikujeme k exstirpaci a pokud neproběhne exstirpace, tak UZ kontrola po 6 měsících, V případě progrese doporučit exstirpaci ložisek.

V případě stationárního nálezu nad 45 let zařadit do screenigového programu a pod 45 let event. další kontroly jako samoplátkyně.

Doporučené schéma sledování hamartomu:

Hamartom lze diagnostikovat pouze z celého exstirpovaného útvaru, z toho důvodu nutné po podezření na hamartom vždy exstirpovat.

Doporučené schéma sledování cyst:

Cystickou resistenci doporučeno punktovat. V případě krvavého zbarvení doporučená biopsie ložiska, v případě serosní tekutiny možno po odstranění cysty punkcí pouze sledovat či punkci opakovat a cytologicky vyšetřit. V případě residuální hmatné lese po vypunktování cysty doporučena biopsie také.

Cysty s intracystickými útvary vždy exstirpovat celé!

Floridní adenosa – bioptické ověření.

2) nepalpovatelné lese:
- *sklerosující adenosa*
- *adenosa*
- *mikrocystická choroba*
- *hyperplasie*
- *atypická hyperplasie*
- *tuková nekrosa*

Tyto nálezy vytvářejí na mammogramu „mikrokalcifikace“, které nutné biopticky ověřit, obdobný nález na MG může tvořit low-grade DCIS.

V případě pochybností volit i exstirpaci ložiska.Mikrokalcifikace doporučeny sledovat na MG s odstupem 8 až 12 měsíců.

Fat nekrosa tvoří na mammogramu makrokalcifikace, které jsou typické pro benignitu nálezu.

3) benigní poruchy ductálního systému:
- *intraductální papilom*
- *intraductální papilomatosa*
- *periductální mastitida a ductectasie*
- *galactorrhea*

Výše uvedené poruchy se projevují většinou výtokem z bradavky.

Nutné provedení ductografie a po zjištění patologie ve vývodu doporučujeme provedení mikrodochectomie či revizi centrálního segmentu.

Při krvavé sekreci z bradavky i přes negativní ductografický nález indikujeme vždy provedení mikrodochectomie.

XIV.
Laboratorní diagnostika nádorů prsu

126 Klinický pohled na molekulární taxonomii karcinomu prsu.

Svoboda M.[1,2], Grell P.[1,2], Fabián P.[3], Palácová M.[1], Foretová L.[4], Hrstka R.[5], Petráková, K.[1], Nenutil R.[3], Hajdúch M.[6], Vyzula R.[1,2]
1) Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav v Brně
2) Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně
3) Oddělení patologie, Masarykův onkologický ústav v Brně
4) Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav v Brně
5) Základna experimentální onkologie, Masarykův onkologický ústav v Brně
6) Laboratoř experimentální medicíny FN a LF UP Olomouc

Pacientky s karcinomem prsu sdílející stejná diagnostická a prognostická kritéria stále vykazují značné rozdíly ve vývoji onemocnění, a to i přes jednotnou protinádorovou léčbu. Příčina těchto diskrepancí může být jak ve stávající histopatologické klasifikaci, tak i v prognostických systémech používaných v klinické praxi. V obou případech jsou do stejných skupin zařazovány karcinomy s odlišným molekulárním profilem a biologickým chováním, neboť histopatologická taxonomie je založena výhradně na morfologických parametrech a prognostické systémy zohledňují pouze velmi limitovaný počet molekulárních prediktivních markerů. Platí-li základní dogma biologických systémů, potom lze diverzitu fenotypu nádorových buněk sledovat na úrovni jejich genomu. Komplexnost těchto změn však předpokládala analýzu stovek až tisíců genů, kterou bylo možné realizovat až pomocí DNA čipů (1). Na podkladě těchto analýz vznikla dosavadní struktura molekulární taxonomie karcinomů prsu, vytvořená na základě podobnosti genové exprese mezi primárními tumory, tkání ze zdravé prsní žlázy a nádorovými liniemi, jenž byly ustaveny z odlišných buněčných komponent tumorů (například z buněk bazálního a luminálního epitelu). Pro první skupinu takto definovaných karcinomů je charakteristická přítomnost exprese estrogenového receptoru- a cytokeratinů buněk luminální epitelu (cytokeratin 8 a 18), a proto byla pojmenována „luminal-like“ a na základě intenzity exprese genů signální dráhy estrogenového receptoru dále rozdělena na podskupinu „luminal-like A“ a „luminal-like B“. Druhá skupina, označená „ErbB2“ (dále jen Her-2), se vyznačuje vysokou expresí genu kódujícího Her-2 receptor. Třetí skupina vykazuje negativní expresi jak estrogenového, tak i progesteronového a Her-2 receptoru, tzv. „triple-negative“ (trojitě negativní) fenotyp, a naopak se nejčastěji vyznačuje zvýšenou hladinou cytokeratinů a receptorů adheze typických pro buňky bazálního epitelu (cytokeratiny 5, 6, 14 a 17 a integriny $\alpha 6$ a $\beta 4$). Tato skupina byla označena „basal-like“. „Normal breast-like“ skupina je čtvrtou a poslední skupinou mamárních karcinomů, sdílející profil genové exprese podobný s profilem normální prsní žlázy, ve které převládají adipocyty (2,3,4).

Skupina „basal-like“ (bazálních) karcinomů představuje přibližně 6-20% všech karcinomů prsu. Jejich definice na základě genové exprese nemá na úrovni fenotypu nádorových buněk naprosto jednoznačný kolerát, neboť ne všechny markery typické pro myoepiteliální buňky, ze kterých se předpokládá vznik „basal-like“ karcinomů, jsou detekovatelné. Příčin může být několik. K nejčastěji diskutovaným patří vznik „basal-like“ karcinomu z progenitorové buňky, která dosud plně nediferencovala, nebo odlišnosti v zapojení jednotlivých signálních drah v průběhu maligní transformace (5,6). Nicméně pro klinické účely jsou tak nejčastěji označovány „triple-negativní“ karcinomy, u kterých byla imunohistochemickým vyšetřením prokázána exprese minimálně jednoho z výše uvedených cytokeratinů bazálního epitelu a případně i dalších molekul (vimentin, EGFR, P-cadherin, c-kit, p53) (6-8). Výsledky posledních mikročipových studií do této skupiny řadí i medulární karcinom prsu (9).

Prognostická stratifikace pacientek na základě běžně používaných indexů fenotyp „basal-like“ karcinomu vůbec nezohledňuje, navíc může být negativní exprese Her-2 receptoru vnímána i jako prognosticky příznivý nález, a proto za určitých okolností pacientky s „basal-like“ karcinomem prsu nemusí být vůbec indikovány k adjuvantní chemoterapii. „Basal-like“ karcinomy přitom vykazují agresivní biologické chování, paradoxně však patří k chemosenzitivním tumorům (7,8). Jejich biologické vlastnosti lze částečně zdůvodnit vysokou frekvencí mutací genů BRCA1 a p53, hypermetylací BRCA1 promotoru, nadměrnou expresí EGFR receptoru a zvýšenou hladinou Ki-67, jenž koresponduje s proliferační aktivitou nádorových buněk. Existuje proto reálný předpoklad, že v případě zavedení individuálního postupu může nastat zlepšení léčebných výsledků „basal-like“ karcinomů**.** Již v současnosti je možné vůči pacientkám s triple-negativním fenotypem uplatňovat předpoklad agresivního chování choroby a indikovat adjuvantní léčbu chemoterapií i v případě I. klinického stádia. Pacientkám ve věku, který sám o sobě není indikací k vyšetření klinickým genetikem, je vhodné možnost testování na přítomnost mutace BRCA1 genu nabídnout. Vezmeme-li v úvahu molekulární alterace zastoupené u „basal-like“ karcinomů, je vysoce pravděpodobné, že brzy dojde k využití terapií přímo interferujících s těmito změnami. Nabízí se například léčba cíleně zaměřená na signální dráhu EGFR receptoru, kterou v současnosti představují aplikace monoklonálních protilátek nebo nízkomolekulárních inhibitorů jeho kinázové aktivity, přičemž tato skupina léčiv by mohla být za účelem stabilizace onemocnění podávána i dlouhodobě, podobně jako je tomu s tamoxifen u karcinomů s pozitivní expresí estrogenového receptoru. Jinou možností, v současnosti testovanou v rámci klinických studií, je podávání chemoterapeutických režimů na bázi derivátů platiny, vůči kterým jsou „basal-like“ karcinomy zvýšeně citlivé (4).

I v případě „luminal-like“ (luminálních) karcinomů byla prokázána prediktivní informace genové exprese ve vztahu k prognóze pacientek a k odpovědi na cílenou terapii tamoxifenem, a to ve prospěch podskupiny „luminal-like A“ ve srovnání s „luminal-like B“, pro kterou je některými autory před zahájením adjuvantní hormoterapie doporučována léčba cytostatiky, bez ohledu na dosavadní prognostická kritéria. Z pohledu klinické praxe je skupina „luminal-like B“ karcinomů charakterizovaná pozitivní, nicméně nižší, expresí estrogenového receptoru, případně alterací dalších signálních drah (Her-2, p53, Cyklin-D1). V současné

době jsou již komerčně dostupné testy predikující odpověď na hormonální i cytostatickou léčbu luminálních karcinomů na základě výsledků genové exprese (např. Oncotype DX, USA) (4,10).

Skupina Her-2 pozitivních karcinomů je rovněž charakteristická svým odlišným biologickým chováním. Uvedené skupině a zejména predikci odpovědi pacientek na cílenou terapii trastuzumabem věnujeme samostatný příspěvek.

Cílem naší přednášky je seznámit posluchače s molekulární taxonomií karcinomu prsu a prezentovat její klinické dopady, které spočívají zejména v možnosti individualizovat přístup a strategii léčby pacientů s tímto onemocněním. Souhrnnou práci na toto téma naleznete v časopisu Klinická onkologie (4).

***Poděkování**: práce byla podpořena grantovými projekty IGA MZČR: NR/8335-3 a NR/8270-3.*

Literatura

1. Svoboda M., et al. Lékař a technika 2004; 35:67-75.
2. Perou C.M., et al. Nature 2000;406(6797):747-52.
3. Sorlie T., et al. Proc Natl Acad Sci. 2003; 100(14):8418-23.
4. Svoboda M., et al. Klinická onkologie, Supplement 2006, str. 373-381.
5. Deugnier M. A., et al. Breast Cancer Res 2002;4(6):224-230.
6. Nielsen T., et al.Clin Cancer Res. 2004; 10(16):5367-74.
7. Rodriguez-Pinilla S.M., et al. Clin Cancer Res 2006; 12(5):1533-1539.
8. Jacquiemer J., et al. Proc. ASCO, JCO 2006, Vol 24., NO18S
9. Jacquiemer J., et al. Journal of Pathology 2005; 207:260-268.
10. Paik S, et al.J Clin Oncol 2006; 24:3726-3734.

127 Endoteliální dysfunkce u karcinomu prsu.

Tesařová P., Barkmanová J., Pazdrová G., Dlouhá Z., Mestek O., Soukupová J., Kalousová M., Zima T., Petruželka L.
Onkologická klinika, Praha

Pro metastazování nádorových buněk jsou mj. nutné změny vlastností endotelu, které mají alespoň některé rysy aktivace endotelu, resp. endotelové dysfunkce. Lze prokázat např. zvýšenou expresi adhezních molekul (např. E-selektinu), zvýšenou produkci protrombotických (thromboxan A2) a antifibrinolytických faktorů (např. PAI-1). Bylo prokázáno, že zvýšená exprese adhezních molekul (např. VCAM-1) je v přímém vztahu k nádorové angiogenezi. Některé další parametry endotelové funkce (vazodilatace při zvýšení průtoku či po vazodilatačních podnětech, produkce NO a volných radikálů, ale ani exprese von Willebrandova faktoru) nebyly dosud u pacientek s nádory systematicky studovány, takže v současné době nelze jednoznačně odpovědět na otázku, zda mají pacienti s nádory pouze některé známky aktivace endotelu, či zda lze změny endotelové funkce charakterizovat podobně jako u aterosklerózy jako generalizovanou endotelovou dysfunkci. U našich pacientek jsme studovali funkci endotelu v různých stadiích karcinomu prsu pomocí měření průtokem stimulované vazodilatace (flow mediated vasodilation) za současného sledování cirkulujících (solubilních) markerů aktivace endotelinu (E- a P-selektinu, VCAM-1, PAI-1, von Willebranova faktoru. Zjištěné změny funkce a známky aktivace endotelu byly vztaženy k prognóze nemocných, zejména k riziku generalizace původně lokalizovaného onemocnění.

Endotel tvoří jedvovrstevnou vnitřní výstelku cévního lumen.Celkový povrch endotelu představuje plochu asi 500-1000 m^2. Dlouho se předpokládalo, že endotel tvoří pouze pasivní buněčnou bariéru odddělující krev od cévní stěny a bránící extravazaci krve a jejímu srážení, ale výzkum posledních let ukázal, že endotel je vemi aktivní orgán s celou řadou fyziologických funkcí. Jednou z nejdůležitějších funkcí endotelu je regulace propustnosti cévní stěny pro buňky i makromolekuly. Extravazaci krevních elementů (zejména leukocytů) umožňuje exprese různých adhezních molekul (E-selektinu, P-selektinu, ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) buňkami endotelu. Endotel je také schopen regulovat regionální průtok krve tvorbou jak vazodilatačních (např. oxidu dusnatého, prostacyklinu a endotelového hyperpolarizujícího faktoru), tak vazokonstrikčních faktorů (např. endotelinu-1). Poškození endotelu má obvykle za následek převažující vazokonstrikci postižené cévy. Jestliže je narušena integrita endotelové bariéry, dochází k aktivaci von Willebrandova faktoru s následnou stimulací agregace krevních destiček a aktivací koagulační kaskády. Současně hraje endotel důležitou roli v antikoagulaci (váže antitrombin III a produkuje trombomodulin) a fibrinolýze (endotel syntetizuje jak tkáňová aktivátor plasminogenu – tPA, tak inhibitor aktivátoru plazminogenu – PAI-1). Mediátory uvolňované z endotelu (FGF2, TGFbeta, PDGF, NO) mohou stimulovat, nebo inhibovat proliferaci cévní intimy a hypertrofii cévní stěny a přispívat k angiogenezi.

Endotelová dysfunkce je definovaná jako funkční poškození endotelu, charakterizované zvýšenou propustností cévní stěny a nerovnováhou mezi různými vazoaktivními, koagulačními a proliferaci ovlivňujícícmi působky, která má za následek sklon k vazokonstrikci, trombotické diateze a nedostatečnou inhibici subendotelové proliferace intimy. Endotelová dysfunkce je tak

charakterizována nedostatečnou odpovědí na vazodilatační podněty (zvýšený průtok krve, nebo např. acetylcholin) s tendencí k vazokonstrikci, zvýšené expresi adhezních molekul s následnou infiltrací cévní stěny monocyty/makrofágy, zvýšenou tendencí k tvorbě destičkových trombů s porušenou fibrinolýzou a zvýšenou tvorbu volných radikálů přispívající k poškození cévní stěny a zvýšení její permeability.

Generalizovaná nebo lokalizovaná endotelová dysfunkce hraje také velmi významnou roli v patogenezi časné aterosklerózy, hypertenze, diabetických komplikací, srdečního a renálního selhání a sepse. K endotelové dysfunkci může přispívat řada faktorů poškozujících endotel, např. stárnutí, hypertenze, hyperlipoproteinémie, hyperglykémie, hypoxie, hyperhomocysteinémie, kouření, infekce, imunitní komplexy, nebo léčba cytostatiky.

Tvorba nádorových metastáz je závislá na změnách endotelové funkce, které mohou mít alespoň určitou podobnost s endotelovou dysfunkcí, např. zpomalení rychlosti toku krve, zvýšená produkce protrombotických (thromboxan A2) a antifibrinolytických (např. PAI-1) faktorů. Exprese adhezních molekul (E-selektinu, P-selektinu, VCAM-1) endotelem je nezbytná pro extravazaci nádorových buněk. Bylo prokázáno, že zvýšená exprese adhezních molekul (např. VCAM-1) má vztah k nádorové angiogenezi.

Tkáňová extravazace nádorových buněk, která je předpokladem vzniku metastáz, vyžaduje interakci mezi nádorovými buňkami a endotelem, velmi podobnou interakce endotelů s leukocyty před jejich extravazací v zánětlivě změněné tkáni. Tato interakce je zprostředkována adhezními molekulami jak ze selektinové rodiny (E-selektin a P-selektin), tak z imunoglobulinové superrodiny (ICAM-1 a VCAM-1). Nádorové buňky musí na svém povrchu exprimovat protireceptory těchto adhezních molekul, stejně jako aktivované leukocyty (lektiny a beta-1 a beta-2 integriny). Exprese adhezních molekul endotelem je stimulována cirkulujícími prozánětlivými cytokiny. Převládající typ exprimované adhezní molekuly může přispívat k lokalizaci metastáz, např. E-selektin je preferenčně exprimován v jaterní cirkulaci, zatímco VCAM-1 je preferenčně exprimován v cirkulaci plicní. Zvýšené sérové hladiny solubilního E-selektinu byly skutečně nalezeny u pacientů s metastatickým karcinomem prsu, nejvyšší sérové hladiny E-selektinu měly pacientky s metastatickým karcinomem prsu s jaterními metastázami. Pacientky s karcinomem prsu s vysokými sérovými koncentracemi solubilního E-selektinu mělya více vyjádřenou nádorovou angiogenezia významně kratší dožití. Solubilní E-selektin byl u pacientek s karcinomem prsu identifikován jako nezávislý negativní prognostický faktor. Jinou adhezní molekulou, která může hrát důležitou roli v tvorbě nádorových metastáz, je P-selektin. Protireceptorem P-selektinu na nádorových buňkách je CD24 (mucinová molekula). Podání solubilního CD24 nebo selektivní deplece CD24 z povrchu nádorových buněk snížila významně metastatický potenciál buněk karcinomu prsu. Jiné (a obvykle běžnější) protireceptory P- a E-selektinu (sialyl Lewis(x) a sialyl Lewis(a)) nejsou normální epiteliemi prsní žlázy exprimovány, exprimují je ale buňky karcinomu prsu.

V našich předchozích studiích jsme zjistili, že pacientky s metastatickým (i nemetastatickým) karcinomem prsu mají zvýšené hladiny E- a P-selektinu a ICAM-1. Sérové hladiny P-selektinu u těchto pacientek těsně korelovaly se sérovými hladinami TNFalfa. Sérové hladiny solubilního VCAM-1 sice nebyly u pacientek s karcinomem prsu ve srovnání s kontrolami zvýšeny, ale pacientky s metastatickým (stadium IV) karcinomem prsu měly sérové hladiny solubilního VCAM-1 vyšší než pacientky s lokalizovaným onemocněním (stadium 0-I). Sérové hladiny solubilního VCAM-1 i P-selektinu u pacientek s karcinomem prsu významně poklesly tři měsíce a jeden rok po zahájení léčby. Sérové hladiny ICAM-1 u těchto pacientek po léčbě také významně klesly, zůstávaly ale stále ve srovnání s kontrolami výrazně zvýšeny.

Je zřejmé, že jak metastazování, tak angiogeneze jsou velmi komplexní děje, kdy event. „endotelová dysfunkce“ může být pouze jedním z faktorů v proponované patogenetické kaskádě (vedle aktivace řady cytokinů, růstových faktorů, proteáz, aj.). Generalizovaná endotelová dysfunkce také nemůže zcela vysvětlit specifické metastazování nádorů do různých tkání. Předpokládáme, že by „endotelová dysfunkce“ mohla být nutnou, ale nikoli postačující podmínkou pro metastazování a angiogenezi.

Karcinom prsu je v naší republice stále velmi závažným problémem. Ročně onemocní touto diagnózou více než 5 tisíc nemocných. Rychle se rozvíjející mammografický skríninkový program umožňuje časnější záchyt karcinomu prsu, a tím nám dává šanci soustředit se zejména na prevenci pozdní generalizace onemocnění. Identifikace časných markerů endotelové aktivace a endotelové dysfunkce by mohlo umožnit včas diagnostikovat pacientky s vysokým rizikem generalizace (tvorby metastáz), které by měli být zřejmě častěji kontrolovány, event. by tento nález mohl v budoucnu určitým způsobem modifikovat i terapeutický postup.

V naší studii jsme se zaměřili zejména na zvlášť rizikovou skupinu premenopauzálních pacientek do 40 let. U těchto pacientek vyšetřujeme nejen markery aktivace endotelu, ale také průtokem stimulovanou vazodilataci pomocí dopplerovské sonografie. U těchto pacientek bychom měli být schopni minimalizovat riziko ovlivnění endotelové funkce aterosklerózou.

První výsledky z vyšetření 57 pacientek chceme prezentovat v tomto sdělení.

Výzkum byl podpořen Grantem České onkologické společnosti a grantem IGA NR-9020.

128 Nestin pozitivní progenitorové buňky v karcinomech prsu: korelace s expresí ER, PR a c-erbB-2.

Kolář Z.[1], Turashvili G.[1], Ehrmann J. jr.[1], Škarda J.[1], Chmelová J.[2], Mokrý J.[3]
1) Ústav patologie a Laboratoř molekulární patologie LF UP, 77515 Olomouc, kolarz@tunw.upol.cz
2) Ústav zobrazovacích metod ZSF OU a RDG ústav FN Ostrava
3) Ústav histologie a embryologie, LF UK, Hradec Králové

Úvod

Nestin (**ne**uroepithelial **st**em cell prote**in**) je protein řadící se mezi tzv. intermediární filamenta, který je považován za marker neurálních kmenových buněk. Jeho exprese byla rovněž potvrzena v četných tkáních jako jsou progenitorové buňky kůže, vlasového folikulu, střevní sliznice, pankreatu, kostní dřeně, svalů a dalších tkání. Nedávno jsme jeho expresi popsali v mozkových nádorech, v aktivovaném endotelu, myoepiteliální vrstvě vývodů a acinů mléčné žlázy i mammárních karcinomech.

Cíl

V této studii jsme se zaměřili na srovnání frekvence a intenzity jeho exprese v invazivních duktálních karcinomech mléčné žlázy s některými prediktivními parametry, jako jsou exprese receptorů pro estrogeny (ER), progesteron (PR) a exprese receptorové tyrosin kinázy c-erbB-2/HER2/neu (c-erbB-2).

Materiál a metodika

Analyzovali jsme expresi výše uvedených znaků detegovaných pomocí nepřímé imunohistochemické metody (primární monoklonální protilátka proti nestinu, klon 10C2, kat. č. MAB5326, Chemicon International, ředění 1:100; primární monoklonální protilátka proti ER, klon 1D5, kat. č. M7947, Dako, ředění 1:40; primární polyklonální protilátka PR, kat. č. A0098, Dako, ředění 1:50; primární polyklonální protilátka proti c-erbB-2, kat. č. A0485, Dako, ředění 1:100; sekundární barvící a zesilovací systém EnVision-HRP, kat. č. K4001/K4003, Dako, dle instrukcí výrobce; použita metodika obnovení antigenicity pomocí mikrovlnného generátoru v citrátovém pufru pH 7.0; aktivita peroxidázy byla vizualizována pomocí diaminobenzidinu) ve 100 archivních ve formalínu fixovaných a do parafínu zalitých tkáňových vzorcích invazivního duktálního karcinomu mléčné žlázy a v tkáňové mikroereji zkonstruované ze 109 dalších případů výše uvedeného histologického typu karcinomu. Pro vyhodnocení statistické signifikance zjištěných rozdílů jsme použili podle charakteru měřených parametrů buď Studentův t test nebo ÷2 test.

Výsledky

Nalezli jsme expresi nestinu ve stromálních elementech pravděpodobně odpovídajících prekurzorům endotelií i v diferencovaném novotvořeném endotelu nádorových kapilár (pozitivita CD34), v daleko menším počtu případů také v elementech současně exprimujících cytokeratin (AE1AE3). Prokázali jsme signifikantní rozdíly v expresi nestinu ve stromálních elementech nádorů s imunofenotypem ER+, PR+/c-erbB-2- oproti imunofenotypu ER-, (PR+-) /c-erbB-2+.

Závěr

Domníváme se, že nález nestin pozitivních buněk v mammárních nádorech může svědčit pro přítomnost progenitorových buněk v nádorovém stromatu, které mohou diferencovat jednak směrem k nádorovým endoteliím a jednak směrem k nádorovému epitelu. Předpokládáme, že jejich denzita by mohla odhalit angiogenetický potenciál každého nádoru a že stanovení exprese nestinu v nádorech by mohlo sloužit k odhadu jejich biologického chování se zřejmým prognostickým i prediktivním významem.

Práce byla podpořena MSM 6198959216 a MSM 0021620820.

129 Tpl2/Cot jako nový prognostický a prediktivní znak u karcinomů mléčné žlázy?

Krčová Z.[1], Ehrmann J.[1], Eliopoulos A.[2], Turashvili G.[1], Klein J.[3], Škarda J.[1], Fridman E.[4], Krejčí V.[1], Zapletalová J.[5], Kolář Z.[1]
1) Laboratoř molekulární patologie a Ústav patologie LF UP a FN Olomouc
2) Molecular and Cellular Biology Laborartory, Basic Science Division, University of Crete Medical School, Heraklion, Crete, Greece
3) I.chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc
4) Department of Pathology, Sheba Medical Centre, Tel-Hashomer, Izrael
5) Pracoviště lékařské biometrie LF UP Olomouc

Tpl2/Cot je protoonkogen kódující serin/threoninovou kinázu. Inhibice funkce Tpl2/Cot vede k jeho neschopnosti aktivovat signální dráhu ERK-MAPK, která mimo jiné reguluje syntézu cytokinů TNF-α aIL-1 a expresi cyklooxygenázy COX-2. Dále

dochází k poruchám signalizace zprostředkované proteinem NF-κB. Zmíněné molekuly jsou ale také ovlivňovány signální dráhou zprostředkovanou proteiny rodiny STAT. Tato signální dráha se podílí nejen na modulaci imunitní odpovědi, ale přispívá i ke vzniku mnoha typů nádorů. U maligních nádorů bývají nadměrně exprimovány zejména proteiny STAT3. Můžeme tedy hypoteticky předpokládat korelaci mezi expresí STAT a Tpl2/Cot, tento vztah však dosud nebyl sledován.

Nejnovější studie prokázaly nadměrnou expresi Tpl2/Cot mRNA u 40% z 35 případů karcinomů mléčné žlázy. Experimentální zvýšení exprese Tpl2 u některých buněčných linií karcinomů mléčné žlázy vedlo k aktivaci exprese COX-2. COX-2 je nadměrně exprimován u cca 40% karcinomů mléčné žlázy a zdá se, že u těchto nádorů hraje důležitou roli zejména v regulaci angiogeneze, proliferace, diferenciace a apoptózy. Práce zabývající se expresí Tpl2/Cot, COX-2 a STAT na úrovni proteinů a na detailněji definovaných skupinách karcinomů mléčné žlázy však chybí. Proto cílem této pilotní studie byla analýza exprese proteinů TPL-2, COX-2 a STAT1,3,5 pomocí monoklonálních protilátek nepřímou imunohistochemickou metodou v tkáňových mikroerejích (TMA) sestávajících z 32 případů invazivních duktálních karcinomů a její korelace se expresním profilem hormonálních receptorů a c-erbB-2.

Výsledky ukazují statisticky signifikantně zvýšenou expresi Tpl2/Cot u c-erbB-2 negativních nádorů (p=0,001). Toto zvýšení koreluje se signifikantně zvýšenou jadernou expresí STAT3 u stejné skupiny nádorů (p=0,014). Naopak, analýza rozptylu v multivariátní analýze prokázala signifikantně nižší hodnoty exprese STAT1 u nádorů charakterizovaných imunofenotypem ER+/PR+/cerb2- oproti ostatním nádorům (p=0,001). Exprese COX-2 byla zvýšena u všech sledovaných skupin. Sledování exprese ostatních proteinů nepřineslo statisticky signifikantní korelace.

Výsledky naznačují, že přítomnost kombinace nadměrné exprese Tpl2/Cot a STAT3 spolu se sníženou expresí STAT1 u c-erB-2 negativních nádorů by mohla u karcinomů mléčné žlázy být dalším významným prognostickým a prediktivním znakem

Práce podpořena granty VZ MSM 6198959216 a 6FP LSHC-CT-2006-037344

130 Význam nových proteinů asociovaných s extracelulární matrix u invazivních karcinomů prsu.

Bouchal J.[1], Turashvili G.[1], Baumforth K.[2], Wei W.[2], Dziechciarková M.[3], Škarda J.[1], Ehrmann J.[1], Hajdúch M.[3], Kolář Z.[1]

1) Laboratoř molekulární patologie & Ústav patologie, LF UP a FN Olomouc
2) Institute of Cancer Studies, University of Birmingham, United Kingdom
3) Laboratoř experimentální medicíny LF UP a FN Olomouc

Invazivita nádorů představuje jeden z klíčových momentů karcinogeneze a souvisí s metastatickým procesem a špatnou prognózou nádorového onemocnění. Invazivní růst nádorových buněk mimo jiné souvisí se změnami buněčných interakcí, a to jednak mezi sebou navzájem, a jednak s extracelulární matrix. Dochází k rozrušení bazální membrány i stromálního prostředí, následně k migraci krevním nebo lymfatickým řečištěm a k další proliferaci a invazi v sekundárním ložisku nádoru.

V naší práci bylo analyzováno celkem deset pacientek, pět s invazivním duktálním a pět s invazivním lobulárním karcinomem. Nádorová i normální tkáň byla ihned po operaci zmražena v kapalném dusíku. Kryořezy fixované v alkoholu a obarvené hematoxylinem byly mikrodisekovány pomocí přístroje Veritas od firmy Arcturus. Od každé pacientky byly mikrodisekovány tři populace buněk (nádorová, normální duktální a normální lobulární). Celková RNA z asi tisíce buněk byla izolována pomocí RNeasy Micro kitu od firmy Qiagen a kvantifikována pomocí spektrofotometru Nanodrop. Následovala amplifikace a značení pomocí Microarray kitu od firmy Roche. Samotná analýza genové exprese byla provedena na čipech HG-U133 Plus 2.0 od firmy Affymetrix. Srovnání genové exprese bylo provedeno mezi jednotlivými populacemi buněk i mezi pacientkami navzájem. K validaci výsledků byla použita imunohistochemie a in situ hybridizace.

Nejvýraznější rozdíly byly nalezeny v genech se vztahem k extracelulární matrix, a to jak mezi normálními a nádorovými buňkami, tak mezi duktálními a lobulárními karcinomy. Zvýšenou expresi u buněk obou nádorových typů vykazovaly především genz pro několik typů kolagenů (COL1A2, COL1A1, COL3A1, COL5A2, COL11A1), fibronectin 1, LRRC15 (leucine rich repeat containing 15) a CSPG2 (chondroitin sulfate proteoglycan 2). Výrazný nárůst exprese u lobulárních karcinomů dále vykazovaly geny pro asporin a CTHRC1 (collagen triple helix containing 1) a u duktálních karcinomů gen pro kolagen typu 10 (COL10A1). Dle literárních údajů byly některé proteiny byly asociovány s nádorovým procesem teprve nedávno (LRRC15, CTHRC1), přičemž přesný význam asporinu v karcinogenezi není znám zatím vůbec. Zvýšenou expresi asporinu v lobulárních karcinomech se nám podařilo verifikovat pomocí in situ hybridizace. Výše uvedené změny souvisí s alteracemi signálních drah Wnt a TGFbeta a s fenoménem tzv. epiteliálně mezenchymálního přechodu nádorových buněk.

Práce byla podpořena granty NR 7844-3 a MSM 6198959216.

131 Amplifikace Her-2/neu a/nebo cyklinu D1, případně negativita progesteronového receptoru, definují pacientky s vysokým rizikem relapsu mammárního karcinomu při adjuvantní léčbě Tamoxifenem.

Petráková K.[1], Vyskočil J.[1], Palácová M.[1], Fabian P.[2], Knoflíčková D.[2], Hanzelková Z.[2], Nenutil R.[2]
1) Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav v Brně.
2) Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav v Brně.

V souvislosti se zaváděním inhibitorů aromatázy do adjuvantní léčby karcinomu prsu je stále častěji diskutována možnost predikce selhání adjuvantní léčby Tamoxifenem (TX) z parametrů primárního nádoru. V prezentované studii jsme se pokusili validovat některé z parametrů, uváděných v této souvislosti, na vlastním materiálu.

Analýzou zdravotnické dokumentace byly vyhledány případy mammárního karcinomy s dostupným minimálně pětiletým sledováním, léčené v MOÚ během let 1993-2001. Podmínkou bylo, aby tyto pacientky měly v průběhu adjuvantní léčby TX biopticky verifikovanou lokální recidivu a/nebo disseminaci nádoru. Ze 40 dostupných bioptických vzorků takových primárních nádorů byly vytvořeny složené tkáňové bloky (tissue miroarrays, TMA) na kterých byla provedena semikvantitativní imunohistologická analýza (IHC) běžných prediktivních parametrů (estrogenový (ER) a progesteronový (PR) receptor), doplněná o stanovení Her-2/neu imunohistologicky a FISH, imunohistologii bcl-2, a imunohistologické a FISH stanovení cyklinu D1. Jako kontrolní soubor sloužily konsekutivní soubory ER pozitivních mammárních karcinomů z let 1994-1995 zpracované obdobným způsobem. Byly hodnoceny pouze nádory s IHC pozitivitou steroidních receptorů.

Velikost nádoru, postižení axilárnícjh uzlin, grade ani exprese Bcl2 se neprokázaly jako prediktivní faktory rezistence k Tamoxifenu. Dobrými prediktory se zdají být zvýšená exprese (2+ nebo 3+), případně FISH amplifikace Her-2/neu (p=0,04), exprese PR pod 50%(p=0,02) a amplifikace cyklinu D1 (p0,001).

Pokud definujeme pacientky s některým z těchto faktorů (tj. amplifikace cyklinu D1 a/nebo amplifikace Her-2/neu, a/nebo exprese PR pod 50%) jako „rizikové“ z hlediska selhání adjuvance TX, v testovaném souboru jich bylo 80%, zatímco v ER pozitivních kontrolách 36% (p=0,03). Tento přístup se jeví jako použitelný k indikaci inhibitorů aromatázy do první linie adjuvantní hormonoterapie karcinomu prsu.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR 8270-3

132 Intratumorální T lymfocyty u karcinomu prsu léčeného neoadjuvantní chemoterapií.

Hornychová H., Melichar B., Tomšová M., Ryška A.
Fingerlandův ústav patologie a Klinika onkologie a radioterapie Lékařské fakulty UK a Fakultní nemocnice Hr. Králové

Úvod

Již dlouhou dobu je v oblasti biologických vlastností nádorů předmětem studia vztah mezi nádorem a imunitním systémem. Ten hraje důležitou roli v obraně organismu proti nádorovému bujení, některé imunitní reakce však působí opačně a růst tumoru podporují mimo jiné také podílem v indukci angiogeneze. V obraně proti nádorovému bujení jsou T lymfocyty spolu s NK buňkami nejdůležitější efektorovou strukturou a jsou také jednou z cílových struktur při protinádorové imunoterapii (například aktivace T lymfocytů pomocí stimulace interleukinem 2 používaná v terapii renálního karcinomu).

Prognostický význam lymfocytů v nádoru je studován již několik desetiletí. V poslední době se začaly rozlišovat tumor infiltrující (intraepiteliální) a tumor asociované (stromální) lymfocyty. Prognostický význam má pravděpodobně pouze první zmiňovaná kategorie a to konkrétně $CD8^+$ cytotoxické T lymfocyty a TH1 subset $CD4^+$ T lymfocytů. Význam protilátkové imunity a B lymfocytů se v protinádorové imunitě nejeví jako zásadní. Za příznivý prognostický faktor se považuje jak vyšší počet $CD3^+$ (obecný T lymfocytární marker) tak i $CD8^+$ tumor infiltrujících lymfocytů. Naproti tomu tento vztah není popisován u $CD4^+$ lymfocytů, protože TH2 subset produkuje cytokiny s angiogenním působením a proto má pravděpodobně spíše pronádorový vliv.

Prezentovaná studie se zabývá vztahem $CD3^+$ lymfocytů k odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii u karcinomu prsu. Cílem bylo posouzení jak jejich prediktivního významu, tak i změn v aktivitě imunitního systému po proběhlé chemoterapii. Důvodem pro druhý z cílů byl předpoklad, že k cytotoxické aktivitě $CD8^+$ T lymfocytů je důležité prezentování antigenu národových buněk. Při chemoterapii dochází k apoptóze nádorových buněk a jejich antigeny jsou proto dostupnější, a proto lze předpokládat vzestup počtu tumor infiltrujících lymfocytů. Výsledky byly korelovány s průkazem standardně vyšetřovaných imunohistochemických markerů: estrogenových a progesteronových receptorů, proliferačního markeru Ki-67, onkoproteinu p53 a onkoproteinu HER2/neu.

Metodika

U každé ze 73 pacientek sledovaných na Klinice onkologie a radioterapie FN Hradec Králové, léčených neoadjuvantní chemoterapií – kombinací paclitaxelu a doxorubicinu -v letech 1998-2003, byl vyšetřován vzorek z jehlové biopsie prsu nebo drobné kožní excize (u tumorů infiltrujících kůži) odebraný před podáním neoadjuvantní chemoterapie a následně resekát prsu. Pacientky byly vybírány na základě dostatečného množství materiálu v tkáňových blocích (zejména v případě jehlové biopsie). Materiál byl standardně zpracováván, byl fixován 10% formalínem a zalit v parafinu. Řezy silné 4 m byly barveny hematoxylinem eosinem. Imunohistochemická barvení byla prováděna streptavidin-biotinovou metodou s peroxidázovým detekčním systémem (EnVision, DAKO). Použité markery: CD 3 (polyklonální, DAKO), estrogenové receptory (1D5, DAKO), progesteronové receptory (PgR636, DAKO), Ki-67 (MIB-1, DAKO), p53 (DO-7, DAKO). Ke zhodnocení HER2/neu byl použit standardizovaný kit HercepTestTM (DAKO)

Metodika hodnocení počtu lymfocytů byla stejná pro vzorky před i po chemoterapii. Počítána byla průměrná hodnota ze tří zorných polí při zvětšení 400x a maximální hodnota. Zvlášť byly hodnoceny elementy intraepiteliální a zvlášť lymfocyty ve stromatu. Stejný systém hodnocení byl použit pro kvantifikaci lymfocytů v normální prsní žláze. Ostatní rutinně vyšetřované markery byly hodnoceny pouze v invazivním tumoru a to standardními metodikami (u ER a PR imunoreaktivní skóre, procento Ki-67 pozitivních nádorových buněk, semikvantitativní hodnocení p53 včetně procenta pozitivních nádorových buněk a HER skóre dle doporučení výrobce kitu).

Statistické hodnocení bylo provedeno Mann-Whitneyovým testem a T testem.

Výsledky

Věk pacientek v souboru se pohyboval od 22 do 75 let, medián věku 56 let. Patologická kompletní odpověď, zde braná jako nepřítomnost tumoru v resekátu (tj. ani in situ komponenty) a nepostižené lymfatické uzliny, se vyskytla u 10 pacientek (tj. 16%).

Histologický typ tumoru ve vzorcích před chemoterapií:

	pCR	non pCR
duktální	60%	5%
lobulární	30%	19%
ostatní	10%	6%

Stupeň diferenciace tumoru ve vzorcích před chemoterapií:

	pCR	non pCR
grade 1	10%	3%
grade 2	50%	49%
grade 3	40%	48%

Srovnání lymfocytů v tumoru před chemoterapií dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR	non pCR
CD3 tumor infiltrující lymfocyty max.	14 ± 14	5 ± 7
CD3 tumor infiltrující lymfocyty prům.	7 ± 8	2 ± 3
CD3 tumor asociované lymfocyty max.	263 ± 251	213 ± 162
CD3 tumor asociované lymfocyty prům.	34 ± 30	47 ± 52

Srovnání lymfocytů v tumoru před a po chemoterapii:

	před NCHT	po NCHT
CD3 tumor infiltrující lymfocyty max.	7 ± 8	10 ± 16
CD3 tumor infiltrující lymfocyty prům.	3 ± 4	2 ± 6
CD3 tumor asociované lymfocyty max.	220 ± 176	359 ± 370
CD3 tumor asociované lymfocyty prům.	45 ± 49	41 ± 90

Srovnání lymfocytů v normální prsní tkáni po chemoterapii dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR	non pCR
CD3 intraepiteliální lymfocyty max.	18 ± 12	19 ± 20
CD3 intraepiteliální lymfocyty prům.	8 ± 7	8 ± 10
CD3 stromální lymfocyty max.	116 ± 104	133 ± 174
CD3 stromální lymfocyty prům.	28 ± 34	25 ± 29

Ostatní markery před chemoterapií dle odpovědi na chemoterapii:

	pCR	non pCR
p53 (%)	31 ± 38	13 ± 27
ER (IRS)	5 ± 5	5 ± 5
PR (IRS)	1 ± 3	4 ± 4
Ki67 (%)	36 ± 26	26 ± 20

	pCR	non pCR
HER skóre 0	40%	40%
HER skóre 1	30%	34%
HER skóre 2	10%	13%
HER skóre 3	20%	13%

Srovnání ostatních markerů před a po chemoterapii:

	před NCHT	po NCHT
p53 (%)	11 ± 25	12 ± 24
ER (IRS)	6 ± 5	5 ± 4
PR (IRS)	4 ± 4	6 ± 5
Ki67 (%)	26 ± 20	16 ± 21

	před NCHT	po NCHT
HER skóre 0	40%	34%
HER skóre 1	34%	43%
HER skóre 2	12%	8%
HER skóre 3	14%	15%

Statisticky významný rozdíl byl u následujících položek:

- U maximálních (p = 0,004) a průměrných (p = 0,05) hodnot tumor infiltrujících lymfocytů mezi skupinami s pCR a bez pCR.
- U maximálních hodnot tumor infiltrujících (p = 0,05) i asociovaných (p = 0,004) lymfocytů mezi skupinami před a po chemoterapii.
- U p53 (p = 0,03) a progesteronových receptorů (p = 0,01) mezi skupinami s pCR a bez pCR.
- U Ki 67 mezi skupinami před a po chemoterapii (p = 0,0002).

Diskuze

Tumor infiltrující lymfocyty byly v souvislosti s neoadjuvantní chemoterapií dosud sledovány pouze v jedné studii (Demaria a kol.: Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chmotherapy) čítající 25 pacientek. Hodnocení bylo semikvantitativní, hodnoceny byly pouze tumor infiltrující lymfocyty. Výsledky srovnání počtu tumor infiltrujících lymfocytů před a po chemoterapii však byly podobné jako v našem souboru. Prediktivní význam tumor infiltrujících lymfocytů zde nebyl prokázán. Náš soubor je také poměrně malý (skupina pCR čítá pouze 10 pacientek), nicméně vztah mezi tumor infiltrujícími lymfocyty a odpovědí na chemoterapii se zdá patrný a ukazuje na vhodnost ověření na větším souboru. Mimo tyto hodnoty jsme se pokusili zhodnotit rozdíl mezi resekáty po neoadjuvantní chemoterapii pacientek s pCR a bez ní hodnocením lymfocytů v normální prsní tkáni, zde není patrný výraznější rozdíl, proto se zdá, že odpověď na chemoterapii závisí více na vlastnostech tumoru (včetně toho jakou odpověď imunitního systému indukují) než na obecném stavu imunitního systému, nicméně i zde je třeba brát výsledky vzhledem k malému rozsahu souboru pouze jako předběžné.

Prediktivní hodnota odpovědi na chemoterapii byla v souladu s literárními údaji prokázána u exprese progesteronového receptoru a u onkoproteinu p53. Literárně jsou udávány jako predikční faktor také vyšší grade, vyšší proliferační aktivita, negativita exprese estrogenového receptoru a overexprese onkoproteinu HER2/neu, u nichž byl (kromě stupně diferenciace a exprese estrogenových receptrorů) v našem souboru patrný rozdíl mezi skupinou bez reziduálního tumoru a ostatními pacientkami, ovšem nedosahoval statistické významnosti. Důvodem může být poměrně malý soubor i metodické nedostatky.

Závěr

Naše studie ukazuje, že mimo známého prognostického významu tumor infiltrujících lymfocytů, jsou tyto velmi pravděpodobně i prediktivním markerem v odpovědi na chemoterapii. Ze vzestupu maximálních hodnot T lymfocytů v tumoru po chemoterapii lze usuzovat na jejich úlohu v likvidaci nádorových buněk (resp. úklidové reakci) při chemoterapii. Jde o další posun vpřed v poznání reakcí mezi tumorem a imunitním systémem, i když zatím bez možnosti konkrétníno terapeutického dopadu pro pacientky.

Práce byla podpořena grantem MZ ČR IGA NR 8392-3/2005.

XV.
Léčba karcinomu prsu

133 Chirurgická terapie multifokálního a multicentrického karcinomu prsu.

Julínek S., Winkler L., Sečkařová D.
Oddělení jednodenní chirurgie Palas-Athéna, Praha 4
Radiodiagnostické oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice Praha 4

V souvislosti s vícečetnými ložisky karcinomu prsu se používají dva různé pojmy a to multifokální a multicentrický karcinom. Terminologie není zcela jednotná a používající se různá hlediska k odlišení těchto dvou jednotek. Nejjednodušší je použít kritérium kvadrantu, kdy u multifokálního karcinomu jsou ložiska ve stejném kvadrantu, zatímco u multicentrického karcinomu se nacházejí ložiska v různých kvadrantech. Tato jednoduchá definice, ale může v některých situacích být nejednoznačná. Jedná se o případy, kdy ložiska se nacházejí na hranicích kvadrantu. Další komplikací je, že hranice kvadrantu je trochu abstraktní pojem, není sofistikovaně vymezena. Proto bylo zavedeno další kritérium. A to je vzdálenost dvou ložisek, která u multifokálního ca by neměla přesáhnout 5cm.

Na vznik multiplicitních ložisek karicnomu prsu existují přinejmenším 2 teorie. Většinový názor je takový, že u multifokálního karcinomu se předpokládá šíření nádorových buněk z primárního ložiska do okolí hematogenní, lymfogenní a duktální cestou a vytvářejí se satelitní ložiska. Naproti tomu u multicentrického karcinomu vznikají ložiska samostatně, na sobě nezávisle tzv. „de novo“. Tyto názory jsou podloženy výsledky chromozomálních, imunohistochemických a dalších vyš., která prokázala, že u multifokálního nádoru mají jednotlivá ložiska velmi podobné znaky. U multicentrického karcinomu prsu tato shoda byla daleko menší.

Na poli diagnostiky je zřejmé, že předoperační diagnostika standardními zobrazovacími metodami (mammografie a sonografie) prsní žlázy podhodnocuje výskyt vícečetných nádorových ložisek. V předoperačním stagingu se ukazuje, že MR je nejsenzitivnější metoda mimo jiné i v diagnostice vícečetných ložisek karcinomu prsu. Specifita MR vyšetření u ca prsu je nižší, problematická je dále dostupnost a vysoká cena vyšetření.

S výsledky zobrazovacích metod výrazně kontrastují fakta při patologickém zpracování. V patologických studiích, kde byla provedena mastektomie a unifokálního tumoru, byl dodatečně diagnostikován další karcinom v 20-63% případů. Je pravdou, že část těchto sekundárních ložisek má velikost v několika mm a je zjištěna jen při mikroskopickém vyšetření. Tedy ani nemohou být diagnostikovány v rámci předoperačního stagingu.

Terapie multifokálního karcinomu na rozdíl od karcinomu multicentrického nemusí být vždy ablativní. Dle některých recentních studií je možný prs zachovávající výkon u multifokálního karcinomu, jsou-li splněny kritéria jako negativní resekční okraje a další. Je dosaženo velmi podobných výsledků v parametrech lokoregionální recidivy a přežití pacientek po parciální mastektomii u unifokálního tak multicentrického karcinomu.

Závěr

V rámci předoperačního stagingu není diagnostika vícečetných ložisek karcinomu prsu častá a v převážné většine případů nastává teprve při patologickém zpracování. Dopadem této skutečnosti je ablace prsu v 2. době a s tím související stresující situace pro pacientku jako jsou opakovaná hospitalizace a další operační zákrok. Není dnes pochyb, že nesjpolehlivější metoda v zobrazení multiplicitních ložisek tumoru je dosaženo MR vyšetřením. Na druhou stranu nelze každý ca prsu z důvodů vysoké ceny vyšetření a také omezené dostupnosti vyšetřovat pomocí MR.

Na základě recentních studií, které srovnávaly přežití a lokální recidivu po parciální mastektomii mezi unifokálním a multifokálním karcinom prsu, není nutná ablace prsu v terapii multifokálního ca prsu.

134 Stanovení cílových objemů pro ozařování axilární oblast u karcinomu prsu.

Dolečková M.[1], Haloun K.[2], Chromý M.[2], Kutová J.[1], Kučera P.[1], Studynková A.[1], Malecha P.[1]
1) Onkologické odd. Nemocnice Č.Budějovice a.s.
2) Chirurgické odd. Nemocnice Č.Budějovice a.s.

Úvod

Lokální a regionální kontrola u časných karcinomů po prs šetřící léčbě (parciální mastektomie, axilární uzlinová disekce, ozáření prsu) je významná a může zlepšit přežití. Přítomnost nebo nepřítomnost, stejně tak jako počet metastatických axilárních uzlin, zůstává základním údajem pro další léčbu a predikci léčebných výsledků. Disekce axilárních uzlin na druhé straně zvyšuje riziko vedlejších komplikací (lymfedém, neuropatie, zhoršená pohyblivost končetiny, bolest aj.) Biopsie sentinelové uzliny v axile u pacientek s klinicky negativními regionálními uzlinami přinesla snížení morbidity, protože nenásledovala kompletní disekce axilárních uzlin I. a II. etáže. Disekce axilárních uzlin se standardně provádí u pacientek s klinicky pozitivními uzlinami. Tento výkon zajišťuje jednak informaci o prognóze a také benefit s ohledem na lokální kontrolu a pravděpodobně i přežití (Fischer B. et al. 1983, 1985, Orr RK. et al.1999). Nárůst komplikací je pozorován u kombinace kompletní axilární disekce a ozáření axily. Iatrogenní poškození, např. otok horní končetiny se vytvoří až ve 37%, zatímco u kombinace biopsie a ozáření je toto riziko pouze v 7% (Larson D.1986, Dewar JA.1988).

Jeden úhel pohledu na problém axilárních uzlin je morbidita a druhý je lokální kontrola onemocnění. Nezvládnuté axilární recidivy jsou významným klinickým problémem. Znalost a zkušenost radioterapeuta by mělo zohlednit oba problémy.

Axilární uzliny I. a II. etáže – kdy ozařovat ?

Riziko recidiv v axile u klinicky negativních axilárních uzlin po parciální mastektomii a ozáření a bez axilární disekce je poměrně nízké – 3% (Takeda A. et al. 2000). U 33-66% pacientek s pozitivní sentinelovou uzlinou byly nalezeny reziduální metastatické axilární uzliny (Galper S. et al. 2000). Standardní léčbou po kompletní disekci axilárních uzlin I. a II. etáže u pacientek s jasným uzlinovým postižením (4 a více metastatických uzlin nebo extranodální šíření) je ozáření nadklíčkové oblasti, tj. apexu axily a nadklíčkové jamky (Reed D.R. et al. 2005). Tangenciální pole potom nezaujímají axilární uzliny I. a II. etáže, protože tato oblast byla léčena chirurgickou disekcí uzlin. Pro tyto pacientky je riziko recidivy především v oblasti podklíčkové a nadklíčkové.

Za indikaci k ozáření axilárních uzlin I. a II. etáže se považuje jejich histologická pozitivita s neúplnou disekcí nebo klinická pozitivita a jejich úplná disekce. Recidivy u pacientek s neúplnou disekcí axilárních uzlin I. a II. etáže jsou lokalizovány častěji do této oblasti, naopak po standardní disekci jsou častěji v pod- a nadklíčkové lokalitě (jako součást regionální recidivy ve 14% I. a II. etáž versus 47% pod- a nadklíček, Katz A. et al. 2000).

Axilární uzliny I. a II. etáže – jaké hranice ?

Znalost anatomie axilární oblasti je potřebná ke správné lokalizaci prvních dvou etáží axilárních uzlin – jejich topografický vztah k prsu. Zaujmutí oblasti axilárních uzlin I. a II. etáže do plánovacího cílového objemu (PTV) pro tangenciální pole není standardní praxí. Z hlediska recidivy, ale i morbidity, je důležité definovat rizikový axilární objem, zahrnout dolní dvě axilární etáže do PTV tangenciálních polí a zhodnotit zde dávkovou distribuci. Nejčastější je zakreslování PTV pro prs a axilární uzliny I. a II. etáže podle anatomických hranic, někteří autoři posuzují tuto oblast podle rtg kontrastních svorek, umístěných chirurgem v disekované axille (Schlembach PJ. 2001, Aristel C. 2001, Reed DR. 2005).

Anatomické hranice axilárních uzlin I. a II. etáže: horní okraj: a. a v. axillaris; dolní okraj: m. latissimus dorsi s fascií při stěně hrudní; zadní okraj: m. latissimus dorsi a m.subscapularis; mediální okraj: mediální okraj m. pectoralis minor (II. etáž) a m. seratus anterior (I. etáž); laterální okraj: fascia a m. latissimus dorsi.

Axilární uzliny I. a II. etáže – jak ozařovat ?

Problematika dávky v axilárních uzlinách je v zakreslení PTV a modifikaci techniky tangenciálních polí. Jednoznačná shoda je v tom, že standardní tangenciální pole nezaujímají celý objem axilárních uzlin I. a II. etáže. Modifikace techniky změnou úhlu kolimátoru a zvětšením polí významně zlepšila ozářený objem uzlin II. etáže, změna úhlu gantry se uplatňuje méně.

Metodika

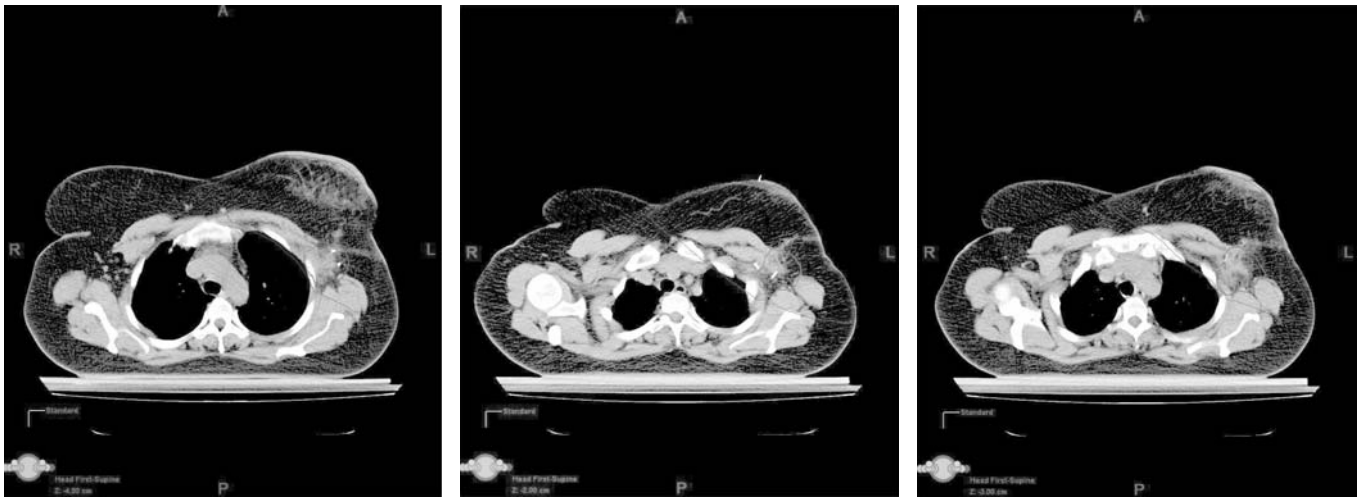
Na onkologickém oddělení Nemocnice Č. Budějovice a.s. jsme začali zakreslovat PTV pro prs a axilární uzliny I. a II. etáže nejen na podkladě anatomických hranic (Reed DR. 2005), ale i na podkladě rtg kontrastních svorek, kterými chirurg označil disekovanou oblast. Umístění svorek v axile: superior – axilární arteriovenózní svazek, inferior – horní okraj m. latissimus dorsi s facií u stěny hrudní, posterior – m. latissimus dorsi a m. subscapularis, medialis – nejvíce dosažený mediální okraj m. pectoralis minor, lateralis – fascie m. latissimus dorsi. Před tímto způsobem zakreslování PTV pro prs s dolními etážemi axilárních uzlin jsme retrospektivně zhodnotil PTV u 10 pacientek, historicky naplánovaných a ozářených. Hodnocené byly pacientky s ca prsu po parciální mastektomií a disekcí axily (exstirpace méně jak 6 uzlin histologicky negativních nebo exstirpace více jak 6 uzlin, z nichž byly 4 nebo více pozitivních a/nebo metastáza šla přes pouzdro uzliny). U všech pacientek jsme ozařovali prs a axilární uzliny I. a II. etáže tangenciálními poli a axilární uzliny III. etáže a nadklíčkové jedním ventrálním polem. Aplikovaná dávka na prs byla 50 Gy, na axilární a nadklíčkové uzliny ozařované předním polem 45 Gy. V průběhu plánování radioterapie byly u pacientek provedeny v ozařovací poloze (poloha na zádech, fixace obou horních končetin nad hlavou ve fixačním zařízení, dolní končetiny v semiflexi – podloženy válcem pod koleny) CT skeny každých 10 mm v celém rozsahu ozařovaného objemu. U pacientek bylo provedeno 3D plánování v plánovacím systému Eclips fy Varian, k hodnocení ozařovaných objemů bylo použito funkce „dose volume histogram“.

Předmětem našeho posuzování bylo zahrnutí axilárních uzlin I. a II. etáže do PTV axil+prs pro tangenciální pole (pacientky historicky naplánované a ozářené) a posouzení aplikované dávky. Dalším cílem bylo posouzení vztahu PTVaxil pouze k PTV prs. Ke srovnání nám sloužil nově zakreslený PTVprs (pouze prs) a PTVaxil, který zaujímal oblast axilárních uzlin I. a II. etáže podle anatomických hranic v CT skenech podle Reed DR. Horní okraj: a. a v. axilaris; dolní okraj: m. latissimus dorsi s fascií při stěně hrudní; zadní okraj: m. latissimus dorsi a m. subscapularis; mediální okraj: mediální okraj m. pectoralis minor (II. etáž) a m. seratus anterior (I. etáž); laterální okraj: fascia a m. latissimus dorsi.

Výsledky

Při hodnocení souboru 10 pacientek byl průměrný objem PTVaxil +prs 1 340 cm^3, PTVprs 1 150 cm^3, PTVaxil 111 cm^3. Žádná pacientka neměla kompletní pokrytí PTVaxil 95% dávky aplikované do PTVprs. Při hodnocení provedeného ozáření u sledovaného souboru pacientek byl PTVaxil pokrytý 95% dávky v PTVaxil+prs v 69,4%. Umístění rtg kontrastních chirurgických svo-

rek, označujících lokalizaci disekovaných axilárních uzlin bylo ve shodě s anatomickou lokalizací uzlin I. a II. etáže. Abychom zaujali tento objem axilárních uzlin I. a II. etáže (jak značených svorkami, tak PTVaxil) bylo nutné modifikovat techniku tangenciálních polí. Modifikace spočívala v rozšíření tangenciálních polí (aby se zahrnula etáž II.) a tvarování pole MLC k minimalizování ozářeného objemu plíce (event. i srdce). K dostatečnému pokrytí I. etáže axilárních uzlin bylo třeba změnit úhel gantry. Nepřistupovali jsme ke změně úhlu kolimátoru, jak je doporučováno v literatuře, neboť by se musel řešit problém zvýšené dávky v části předního axilárního pole, které je u těchto pacientek indikováno.



Diskuze

Tangenciální pole ne vždy zahrnují celou axilu – I. a II. etáž (Kiel KD. et al. 1997, Takeda A. et al. 2000, Schlembach PJ. et al. 2001, Aristel C. et al. 2001, Reed DR. et al. 2005, Mansur DB. et al. 2005, Rezník J. et al. 2005). Posuzování lokalizace axilárních uzlin historicky bylo prováděno kontrastní lymfografií (Bentel GC.,1996 Radiation Therapy Planning), podle anatomie v CT skenech (Jephcott CR. et al 2004, Reed DR. et al. 2005, Mansur DB. et al. 2005), podle umístění chirurgických rtg kontrastních svorek (Schlembach PJ. 2001, Aristel C.2001, Reed DR. 2005).

Kiel KD. na základě posuzování vztahu rtg kontrastních svorek označující lůžko disekované axily a kostěných struktur doporučuje k dostatečnému pokrytí axily: kraniální okraj tangenciálních polí umístit 1,2 cm pod hlavici humeru a zaujmutí 2,5 cm plíce do tangenciálních polí. Schlembach PJ. et al. (2001) zdůrazňuje individuální zakreslení PTV pro tangenciální pole podle anatomie pacientky a očekává také variabilitu axillárních uzlin I. a II. etáže. Aristel C. et al. (2001) hodnotí dávku v axilárních uzlinách I. a II. etáže u 35 pacientek po parciální mastektomii při ozařování prsu dvěmi tangenciálními poli pomocí umistění tří chirurgických svorek: l. je umístěná na začátku I. etáže, 2. mezi I. a II. etáží a 3. v úrovni konce 3. etáže. PTV byl zakreslen do CT skenů podle anatomie a oblast rtg kontrastních svorek byla hodnocena topograficky – zda je zaujata do tangenciálních polí a potom byla zhodnocena dávka. I. etáž byla zahrnuta do tangenciálních polí v 66,7% (mediální pole) a v 63,7% (laterální pole). II. etáž v 54,5% (laterální pole) a ve 45,4% (mediální pole). Medián dávky I. a II. úrovně axilárních uzlin byl 38,58 Gy a 20,65 Gy. Změna úhlu gantry se jen v malé míře podílela na zlepšení zaujmutí axilárních uzlin I. etáže do tangenciálních polí. Prodloužení polí a stočení kolimátoru signifikantně korelovalo se zabráním uzlin II. etáže do tangenciálních polí.

Takeda A. et al. (2000) hodnotil pozici chirurgických svorek označující I., II. a III. etáž axilárních uzlin. Svorky při disekci I. etáže byly lokalizovány laterálně od m. pectoralis minor, svorky při disekci I. a II. etáže byly lokalizovány v laterální nebo zadní oblasti a při disekci všech tří etáží (I, II, III) byly svorky nalezeny v laterální, zadní a mediální oblasti. Při hodnocení svorek ve vztahu k hlavici humeru byly všechny svorky nalezeny pod rovinou dolního okraje hlavice humeru (kaudálně) a současně nad (ventrálně). Na tomto podkladě doporučuje modifikovat techniku tangenciálních polí: změnit úhel kolimátoru tak, aby se nezvětšil objem ozářené plíce, polovina hlavice humeru (více než 2 cm) bude zahrnuta do mediálního tangenciálního pole. Reed DR. et al 2005 ve své studii potvrzuje, že za použití standardních tangenciálních polích se zaujímá asi 55% objemu axilárních uzlin I. a II. etáže.

Závěr

1. Výsledky všech uvedených studií, včetně našich údajů, potvrzují, že při ozařování prsu tangenciálními poli jsou axilární uzliny I. a II. etáže významně poddávkované.
2. Indikace k ozáření axilárních uzlin I. a II. etáže u časného karcinomu prsu je při jejich histologické pozitivitě s neúplnou disekcí – ponechání residua v axile. V případě, že je indikováno ozáření pouze prsu a axilárních uzlin III. etáže, včetně nadklíčkových uzlin, bude v PTV pro tangenciální pole zahrnutý pouze prs, zatímco v případě indikace k ozáření prsu a celé axily bude do PTV tangenciálních polí zahrnutý prs a axilární uzliny I. a II. etáže. Oblast III. etáže axilárních uzlin bude včetně nadklíčkových uzlin zahrnuta v samostatném axilárním poli.

3. Plánovat je třeba individuálně ve 3D (pacientky s fixovanými horními končetinami), objem axilárních uzlin I. a II. etáže je nutné zakreslovat podle anatomických hranic nebo podle rtg kontrastních svorek, kterými chirurg označil okraje disekované axily.
4. Při ozařování axilárních uzlin I. a II. etáže je potřebné modifikovat techniku tangenciálních polí tak, abychom zde dosáhli 95% aplikované dávky. Modifikace spočívá buď ve stočení kolimátoru a prodloužení pole, změně úhlu gantry anebo rozšíření tangenciálních polí a tvarování pole MLC se změnou úhlu gantry.

Literatura

1. Aristel, C. et al. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys., 51, 2001, 1, s. 69-73
2. Bentel, GC. Radiation Therapy Planning, second edition. 1996
3. Galper, S. et al. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys., 48, 2000, 1, s. 125-132
4. Jephcott, CR. et al. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys., 60, 2004, 1, s. 103-110
5. Mansur, DB. et al. Radioth. Oncol., 77, 2005, s. 191-193
6. Reed, DR. et al. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 61, 2005, 2, s. 358-364
7. Rezník, J. et al. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 61, 2005, 1, s. 163-168
8. Schlembach, PJ. et al. Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 51, 2001, 3, s. 671-678
9. Takeda, A. et al. Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys., 46, 2000, 4, s. 815-822

135 Bio-hormonoterapie jako nová možnost pro zvýšení účinnosti hormonální léčby karcinomu prsu.

Petruželka L., Konopásek B., Přibylová O., Tesařová P.
Onkologická klinika VFN 1. LF UK
Komplexní onkologická skupina Praha a středočeský kraj

Při výběru léčebného postupu u hormonálně dependentního metastazujícího karcinomu prsu je historicky první volbou hormonální terapie. Chemoterapie je obvykle zahajována až po jejím selhání. V současnosti neexistuje jednoznačný doklad pro výhodu současného podání konvenční chemoterapie a hormonální léčby (1). Při standardně prováděné léčbě jsou tyto modality podávány sekvenčně. (2). Současné podávání obou modalit při použití tamoxifenu bylo spojeno s nárůstem tromboembolických komplikací (3). Adjuvantní léčba časných stadií hormonálně dependentních karcinomů spočívá v samostatné endokrinní adjuvantní léčbě anebo v kombinaci s adjuvantní chemoterapií. Při kombinaci s adjuvantní chemoterapií je hormonální léčba podávána sekvenčně po ukončení chemoterapii. Cílená biologická léčba jako nová léčebná modalita přináší novou možnost jak zvýšit účinnost hormonální léčby nebo zabránit vzniku resistence. Na rozdíl od konvenční chemoterapie může být simultánní podání biologické a hormonální léčby výhodné. Koexprese HER-2 při hormonální dependenci zvyšuje riziko resistence k hormonální terapii vzhledem k aktivaci signálních drah nezávislých na estrogenech. U hormonálně dependentních karcinomů se zvýšenou koexpresí HER-2 je léčebnou možností jak samostatná hormonální léčba tak kombinace biologické a hormonální léčby (4). Otázkou je zdali není výhodnější sekvenční použití obou modalit se zahájením léčby hormonální se sekvenčním přidáním biologické léčby k hormonální léčbě při jejím selhání. Kromě kombinace selektivního inhibitoru aromatázy s trastuzumabem je dalším perspektivním režimem „bio-hormonoterapie“ kombinace – fulvestrantu s lapatinibem. Fulvestrant je selektivní deregulátor estrogenových receptorů (SERD) účinný po selhání tamoxifenu i selektivního inhibitoru aromatázy (5). Lapatinib je duální tyrosinkinázový inhibitor HER-1 (EGFR) a HER-2 účinný u trastuzumab resistentních nádorů (6).

Lapatinib inhibuje nádorový růst na tamoxifen resistentních nádorových linií (7). Podkladem pro kombinaci je lapatinibem indukovaná exprese estrogenových a progesteronových receptorů na buněčných liniích karcinomu prsu (8). Zvýšená koncentrace vaskulárního endotelového faktoru (VEGF) je jedním z prediktorů vzniku resistence hormonální léčby a tak je další možností je kombinace selektivního inhibitoru aromatázy s inhibitory angiogeneze. Optimální postup „bio-hormonoterapie“ zatím není znám.

Literatura

1. Osborne CK. Effects of estrogen and antiestrogens on cell proliferation. In: Osborne, CK, ed. Endocrine Treatment in Breast and Prostate Cancer. Boston: Kluwer, 1988:1 1-129 Osborne CK. Effects of estrogen and antiestrogens on cell proliferation. In: Osborne, CK, ed. Endocrine Treatment in Breast and Prostate Cancer. Boston: Kluwer, 1,1988, s. 1-129.
2. Beslija, S., Bonneterre, J., Burstein, H., Cocquyt, V., Gnant, M., Goodwin, P., Heinemann, V., Jassem, J. Köstler,W.J.,. Krainer, M., Menard, S., Petit, Petruzelka, L., Possinger, K., Schmid, P., Stadtmauer, E., Stockler, M., Van Belle, S., Vogel, C., Wilcken, C.Wiltschke, C. Zielinski Ch, Zwierzina, H.: Second Consensus on Medical Treatment of Metastatic Breast Cancer. Annals of Oncology, 17.,2006, s.1320-1329

3. Pritchard KI, Paterson AH, Paul NA et al. Increased thromboembolic complications with concurrent tamoxifen and chemotherapy in a randomized trial of adjuvant therapy for women with breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Breast Cancer Site Group. J Clin Oncol, 14, 1996, s. 2731-2737,
4. Kauffman, B., Mackey et. Al.: Combining trastuzumab and anastrozole prolongs survival for some postmenopausal women with metastatic breast cancer. Ann.Oncol 2006, Suppl.9, Late -breaking abstrakt-
5. Petruželka, L: Fulvestrant – nová možnost hormonální léčby karcinomu prsu. Farmakoterapie, 2, 2006, s.149 – 151.
6. Konecny, G.E., Pegram, M.D., Venkatesan, N.: Aktivity of the dual dinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. Cancer Res. 66, 2006, s.1630 – 1639.
7. Chu, I., Blackwell, K., Chen, S., Slingerland, J.: The dual ErbB1/ErbB2 inhibitor, lapatinib (GW572016), cooperates with tamoxifen to inhibit both cell proliferation-and estrogen- dependent gene expression in antiestrogen-resistant breast cancer. Cancer Res, 2005, 65, s. 18-25.
8. Xia,W., Bacus, S., Hedge, P.: A model of acquired autoresitence to a potent ErB2 tyrosine kinase inhibitor and therapeutic strategy to prevent its onset in breast. Proc Narl Acad Sci USA,103, 2006, s.7795 – 7800.

136 Adjuvantní trastuzumab po roce – snášelivost, kvalita života, náklady.

Tesařová P., Barkmanová J., Tomancová V., Konopásek B, Novotný J., Přibylová O., Petruželka L.
Onkologická klinika, VFN, Praha

Pozitivita HER-2 receptorového onkoproteinu, kterou lze diagnostikovat zhruba u čtvrtiny všech karcinomů prsu, je spojena se nepříznivou prognózou, zkrácením období bez progrese nemoci i kratší celkovou dobou přežití. Cílená biologická léčba trastuzumabem, který osvědčil svoji účinnost u pacientek s pokročilým HER2 dependentním karcinomem prsu, může zlepšovat terapeutické výsledky u této prognosticky nepříznivé skupiny nemocných i v adjuvantním podání. Jeho účinnost v adjuvantním podání potvrdily 4 velké a jedna menší studie.

Studie fáze 3 HERA s 5081 pacientek s N+ nebo N-nádorem větším než 1 cm, které absolvovaly alespoň 4 cykly adjuvantní chemoterapie, byly rozděleny do ramene s trastuzumabem 1 rok, dva roky a jen sledovány. Přidání trastuzumabu prodlužuje období bez projevů nemoci. (HR 0,64). Od amerických studií se HERA liší sekvenčním podáním trastuzumabu a chemoterapie, což se promítá do nižší kardiální toxicity. Americké klinické studie NSABP B31(pro pacientky HER2 dependentní, N+, léčené adjuvantní chemoterapií 4xA C + P po 3 týdnech bez nebo s týdenním podání trastuzumabu) a N 9831(pro pacientky HER 2 dependentní, s tumorem nad 1 cm, randomizované do 3 ramen 4xAC + 12xP, 4xAC + trastuzumab týdně, 4xAC + 12x P + trastuzumab týdně.) Při kombinované analýze byly srovnávávány pacientky s trastuzumabem (N= 1672) proti 1679 pacientkám bez biologické léčby.

Adjuvantní trastuzumab statisticky významně prodlužuje období bez projevů nemoci (HR 0,48). Trastuzumab zvyšuje počet kardiálních selhání (4,1% vs. 0,8%). (BCIRG) 006 studie randomizuje 3222 pacientů do ramene to s AC → T(docetaxel), AC → TH (tratuzumab), TCH (karboplatina). Výsledky 4-letého DFS svědčí pro rameno s antracykliny a taxany a herceptinem (AC → T, 73%, AC → TH, 84%, 80% a TCH, 73%). Herceptin nepříznivě ovlivňuje kardiální toxicitu (zhoršení kardiální funkce o 10% bylo v rameni s herceptinem o 8,3% více než v rameni bez herceptinu (AC → TH vs. AC → T) Provokativní studie FinHer randomizuje 1010 žen s N+ rizikovým karcinomem prsu, které byly léčeny třemi cykly docetaxelu nebo vinorelbinu, a následně třemi cykly FEC. 232 žen s her2 pozitivitou nádoru bylo randomizováno do dvou skupin s 9ti týdenním podáním trastuzumabu nebo bez další léčby.

Skupina léčená herceptinem měla lepší 3 letý disease free survival. (89% vs 78%; HR pro recidivu a úmrtí, 0.42; l, 0.21 – 0.83; P = 0.01). Na základě výsledků těchto klinických studií jsme začali podávat trastuzumab s adjuvantním záměrem od srpna 2005. Indikovány byly pacientky s FISH konfirmovanou amplifikací HER2 v nádoru, s nádorem větším než 1 cm, s dobrou kardiální funkcí dle ECHO a věkem pod 80 let. Léčbu podáváme sekvenčně po antracyklinovém režimu samostatně nebo spolu s taxany, pokud byly indikovány, eventuelně s hormonoterapií při ER+. Léčba je plánovaná na 1 rok. Po 3 měsících provádíme kontrolu EF vyšetřením ECHO. Celkem jsme léčbu indikovali u 12 pacientek. Vzhledem k mediánu podávání 6,5 měsíce nelze hodnotit parametry přežití i období bez nemoci.

Můžeme konstatovat, že terapie je obecně dobře snášená, nesnižuje zásadně kvalitu života. V průběhu podávání nebyla zaznamenána žádná závažná kardiální příhoda, ani ejekční frakce nebyla významně snížena u asymptomatických pacientek. Pro vlastní prezentací bude k dispozici analýza nákladů adjuvantní léčby a terapie pokročilého onemocnění trastuzumabem.

137 Srovnání efektivity a toxicity I. a II. linie léčby metastatického karcinomu prsu orální chemoterapií vinorelbin + kapecitabin.

Fínek. J., Holubec L. jun, Šefrhansová L., Svoboda T., Salvét J., Šedivá M., Filip S., Koževnikovová R.
FN Plzeň, FN Bulovka Praha, FN Hradec Králové, DTC Centrum Praha

Východiska

Není známa optimální léčba metastatického karcinomu prsu (MBC) po vyčerpání účinku antracyklinů.

Není znám optimální počet linií léčby MBC, indikace vyšších linií je sporná pro možný nárůst toxicity a snížení účinnosti

Přímé hodnocení jednotlivých linií identické chemoterapie je v písemnictví řídké

Metoda

Ve II. fázi multicentrické studie, v 1. a 2. linii léčby MBC po vyčerpání účinku antracyklinů, bylo léčeno 115 nemocných alespoň s jednou měřitelnou lézí. Dávkovací schéma léčby vinorelbin: 60 mg/m^2 p.o. 1. a 8. den, kapecitabin 1000 mg/m^2 2x denně, den 1.-14. den, opakovat po 3 týdnech. Léčba do progrese onemocnění či závažné toxicity.

Prospektivně získaná data mezi lety 2003 a 2006

Nemocné

Léčili jsme 115 nemocných v 1. a 2. linii léčby MBC, medián věku 58.5 roků, rozmezí (39.7 roku – 74.9 roku). Průměrný věk nemocných léčených prvou linií byl 49 let, ve druhé linii 61 let (p= 0,059)

V 1. linii léčby MBC jsme léčili 57 nemocných (49.57%), ve 2. linii 58 nemocných (50,43%). Adjuvantní či paliativní chemoterapie (u 2. linie) musela být ukončena před více než 12 měsíci, konkomitantní hormonoterapie, jakožto ozáření jediné měřitelné léze, nebyly povoleny.

Výsledky

Medián počtu podaných cyklů chemoterapie byl v souboru 115 nemocných léčených 1. a 2. linií chemoterapie vinorelbin – kapecitabin 6 cyklů. (od 3 do 32 cyklů). Nebyl statistický rozdíl mezi počtem cyklů podaných v 1. linii léčby a 2. linii léčby (p=0,5663)

Celkový počet podaných cyklů byl 801. Ze 115 nemocných léčených v obou liniích jsme dosáhli léčebné odpovědi (ORR= CR+PR) u 65 nemocných tj. 56.5%.

	1. + 2. linie léčby
CR	22 (19.1%)
PR	43 (37,4 %)
PD	14 (12,2)
NC	36 (31,3 %)

Tabulka 1.
Nejlepší dosažená odpověď
v 1. a 2. linii léčby (počty nemocných)

	1.linie	2.linie
CR	14 (24,56 %)	8 (13,79%)
PR	19 (33,33 %)	24 (41,38%)
PD	6 (10,53 %)	8 (13,79 %)
NC	18 (31.58%)	18 (31,03%)
Celkem	57 (49,57%)	58 (50,43%)

Tabulka 2.
Nejlepší dosažené léčebné odpovědi v prvé a druhé linii léčby, počty nemocných v jednotlivých skupinách dle nejlepší dosažené odpovědi a jejich relativní počty

Medián sledování byl 10 měsíců.

Medián času do progrese 10,5 měsíce. Medián přežití byl 17,5 měsíce a 77 nemocných (67%) bylo v čase hodnocení naživu

Toxicita NCI grade III a IV v jednotlivých liniích léčby: neutropenie u 6 nemocných (5%), z toho 1x v první linii a 5x ve druhé linii, trombocytopenie 3 (2,61%), 1x v první linii a 2x ve druhé linii léčby, febrilní neutropenie u jednoho nemocného ve druhé linii (0.9%), zvracení u 8 nemocných (7%), z toho v první linii 6x a ve druhé 2x, infekční komplikace u 6 nemocných (5,22%), z toho 2 x v prvé a 4 x ve druhé linii. Hand – foot syndrom nebyl reportován.

Nebyl prokázán statistický rozdíl mezi toxicitou chemoterapie vinorelbin – kapecitabin podané v prvé či ve druhé linii

Závěr

Kombinace orálního vinorelbinu a kapecitabinu prokazuje vysokou účinnost – čas do progrese 10,5 měsíce, ORR 56,5%.

Prokazuje vysokou a stejnou účinnost jak v postavení 1. linie, tak 2. linie léčby MBC, není statistického rozdílu v účinnosti mezi liniemi.

Toxicita kombinace vinorelbin a kapecitabin je nízká a to jak v prvé, tak druhé linii, obě linie se od sebe statisticky neliší.

Orální léčba doma přispívá k psychické pohodě nemocných, které ji velmi vítají a oceňují.

138 Terapie metastického karcinomu prsu fulvestrantem.

Ostřížková L., Pospíšková M., Kohoutek M.
Nemocnice, Zlín

Fulvestrant je indikována pro léčbu postmenopauzálních žen s metastatickým hormonálně dependentním lokálně pokročilým nebo metastatickým karcinem prsu, při relapsu onemocnění, v průběhu nebo po adjuvantní antiestrogenové terapii, nebo při progresi onemocnění při léčbě antiestrogeny.

Původní doporučená dávka je 250mg lx měsíčně, nyní ale dobíhají studie s dvojnásobnou dop. dávkou.

V našem onkologickém centru bylo od září 2005 do ledna 2007 léčeno celkem 11 pac. a to ve standartním dávkováním 250 mg měsíčně.

Fulvestrant byl podáván ve II, III a IV linii hormonální terapie, chemoterapií bylo předléčeno 5 pacientek. Hormonální status byl stanoven pouze z primárního tumoru. Trvání předchozí hormonální terapie bylo 5-70 měsíců, medián 24 měsíců.

Věkový medián léčených pacientek byl 65 let. Počet aplikací 1-9, medián 6 aplikací..

Nejlepší dosažený efekt byla SD u 9 pacientek, odpověď trvala od 3-9 měsíců, medián 6 měsíců. 2 pacientky progrese onemocnění. Parciální ani celkové remise nebylo dosaženo.

Toxicita v průběhu podávání nebyla zaznamenána.

Závěr

Fulvestrant byl podáván ve II a vyšší linii hormonální terapie u pacientek, u kterých byly možnosti chemoterapie vyčerpány nebo nebylo podání chemoterapie možné pro komorbiditu. Přestože byla nejlepším výsledkem stabilizace onemocnění, u žádné pacientky nevedla léčba ke zhoršení kvality života. Negativním aspektem léčby je vysoká finanční nákladnost.

Příčinou nižšího účinku by mohlo být nasazení u vysoce předléčených pacientek, po vyčerpání 2 a více linií hormonální terapie.

Dále neznámý hormonální status metastáz.

139 Sledování pacientek po léčbě pro karcinom prsu.

Petráková K., Palácová M.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorem žen v České republice. Incidence má v posledních letech výrazně stoupající tendenci při stagnující úmrtnosti. V roce 2003 bylo hlášeno 5784 nově diagnostikovaných karcinomů prsu a zemřelo 2032 pacientek (SVOD). Znamená to tedy, že neustále přibývá pacientek s karcinomem prsu, které jsou po léčbě v kompletní remisi a které jsou sledovány. Je proto vhodné znát přínos různě intenzivních režimů sledování pro prognózu pacientek.

Riziko relapsu onemocnění je závislé na stadiu onemocnění, přičemž pacientky s většími nádory a větším počtem postižených axilárnch uzlin mají větší riziko relapsu. Pacientky s postižením axilarních uzlin mají riziko relapsu 50% až 75%. 82% pacientek s klinickým stadiem I přežívá bez známek nemoci 10 let a 78% 20 let. Většina relapsů onemocnění se objeví během prvních 10 let s vrcholem mezi druhým a pátým rokem po diagnóze. Pacientky s nádory s negativními steroidními receptory mají tendenci relabovat dříve (během prvních 5 let), pacientky s nádory s pozitivními steroidními receptory relabují i později (za 6 až 12 let po diagnóze). Screeningová vyšetření v rámci sledování pacientek s karcinomem prsu jsou tedy nejpřínosnější během prvních 5 let po diagnóze. Nejčastějším místem relapsu je skelet, měkké tkáně a plíce. Většina studií sledujících vliv intenzity sledování na prognózu pacientek byla vedena v době, kdy byla preferována mastectomie před parciálním výkonem, proto není zcela jasný přínos mamografie při časném zjištění lokální recidivy nádoru. Přitom lokoregionální relaps onemocnění tvoří 15% až 40% všech relapsů. Rizikovými faktory lokoregionálniho relapsu jsou: pozitivní resekční okraje, multifokální onemocnění, mladý věk v době diagnózy.

Dvě velké randomizované studie, které se soustředily na přínos intenzivního sledování u pacientek s karcinomem prsu, zjistily, že až 75% relapsů je zjištěných samotnými pacientkami mezi intervaly návštěv nebo v době návštěvy lékaře. 15% relapsů bylo zjištěno klinickým vyšetřením. 60% až 80% relapsů se objevilo během prvních 3 let. Na základě těchto údajů autoři považují za nejdůležitější edukaci pacientů o možných symptomech ralapsu. (1,2) Ani velká Cochranova metaanalýza čtyř velkých klinických studií s 3055 pacientkami nepotvrdila lepší celkové přežívání ani přežívání bez nemoci u pacientek s intenzivním sledováním, které obsahovalo jak zobrazovací metody, tak laboratorní vyšetření. (3) Pouze 1,3% pacientek s jaterními metastázami mělo vyšší transaminázy v době relapsu onemocnění v játrech. Vyšší hladiny alkalické fosfatázy mělo pouze 50% pacientek s postižením skeletu a navíc 30% pacientek s vyšší hladinou alkalické fosfatázy nemělo postižení skeletu. Potenciálně senzitivnější jsou nádorové markery CEA a CA15,3, které mohou predikovat relaps až o 5 až 6 měsíců dříve než je diagnostikován pomocí zobrazovacích metod. Pouze 3% asymptomatických relapsů v plicích, 1% relapsů v játrech a 0,6% kostních metastáz bylo ve studiích diagnostikováno pomocí zobrazovacích metod.

Pacientkám s výskytem karcinomu prsu a ovariálního karcinomu by mělo být doporučeno genetické vyšetření. Indikací je: anamnéza ovariálního karcinomu u pacientky anebo u příbuzné prvního nebo druhého stupně, prvostupňová příbuzná s karcinomem prsu ve věku mladším 50 let, dvě anebo více příbuzných prvního anebo druhého stupně s karcinomem prsu, pacientka s diagnózou bilaterálního karcinomu prsu, mužský příbuzný s karcinomem prsu. Je nutné vzít v úvahu i nedostatečnou senzitivitu a specificitu nádorových markerů.

Na základě těchto faktů není k rutinnímu sledování doporučena scintigrafie skeletu, rentgen plic ani ultrazvukové vyšetření jater. Doporučeny jsou klinické kontroly lékařem v tříměsíčních intervalech první tři roky, v šestiměsíčním intervalu další dva roky. Mamografie šest měsíců po skončení radioterapie, potom jednou ročně po dobu 5 let.

Doporučené sledování různými společnostmi

Typ sledování	ASCO	NCCN	MRC (Australie)	CMA (Kanada)
Anamnéza	Ano	Ano	Ano	Ano
Klinické vyšetření	Ano	Ano	Ano	Ano
Mamografie	Ano	Ano	Ano	Ano
Vyšetření malé pánve	Ano	Ano	–	–
Edukace pacientek	Ano	–	Ano	Ano
Sebevyšetřování	Ano	–	–	Ano
Došetření všech symptomů	Ano	Ano	Ano	–

Literatura

1. The GIVO Investigators. Impact of follow-up testing on survival and health related quality of life in breast cancer patients: A multicentric randomised controlled trial. JAMA 271:1587-1592,1994.
2. Rosseli Dei Turco M, Palli D, Cariddi A, et al. Intensive diagnostic follow-up after treatment of primary breast cancer: A randomised trial-National Research Council Project on Breast Cancer Follow Up. JAMA 271:1593-1597,1994.
3. Rojas MP, Telaro E, Russo A, et al. Follow-up strategies for women treated for early breast cancer. Oxford, United Kingdom, Cochran Library CD01768,1,2005.
4. Leisha A., Emens and Nancy E Davidson. The Follow-Up of Breast Cancer. Seminars in Oncology, Vol 30, No 3 (June), 2003:338-348.
5. Katcheressian JL, Wolf AC, Smith TJ, et al. American Society of Clinical Oncology 2006 Update of the Breast Cancer Follow-Up and Menagment Guidelines in the Adjuvant Setting. J Clin Oncol 2006; 24:5091-5097

Práce byla podpořena grantem NR 8270-3/2005

XVI.
Kolorektální karcinom

140 The early detection of anal dysplasia and anal cancer by screening cytology.

Karaitianos I.[1], Archondakis S. K.[2], Maragoudakis E.[3]
1) Departement of Surgical Oncology, Saint Savvas Anticancer Hospital, Athens, Greece
2) Departement of Cytology, Saint Savvas Anticancer Hospital, Athens, Greece
3) Departement of Radiotherapy, Iaso Hospital, Athens, Greece

Address for correspondence: Prof. I. G. Karaitianos, 32 Stournara Street, 10433 Athens Greece.
E-mail: igkaraitianos@yahoo.com

The role of anal screening cytology has entered the epidemiologic and cytopathologic literature as a topic of interest over the last 15 years. The increasing frequency of premalignant anal lesions and anal cancer among the high risk groups of population (homosexual men, HPV and HIV infected, transplant patients etc) was the main causative factor. The cytological diagnostic categories of anal dysplasia are those of atypical cells of uncertain significance (ASCUS), low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL). Classification according to Bethesda system has been advised, implying similarity of anal dysplasia and cancer to those encountered in the cervix.

Natural exfoliative cytology was introduced as a cost effective screening method („anal Pap smear"). Standard colonic preparation is not required, but the rectum should be emptied prior to obtaining the anal sample. Some have used direct smears onto glass slides with immediate wet fixation; other centers, however, employ immediate insertion of the scraping device into liquid fixative for thin layer preparation.

Screening programs have implemented anal cytological screening in high risk populations. The screening for ASIL consists of a swab for anal cytology. Anal cytology had a 69% sensitivity among HIV positive men and 47% among HIV negative men at their first visit. Its sensitivity was 81% for the former and 50% for the latter group for all subsequent visits combined. In comparison, the sensitivity of cervical cytology is 80%. The specificity of anal cytology was 59% in HIV positive men and 92% in HIV negative men when including ASCUS.

The conclusion is that screening HIV positive homosexual men annually and HIV negative homosexual men every 2-3 years for HPV induced anal disease would prolong significantly life expectancy in high risk groups of population.

A clear management strategy is still lacking, nevertheless pilot programs should be established offering anal cytology screening programs for HIV positive homosexual men as well as for any macroscopically suspicious anal lesion, such as anal warts, condylomas, chronic irritation, chronic fissures and pruritus anii. The aim of these screening pilot programs should be to detect anal cancer at an early and curable stage and to aquire long term prospective data on the progression and prognosis of anal dysplasia (AIN) as well as to identify AIN patients who are eligible for local therapeutic management.

141 Význam 3D endosonografie při stagingu tumorů rekta.

Zbořil P., Neoral Č., Vysloužil K., Starý L., Klementa I.
I. chirurgická klinika FN a LF UP Olomouc

Úvod

Incidence kolorektálního karcinomu se neustále zvyšuje, naprostá většina tumoru vzniká na podkladě maligního zvratu polypu. Nádory rekta v počátečních stádiích lze odstranit lokálně, čímž pacienta uchráníme od velkých výkonu jako je přední nízká resekce či amputace rekta. Ke správnému zvolení typu operace musíme znát přesně staging a grading tumoru.

Rozhodující roli při T a N stagingu tumorů anorekta hraje 3D endosonografie.

S použitím 3D zobrazení je diagnostická přesnost stagingu tumorů v naší studii 87.7%.

Endosonografie s 3D rekonstrukcí obrazu je dokonce přesnější než CT a MRI zejména u časných stádií. tumorů. Lymfatické uzliny nad 3 mm mohou být detekovány. Je však těžké rozlišit zánětlivě aktivovanou uzlinu od tumorosně infiltrované. Zde se diagnostická přesnost pohybuje mezi 50-70%.

Cílem naší práce bylo zhodnotit význam 3D endosonografie v diagnostice tumorů anorekta, a zejména přesnost uT stagingu tumorů při porovnání s histopatologickým vyšetřením resekátu.

Metodologie

Metodu 3D endosonografii jsme zavedli v roce 2000. Za období 8/2000-10/2006 jsme provedli 286 3D endorektálních sonografií pro tumor rekta. U 180 nemocných se jednalo o maligní nádor konečníku, 106 krát bylo vyšetření indikováno pro adenomatozní či vilozní polyp rekta. Všichni nemocní podstoupili operační léčení. Endorektální cestou pomocí operačního rektoskopu byli operování nemocní stagingu uT1 a uT2. V případě stagingu uT2 se jednalo o nemocné s tumorem průměru do 3cm gradingu G1-2. Nemocní s pokročilejším tumorem byli operováni klasicky. Histopatologické vyšetření u všech operačních preparátů provedl jeden patolog.

Výsledky

Předoperační nálezy stagingu určeného 3D endorektální sonografií jsme srovnali se závěrečným histopatologickým vyšetřením. Korelace předoperační endorektální sonografie s histopatologickým závěrem byla v 87,7%. U 10,3% nemocných 3D endorektální sonografie hodnotila pokročilejší stádium než bylo závěrečné histolopatologické vyšetření. Stanovení stagingu T2 bylo zatíženo největší chybou.

Závěr

Z výsledků naší práce vyplývá že 3D endonografie anorekta v hraničních případech nadhodnocuje T staging tumorů, zejména stádum T2 a T3 o půl až jeden stupeň. Při hlubším porovnání endosonografických nálezů s histopatologickým vyšetřením zjišťujeme, že to způsobuje peritumorosní zánětlivá infiltrace, která posouvá hranici prorůstání tumoru (upstaging) a endo UZ ji nedokáže odlišit. Jedná se o kritická stadia, kde můžeme pacientovi nabídnout lokální výkon před resekcí či amputací rekta. Proto musíme být v hodnocení endoUZ nálezů opatrní a v případě hraničních uT stádií volit méně radikální postup, který bude po histologickém zpřesnění eventuálně doplněn resekcí či amputací rekta.

142 UZ v diagnostice ložiskových procesů jater – CEUS.

Válek V., Bohatá Š., Mechl M.
FN Brno

Ultrasonografie je v rutinní diagnostice jaterních lézí nejrozšířenější vyšetřovací metodou využívanou v některých zemích i jako screeningové vyšetření (např. detekce HCC v terénu jaterní cirhózy či hepatitidy). Zásadním omezením je subjektivní hodnocení nálezů a nedostatečná standardizace postupů. V mnoha případech tak dochází k různým extrémům. Sonografie se někdy stává „lepší palpací“, jindy standardizovaným postupem, kdy lékař hodnotí nález ze snímků zhotovených radiologickým asistentem a vyšetření tak ztrácí rozměr dynamického hodnocení. Impuls k vývoji ultrazvukových přístrojů a k emancipaci metody na úroveň výpočetní tomografie a magnetické rezonance znamená mimo jiné vývoj kontrastních látek. Ultrazvuková kontrastní látka dále zlepšuje detekce toků v cévách. Problémem doposud byla nestabilita kontrastních látek a jejich využití bylo v podstatě limitované na oblast echokardiografie. Přelom znamená vývoj nové kontrastní látky – sonovue (Bracco).

Kontrastní látka sonovue je kontrastní látkou druhé generace. Umožňuje zvýšení specifity a senzitivity ultrazvukového vyšetření v šedé škále s optimální kontrastní senzitivitou a prostorovým rozložením. Výrazně zvyšuje možnost posoudit a odhalit makro- a mikrocirkulace fokálních jaterních lézí v reálném čase. Tato kontrastní látka je tvořena mikrobublinami o velikosti 2um, které jsou tvořeny plynem (sulphurheafluoridem) a stabilizovány surfaktanty, především fosfolipidy. Relativní kontraindikace jejího podání jsou pravolevé zkraty, plicní hypertenze, ARDS a maligní hypertenze. Aplikace je omezená u nemocných se závažným plícním a srdečním onemocněním.

Materiál a metodika

V prospektivní neradomizované studii jsme posuzovali specifitu a senzitivitu sonovue v diagnostice ložiskových procesů jater. U nemocných jsme během 14 dnů provedli vyšetření jater s aplikací sonovue (natavení sono ct + Xres, MI 0.06 + nastavení na kontrast sonovue), vyšetření výpočetní tomografií (5/5, 1 pitch, třífázové vyšetření, 130ml neionické kontrastní látky koncentrace 350) a vyšetření magnetickou rezonancí (MR) s podáním speficiké kontrastní látky multihance (Nycomed). V rozmezí leden 2005 – prosinec 2006 jsme takto vyšetřili 153 nemocných.

Vlastní ultrazvukové vyšetření probíhalo v B-modu (charakteristika léze, segmentární klasifikace, velikost, povaha léze). Dále byla pacientovi za kontinuálního vyšetřování v dynamickém B-modu abdominální konvexní sondou o frekvenci 5 MHz intravenózně aplikována kontrastní látka o objemu 4,8ml. Tento bolus byl v některých případech rozdělen do dvou dávek o objemu 2,4ml. První dávka sloužila k detekci léze a druhá k její charakteristice. Kontrastní látka sonovue se připravuje smícháním 5ml solného roztoku s mikrobublinami. Kontrast zůstává stabilní asi 6 hodin. Příprava je velmi jednoduchá a je bezpečná a celý systém je sterilně uzavřený. Arteriální fáze byla snímána za 15 sekund po intravenózní aplikaci kontrastu. Po dalších 15 sekundách jsme zachytili fázi porto-venózní, která přetrvává asi 40 sekund. V pozdní fázi dochází k úplnému vyplavení kontrastní látky z jater. Vyšetření trvá 10 minut. Všechny fáze byly kontinuálně sledovány a nahrávány.

Vyšetření bylo průběžně vyhodnocováno, dva nezávislí lékaři na základě subjektivního hodnocení charakterizovali schopnost detekce solidního ložiska, jeho uložení v jaterním segmentu, jeho velikost a na základě cévního zásobení možný maligní či benigní potenciál a bližší specifikaci. Popis cévního zásobení zahrnoval detekci inratumorózních cév, přívodných cév přímých, přívodných cév nepravidelných, radiálně uspořádaných cév a charakter cév v okolí léze. Následoval popis echogenity a homogenity ložiska v jednotlivých fází. Důležitá byla také možná detekce dalšího ložiska na základě vyšší či nižší intenzity signálu po aplikaci kontrastní látky. Parametry byly hodnoceny průběžně během vyšetření a následně z video záznamu (DICOM formát) a po zpracování v počítači (DV studio 9).

Kontrastní látku snášeli pacienti velmi dobře, nevyskytly se žádné alergické reakce.

Výsledky a diskuze

K diagnostice ložiskových procesů v játrech lze využít tři zobrazovací metody ultrasonografie (US), výpočetní tomografii (CT) a magnetickou rezonanci (MR). CT i MR má své nesporné výhody a indikace, ale i omezení a kontraindikaci. Jediné ultrazvukové vyšetření nemá žádné známé kontraindikace, je velmi levné a není omezeno ani u těhotných či dětí. Problémem je subjektivní hodnocení nálezů, limitace habitem pacienta a obecné povědomí, že US je pouze „orientační metoda" a tedy metoda neplnohodnotná. Diagnostický potencionál ultrazvuku je obrovský. Kontrastní ultrasonografie v naší studii ukázala srovnatelnou či dokonce vyšší senzitivitu a specificitu než CT či MR.

Výpočetní tomografie je zobrazovací metoda využívající digitální zpracování dat o průchodu rentgenového záření v mnoha průmětech vyšetřovanou vrstvou. Základní princip je založen na zeslabování svazku rentgenového záření při průchodu vyšetřovanou tkání (měření denzity tkáně). Hlavní nevýhodou je právě použití ionizujícího záření (Berrington 2004).

Magnetická rezonance vychází z měření magnetických momentů jader atomu vodíku v různých sekvencích, měří tedy intenzitu signálu ve vyšetřovaných tkáních. Srovnáme-li CT a MRI vyšetření, patří k obecným výhodám MRI absence ionizujícího záření a možnost zobrazení v libovolné rovině.

Výhodami CT jsou hlavně větší dostupnost a rychlost vyšetření, nižší cena a volnější přístup k pacientovi. CT je také oproti MR přesnější v průkazu kalcifikací. Obě metody však mají své absolutní kontraindikace. U MRI je absolutní kontraindikací zavedený kardiostimulátor, relativní pak přítomnost feromagnetických materiálů a klaustrofobie (Boutin 1994). U CT vyšetření je hlavním omezením vedle radiační zátěže především alergie nemocného na jodové kontrastní látky a obecná nefrotoxicita těchto kontrastních látek (Heyman 2003, Meurisse 2001, Birnbaum 1999, Romano 2002). CT vyšetření jater bez podání kontrastní látky v dynamickém protokolu v nejméně dvou fázích má pak výrazně nižší senzitivitu i specificitu (Kanematsu 1999). Žádná z těchto kontraindikací u ultrasonografie není.

V naší studii jsme potvrdili, že intravenózním podáním sonovue zvyšuje senzitivitu a specificitu ultrazvukového vyšetření a potvrdili jsme údaje z literatury, že dosažené výsledky mohou být při minimální zátěži nemocného srovnatelné či lepší než při vyšetření výpočetní tomografií nebo magnetickou rezonancí (Solbiati 2003, Bernatik 2001, Eberhardt 2003). Sonovue umožňuje vizualizaci a charakterizaci fokálních jaterních lézí v různých vaskulárních fázích a má i jiné nesporné výhody oproti jiným modalitám (Burns 2000).

Závěr

Podle našich zkušeností ultrazvukové vyšetření v kombinaci s podáním sonovue nabívá zcela nový rozměr. Zvyšuje se jak senzitivita vyšetření (především v detekci jaterních metastáz a HCC), tak jeho specifikaci (v diagnostice maligních ložiskových lézí). Metoda nemá kontraindikace, výkon je ambulantní a vyšetření trvá do 15 minut. Není nutná speciální příprava nemocného. Limitací je habitus, přístrojové vybavení a samozřejmě zkušenosti lékaře, který vyšetření provádí. Pokud je ale pořízena kvalitní videodokumentace, je možné provádět druhé čtení a tím eliminovat poslední omezení této metody. Domníváme se, že u onkologických nemocných a rizikových skupin pacientů (jaterní cirhóza, hepatitida) by mohlo být ultrazvukové vyšetření jater s podáním kontrastní látky screeningovou metodou. Náklady na tuto metodu jsou spojené s cenou kontrastní látky. Je obecnou zkušeností, že se zvyšujícím počtem vyšetření cena kontrastní látky klesá.

143 Peroperační laparoskopická ultrasonografie jater – standardní součást stagingu kolorektálního karcinomu.

Bartoš J., Škrovina M., Čech B., Czudek S., Adamčík L., Velkoborský M., Soumarová R.
Oddělení chirurgie, Nemocnice Nový Jičín – Onkologické centrum J. G. Mendela
Radiodiagnostické oddělení, Nemocnice Nový Jičín – Onkologické centrum J. G. Mendela
Radioterapie a.s., Onkologické centrum J. G. Mendela

Cíl práce

Vyhodnocení výtěžnosti peroperační laparoskopické ultrasonografie jater

Metoda

Do prospektivní pilotní studie bylo zatím zařazeno 50 pacientů s kolorektálním karcinomem indikovaných k chirurgické léčbě. U pacientů byl proveden předoperační staging na základě předoperačního vyšetření (laboratorní nález, nádorové markery, RTG plic, CT břicha a malé pánve, TRUS, NMR event. PET CT). V uvedeném souboru bylo v I.-III. stádiu onemocnění 37 nemocných, ve stádiu metastatického postižení jater 13 nemocných.

Výsledky

U všech 50 nemocných byla provedena laparoskopická ultrasonografie jater v úvodu operace se zhodnocením nálezu zkušeným sonografistou. Následně byla provedena laparoskopická resekce. Diagnostický výkon nebyl provázen žádnou komplikací. V souboru bylo 37 nemocných bez průkazu jaterních metastáz u obou vyšetření.

Při CT vyšetření byly prokázány metastázy u 7 nemocných, při laparoskopické ultrasonografii u 13 nemocných. Uvedený rozdíl 6 nemocných činí 14% ze všech CT negativních nálezů. Dále nám sonografie umožnila zpřesnění diagnostiky ve smyslu lokalizace a charakteru ložisek u 7 nemocných (14%).

Závěr

Dosavadní výsledky pilotní studie nás opravňují, ve shodě s literárními údaji, doporučit peroperační sonografii jater jako standardní skríningové vyšetření ke stanovení stagingu kolorektálního karcinomu. Zpřesnění nebo změna stagingu může vést ke změně terapeutického plánu a tím i ke zlepšení prognózy pacienta s malignitou.

144 The malignant polyp – When to operate and when to watch ?

Pfeifer J.
Department of General Surgery, Medical University of Graz, Austria

Introduction

Colorectal cancer is one of the most leading causes of death in the Western world. Frequency of colorectal adenomas varies according to the studies (if younger people are included or not) between 2% – 35%. Adenomas are thought to be precursors for cancer (adenoma-carcinoma sequence) and therefore should be removed. However, polyps of the large bowel may originate from mucosa or submucosal tissue independant from their behaviour. Histological examination can differentiate between the various benign and potentially malignant forms.

Definition

Adenomatous polyps are neoplastic epithelial tumours with no evidence of malignancy. All adenomas are dysplastic by nature but not all dysplastic lesions are adenomas. A malignant polyp is a adenomatous lesion where cancer has invaded by direct continuity through the muscularis mucosa into the submucosa.

Pathology

The risk of malignant transformation depends on size, degree of dysplasia, the site (colon or rectum) and if the tumour's appearance is tubulous or villous.

Diagnosis

Biopsies of a polyp carries a risk of false negative results of 18.5%. Therefore a whole polypectomy must always be done. When polypectomy is done and the diagnosis of a malignant transformation has been established, several points must be considered: Is polypectomy enough? What are high risk factors, which may require colonic resection? Are there any other relevant factors?

Decision making

An exact level of invasion according to Hagitt's classification must be stated by the pathologist. Furthermore degree of differentiation, lympho-vascular invasion, completelyness of excision, resection margins and length of pedicle (if less than 3 mm) is important. It should be mentioned that malignant polyps with an unfavourable histology carry a cancer-specific risk of 10%-25%.

Factors against resection

Every colorectal resection has a significant risk of morbidity and mortality. To mention a few: leakage of the anastomosis, diarrhea, stoma complication beside age specific cardio-respiratory complications. The risk of malignant transformation in adenomas is less than 10%, the risk of postoperative death between 2%-10% dependent on age and co-morbidities.

Conclusion

The surgeon, gastroenterologist (endoscopist) and the pathologist must work together to offer the single individual the best available treatment.

145 Lokální terapie karcinomu rekta.

Starý L., Vysloužil K., Klementa I., Zbořil P., Neoral Č.
I.chirurgická klinika FN Olomouc

Cíl

Radikální chirurgický výkon je základním krokem při léčbě karcinomu rekta, a to i přes značné pokroky chemoterapie a radioterapie. Volba operačního výkonu závisí na TNM klasifikaci, uložení tumoru v rektální ampule, jeho velikosti a konfiguraci, stupni diferenciace. Mezi další kritéria, která limitují typ operace patří věk nemocného, jeho habitus, přidružené choroby a v neposlední řadě i přání pacienta.

Mezi základní chirurgické postupy při radikální léčbě karcinomu rekta patří abdominoperineální amputace rekta, přední nízká resekce a místní exscize. U prvních dvou jsou indikační pravidla dobře definovaná, lokální léčba je však stále diskutovaná. Zatímco u karcinomu in situ a intramukózního karcinomu je indikace k lokálnímu výkonu jednoznačná, u karcinomu invazivního se většinou respektuje do stádia T2 při G1, G2.

Autoři ve své práci dokumentují vlastní klinický materiál a zkušenosti s miniinvazivním přístupem k řešení maligních nádorů rekta.

Metoda

Prospektivní vyhodnocení klinického materiálu.

Výsledky

Na naší klinice jsme od ledna 2002 do ledna 2007 hospitalizovali celkem 262 pacientů s karcinomem rekta, 168 (64%) mužů a 94 (36%)žen. Z toho k lokálnímu výkonu bylo indikováno 47 (18%) nemocných, 26 mužů a 21 žen. Z celkového množství 214 operací transanální endoskopickou technikou tyto indikace tvoří 22%. Všichni pacienti před operací podstoupili endoskopické vyšetření s histologickým odběrem, endosonografické vyšetření (alternativně CT diagnostiku) a sonografické vyšetření jater a RTG plic. U všech nemocných byl zvolen typ výkonu transmurální resekce transanální endoskopickou mikrochirurgickou technikou. Histologicky se jednalo ve 19 případech o neinvazivní karcinom. U 28 nemocných o invazivní karcinom. Stádium T1 histolog potvrdil v 19 případech, T2 ve 7 případech a ve dvou preparátech bylo popsáno stádium T3. Grading ani v jednom případě nepřekročil stupeň G2. Komplikace nastaly ve třech případech. Jednalo se dvakrát o krvácení, které se zvládlo konzervativně a rektovaginální pištěl, která si vyžádala stomii. Dva nemocní ve stádiu T3 byli indikováni k lokálnímu výkonu v jednom případě jako k paliativnímu odstranění tumoru a v dalším případě pro odmítnutí amputace rekta. Recidivu po transmurální resekci jsme zatím nezaznamenali ani u jednoho nemocného. Jsme si však vědomi relativně krátkého období sledování.

Závěr

Závažnost kolorektálního karcinomu není jen v jeho stále se zvyšující incidenci, ale také fakt, že se vyskytuje se stoupající frekvencí u mladších jedinců. Léčba tohoto onemocnění by neměla směřovat pouze k přežití nemocných, ale i ke kvalitnímu dalšímu životu. Lokální výkon, správně indikovaný, nemocného „uchrání“ od rozsáhlého výkonu ve smyslu přední nízké resekce s jejími možnými důsledky nebo mutilujícímu výkonu jako je amputace rekta.

146 Long term results of local excision alone in patients with early rectal cancer.

Federico M.
Surgical Department General Hospital Bolzano (Italy)

Forty nine patients underwent local excison for rectal cancer in the last 18 years and were followed for a mean time of 90.9 months (range: 3 -240) after surgery.

Preoperative selection included CT-scan / MRI of the pelvis and rectal endosonography in attempt to select early rectal cancer (T1/T2 and N0 tumors) with a diameter smaller than 3 cm.

Full-disc excision was performed through the transanal or the transphincteric (after Mason) approach. The latter was abbounded in year 2000.

The definitive hystological examination of the specimen determined or not the adequacy of the limited treatment: tumors infiltrating the whole muscolar layer and/or with high risk-hystology (poor differentiation, lymphatic or vascular invasion) were considered not adequately treated and the patients were invited to undergo an abdominoperineal resection (salvage surgery).

In the group of 33 patiens in whom the cancer was confined to the submucosa (pT1) the recurrence rate was 6%. In 8 cases with invasion of the internal muscolar layer (pT2a) and low-risk histology, local recurrence occurred in 25%.

Finally in the group of patients with tumor invading the outer muscolar layer (pT2b) or with high-risk histolgy in whom salvage surgery was not performed because poor general condition or refusal, the recurrence rate was 50%.

The mean disease-free interval in the recurred patients was 27 months ranging from 11 to 48 months.

On the basis of our experience and according with the data of the literature we strongly suggest to perform local excision alone only for tumors limited to the submucosa with low-risk histology.

Counseling of the patient and accurate preoperative study are fundamental to achieve good results.

147 Surgery of rectal cancer after neoadjuant radiochemotherapy.

Hoch J.[1], Škapa P.[2], Jech Z., Umlaufová D.[1], Prausová J.[3]
1) Department of Surgery
2) Department of Pathology and Molecular Biology
3) Department of Radiotherapy and Oncology, University Hospital Motol, Charles University Prague, Czech Republic

Neoadjuvant radiochemotherapy has become to be a standard for the treatment of Stage II and III rectal adenocarcinoma during last 15 years in majority of European countries including Czech Republic. The effect of radiation on rectal cancer has been known for 70 years, however the use of radiotherapy was expanded since 1980. The dose, timming, purpose and goal of radiation were under debate for a long time. Pahlman and Glimelius in 1990 (1), Swedish Rectal Cancer Trial (2) and Kapitejn, Kranenbarg et al (3) and others (4, 5) showed the significance of radiotherapy on rectal cancer and the superiority of preoperative radiation. Increased dose of radiation (6), longer time interval between neoadjuvant radiotherapy and surgery (7) and particularly the chemosenzitization by combination with chemotherapy (8) enhance the effect of preoperative radiotherapy. It was proved that neoadjuvant radiochemotherapy allows to decrease local recurrency, to achieve a longer survival and longer disease free period, to downstage tumor and to perform more curative and sphincter saving surgeries. Preoperative radiochemotherapy leads to typical changes on tumor and lymphatic tissue and nodes. Tumor necrosis and sterilisation – disappearing of viable tumor cells – qualified and quantified by tumor regression grade – TRG – represents one of possible outcomes of RT (9). According to the literature the complete pathologic response (CPR) as the maximal effect of preoperative radiochemotherapy was found in the large range from 5 to 67% patients (6, 9). These patients qualified as ypT0N0M0 are free of cancer at the time of surgery.

The problem is to recognize the correct tumor stage before surgery. After neoadjuvant therapy there remain mesorectal tumor deposits or mesorectal microfoci and rectal wall microscopic foci covered by mucosa and fibrosis. Those are to small to be easily detected but causing tumor local recurrence (9, 10, 11, 12,). Despite to high senzitivity and specificity of present imaginative techniques such as CT, endosonography, 3D endosonography and especialy MRI, 25 – 40% of these microfocuses escape from any detection and postradiative reaction and fibrosis causes investigations more difficult. Only histopathological and/or histochemical investigation of removed bowel allows the definitive confirmation of tumor regression and extent of pathologic response. Due to the risk of oversight viable tumor in the irratiated tissue the surgery is still needed. The only exception represent studies of A.Habr-Gama. CPR after radiochemotherapy were observed in 27% of patients. These patients did not have surgery and were followed up, all of them survived over five years, 92% of them were disease free within this interval (12).

Our experience is based on the group of 188 patients treated for UICC stage II and III rectal cancer. They recieved 45 Gy preoperatively combined with 5-Fu (400 mg/m^2). The surgery was performed after 4-6 weeks. Macroscopic regression was confirmed in 55 (29.2%), the stage ypT0N0M0 – CPR in 17 (9%), and nCPR with tumor deposits in 58 (30.1%) patients. One patient suffered initialy from T2N0M0 rectal tumor. He refused surgery and the tumor disappeared completely after NeoRT/CT. He has no recurrence after three years.

Conclusion

Neoadjuvant radiochemotherapy allows even to achieve complete pathologic response by significant part of patients with rectal cancer. Due to the risk of missing undetectable residual tumor after NeoRT/CT the surgery is still needed. To choose suitable candidates both for surgery and chemoradiation depends on precise identification before and after CT/RT. Due to increasing amount of patients (13) it is very important to recognize appropriate candidates of multimodal therapy and select patients who may best respond to preoperative therapy (14,15).

Literature

1. Pahlman, L., Glimelius, B.: Pre- or postoperative radiotherapy in rectal cancer and rectosigmoid carcinoma: report from a randomized multicenter trial. Ann Surg, 1990, 211, p. 187-195.
2. Swedish Rectal Cancer Trial. In: Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. N Engl J Med,1997, 336, p. 980-987.
3. Kapitejn, E., Kranenbarg, EK., Steup, WH et al., Dutch Colorectal Cancer Group, Eur J Surg, 1999, 165, p. 410-420.
4. Frykholm, GJ., Glimelius, B., Pahlman, L.: Preoperative or postoperative irradiation in adenocarcinoma of the rectum: final treatment results of a randomized trial and an evaluation of late secondary effects. Dis Colon Rectum, 1993, 36, p. 564-572.
5. Camma, C., Giunta, M., Fiorica, F. et al: Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: a meta analysis. JAMA, 2000, 284, p. 1008-1015.

6. Janjan, NA., Khoo, VS., Abbruzzese, J. et al: Tumor downstaging and sphincter preservation with preoperativechemoradiation in locally advanced rectal cancer.
Int J Rad Oncol Biol Phys, 1999, 44, p. 1027-1038.
7. Stein, D., Mahmoud, NN., PR, A. et al: Longer time interval between completion of neoadjuvant chemoradiation and surgical resection does not improve downstaging of rectal carcinoma. Dis Colon Rectum, 2003, 46, p. 448-453.
8. Read, TE., Andjuar, JE., Caushaj, PF. ett al: Neoadjuvant therapy for rectal cancer: Histologic response of the primary tumor predicts nodal status. Dis Colon Rectum, 2004, 47, 6, p. 825-831.
9. Wheeler, JMD., Warren, BF., Mortensen, NJMcC.et al: Quantification of histologic regression of rectal cancer after irradiation. Dis Colon Rectum, 2002, 45, p. 1051-1056.
10. Heald, R., Husband, EM., Ryall, RD: The mesorectum in rectal cancer surgery – the clue to pelvic recurrence? Br J Surg, 1982, 69, p. 613-616.
11. Ratto, C., Ricci, R., Rossi, C. et al: Mesorectal microfoci adversely affect the prognosis of patients with rectal cancer. Dis Colon Rectum, 2002, 45, p. 733-743.
12. Habr-Gama, A., Perez, R., Nadalin, W. et al: Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy. Ann Surg, 2004, 4, p. 711-717
13. Annual statistics of health, Czech Republic, 2002.
14. Minsky, BD.: Combined modality therapy of resectable rectal cancer: Current approaches. Tech Coloproctol, 2004, 8, p. 67-76.
15. Nagtegaal, ID., van Krieken, JH.: The role of pathologists in the quality control of diagnosis and treatment of rectal cancer – an overview. Eur J Cancer, 2002, 38, p. 964-972.

Address to corresponding author: *jiri.hoch@lfmotol.cuni.cz*

148 The use of radiotherapy in early rectal cancer.

Pählman L.
University Hospital, Uppsala, Sweden

The treatment of early rectal cancer is mainly based upon different staging processes. If the tumour is suitable for a local excision, especially in low-lying tumours where an abdominal perineal excision is the alternative, a local procedure is often preferred. However, there is a clear shortage of doing a radical procedure in tumours involving the sphincter and sometimes the sphincter might be involved in the resection margin giving a bad bowel function.

According to data from the Swedish Cancer Register, the overall survival and cancer-specific survival of patients having been treated with a local excision are of similar magnitude as those treated with an abdominal procedure, if an analysis is done stage by stage. The use of radiotherapy in this specific group of patients has been very low.

The main use of radiotherapy could be in a preoperative setting to deliver a total downsizing of the tumour with no tumour left to operate upon, but also as a postoperative treatment if the pathological report after a local excision indicates a more aggressive tumour than interpreted from the beginning.

In a preoperative setting, it is rare that radiotherapy is used in abdominal surgery if the tumour is in an early stage (stage I). Due to the drawback of radiotherapy the use of preoperative radiotherapy has diminished over the years in this specific group. However, the new rational of giving chemo-radiotherapy in a preoperative setting with the purpose to more or less eradicate the tumour has changed the use of radiotherapy. Another type of preoperative treatment is the contact radiotherapy in stage I disease, where the tumour is totally eradicated by radiotherapy. This is like a local excision and is used in several units with an increasing use because new facilities are available nowadays.

The more common situation is a patient who has been treated with a local excision and the pathological report indicates an unfavourable tumour. The question in those patients is whether or not a salvage procedure with surgery should be done or if postoperative adjuvant radiotherapy with or without chemotherapy is appropriate. There are no randomised data supporting either of those two options and this is mainly a matter of information and discussion with the patient.

In summary, the use of radiotherapy in early rectal cancer (stage I) is rare and the evidence how to use it is more or less nonexistent.

149 Avastin v první linii kolorektálního karcinomu a bezpečnost léčby v podmínkách široké české onkologické praxe.

Šafanda M.[1], Abrahámová J.[2], Bartoš J.[3], Cwiertka K.[4], Fínek J.[5], Kiss I.[6], Kůta M.[7], Melichar B.[8], Petruželka L.[1], Prausová J.[9], Soumarová R.[10], Spurný V.[11], Stáhalová V.[12], Šiffnerová H.[13], Vodvářka P.[14], Vyzula R.[15]

1) VFN Praha
2) FTN Praha
3) Nemocnice Liberec
4) FN Olomouc
5) FN Plzeň
6) FN Brno
7) Nemocnice Chomutov
8) FN Hradec Králové
9) FN Motol Praha
10) Nemocnice Nový Jičín
11) FN u sv. Anny Brno
12) FN Bulovka
13) Nemocnice České Budějovice
14) FN Ostrava
15) MOÚ Brno

Bevacizumab (Avastin) je prvním klinicky ověřeným inhibitorem angiogeneze. Avastin prodlužuje jak celkové přežití (OS) tak přežití bez progrese onemocnění (PFS), je-li přidán ke standardní chemoterapii v první i ve druhé linii léčby metastazujícího kolorektálního karcinomu, jak je potvrzeno ve studiích fáze III a dalších rozsáhlých mezinárodních souborech čítajících k dnešnímu datu kolem 9 000 pacientů. Specifický léčebný program přinesl stovce českých pacientů – ještě před evropskou registrací – možnost léčby Avastinem v českých podmínkách. Vzhledem k pečlivému sběru dat v tomto programu a jeho monitorování jsme nyní schopni publikovat první ucelenou českou zkušenost s tolerancí této léčby a také první data o účinnosti léčby v české populaci. Účastnilo se celkem 15 pracovišť. Sponzorem programu byla firma Roche.

Cíl

Zajištění léčby bevacizumabem (Avastin) v kombinaci s chemoterapií na bázi fluoropyrimidinů pro pacienty s metastazujícím kolorektálním karcinomem v 1. linii a sledování a následné vyhodnocení parametrů účinnosti léčby (doba do progrese onemocnění, celková doba přežití) a výskyt nežádoucích účinků. Sledovány byly i demografické charakteristiky pacientů.

Metoda

Bevacizumabem bylo léčeno 96 pacientů v kombinaci s chemoterapií na bázi fluoropyrimidinů dle zvyku každého pracoviště (u 4 pacientů nebyla léčba zahájena). Léčba byla k 1.2.2007 ukončena u 84 pacientů, u 12 pacientů pokračuje. Nejčastěji podaným režimem byl FOLFOX4 -19 pacientů (20%), XELIRI – 16 pacientů (16,8%) a XELOX 13 pacientů (13,7%).

Výsledky

Demografické charakteristiky a bezpečnost léčby jsou zpracovány u 96 pacientů, medián sledování 9,9 měsíce. Do souboru byli zařazeni pacienti ve věkovém rozmezí od 27 do 82 let, 65% tvoří muži a 34% ženy, 59% pacientů mělo PS 0 a 41% pacientů PS 1. V roce 2006 byly hlášeny celkem 4 závažné nežádoucí účinky ve vztahu k bevacizumabu (tromboembolická příhoda, infarkt myokardu, metrorrhagie a krvácení z okolí anastomózy) a 20 nezávažných nežádoucích účinků ve vztahu k bevacizumabu. Aktualizované výsledky bezpečnosti léčby a první data o účinnosti léčby budou prezentována během kongresu.

Závěr

Léčba bevacizumabem v kombinaci s jakýmkoli režimem standardně používaným v České republice je bezpečnou, účinnou a dobře tolerovanou léčbou pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem v první linii.

150 The role of radiotherapy in rectal cancer treatment in 2007.

Pählman L.
Dept. surgery, University Hospital, Uppsala, Sweden • lars.pahlman@surgsci.uu.se

Introduction

The most important part in treating patients with rectal cancer is surgery, although the overall treatment policy has changed during the last three decades. Surgery has become more precise with a specific attention to a locally more aggressive and meticulous technique. Moreover, local excision has become a realistic alternative in some patients. The value of concomitant radiotherapy as well as the use of chemotherapy given pre– or postoperatively, has been studied extensively in many trials showing the benefit of adding chemotherapy and radiotherapy to surgery.

Based upon the modern treatment philosophy, with a multidisciplinary approach, every single patient must be offer the best and most appropriate treatment based upon a correct local staging as well as evaluating eventual spread of the disease to distant

organs. After the local and distant staging process the next step is to decide how to use adjuvant radiotherapy and/or chemoradiotherapy but also how to use different types of surgical approaches, i.e., local excision or an abdominal procedure.

Surgery

The decision making between a local excision and an abdominal resection is based upon estimating the risk of lymph node metastases in the mesorectum. This estimation is done with a proper preoperative T-staging, and to reach this endorectal ultrasound is necessary, since no other staging technique (CT or MRI) can with high accuracy evaluate whether or not the tumour is growing into the m. propria or not. A T1 tumour, i.e., not growing into m. propria has 1-15% risk of having involved lymph nodes in the mesorectum dependent upon how deep into the subserosal tissue the tumour is penetrating [1,2].

If a local excision is planned the TEM-technique (Transanal Endoscopic Microsurgery) is to be preferred due to a better visualisation of the tumour area with a much better chance of having a local radical excision. Based upon the final pathological report a proper risk analysis can be done regarding possible lymph node metastases, based upon the SM 1-3 classification proposed by Kukuchi et al [1].

If, based upon digital examination, it is obvious that the tumour cannot be excised locally an abdominal procedure must be consider. In this group, adjuvant radiotherapy must be considered and therefore a proper staging with MRI (Magnetic Resonance Image) is essential. With a high resolution technique the distance from the bowel wall to the rectal fascia can be estimated as well as whether or not the fascia is involved indicating that the circumferential resection margin will not be free at surgery [3-5]. If the margin is involved neo-adjuvant radiotherapy should be considered.

The abdominal part of the procedure has changed dramatically during the last 3 decades. The more precise dissection technique following the rectal fascia leaving the mesorectum intact as proposed by Mr Heald is essential, i.e., the TME-technique (Total Mesorectal Excision) [6]. The most challenging part of rectal cancer surgery is the perineal part of the abdominoperineal resection. With the patient in the prone position and excise the pelvic floor cylindrically a waste will be avoided leading to a radical procedure [7].

Radiotherapy

The indication for radiotherapy in the treatment of rectal cancer can be divided in four main topics.

1. To lower local recurrence rates and improves survival in resectable rectal cancer.
2. To allow surgery in non-resectable rectal cancer.
3. To facilitate sphincter-preserving procedures in low lying rectal cancer.
4. A totally curative procedure without major surgery.

To lower the local recurrence rate and improve survival in resectable rectal cancer.

Radiotherapy has been used for more than 30 years as a neo-adjuvant (given preoperatively) or adjuvant (given postoperatively) treatment and both settings has been used in combination with chemotherapy. According to the three published meta-analyses there are no doubt that neo-adjuvant treatment is superior in terms of reduction in local failures rate and cancer specific survival [8-10]. This is supported by the results from the three trials that specifically have studied pre- vs. postoperative radiotherapy. The first report was the Uppsala Trial where short-course preoperative radiotherapy to all patients was compared with postoperative prolonged course only till patients with advanced cancers (stage II and III) [11]. The other two trials have compared neo-adjuvant chemoradiotherapy with adjuvant chemoradiotherapy with same schedules and doses. The NSABP R-03 trial, which closed prematurely because of poor accrual, showed that 44% of patients having undergone preoperative chemoradiation were disease-free at one year, compared with 34% of patients who had received postoperative chemoradiation [12]. The German CAO/ARO/AIO-94 trial was randomizing patients with T3-4 N0-1 rectal cancer to neo-adjuvant chemoradiation followed by surgery and additional postoperative chemotherapy or postoperative chemoradiation. The local recurrence rate was halved in the preoperative setting and the survival was superior although not statistically significant in the neo-adjuvant arm [13].

Neo-adjuvant therapy: radiation alone versus chemoradiation

The advantages of neo-adjuvant therapy include increased tumour radiosensitivity with decreased small bowel toxicity, decreased overall radiation, and decreased tumour seeding. The main disadvantage of neo-adjuvant therapy is the risk for overtreatment in patients with early-stage disease. However, with appropriate imaging with endorectal ultrasound [14] and magnetic resonance imaging (MRI) [3-5] preoperative identification of patients with T2 and T3 tumours will be identified, thus minimizing the number of patients who would be overtreated.

Neo-adjuvant radiation alone has been used with to main techniques, i.e., the short preoperative course, 25 Gy given during one week (most commonly used), or as a long-course treatment of 45-55 Gy given over 5-6 weeks. Both schedules have an equivalent biological effect on the tumour. In 1996, the Swedish Rectal Cancer Trial (SRCT) demonstrated that short course (25 Gy) of preoperative radiotherapy with surgery within the next week significantly reduced local recurrence from 27% to 12%, and improved 5-year survival rates from 48% to 58% when compared to surgery alone [15]. In new follow-up more than 10 years, the beneficial effect of radiotherapy dose exist [16]. The main objection to all trials published during the 80's and early 90's, including the SRCT, is that surgery was not optimal. The average local recurrence rate in the „surgery alone"-arm in all trials dis-

cussed in the meta-analyses was 29-30% [8-10]. Although the undisputed major benefits of preoperative radiotherapy remain loco-regional tumour control with a decreased local recurrence rates, several reports have shown that the same low local recurrence rates have been achieved in specialized centres with surgery alone using a more meticulous surgery [17-19]. Several reports from different countries have demonstrated that surgical skill is of outmost importance, and the use of radiotherapy can be discussed if surgery is optimized [20-23].

In the Dutch trial short-course neo-adjuvant radiotherapy followed by surgery in one week was tested against surgery alone but it was mandatory that surgeons had adopted the TME-technique before entering patients. A total of 1861 patients were included and a significantly improved 2-year local recurrence rates from 8.2% to 2.4% was noticed if preoperative radiation was given [24]. The improvement in local recurrence rate after five years follow-up is 11.4% to 5.6% but now advantage in overall 5-years survival has been demonstrated in this trial [25].

There are several theoretical reasons to combine chemotherapy to preoperative radiation. The addition of 5-FU based chemotherapy may theoretically act as a radiosensitizer and has therefore been used in advanced rectal cancers (see below). However, in patients with advanced but resectable tumour (T3-4, N2) two randomized phase III study comparing neo-adjuvant radiotherapy versus neo-adjuvant chemoradiotherapy have failed to demonstrate an survival effect although the local recurrence rate have been halved from 11% to 5% [26,27].

Postoperative adjuvant therapy: radiation alone versus chemoradiation.

The rational of reserving adjuvant treatment for the postoperative setting is to restrict its use to patients who are at identified risk for failure, based on their histopathologic staging. Disadvantages include a higher incidence of radiation-related complications, particularly to the small bowel and a higher number of patients unable to complete the entire course of therapy because of treatment side effects.

Several trials using postoperative radiotherapy alone was conducted during the 80's and did report decreased local recurrence, although not to the same extent as neo-adjuvant treatment, and but this reduction did not improve survival [28-30]. If radiotherapy was combined with 5-fluorouracil based chemotherapy an increased local control and significantly improved survival by 10-15% [31,32]. All those trials were heavily under-powered, but despite this, these findings prompted the National Cancer Institute Consensus Conference of 1990 to recommend combined modality chemoradiotherapy as the standard postoperative adjuvant treatment for patients with stage II and stage III rectal cancer [33]. Although a recently published Norwegian trial confirmed [34] these findings, many countries, especially in Europe, did not follow those recommendations manly due to the fact that neo-adjuvant radiotherapy was proven to be more efficacious. Other reasons are the relative radioresistance of the hypoxic surgical bed and the risk for re-population of tumour cells from surgery to the start of radiotherapy.

To allow surgery in non-resectable rectal cancer.

A non-resectable rectal cancer is by definition a tumour not possible to excise without a very high risk of a local recurrence, indicating that the tumour has an involvement with the rectal fascia. Accordingly, there is a high risk of having a positive circumferential resection margin on the surgical specimen. These are the tumours which are tethered or fixed but it is difficult to know whether or not the fixity is due to cancer overgrowth or fibrosis. From the literature it is obvious that there is no uniform definition of a non-resectable rectal cancer but based upon available data, patients with such a large tumour do benefit from a preoperative radiotherapy with the aim to downsize the tumour. Approximately 10-15% of all patients with a rectal cancer do have an advanced cancer, which could be considered non-resectable and half of those patients have no metastases, indicating that there is a potential possibility for a curative procedure [35]. Surgery alone is likely to cure very few and therefore it is more or less mandatory to offer those patients radiotherapy. The question is whether this should be combined with chemotherapy. However, in this specific setting short-course radiotherapy is not a valid option. The rationale for using radiotherapy in this group of patients is the down-sizing effect and therefore a prolonged treatment with conventional radiotherapy (25x2 Gy) over a five weeks period is used. After a waiting time for up to 6-8 weeks the tumour shrinkage will make it possible to do a curative procedure.

The evidence for chemoradiotherapy based upon randomised trials is very poor with only one old positive trial published in 1969 [36] and two negative trials with increased toxicity published in the late 80's [37,38]. One Swedish trial in which patients was randomised to long-course radiotherapy alone or to long-course chemoradiation was published in 2001 showed a beneficial effect on both local recurrence rate and survival. Unfortunately, that trial was under powered [39]. However, several phase II trials have reported a good reduction in local recurrence rate and these data are also very impressive regarding survival [40,41]. The problem with all different reports is the case-mix making it almost impossible to really interpret the trials since the definition of 'non-resectability' differs enormously. One recently finished Nordic trial, the LARCS trial, where patients were randomised to either 50 Gy preoperatively or 50 Gy and chemotherapy preoperatively. The trial has just been closed and preliminary data supports the advantage of chemoradiation in this group of patients [42]. Despite lack of good evidence-based data the movement is strong and many patients will be offered chemoradiotherapy, and probably no more trials with a radiotherapy arm will start.

Although no strong evidence-based data support the use of chemo-radiotherapy in patients with advanced rectal cancers, most radiotherapists and medical oncologists use this combined treatment to improve the effect of radiotherapy. The newer chemotherapeutic agents currently in use or under study for treatment of locally advanced and metastatic colon cancer (e.g. irinotecan,

capecitabine, and oxaliplatin) will doubtlessly be evaluated for their usefulness in neo-adjuvant treatment of rectal cancer in the near future and several phase-II trials are ongoing [43].

To facilitate sphincter-preserving procedures in low-lying rectal cancer.

It has been claimed from several series that preoperative radiotherapy and preferably chemoradiotherapy will downsize the tumour to that extent that it is possible to increase the number of patients where the sphincters could be preserved [44-48]. Moreover, there is one group who has reported a series of patients with complete response to chemoradiotherapy (including T4 tumours), where surgery has been postponed with several long-term survivors and those patients are alive and doing well despite no surgery has been done [49].

However, the problem with all those phase II trials is that all authors are comparing the results with historical controls from their own unit. Since surgery has change the last two decades with acceptance of a much less distal margin of 5-10 mm margin it is difficult to interpret all trials [50-51]. Therefore, randomised comparisons with patients treated having different radiation options have to be done. In one French trial, were sphincter preservation was an endpoint, patients with T2 and T3 tumours had preoperative 39 Gy (13 x 3 Gy) and were randomised to immediate surgery or surgery 5 weeks after irradiation. The surgeons were asked before any treatment to evaluate the possibility to preserve the sphincters. There is a slight increase in numbers where the sphincter could be preserved if surgery was delayed [52]. However, the overall recurrence rate was 9%, which is considered a rather high figure today, but more importantly, the local recurrence rate among those patients where the surgeon change the procedure to a sphincter sparing one was 12% [52].

A sub-group analysis from the German trial (CAO/ARO/AIO-94) where patients were randomised to pre- or postoperative chemoradiotherapy, revealed an increase in sphincter preservation if preoperative chemoradiotherapy was used (35% vs. 18%). However, it is not possible, based upon the report to interpret the figures and the overall sphincter preservation was the same in both arm, and no data on local recurrence rate from this sub-group is reported [13].

Another very important trial is the Polish trial, where patients were randomised to short-course radiotherapy with immediate surgery vs. a long-course chemoradiotherapy and delayed surgery. The inclusion criterion in this trial was a tumour possible to be reached by a digital examination but no sphincter infiltration. It should be a T3 or a resectable T4 tumour and 1 cm microscopic distant margin was sufficient. This trial was conducted to see whether chemoradiotherapy and delayed surgery would have an impact on sphincter preservation and this was primary end-point in the trial together with local recurrence rate. More than 300 patients were randomised and after closure of the trial the percentage of preserved sphincters was identical in both groups, 61% in the short-course radiotherapy with immediate surgery vs. 59% in the prolonged chemoradiotherapy course and delayed surgery [53].

The results from the Polish trial are important and underlines that there is still no good evidence supporting that a prolonged course radiotherapy combined with chemotherapy with delayed surgery will have an impact on sphincter preservation. A very important draw-back of having too many sphincters preserved is actually the poor function. In some reports up to 20% of all patients are incontinent for solid stools [47]. This cannot be a good quality of life! Moreover, there are data supporting that, as a group, patients with a stoma has a better quality of life compared to those with an anterior resection [54].

In summary, there are rather vague data supporting that chemoradiotherapy will reduce more preserved sphincters than radiotherapy alone. Probably, an important factor is the waiting time from end of radiotherapy to surgery to achieve good downsizing and this might improve the number of sphincters preserved.

Conclusion

Based upon available literature the use of radiotherapy can be summarised as followed:

Provided the preoperative staging indicates a high risk of having a local recurrence after surgery alone (> T3 tumours) preoperative radiotherapy should be considered. Data do support that preoperative short-course radiotherapy is as good as long-course radiotherapy. If the preoperative staging indicates an involved margin, preoperative long-course chemoradiation should be considered. There is still no evidence supporting that radiotherapy or chemoradiation will increase sphincter-preservation.

References

1. Kukuchi R, Takano M, Tagagi K, et al. Management of early invasive colorectal cancer. Dis Colon Rectum 1995; 38: 1286-1295.
2. Haggitt RC, Glotzbach RE, Soffer EE Wruble LD. Prognostic factors in colonrectal carcinomas arising in adenomatous implications for lesions removed by endoscopic polypectomy. Gastroenterology 1985; 89: 328-336.
3. Brown G, Richards CJ, Newcombe RG et al. Rectal carcinoma: thin-section MR imaging for staging in 28 patients. Radiology 1999; 211: 215-222.
4. Blomqvist L. Holm T, Nyren O et al. MR imaging and computed tomography in patients with rectal tumours clinically judged as locally advanced. Clin Radiol 2002; 57: 211-218.
5. Beets-Tan RG, Reets GL, Vliegen RFK et al. Accuracy of magnetic resonance imaging in prediction of tumour-free resection margin in rectal cancer surgery. Lancet 2001; 357: 497-504.

6. Heald RJ, Moran BJ. Embryology and anatomy of the rectum. Semin Surg Oncol 1998; 15: 66-71.
7. Holm T, Ljung A, Häggmark T, Jurell G, Lagergren J. Extended abdoninoperineal resection with gluteus maximus flap reconstruction of the pelvic floor for rectal cancer. Br J Surg 2007; 94: 232-238.
8. Camma C, Giunta M, Fiorica F et al. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: a meta-analysis. JAMA 2000; 284: 1008-1015
9. Colorectal Cancer Collaborative Group: Adjuvant radiotherapy for rectal cancer: a systematic overview of 8,507 patients from 22 randomised trials. Lancet 2001; 358: 1291-304
10. Glimelius B, Grönberg H, Järhult J, Wallgren A, Cavallin-StĺhI E. A systematic overview of radiation therapy in rectal cancer. Acta Oncologica 2003; 42: 476-492
11. Pählman L, Glimelius B: Pre- or postoperative radiotherapy in rectal and rectosigmoid carcinoma – report from a randomized multicentre trial. Ann Surg 1990; 211: 187-195
12. Roh MS, Petrilli N, Wieand H et al. Phase III randomized trial of preoperative versus postoperative multimodality therapy in patients with carcinoma of the rectum (NSABP R-03). Proc Am Soc Clin Oncol 2001; 20:123a (abstract)
13. Sauer R, Becker H, Hohenberger W et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer New Engl J Med 2004; 351: 1731-1740.
14. Garcia-Aguilar J, Pollack J, Lee SH et al. Accuracy of endorectal ultrasonography in preoperative staging of rectal tumors. Dis Colon Rectum 2002; 45: 10-15
15. Swedish Rectal Cancer Trial (PĺhIman L & Glimelius B): Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal carcinoma. N Engl J Med 1997; 336: 980-987.
16. Folkesson J, Birgisson H, PĺhIman L, Cedermark B, Glimelius B and Gunarsson U. The Swedish Rectal Cancer Trial – long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. J Clin Oncol 2005; 23: 5644-5650.
17. Heald RJ, Karanjia ND. Results of radical surgery for rectal cancer. World J Surg 1992; 16: 848-57
18. Enker WE. Potency, cure, and local control in the operative treatment of rectal cancer. Arch Surg 1992; 127: 1396-401
19. Moriya Y, Hojo K, Sawada T, Koyama Y. Significance of lateral node dissection for advanced rectal carcinoma at or below the peritoneal reflection. Dis Colon Rectum 1989; 32: 307-15
20. Wibe A, Rendedal PR, Svensson E, Norstein J, Eide TJ, Myrvold HE, Soreide O: Prognostic significance of the circumferential resection margin following total mesorectal excision for rectal cancer. Br J Surg 2002; 89: 327
21. Dahlberg M, Glimelius B, PĺhIman L: Changing strategy for rectal cancer is associated with improved outcome. Br J Surg 1999; 86: 379-84
22. Martling AL, Holm T, et al: Effect of a surgical training programme on the outcome of rectal cancer in the County of Stockholm. Lancet 2000; 356: 93-96
23. Pählman L, Bohe M, Cedermark B, Dahlberg M, Lindmark G, Sjödahl R, Öjerskog B, Damber L Johansson R. The Swedish Rectal Cancer Regisrty. Br J Surg 2007; in press.
24. Kapiteijn E, Matijnen CA, Naggtegaal ID et al. Preoperative radiotehrapy combined with total mesorectal excsision for resectable rectal cancer. N Engl J Med 2001; 345:638-646
25. Peeters KCMJ, Marijnen CAM, Nagtegaal ID et al. The TME trial after a median follow-up of 5 years: increased local control but no survival benefit in irradiation patients with mobile rectal carcinoma. Ann Surg 2007, in press.
26. Bosset JF, Calais G, Daban A et al. Preoperative chemoradiotherapy versus preoperative radiotherapy in rectal cancer patients: assessment of acute toxicity and treatment compliance. Report of the 22921 randomised trial conducted by the EORTC radiotherapy group. Eur J Cancer 2004; 40:219-24.
27. Gerard J, Bonnetaine F, Conroy T, Chapet O, Bouche O, Closon-Dejardin M, et al. Preoperative (preop) radiotherapy (RT) + 5 FU/folinic acid (FA) in T3-4 rectal cancers: results of the FFCD 9203 randomized trial. Proc Am Soc Clin Oncol 2005; Abstr 3504
28. Fisher B, Wolmark N, Rockette H et al. Postoperative adjuvant chemotherapy or radiation therapy for rectal cancer. Results from NSABP protocol R-01. J Natl Cancer Inst 1988; 80:21-29
29. Wolmark N, Weiand HS, Hyams DM et al. Randomized trial of postoperative adjuvant chemotherapy with or without radiotherapy for carcinoma of the rectum: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol R-02. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 388-396
30. Willett CG, Tepper JE, Kaufman DS et al. Adjuvant postoperative radiation therapy for rectal adenocarcinoma. Am J Clin Oncol 1992; 15: 371-375
31. Krook JE, Moertel CG, Gunderson LL et al. Effective surgical adjuvant therapy for high-risk rectal carcinoma. N Engl J Med 1991; 324: 709-715
32. Gastrointestinal Tumor Study Group: Adjuvant therapy of colon cancer: results of a prospective randomized trial. N Engl J Med 1984; 310: 737-743
33. National Institutes of Health Consensus Conference: adjuvant therapy for patients with colon and rectal cancer. JAMA 1990; 264: 1444-1450
34. Tveit KM, Guldvog I, Hagen S, et al: Randomised controlled trial of postoperative radiotherapy and short-term time-scheduled 5-fluorouracil against surgery alone in the treatment of Dukes B and C rectal cancer. Br J Surg 1997; 84: 1130-1135

35. Pählman L, Enblad P, Glimelius B: Clinical characteristics and their relation to surgical curability in adenocarcinoma of the rectum and recto-sigmoid: a population-based study in 279 consecutive patients. Acta Chir Scand 1985; 151: 685-693
36. Moertel C G, Childs D S, Reitemeier R J et al: Combined 5-fluorouracil and supervoltage radiation therapy of locally unresectable gastrointestinal carcinoma. Lancet 1969; 2: 865-867
37. Overgaard M, Berthelsen K, Dahlmark M, Gadeberg C G, van der Maase H, Overgaard J, Sell A: A randomized trial of radiotherapy alone or combined with 5-FU in the treatment of locally advanced colorectal carcinoma. ECCO 5, meeting abstract 1989; 0-0626
38. Wassif-Boulis S: The role of preoperative adjuvant therapy in management of borderline operability of rectal cancer. Clinical Radiology 1982; 33: 353-358
39. Frykholm GJ, Pahlman L, Glimelius B: Combined chemo and radiotherapy versus radiotherapy alone in the treatment of primary, non-resectable adenocarcinoma of the rectum. Int J Rad Onc Biol Phys 2001; 50: 433-440
40. Janjan NA, Abbruzzese J, Pazdur R, Khoo VS, Cleary K, Dubrow R, Ajani J, Rich TA, Goswitz MS, Evetts PA, Allen PK, Lynch PM, Skibber JM: Prognostic implications of response to preoperative infusional chemoradiation in locally advanced rectal cancer. Radiotherapy & Oncology 1999; 51: 153-160
41. Bouzourene H, Bosman FT, Seelentag W, Matter M, Coucke P: Importance of tumor regression assessment in predicting the outcome in patients with locally advanced rectal carcinoma who are treated with preoperative radiotherapy. Cancer 2002; 94: 1121-1130
42. Brandaengen M, Tveit KM, Berglund E, Birkemeyer G, Frykholm L, PÍhlman et al. A randomized phase III study (LARCS) comparing preoperative radiotherapy alone versus chemoradiotherapy in non-resectable rectal cancer. ECCO Conference, Paris 2005; Abstr.
43. Glynne-Jones R, Sebag-Montefiore D: Chemoradiation schedules – what radiotherapy? Eur J Cancer. 2002; 38: 258-69
44. Valentini V, Coco C, Cellini N et al. Preoperative chemoradiation with cisplatin and 5-fluorouracil for extraperitoneal T3 rectal cancer: acute toxicity tumor response, sphincter preservation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999; 45: 1175-1184
45. Grann A, Minsky BD, Cohen AM et al. Preliminary results of preoperative 5-fluorouracil, low-dose leucovorin and concurrent radiation therapy for clinically respectable T3 rectal cancer. Dis Colon Rectum 1997; 40: 515-522
46. Hyams DM, Mamounas EP, Petrelli N et al. A clinical trial to evaluate the worth of preoperative multimodality therapy in patients with operable carcinoma of the rectum: a progress report of National Surgical Breast and Bowel Project Protocol R-03. Dis Colon Rectum 1997; 40: 131-139
47. Rouanet P, Saint-Aubert B, Lemanski C et.al: Restorative and nonrestorative surgery for low rectal cancer after high-dose radiation. Dis Colon Rectum 2002; 45: 305-315
48. Mohiuddin M, Regine WF, Marks GJ, Marks JW. High dose preoperative radiation and the challenge of sphincter-preservation surgery for rectal cancer of the distal 2 cm of the rectum. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 40: 569-574
49. Habr-Gama A, de Souza PM, Ribeiro U et al. Low rectal cancer: impact of radiation and chemotherapy on surgical treatment. Dis Colon Rectum 1998; 41: 1087-1096
50. Moore HG, Riedel E, Minsky BD et al. Adequacy of 1 cm distal margin after restorative rectal cancer resection with sharp mesorectal excision and preoperative combined-modality therapy. Ann Surg Oncol 2003; 1: 80-85
51. Karnjia ND, Schache DJ, Nort WR, Heald RJ. 'Close shave' in anterior resection Br J Surg 1990; 63: 673-677
52. Francois Y, Nemoz CJ, Baulieux J, et al. Influence of the interval between preoperative radiation therapy and surgery on downstaging and on the rate of sphincter-sparing surgery for rectal cancer: The Lyon R90-01 randomized trial. J Clin Oncol 1999; 17: 2396-2402
53. Bujko K, Nowacki MP, Bebenek M et al: Sphincter preservation following preoperative radiotherapy for rectal cancer: report of a randomised trial comparing short-term radiotherapy versus conventionally fractionated radiochemotherapy. Radiation Oncol 2004; 72: 15-24
54. Frigell A, Ottander M, Stenbeck H & Pählman L: Quality of life of patients treated with abdominoperineal resection or anterior resection for rectal carcinoma. Ann Chir Gynaecol 1990; 79: 26-30

151 Bevacizumab, irinotekan a kapecitabin – léčebná odpověď, čas do progrese a jednoleté přežití u pacientů s nepředléčeným metastatickým kolorektálním karcinomem, retrospektivní analýza.

Kocáková I, Kocák I, Špelda S, Holánek M., Poprach A., Vyzula R.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Bevacizumab (Avastin™) představuje monoklonální protilátku zacílenou na vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Na základě výsledků randomizovaných klinických studií (studie AVF2192 a studie AVF2107g) je první zaregistrovanou antiangiogenní látkou pro pacienty s metastazujícím kolorektálním karcinomem (MCRC). Tyto studie prokázaly, že přidání bevacizu-

mabu k chemoterapii vedlo k signifikantnímu prodloužení mediánu přežití, zlepšení doby přežití bez progrese onemocnění, zvýšení četnosti léčebných odpovědí a prodloužení trvání odpovědi při dobré toleranci.

Od dubna do prosince 2005 byl v MOÚ podáván v rámci specifického léčebného programu (SLP) firmy Roche bevacizumab pacientům s kolorektálním karcinomem klinického stadia IV v kombinaci s irinotekanem a kapecitabinem (režim XELIRI). Tato kombinace byla zvolena na základě prokazatelné protinádorové účinnosti kapecitabinu a irinotekanu v léčbě MCRC, synergistické protinádorové účinnosti kombinace kapecitabinu s bevacizumabem a irinotekanu s bevacizumabem v preklinických studiích a na základě srovnatelné účinnosti kombinace XELIRI v porovnání s režimem FOLFIRI, kdy procento léčebných odpovědí dosahuje 50%. Režim XELIRI navíc v publikovaných studiích měl lepší bezpečnostní profil než kombinace FOLFIRI a umožňuje plně ambulantní léčbu bez nutnosti zavádění centrálního žilního katetru.

Léčebné schéma

- ***Irinotekan*** *250 mg/m^2 den 1.*
- ***Bevacizumab*** *7,5 mg/kg den 1.* (první podání v infuzi na 90 min., následně byla doba podání při dobré toleranci zkrácena na 60 min. a od třetí aplikace na 30 min.)
- ***Kapecitabin*** *1000 mg/m^2 2 x denně, den 2.-15.*

Cyklus byl opakován každé 3 týdny. Léčebná odpověď dle RECIST kriterií byla hodnocena po 2-3 cyklech chemobioterapie. Léčba trvala do progrese onemocnění, neakceptovatelné toxicity, nebo byla ukončena z rozhodnutí nemocného.

Počet pacientů	14
Muži/ženy	9/5
Medián věku	53 let
Věkové rozmezí	39-67 let
Performance status	
PS 0	7
PS 1	8
Lokalizace primárního tumoru	
Kolon	6
Rektum	8
Předchozí léčba	
Adjuvantní radioterapie	3
Adjuvantní chemoterapie	4
Počet metastatických lokalit	
Medián	2
Rozmezí	1-4
Jednoorgánové postižení	3 pacienti
Víceorgánové postižení	11 pacientů
Nejčastější metastatické lokality	
Játra	12 pacientů
Plíce	7 pacientů
Retroperitoneální uzliny	3 pacienti
Lokální recidiva	3 pacienti

Tab. č. 1: Charakteristika léčených pacientů

Počet hodnotitelných pacientů	13
Počet podaných cyklů	158
Rozmezí	8-18
Medián	12
Léčebná odpověď dle RECIST kritérií	
Kompletní remise	1
Parciální remise	11
Kompletní resekce reziduálního nádoru	2*
Stabilizace nemoci	1
Progrese nemoci0	
Doba sledování od zahájení terapie/měsíce	
Rozmezí	14-21
Medián	17
Čas do progrese onemocnění/měsíce	
Rozmezí	6-17
Medián	12
Jednoleté přežit: n (%)	13/100%
Další terapie nemocných při progresi nemoci	
XELOX	7 pac.
FOLFOX	44 pac.
Campto a Erbitux	1 pac.
Opakovaná reoperace recidivy	1 pac.

Tab. č. 2: Hodnocení léčebné odpovědi podle RECIST kriterií, počet podaných cyklů, doba sledování a čas do progrese onemocnění

Výsledky

Do tohoto léčebného programu bylo v MOÚ od 3.5. 2005 do 29.11. 2005 zařazeno 14 pacientů, 9 mužů, 5 žen s mediánem věku 53 let. U všech nemocných se jednalo o histologicky ověřený metastatický nebo lokálně pokročilý, inoperabilní kolorektální karcinom minimálně s jednou měřitelnou lézí. Bližší charakteristika pacientů a nádorů je uvedena v tabulce č. 1.

Předběžné výsledky hodnotící efektivitu a toleranci této pilotní studie byly velice povzbudivé a byly prezentovány na kongresu BOD 2006, ASCO 2006 a v Barceloně 2006. Klinický benefit (CR, PR a SD) provázený dramatickým poklesem nádorových markerů byl dokumentován u všech léčených pacientů.

Dobrá snášenlivost této kombinované terapie při absenci kumulativní toxicity irinotekanu umožňovala podávat toto schéma po řadu měsíců, aniž by vedla ke zhoršení kvality života léčených. Očekávali jsme, že přidání bioterapie povede k prodloužení času do progrese nemoci (TTP) a prodloužení celkového přežití nemocných (OS).

Cílem tohoto sdělení je retrospektivní analýza souboru nemocných léčených v rámci SLP k datu 30.1. 2007 se zaměřením se na čas do progrese onemocnění a jednoleté přežití pacientů a srovnání těchto výsledků s výsledky publikovaných studií.

Léčebnou odpověď a počet podaných cyklů vystihuje tabulka č. 2. Kompletní remise onemocnění (CR) byla zaznamenána u 1 pacienta, parciální remise (PR) u 11 léčených. Kompletní resekce reziduálního nádoru byla indikována u 2 pacientů. V jednom případě šlo o resekci jaterních metastáz, ve druhém případě o odstranění reziduálního nádorového infiltrátu v retroperitoneu. Pouze u 1 pacientky s lokální pánevní recidivou byla terapie na žádost nemocné ukončena s efektem stabilizace onemocnění (SD) dle CT vyšetření a s dokumentovaným poklesem nádorových markerů.

Z tabulky vyplývá, že při mediánu 12 cyklů aplikované chemobioterapie, byla střední doba léčby pacientů 36 týdnů. Ačkoliv se jednalo o soubor pacientů s poměrně značným rozsahem onemocnění (11 pacientů z 13 hodnotiltených mělo víceorgánové postižení), byl dokumentován medián času do progrese onemocnění 12 měsíců. Jeden rok od zahájení terapie pro MCRC žili všichni nemocní. Při dokumentované progresi onemocnění byl v 2. linii léčby nejčastěji podáván režim XELOX. Ze 7 takto léčených pacientů byla u 1 nemocné pro hyperbilirubinémii následkem rychlé progrese jaterních metastáz chemoterapie po 3 cyklech ukončena. Při mediánu sledování 17 měsíců žije 12 nemocných (92%).

Režim	*TTP/měsíce*	*OS/měsíce*
FU/FA Mayo	6,2	12,6
IFL	7	15-16
FOLFIRI	8,5	16-17
FOLFOX	8,7	16-17
FOLFIRI>FOLFOX FOLFOX>FOLFIRI	–	20-22
IFL+Bevacizumab	10,6	20,3
XELIRI + Bevacizumab	12	nestanoven >17 měsíců žije 96% pac.

Ref: Scheithauer 1993; Saltz 2000, Douillard 2000, de Gramont 2000; Goldberg 2004, Tournigand 2004; Hurwitz 2004).

Tab. č. 3: Srovnání času do progrese onemocnění (TTP) a mediánu přežití (OS) u různých chemoterapeutických režimů.

Závěr

V léčbě MCRC paliativní chemoterapie zmírňuje symptomy nemoci, prodlužuje čas do progrese onemocnění a medián přežití nemocných v porovnání s nejlepší podpůrnou léčbou.

Kombinace irinotekan/5-fluorouracil/kyselina folinová (studie AVF2107g) jako první ukázala, že anti-angiogenní léčba může prodloužit přežití pacientů. Přidání bevacizumabu k IFL prodloužilo medián přežití z 15,6 na 20,3 měsíců ($p < 0,001$). Režim signifikantně zlepšil dobu přežití bez progrese onemocnění (6,2 vs 10,6 měsíců; $p < 0,001$) a četnost léčebných odpovědí (35 vs 45%, p=0,004).

Tabulka č. 3 srovnává TTP a OS různých chemoterapeutických schemat používaných v léčbě MCRC. Jsme si vědomi omezeného počtu pacientů v prezentovaném souboru, nicméně výsledky této pilotní studie (TTP 12 měsíců a 92% žijících nemocných při mediánu sledování 17 měsíců) jsou excelentní a měly by vést k ověření těchto výsledků na větším souboru nemocných.

Literatura

1. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2004;350:2335-2342.
2. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2003;21:60-65
3. Kabbinavar F, Schultz J, McCleod M et al. Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) to prolong progression-free survival in first line colorectal cancer (CRC) in subjects who are not suitable candidates for first-line CPT-11. Presented at the American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Symposium, San Francisco, California, January 22-24, 2004.

152 Cetuximab a irinotekan v léčbě metastazujícího chemorezistentního kolorektálního karcinomu, zkušenosti z MOÚ.

Kocáková I., Kocák I., Nenutil R., Špelda S., Garajová I., Vyzula R.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Na metastatický kolorektální karcinom (MCRC) zemře ročně v České republice přibližně 5 000 osob. Léčba spočívá v kombinaci různých přístupů, k nimž patří chirurgie, radioterapie a především systémová chemoterapie. V současnosti za zlatý standard terapie metastatického onemocnění považujeme sekvenční kombinovanou chemoterapii s 5-fluorouracilem, irinotekanem a oxaliplatinou. Překážkou déletrvajícího úspěchu léčby je však neselektivita cytotoxických látek a postupný rozvoj rezistence nádorových buněk, a tak i při použití výše zmíněných cytostatik medián přežití nepřesahuje 22 měsíců. Jednu z dalších velkých nadějí v protinádorové léčbě tohoto onemocnění představuje objev biologické terapie založené na monoklonálních protilátkách.

Cetuximab (Erbitux), inhibitor tyrosinkinázy receptoru pro růstový faktor (epithelial-growth-factor-receptor -EGFR), má selektivní protinádorovou aktivitu. Inhibuje proliferaci a indukuje apoptózu nádorových buněk, inhibuje angiogenezi a snižuje nádorovou neovaskularizaci a metastatický potenciál. Synergistická protinádorová účinnost s irinotekanem v modelech in vitro a in vivo vedla k iniciování randomizované klinické studie – „BOND“ studie. Kombinace irinotekanu s cetuximabem vedla u 23% intenzivně předléčených nemocných k dosažení parciální odpovědi (PR), klinický benefit (CR+PR+SD) byl dokumentován u 55,5% pacientů. Čas do progrese onemocnění (TTP) dosáhl 4,1 měsíce.

Počet zařazených pacientů	19
Počet hodnotitelných pacientů	18
Muži/ženy	15/3
Medián věku	57 let
Věkové rozmezí	40-71 let
Performance status	
PS 0	11
PS 1	7
Lokalizace primárního tumoru	
Kolon	10
Rektum	8
Klinické stádium v době diagnozy	
Klinické st. II	2
Klinické stádium III	5
Klinické stádium IV	11
Počet metastatických lokalit	
Medián	2
Rozmezí	1-4
Jednoorgánové postižení	2 pac.
Víceorgánové postižení	16 pac.
Nejčastější metastatické lokality	
Játra	17 pac.
Plíce	7 pac.
Retroperitoneál. lymphadenopathie	7 pac.
Periferní lymphadenopathie	3 pac.
Peritoneální diseminace	2 pac.

Ovarium: 1 pac.,
Primární TU: 1 pac., Nadledvina: 1 pac.

Tab. č. 1: Charakteristika léčených pacientů

Počet hodnotitelných pacientů	18 pac.
Adjuvantní chemoterapie	
ANO	5
NE	13
Počet linií předchozí paliativní chemoterapie	
2 linie	12 pac.
3 linie	3
4 linie	3
Necytotoxická terapie, chirurgická a jiná	
Resekce primárního tumoru	17 pac.
Resekce jaterních MTS	3
Resekce plicních MTS	2
Resekce lokální recidivy	1
Vícečetné operace	1
Radiofrekvenční ablace jater. MTS	4
Biologická léčba	3 pac.
Bevacizumab	2
Panitumumab	1

Tab. č. 2: Předchozí léčba pacientů před zahájením kombinované chemobioterapie cetuximabem a irinotekanem

V Masarykově onkologickém ústavu používáme cetuximab v kombinaci s irinotekanem od července 2005 u pacientů s MCRC exprimujícím EGFR po selhání cytotoxické léčby zahrnující fluoropyrimidiny, oxaliplatinu a irinotekan. K léčbě byli indikováni pacienti s uspokojivými hematologickými a biochemickými parametry, v dobrém výkonnostním stavu (PS: 0, 1). Do 31. 12. 2006 byla léčba zahájena u 19 pacientů. V retrospektivní analýze vyhodnocujeme terapeutickou odpověď dle RECIST kriterií, počet aplikovaných cyklů, dobu terapie, zaměřujeme se na zhodnocení času do progrese onemocnění, přežití od zahájení terapie

cetuximabem a přežití od zahájení 1. linie cytostatické terapie pro MCRC. Cílem je i zjištění, zda existuje vztah mezi stupněm exprese EGFR a léčebnou odpovědí (RR) a zda předchozí odpověd na irinotekan ovlivňuje RR na režim cetuximab a irinotekan.

Léčebné schéma

- *Cetuximab* se podával v úvodní dávce 400 mg/m^2 tělesného povrchu intravenózně pomocí infuzní pumpy. Doporučená doba první aplikace byla 120 minut. Před zahájením první infúze byli pacienti premedikováni antihistaminikem pro nebezpečí reakce z přecitlivělosti, tuto premedikaci jsme na našem pracovišti používali i při všech následných týdenních aplikacích, kdy byla dávka cetuximabu snížena na 250 mg/m^2 a doba aplikace zkrácena na 60 minut. V průběhu podávání infúze a minimálně 1 hodinu po jejím ukončení byly pečlivě monitorovány vitální funkce.
- *Irinotekan* se podával za 1 hodinu po ukončení aplikace cetuximabu. Doporučená dávka byla 350 mg/m^2 tělesného povrchu jedenkrát za 3 týdny. Předcházela-li v minulosti radioterapie na oblast pánve, dávka irinotekanu byla snížena na 300mg/ m^2.

Cyklus byl opakován každé 3 týdny. Léčebná odpověď dle RECIST kriterií byla hodnocena po 3-4 cyklech chemobioterapie. Léčba probíhala do progrese onemocnění, závažné toxicity, nebo byla ukončena z rozhodnutí nemocného.

Počet hodnotitelných pacientů	18 pac.
Počet podaných cyklů	117
rozmezí/medián	6/1-17
Léčba ukončena	11 pac.
počet podaných cyklů: rozmezí/medián	1-11/6
Léčba pokračuje	7 pac.
počet podaných cyklů: rozmezí/medián	1-6/4
Léčebná odpověď dle RECIST	
Kompletní remise	1 pac.
Parciální remise	9 pac.
Stabilizace onemocnění	2 pac.
Progrese onemocnění	3 pac.
Nehodnoceno	3 pac.
Léčebná odpověď dle TM	
CEA před léčbou: rozmezí/ medián	23,1-3594/202,6
CEA v průběhu terapie: rozmezí/ medián	1,9-1245/28,2
CA 19-9 před léčbou: rozmezí/ medián	79,8-2688/538,5
CA19-9 v průběhu terapie: rozmezí/ medián	7,1-1056/23,5
Léčebná odpověď ve vztahu k expresi EGFR	
EGFR+1: 3 pacienti	2xRR, 1xPD
EGFR+2: 2 pacienti	1xRR. 1x nehodnoceno
EGFR+2-3: 2 pacienti	1xSD, 1x nehodnoceno
EGFR+3: 7 pacientů	6xRR, 1xPD
EGFR vyšetřeno v zahraničí v rámci klinické stud.	4 pac.
Léčebná odpověď ve vztahu k předchozí senzitivitě na irinotekan	
senzitivita na irinotekan: 6 pac. > senzitivita na cetuximab + irinotekan: 4 pac.	
rezistence na irinotekan: 12 pac. > senzitivita na cetuximab + irinotekan: 9 pac.!!!	

Tab. č. 3: Vyhodnocení léčebné odpověďi dle RECIST kriterií, dynamiky nádorových markerů, vztah mezi expresí EGFR a citlivostí MCRC na předchozí terapii irinotekanem a léčebnou odpovědí kombinací cetuximab a irinotekan.

Výsledky

K 31.12. 2006 byla léčba výše uvedenou kombinací indikována u 19 nemocných. U jednoho pacienta i přes premedikaci antihistaminikem došlo k anafylaktické reakci již při první aplikaci cetuximabu. Bližší charakteristika 18 léčených pacientů a nádorů je uvedena v tabulce č. 1. V souboru dominovali muži, medián věku léčených byl 57 let, rozmezí 40-71 roků. U 11 pacientů (63%) šlo již iniciálně o metastatický kolorektální karcinom. V 89% (16 pac.) se jednalo o vícečetné orgánové postižení, medián postižených lokalit 2. Nejčastějším místem orgánové diseminace byla játra (17 pac.). Všichni pacienti byli předléčeni fluoropyrimidiny (5-fluorouracil, kapecitabin), irinotekanem a oxaliplatinou. U 6 pac. (33%) byly podány > 2 linie paliativní chemo-

terapie, u 3 pac. předcházela i aplikace biologická léčby. Prakticky u všech nemocných byl chirurgicky řešen primární nádor, v léčebném algoritmu metastatického onemocnění byla u některých pacientů indikována i, radiofrekvenční ablace nebo resekce jaterních MTS, plicních metastáz…

Vzhledem k tomu, že hodnocení léčebné odpovědi je indikováno po 3-4 cyklech chemobioterapie (2-3 měsíce terapie), bylo možné léčebnou odpověď k výše uvedenému datu hodnotit u 15 nemocných. Dle zobrazovacích metod a hodnot nádorových markerů byla zaznamenána CR: 1 pac., PR: 9 pac. a SD: 2 pac. Vysokou protinádorovou účinnost režimu vystihuje i dramatický pokles nádorových markerů v průběhu terapie, tabulka č. 2. Počet podaných cyklů byl ve sledovaném souboru v rozmezí 1-17, medián 6. Léčba pokračuje u 7 nemocných. Léčba výše uvedenou kombinací byla efektivní i u 9 léčených pacientů z 12 (75%), u kterých na dřívější podání irinotekanu nebyla zaznamenána žádná léčebná odpověď. Zdá se, že stupeň exprese EGFR nekoreloval s léčebnou odpovědí. Čas do progrese onemocění lze dosud hodnotit u 10 pacientů, pohybuje se v rozmezí 1-11 měsíce, medián 7,5. Přežití od zahájení léčby cetuximabem u 3 zemřelých bylo: 2, 6 a 12 měsíců a přežití od zahájení terapie pro metastatické onemocnění 21, 25 a 39 měsíců. Při mediánu sledování 6 měsíců od zahájení terapie cetuximabem (rozmezí 1-20) žije 14 pacientů (77%). U těchto nemocných je medián od zahájení terapie pro metastatického onemocnění 28 měsíců (rozmezí 11-60m).

Závěr

Výsledky „BOND“ studie podporují využití cetuximabu s irinotekanem k léčbě pacientů s metastatickým karcinomem exprimujícím EGFR po selhání cytotoxické léčby zahrnující irinotekan. Z 15 hodnotitelných pacientů byla v našem souboru zaznamenána léčebná odpověď u 12 léčených (66%), 7 pacientů v efektivní terapii pokračuje. U 14 žijících je medián sledování od zahájení terapie metastatického onemocnění 28 měsíců. Tyto výsledky jsou zřejmě dány kombinací různých přístupů léčby, chirurgie, lokoregionální terapie a především intermitentně aplikované systémové chemoterapie a bioterapie.

Literatura

1. Saltz L, Rubin M, Hochster H, et al: Cetuximab (IMC-C225) plus irinotecan (CPT-11) is active in CPT-11 refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor (EGFR) (abstract 7). *Proc Am Soc Clin Onc* 20:3a, 2001.
2. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al: Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351:337-345, 2004.

153 Vztah mezi výskytem nežádoucích účinků bevacizumabu v kombinaci s chemoterapií a komorbiditou u pacientů s karcinomem kolorekta.

Bustová I., Šiffnerová H., Bělehradová M.
Onkologické oddělení Nemocnice České Budějovice a.s.

Úvod

Optimálním přístupem v 1. linii léčby metastatického nádoru kolorekta je kombinace bevacizumabu a chemoterapeutických režimů FOLFOX nebo FOLFIRI. Kombinace je přínosem jak v počtu léčebných odpovědí, tak i v trvání odpovědi.

Bevacizumab je rekombinantní humanizovaná monoklonální IGg protilátka, která se váže na VEGF a zabraňuje tak interakci mezi VEGF a tyrozin- kinázovými receptory.

Mezi nejčastější nežádoucí účinky bevacizumabu patří hypertenze, proteinurie a krvácivé projevy

Cíl: V našem souboru pacientů se zabýváme vztahem mezi komorbiditou pacienta a předpokládanou toxicitou bevacizumabu.

Soubor: Soubor tvoří celkem 17 pacientů léčených v 1. linii pro metastatický tumor kolorekta. U 15 pacientů byla aplikována chemoterapie FOLFOX 4 a u dvou nemocných chemoterapie FOLFIRI vždy v kombinaci s bevacizumabem. Medián věku nemocných byl 54 let (36-73 let).

Anamnéza	hypertenze	ICHS nebo I.M.	trombóza	vřed duodena
Počet pacientů	8	3	1	1

I.M. -infarkt myokardu

Tab. 1 Anamnestické údaje pacientů souboru

Do zahájení léčby byli 4 pacienti aktivními kuřáky a 5 nemocných bylo bývalými kuřáky, kteří nekouřili 8-14 let.

K hodnocení stupně toxicity byly použity NCI-CTC kriteria verze 3.

Výsledky: Během léčby jsme u 6 pacientů zaznamenali následující toxicitu, z toho u 1 nemocného byla toxicita(hypertenze Grade 3) důvodem ukončení léčby bevacizumabem.

	Počet událostí	Grade 1	Grade 2	Grade 3
hypertenze	5	2		3
proteinurie	2	1	1	
krvácení	2	2		

Tab. 2 Toxicita souboru

Z 8 pacientů s anamnesticky zjištěnou korigovanou hypertenzí došlo při podání bevacizumabu pouze u dvou pacientů k jejímu zhoršení. U ostatních pacientů, kteří měli v anamneze hypertensi, ICHS, trombózu nebo krvácení nemělo podání bevacizumabu žádný vliv.

Proteinurie u obou pacientů odezněla spontánně a nebyla důvodem k přerušení léčby.

Mezi pacienty s nežádoucími účinky po biologické léčbě nebyl žádný kuřák.

Závěr: Dle výsledků zjištěných v našem souboru nevedla korigovaná komorbidita k navýšení toxických projevů po podání bevacizumabu

Nebyl zaznamenán rozdíl ve výskytu nežádoucích účinků mezi kuřáky, bývalými kuřáky a nekuřáky.

154 Dispenzarizace po komplexní léčbě kolorektálního karcinomu.

Cwiertka K.[1], Vysloužil K.[2], Klementa I.[2], Kapustová M.[3], Šrámek V.[1], Skalický P.[2], Starý L.[2], Beneš P.[1], Krejčí E.[1]

1) Onkologická klinika LF UP Olomouc a FN Olomouc
2) I. chirurgická klinika LF UP Olomouc a FN Olomouc
3) Oddělení klinické biochemie FN Olomouc

Dispenzarizaci po onkologické léčbě provádíme běžně prakticky u nemocných s jakoukoliv onkologickou diagnózou. Zřejmé místo má ve sledování výskytu, diagnostice a léčbě komplikací po protinádorové terapii. Stejně lze její význam spatřovat v časné diagnostice dalších nádorových onemocnění. Její význam pro časnou diagnostiku relapsu nádorového onemocnění ještě před několika léty byl předmětem diskuse. Z celé řady studií nebylo zřejmé, zda časný záchyt relapsu a jeho časná léčba má vliv na délku a kvalitu života. Často diskutovanou otázkou je frekvence návštěv a spektrum vyšetření, která by měla být provedena. Vývoj na poli diagnostiky, chirurgické a systémové léčby jaterních nebo plicních metastáz v poslední době zdůrazňuje význam poléčebné dispenzarizace. V případě metastatického postižení jednoho orgánu (jater nebo plic) časný záchyt zvyšuje šanci na radikální chirurgické odstranění všech metastatických ložisek a spolu se současnou systémovou terapií (5-fluorouracil, oxaliplatina, irinotekan, bevacizumab, cetuximab) zvyšuje šanci na významné prodloužení života bez známek onemocnění.

Cílem poléčebné dispenzarizace by měl být záchyt vzdálených metastáz v rozsahu umožňujícím jejich radikální chirurgické odstranění. Intenzívní protokol sledování by měl být zaměřen zvláště na pacienty s vyšším rizikem návratu onemocnění – tj. nemocné s postižením lymfatických uzlin, s nízce diferencovanými či anaplastickými karcinomy, s nádory se známkami perivaskulárního nebo perineurálního šíření. Samozřejmě měl by zahrnovat zvláště ty nemocné, jejichž celkový stav a přidružené nemoci nevylučují budoucí chirurgický zákrok v případě metastatického postižení. Z analýzy dat 12915 nemocných léčených v rámci klinických studií zaměřených na adjuvantní léčbu kolorektálního karcinomu prezentované Sargentem na kongresu ASCO v roce 2004 vyplývá, že 85% relapsů po iniciální chirurgické léčbě (+/– adjuvantní chemoterapii) se odehrává v průběhu prvních tří let. Z tohoto důvodu by v tomto období frekvence vyšetření měla být vyšší. Většinou jsou doporučovány kontroly 1x za tři měsíce, které zahrnují anamnézu, klinické vyšetření a odběr na CEA. Ultrazvukové vyšetření jater bývá doporučováno 2x ročně, rentgen plic 1x ročně a kolonoskopie 1x ročně (v řadě zemí 1x za 2 roky). V případě podezření na relaps onemocnění je nutno doplnit CT vyšetření hrudníku a břicha. U nemocných s karcinomem rekta pak CT pánve.

V posledních letech byly publikovány tři metaanalýzy studií srovnávajících intenzivnější program dispenzarizace (více vyšetřovacích metod, velmi často včetně CT, 2-4x ročně) s méně intenzivním. Závěr je jednoznačný intenzivnější program poléčebného sledování vede ke snížení rizika úmrtí v pěti letech od diagnózy o 20% (*viz tabulka č. 1*).

	počet pacientů		5-letá úmrtnost				
metaanalýza	kontrolní	intezivní	kontrolní	intezivní		95% CI	p
Renehan 2002	676	666	37%	30%	RR=0.81	0.70-0.94	0.0070
Jeffery 2002	676	666	37%	30%	OR=0.67	0.53-0.84	
Figueredo 2002	821	858	37%	30%	RR=0.80	0.70-0.91	0.0008

Tabulka č. 1:
Výsledky metaanalýz klininických studií zaměřených na poléčebné sledování nemocných s kolorektálním karcinomem

Jaká pravidla můžeme najít v různých doporučeních?

- NCCN (verze 1.2007) doporučuje klinické vyšetření, včetně anamnézy a CEA 1x za 3-6 měsíců v průběhu prvních dvou let, následně 2x ročně do pěti let. Dále je doporučováno CT hrudníku, břicha a pánve jednou ročně během prvních tří let a kolonoskopie za rok, za 3 roky a dále v 5-letých intervalech (v případě, že nikdy nebyly zjištěny nové polypy v tlustém střevě), u karcinomů rekta je doporučováno zvážit ještě rektoskopii 2x ročně po dobu pěti let u nemocných po nízkých předních resekcích zaměřené na recidivy v oblasti anastomózy.
- ESMO (verze 2005) doporučuje klinické vyšetření včetně CEA 1x za 3-6 měsíců v průběhu prvních 3 let pak další 2 roky v intervalu 6-12 měsíců, UZ jater 1x za 6 měsíců 3 roky pak jednou ročně do 5 let, kolonoskopii po roce a následně každé 3 roky. U nemocných s karcinomy distálního sigmoidea ještě doporučuje v prvních dvou letech rektosigmoideoskopii 1x za 6 měsíců. Pro karcinom rekta po radikální léčbě nejsou žádná doporučení pro dispenzarizaci, pouze 2 roky 1x za 6 měsíců provedení rektosigmoideoskopie.
- ASCO doporučuje klinické vyšetření, anamnézu 1x za 3-6 měsíců v prvních třech letech, v 6-měsíčních intervalech ve 4. a 5. roce dále pak dle úvahy lékaře, CEA každé 3 měsíce nejméně po dobu 3 let u nemocných v klinickém stadiu II a III. Dále doporučuje CT vyšetření hrudníku a břicha jednou ročně po dobu tří let a zvážit CT pánve u nemocných s karcinomem rekta, kteří nebyli léčeni radioterapií. Kolonoskopie je doporučována po roce, po 3 letech a následně jednou za 5 let. U nemocných s karcinomem rekta, kteří nebyli ozařováni, doporučuje flexibilní proktosigmodeoskopii 1x za 6 měsíců po dobu 5 let.

	ESMO	NCCN	ASCO	KOC FN Olomouc
klinické vyšetření, anamnéza	1x za 3-6 měsíců – 3 roky, 4. a 5. rok 1x za 6-12 měs.	1x za 3-6 měsíců – 2 roky, 3. - 5. rok 1x za 6-12 měs.	1x za 3-6 měsíců – 3 roky, 4. a 5. rok 1x za 6 měs.	1x za 3 měsíce – 3 roky, 4. a 5. rok 1x za 4-6 měs.
CEA	1x za 3-6 měsíců – 3 roky, 4. a 5. rok 1x za 6-12 měs.	1x za 3-6 měsíců – 2 roky, 3. - 5. rok 1x za 6-12 měs.	1x za 3 měsíce – nejméně 3 roky,	1x za 3 měsíce – 3 roky, 4. a 5. rok 1x za 4-6 měs.
ultrazvuk jater	1x za 6 měsíců – 3 roky, 4. a 5. rok 1x ročně	-	-	1x za 6 měsíců – 3 roky, 4. a 5. rok 1x ročně
rentgen hrudníku	1x ročně – 5 let	-	-	1x ročně – 5 let
CT hrudníku a břicha	pouze při podzření na relaps	1x ročně – 3 roky	1x ročně – 3 roky	pouze při podzření na relaps
CT pánve	pouze při podzření na relaps	1x ročně – 3 roky u karcinomů rekta po ALR	1x ročně – 3 roky u karcinomů rekta bez RT	pouze při podzření na relaps
kolonoskopie	po roce a následně 1x za 3 roky	po roce, po 3 letech a dále 1x za 5 let	po roce, po 3 letech a dále 1x za 5 let	1x ročně – 3 roky, dále 1x za 2 roky
rektosigmoideoskopie	1x za 6 měsíců – 2 roky, u distálního sigmoidea a rekta	1x za 6 měsíců – 5 let	1x za 6 měsíců – 5 let	1x ročně – 3 roky, dále 1x za 2 roky

Tabulka č. 2: Srovnání doporučení poléčebné dispenzarizace (ESMO – European Society for Medical Oncology, NCCN – National Comprehensive Cancer Network, ASCO – American Society for Medical Oncology, CEA – karcinoembryonální antigen)

V našem centru je klinické vyšetření, anamnéza a CEA prováděno v tříměsíčních intervalech v průběhu první tří let, v následujících dvou letech 2-3 x ročně a dále jednou ročně. UZ vyšetření jater 2x ročně a rentgenové vyšetření plic jednou ročně po dobu 5 let. Kolonoskopie je prováděna v prvních třech letech jednou ročně dále pak v dvouletých intervalech. Vyšetření CT je indikováno pouze v případě podezření na relaps onemocnění. Přehledně doporučení jsou uvedena v *tabulce č. 2*.

Závěr

Pečlivá dispezarizace po radikální léčbě kolorektálního karcinomu může vést k časnému záchytu relapsu onemocnění. V případě, že se jedná o postižení jednoho orgánu (jater nebo plic) může adekvátní léčba vést k významnému prodloužení života. V dnešní době, kdy máme k dispozici celou řadu nových a bohužel nákladných léků, je nutné zvažovat jejich optimální indikaci. Z tohoto pohledu použití u metastazujícího onemocnění s cílem umožnit radikální chirurgické odstranění všech ložisek nebo v případě resekabilních metastáz zlepšit dlouhodobé výsledky se jeví jako zvláště smysluplné.

Literatura

1. Desch, C. E., Benson, A. B., Somerfield, M. R. et al.: Colorectal Cancer Surveilance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. J. Clin. Oncol. 23, 2005, s. 8512-8519.
2. Figueredo, A., Rumble, R.B., Maroun, J. et al.: Follow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: A practice guideline. BMC Cancer 3, 2003, s. 26.
3. Jeffery, G.M., Hickey, B.E., Hider P.: Follow-up strategies for patients treated for non-metastatic colorectal cancer (Cochrane Database Systém Review). Oxford United Kingdom, Cochrane Library, CD002200, 2002.
4. NCCN Practice guidelines in oncology – v.1.2007. Colon cancer. www.nccn.org/professionals/physician gls/PDF/colon.pdf.
5. NCCN Practice guidelines in oncology – v.1.2007. Colon cancer. www.nccn.org/professionals/physician gls/PDF/rectal.pdf.

6. Renehan, A.G., Egger, M., Saunders, M.P. et al.: Impact on survival of intensive follow-up after curative resection for colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised trials. Br. Med. J. 324, 2002, s. 813
7. Sargent, D.J., Wieand, S., Benedetti et al.: Disease-free (DS) vs. overal survival (OS) as a primary endpoint for adjuvant colon cancer studies: Individual patient data from 12,915 patients on 15 randomized trials. J. Clin. Oncol. 22, 2004, s. 244 (abs 3502).
8. Van Cutsem, E. J. D., Kataja, V. V.: ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of colon cancer. Ann. Oncol. 16 (Suppl.1), 2005, s. i16-i17.
9. Van Cutsem E. J. D., Kataja V. V.: ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of rectal cancer. Ann. Oncol. 16 (Suppl.1), 2005, s. i20-i21.

155 Včasná detekce recidivy kolorektálního karcinomu – využití nádorových markerů a pozitronové emisní tomografie.

Lipská L., Visokai V., Štrupová L., Levý M.
Chirurgická klinika 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou Praha

Úvod

Stále ještě platí, že kolorektální karcinom je nejlépe léčitelný, pokud je operovatelný, to znamená, pokud lze docílit R0 resekce. Stejně je tomu i u recidivy tohoto onemocnění a včasný záchyt zvyšuje pravděpodobnost operability. Doporučená schémata sledování pacientů po operacích s kurativním záměrem pro kolorektální karcinom se liší podle země a v průběhu let jsou upravována a doplňována. V tomto sdělení je předkládána retrospektivní analýza výsledků dlouhodobého sledování nemocných po operacích s kurativním záměrem s ohledem na využití FDG-PET a FDG-PET/CT na jednom chirurgickém pracovišti.

Materiál a metody

Na chirurgické klinice 1. LFUK a FTNsP jsou pacienti po operacích pro kolorektální karcinom vedeni v dispensárním programu a v elektronické databázi je dnes 1280 pacientů. Jedná se o jednotný protokol sledování, protokol není „risk adapted“. Během let bylo do systému sledování postupně zařazeno vyšetření PET a později PET/CT. Tabulka č.1. Charakteristika celého sledovaného souboru je v tabulce č. 2. Od roku 2001 do června roku 2006 bylo z dispensarizovaných pacientů vyšetřeno 328 pacientů pomocí PET nebo PET/CT vyšetření, z nichž 21 bylo pro neúplná data ze zpracování vyřazeno. Hodnotili jsme tedy soubor 307 nemocných, z toho 106 pacientů v rámci stagingu a 201 z důvodů restagingu. Při restagingu bylo u 124 nemocných provedeno vyšetření PET a u 77 PET/CT. Tabulka č.3. Indikací k provedení PET vyštření bylo zvýšení nádorových markerů CEA, CA 19-9 ve 44%, suspektní nález na CT vyšetření rovněž ve 44%, z jiných důvodů ve 12%. PET/CT vyšetření bylo indikováno na základě zvýšených nádorových markerů v 55%, pro suspektní CT nález ve 26% a z jiných důvodů v 19%.

	Měsíce po operaci														
	3	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	72	84	96, 120	108, 144, 166
Anamnéza	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Klinické vyšetření	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CEA, CA19-9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SONO břicha	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CT			X		X		X		X		X	X	X	X	X
Koloskopie			X		X		X		X		X	X	X	X	X
RTG S+P					X				X			X		X	
PET, PET/CT	Pokud jsou elevovány markery a ostatní vyšetření negativní anebo před indikací k reoperaci														

Tab. č. 1 Protokol follow-up

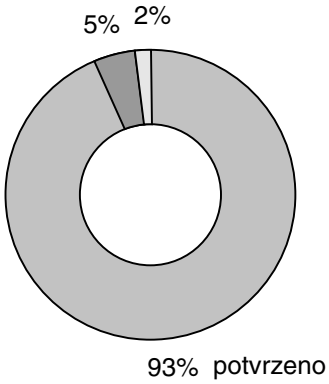
Celkem pacientů ve sledování	n	1275
Věk v době operace	29 - 95 let	
Radikalita	R0	845
	R1	141
	R2	339
	RX	56
Operace	Akutní	228
	Plánovaná	1047
TNM stadium	I	164
	II	447
	III	227
	IV	343
	X	94
Lokalizace tumoru - tračník/konečník	C18	838
	C19+C20	437

Tab. č. 2 Charakteristika celého souboru dispensarizovaných pacientů po operaci pro KRC

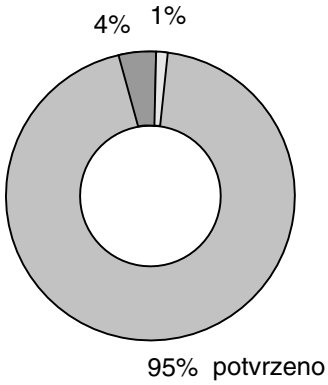
Výsledky

Výsledky FDG-PET vyšetření byly potvrzeny u 117 pacientů, to je v 93%. Operací a histologicky u 34 pacientů, dalším sledováním u 83 nemocných. Falešně pozitivní nálezy FDG-PET byly u 5 pacientů to je v 5% a u 2 nemocných, ve 2% byly falešně negativní. Ve všech případech falešně pozitivních nálezů byl potvrzen zánět. Ze dvou falešně negativních nálezů byla jedna nemocná po komplikované resekci centrálně uložené metastázy jater s pooperačním únikem žluči, kdy FDG-PET vyšetřením byla

lokální recidiva v játrech považována přechodně spíše za zánětlivou komplikaci. U druhého pacienta po amputaci konečníku dle Milese s aktinoterapií, nebyla lokální recidiva ve fibrotické tkáni jasně na FDG-PET patrná. Graf č.1



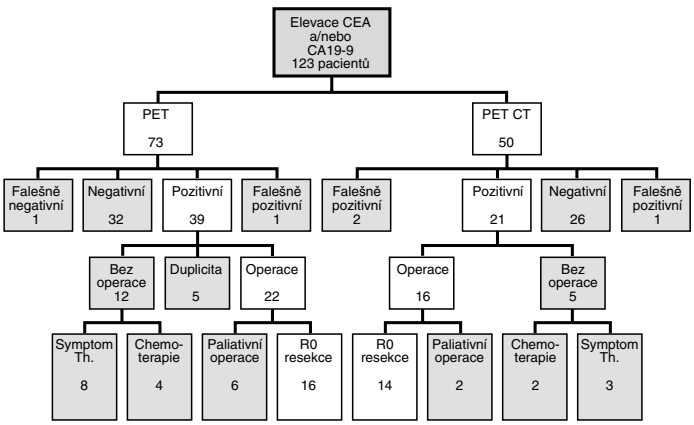
Graf č. 1: Výsledky PET korelované operací či dalším follow-up



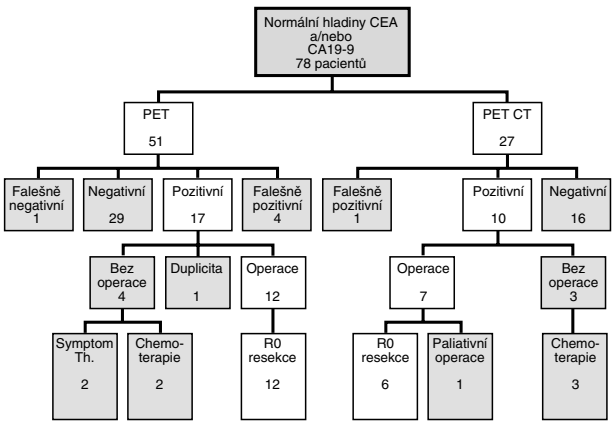
Graf č. 2: Výsledky PET/CT korelované operací či dalším follow-up

Výsledky FDG-PET/CT vyšetření byly potvrzeny u 73 pacientů, to je v 95%. Operací a histologicky u 23 pacientů, dalším sledováním u 50 nemocných. U 3 pacientů, ve 4% se jednalo o falešně pozitivní nález na FDG-PET/CT a u jednoho nemocného v 1% o falešně negativní nález. Falešně pozitivní nálezy na FDG-PET/CT vyšetření byly u dvou pacientů u kterých se jednalo o hojící se zlomeniny. U jednoho pacienta byl falešně pozitivní nález difuzně v játrech. Metastázy však nebyly prokázány ani dalším vyšetřením (MR) ani dalším sledováním. Falešně negativní nález byl u jednoho pacienta, který byl opakovaně vyšetřen pro elevaci CEA a teprve při druhém PET/CT vyšetření byla nalezena kumulace ve štítnici, poté byl pacient odeslán na endokrinologii. Graf č.2

Na základě zvýšení nádorových markerů CEA a/nebo CA19-9 bylo FDG-PET nebo FDG-PET/CT vyšetření indikováno u 123 pacientů. Pozitivní nálezyo byly u 60 nemocných (49%). K operaci bylo indikováno 38 pacientů a kurativní operace byla provedena u 30 nemocných. Resekabilita v podskupině pacientů indikovaných na základě elevace markerů byla 50%. Graf č.3.



Graf č. 3 Skupina pacientů s elevovanými markery CEA a/nebo CA 19-9



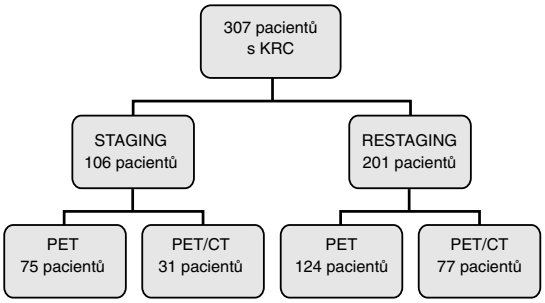
Graf č. 4 Skupina pacientů s normálními hladinami markerů CEA a CA 19-9

Ve druhé skupině jsou nemocní indikovaní k vyšetření FDG-PET nebo FDG-PET/CT z důvodů suspektních a/nebo nejasných CT nálezů, UZ vyšetření, kolonoskopických nebo klinických nálezů při normálních hodnotách obou markerů. V této skupině bylo 78 pacientů, pozitivní nález na FDG-PET nebo FDG-PET/CT vyštření byl u 27 nemocných (34%). Z 19 pacientů indikovaných k chirurgické léčbě byla R0 resekce provedena u 18 pacientů. Resekabilita recidivy kolorektálního karcinomu zjištěné při nezvýšených CEA a CA19-9 byla v našem souboru 66% (18 ze 27 pozitivních záchytů). Graf č.4.

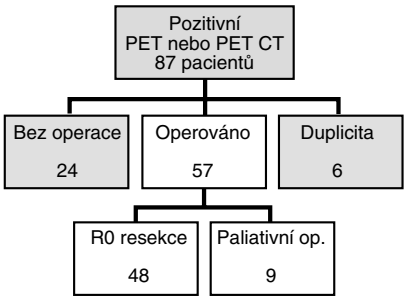
Celkem bylo tímto způsobem kontrol zachyceno 87 relapsů onemocnění kolorektálním karcinomem a z nich u 48 bylo možné provést kurativní operaci, resekabilita 55%. Poměr radikálních operací k paliativním byl v našem souboru 48 / 9. Jako vedlejší nález bylo zjištěno 6 duplicit maligních onemocnění, pacienti byli odesláni k příslušným odborníkům. Graf č.5

Vzhledem k tomu, že v souboru jsou recidivy kolorektálního karcinomu v nejrůznějších lokalizacích, (viz Tab. č.4), výpočet přežití z takto nehomogenního souboru nepovažujeme za relevantní. Vyhodnotili jsme proto soubor nemocných s metachronními metastázami do jater které jsou u kolorektálního karcinomu nejčastěji metastaticky postižené. Celkové pětileté přežití v souboru 23 pacientů po resekci metachronních metastáz do jater, je 52% a medián sledování byl 1,99 roku.

Náklady na sledování 1 pacienta/1 rok podle našeho protokolu činily 6 732,-Kč a po započítání výdajů na PET vzrostly na 10 268,- Kč/ 1 pacienta/ 1 rok.



Tabulka 3: Indikace k vyšetření a typy vyšetření (PET nebo PET/CT)



Graf. č. 5: Resekabilita relapsu diagnostikovaného follow-up protokolem

Lokalizace relapsu	Počet kurativních resekcí	%
Játra	23	48
Plíce	11	23
Lokální recidiva	9	19
Metachronní KRC	2	4
Adnexa	2	4
Uzliny	1	2
Celkem	48	100

Tab. č. 4:
Lokalizace a počty R0 resekcí provedených pro recidivu

Diskuse

Sledování pacientů po kurativních operacích pro kolorektální karcinom vyvolává mnoho otázek. Je nutné takového pacienta vůbec sledovat nebo máme řešit až symptomatickou recidivu? Pokud máme pacienta sledovat, podle jakého protokolu? Jaká vyšetření patří do tohoto protokolu? Jak časté mají být kontroly? Je možné sledovat pacienty v individuálním režimu podle předpokládaného rizika recidivy? Které jsou prediktivní faktory, podle nichž stanovíme pravděpodobné riziko? Co je minimální, standardní a intenzivní model sledování? Je rozdíl v jejich dlouhodobém výsledku, tedy přežití pacienta? S těmito otázkami souvisí další balík otázek týkající se standardizace stagingu a zejména radikality výkonu, tedy R kategorie. Co lze považovat za standardní staging a restaging, kdy je možné předpokládat, že před chirurgickým léčením známe všechna ložiska recidivujícího karcinomu? Jaké máme standardy při operaci, abychom mohli operaci nazvat kurativní? Jakou dostal pacient adjuvantní chemo a radioterapii? Je jistě chybou, když resekujeme lokální recidivu karcinomu rekta a díky nedokonalému restagingu nevíme o metastázách v plicích nebo při nedokonalé peroperační revizi přehlédneme ložiska karcinosy peritonea, či ve snaze neprovést multiorgánovou resekci, porušíme peroperačně tumor. Takové postupy vedou k devalvaci výsledků operace i sledování a k diskreditaci snahy chirurga o léčení relapsu KRC. Pohled na význam sledování nemocných po kurativních operacích pro kolorektální karcinom se mění v čase. Stejně tak i doporučené postupy jsou v různých zemích různé. Původní téměř nihilismus ohledně významu sledování těchto pacientů se postupně mění, jednak v důsledku lepších zkušeností s léčbou recidivy jednak i proto, že se objevují studie srovnávající výsledky intenzivního sledování s minimálním nebo standardním. ASCO v roce 2005 doporučilo sledovat v určených intervalech CT vyšetření břicha a hrudníku a eventuelně pánve, kolonoskopii a sledování hladiny CEA. V doporučeních ASCO došlo k významnému posunu ve prospěch intenzivního follow-up na základě výsledků několika studií, které prokazují zlepšení přežití při intenzivním sledování. Jak vyplývá ze studie z roku 2006, v USA se většina lékařů, kteří tyto pacienty dispensarizují, existujícími doporučeními neřídí. Existuje přehledový článek, který na základě studia šesti randomizovaných studií a dvou metaanalýz, uznává nevelké, ale signifikantní zlepšení přežití pacientů sledováných v intenzivním režimu. Tato publikace poskytuje rovněž doporučené postupy ke sledování nemocných po operacích pro kolorektální karcinom.

Závěr

V uvedeném souboru pacientů, při uvedeném protokolu sledování je na našem pracovišti resekabilita recidivy kolorektálního karcinomu 55%.

Literatura

1. Desch CE, Benson AB 3rd, Smith TJ, Flynn PJ, Krause C, Loprinzi CL, Minsky BD,Petrelli NJ, Pfister DG, Somerfield MR. Recommended colorectal cancer surveillance guidelines by the American Society of Clinical Oncology. J Clin Oncol. 1999 Apr;17(4):1312.
2. Chau I, Allen MJ, Cunningham D, Norman AR, Brown G, Ford HE, Tebbutt N, Tait D,Hill M, Ross PJ, Oates J. The value of routine serum carcino-embryonic antigen measurement and computed tomography in the surveillance of patients after adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. J Clin Oncol. 2004 Apr 15;22(8):1420-9. Epub 2004 Mar 8.
3. Desch CE, Benson AB 3rd, Somerfield MR, Flynn PJ, Krause C, Loprinzi CL, Minsky BD, Pfister DG, Virgo KS, Petrelli NJ Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. J Clin Oncol. 2005 Nov 20;23(33):8512-9. Epub 2005 Oct 31.
4. Jeffery GM, Hickey BE, Hider P: Follow-up strategies for patients treated for non-metastatic colorectal cancer [Cochrane Database SystemReview]. Oxford, United Kingdom, Cochrane Library, CD002200, 2002
5. Giordano P, Efron J, Vernava AM 3rd, Weiss EG, Nogueras JJ, Wexner SD. Strategies of follow-up for colorectal cancer: a survey of the American Society of Colon and Rectal Surgeons. Tech Coloproctol. 2006 Oct;10(3):199-207. Epub 2006 Sep 20.
6. Cummings, Robin McLeod, Lisa Zuraw, Caroline Zwaal, and the members of the Gastrointestinal Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based CareFollow-up of patients with curatively resected colorectal cancer: a practice guideline, BMC Cancer. 2003; 3: 26.

156 Lze podstatně ovlivnit tvorbu maligního ascitu?

Antoš F., Šerclová Z., Marvan J., Vitek P., Skála M.
Chirurgická klinika, FN Na Bulovce, Praha
Ústav radiační onkologie, FN Na Bulovce, Praha, přednosta: prof. MUDr F. Antoš, CSc

Úvod

Tvorba ascitu při maligních onemocněních dutiny břišní je jednou ze známek blížícího se konce života onkologicky nemocných do 1-8 měsíců. 1 rok přežije pouze 0-13% z těchto nemocných. Jejich kvalita života je velmi nízká. Maligním ascitem trpí asi 10% pacientů s nádorovým onemocněním, u 20% maligních ascitů se nezjistí primární malignita. Předpokládá se, že ascites je způsoben nadbytečnou produkcí tekutin a vyšší vaskulární permeabilitou, přičemž je omezená lymfatická drenáž. Nemocní s maligním ascitem trpí bolestmi břicha, dušností, mají gastrointestinální symptomatologii, jejich kvalita života je významně alterována. Dosud jedinou doporučovanou symptomatickou léčbou (krom podávání diuretik) jsou opakované abdominocentézy se všemi důsledky z toho plynoucími, především metabolickými a infekčními.

Metoda

Při řešení problematiky pokročilých nádorů peritonea nádorů s peritoneální diseminací kombinací postupu chirurgického a podáním peroperační hypertermické chemoterapie (HIPEC) jsme si povšimli, že po takto aplikované terapii nedochází k opětné tvorbě ascitu, a to zpravidla až do konce života. Proto jsme zhodnotili naši sestavu nemocných z pohledu možnosti ovlivnění chronické tvorby maligního ascitu

Pacienti

Na našem pracovišti bylo k operační revizi s plánem peritonektomie a HIPEC indikováno 112 nemocných z důvodů pseudomyxomu, mezoteliomu či pokročilého kolorektálního nebo gynekologického karcinomu. U 25 nemocných, kterým nebylo během operace možné jakkoliv chirurgicky pomoci pro rozsah onemocnění, byl peroperačně nalezen ascites (1- 9l). U části těchto infaustně nemocných (1. skupina) bylo možné provést paliativní debulking a HIPEC (16p.). Ve 2. skupině (9p.) extenzivní nitrobřišní postižení dovolilo pouze HIPEC.

Výsledky

V 1. skupině se u 12 nemocných ascites již neobjevil, u 4 nemocných se ascites doplnil v průměru 6,3 měsíců po chirurgickém výkonu. Dosud zemřeli 4 nemocní, průměrně 10,7 měsíců po operaci, 3 z nich přežívali více než rok. 12 pacientů žije – 6p > 1 rok, 3p > 2 roky, 1p > 4 roky.

Ve 2. skupině se neobjevil ascites u 3 nemocných, u 5 nemocných se doplnil po v průměru 7,2 měsíců po operaci. Tito nemocní přežili 2-23 měsíců (2, 3, 9, 11, 12, 12, 13, 23).

Závěry

S pomocí HIPEC (event. + debulking) se zhruba 60% pacientů zbaví svého maligního ascitu nadobro.

U zbylých asi 40% nemocných se opět ascites vytvoří, ale v přijatelné míře, bez nutnosti punkcí.

Význam této léčby se projeví prodloužením života, ale především podstatným zlepšením QoL pacientů s tímto beznadějným onemocněním.

V porovnání s jinými modalitami terapie se jeví užití HIPEC při paliativním léčení maligního ascitu jako vysoce efektivní.

Studie je podporována grantem IGA ČR č.8414-5/2005

157 Dočasný uzávěr odtoku krve z jater zvyšuje efektivitu radiofrekvenční ablace. Experimentální studie.

Šubrt Z.[1], Ferko A.[1,2], Ryska M.[3], Hoffmann P.[4], Tyčová V.[5]

1) Katedra válečné chirurgie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany Brno, vedoucí katedry doc. MUDr. Alexander Ferko, CSc.
2) Klinika chirurgie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, přednosta kliniky doc. MUDr. Alexander Ferko, CSc.
3) Chirurgická klinika ÚVN a 2. LF UK v Praze, přednosta kliniky prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc.
4) Radiodiagnostická klinika Fakultní nemocnice v Hradci Králové, přednosta kliniky prof. MUDr. Pavel Eliáš, CSc.
5) Fingerlandův ústav patologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové, přednosta kliniky prof. MUDr. Aleš Ryška, CSc.

Úvod

Limitací termické ablace jaterního parenchymu je krevní průtok, který ochlazuje zahřívané ložisko protékající krví. Experimentálně prokázaný je význam uzávěru portální žíly, který je těžko proveditelný perkutánně. Uzávěr odtoku krve z jater není dosud experimentálně ověřen.

Cíl

V experimentu na zvířeti prokázat změny průtoku jaterním parenchymem a zvýšenou efektivitu radiofrekvenční ablace (RFA) v kombinaci s perkutánním balonovým uzávěrem retrohepatální dolní duté žíly (RhDDŽ).

Materiál a metody: Experiment byl proveden na 10 jedincích prasete domácího. Zvířata byla rozdělena do dvou skupin podle 2 protokolů RFA. Skupina A (n=5) s dobou RFA do dosažení cílové teploty 105°C, skupina B (n=5) s konstantní časem RFA 8 minut. Pomocí peroperačního UZ vyšetření byly kvantifikovány změny průtoku jaterním parenchymem při uzávěru RhDDŽ. Dále byla vytvořena dvě ložiska RFA v jaterním parenchymu. Byl použit generátor RITA 1500X® a jehla StarBurst XL™ (Rita Medical System, Mountain View, CA) pro ablaci o průměru 3 cm. Jedno ložisko bylo vytvořeno při nativním průtoku, druhé po uzávěru odtoku krve z jater. Byly hodnoceny doby dosažení cílové teploty ablace 105°C, dále byl porovnány tvar a objem vytvořených ložisek. Bylo provedeno mikroskopické vyšetření ložisek.

Výsledky

Při uzávěru RhDDŽ došlo k výrazné redukci průtoku krve játry. Objemy vytvořených ložisek dosahovaly ve skupině A 8.2 ± 2.2 cm^3 (6.7 ± 2.8 cm^3 ve skupině B) v porovnání se 17.4 ± 3.8 cm^3 (19.4 ± 1.8 cm^3 ve skupině B) při uzávěru odtoku krve z jater, $p < 0,01$. Mikroskopické vyšetření prokázalo homogenní koagulační nekrózu ložiska vytvořeného při uzávěru odtoku krve z jater.

Závěr

Perkutánní balonový uzávěr RhDDŽ vedl ke snížení průtoku krve játry a ke zvýšení efektivity RFA v jaterním parenchymu.

Tato práce vznikla za podpory Výzkumného záměru Ministerstva zdravotnictví č. 00179906.
a Výzkumného záměru Fakulty vojenského zdravotnictví MOO FVZ0000503.

XVII.
Karcinom pankreatu

158 Přínos PET-CT v předoperační diagnostice karcinomu pankreatu.

Havlík R., Loveček M., Buriánková E., Klos D., Neoral Č.
I. chirurgická klinika a Klinika nukleární medicíny, LF UP Olomouc, Onkologické centrum Olomouc

Prognóza pacientů s karcinomem pankreatu je tristní. Největší šanci na vyléčení, eventuálně delší přežití, stále jako jediná nabízí pouze chirurgická resekce. Nádor pankreatu je navíc u většiny pacientů diagnostikován pozdě, a to již v době pokročilého onemocnění. U mnohých je pak obtížné rozhodnout o možné resekabilitě předoperačně. Kontraindikací radikální resekce jsou vzdálené metastázy nebo prorůstání nádoru do cévních struktur (portální řečiště, arteria mesenterica superior).

Navíc u mnohých pacientů i po potenciálně kurativním chirurgickém výkonu dochází k časné progresi a generalizaci onemocnění. Doposud chybí metoda, která by předoperačně byla schopná určit pacientky, kteří budou z radikální resekce benefitovat a ty, u kterých bude onemocnění pokračovat. V současnosti se zaměřujeme na detekci minimální reziduální choroby a evaluaci předoperačního PET-CT.

Naše sdělení je zaměřeno na klinický přínos PET-CT u pacientů s nádory pankreatu. Před vyšetřením byla nitrožilně aplikováno 350-450 MBq 18F-FDG, snímání bylo provedeno na PET skeneru Biograph 16 za použití iterativní rekonstrukce dat s transmisní korekcí na zeslabení záření gama pomocí CT.

V průběhu 11/06-01/07 jsme předoperačně provedli PET-CT u 8 nemocných s potenciálně operabilním tumorem hlavy pankreatu. U 3 nemocných byly zjištěny pozitivní jaterní ložiska, která nebyla detekována jinými metodami. Současně bylo u všech těchto nemocných potvrzeno pozitivní ložisko v hlavě pankreatu.

Pacienti byli následně podrobeni chirurgické exploraci – při podezření na jaterní léze v úvodu laparoskopické. U pacientů s PET pozitivními jaterními lézemi byla tato ložiska vždy potvrzena a od radikálního výkonu bylo ustoupeno. Ve skupině 5 pacientů s neprokázanou generalizací na PET-CT byla u jednoho peroperačně taktéž prokázána generalizace v játrech.

Závěr – první výsledky u pacientů vyšetřovaných pomocí PET-CT s diagnózou ca pankreatu ukazují přínos této metody v detekci vzdálených (zvláště jaterních) metastáz. U těchto pacientů nebude v budoucnu indikována chirurgická revize.

159 Zpřesnění diagnostiky karcinomu pankreatu na základě detekce bodových mutací genů k-ras, p16 a p53 a alelických delecí 9p a 18q.

Šálek C.[1,2], Fantová L.[1], Benešová L.[1], Zavoral M.[2], Minárik M.[1]
1) Laboratoř molekulární genetiky a onkologie, Genomac International, s.r.o., Praha
2) Interní klinika 1. LF UK a ÚVN, Praha

Přes významný pokrok v diagnostických technologiích a terapeutických metodách je prognóza pacientů s karcinomem pankreatu stále téměř nezměněna. Jeho incidence se prakticky rovná mortalitě, což je především důsledkem pozdní diagnózy onemocnění. Jelikož karcinom pankreatu je dnes považován za geneticky podmíněné onemocnění, jsou naděje na včasnou diagnózu i racionální volbu terapeutických modalit vkládány do genetického testování a výzkumu jeho molekulárních mechanismů. Cílem studie bylo ověřit sensitivitu a specificitu molekulárně-genetického vyšetření nejčastějších změn vzhledem k rozlišení diagnózy karcinomu a chronické pankreatitidy.

Studovaný soubor obsahoval 101 osob (63 mužů a 38 žen, střední věk 60 ± 12 let, rozpětí 3284 let), z nichž u 81 byl diagnostikován karcinom pankreatu a u 20 chronická pankreatitida. Všichni pacienti byli podrobeni odběru pankreatické tkáně tenkojehlovou biopsií s ultrasonografickou navigací (EUS-FNAB). Ze získaného aspirátu byly po obarvení isolovány suspektní buňky metodou laserové mikrodisekce. Z takto získaných buněk byla provedeno vyšetření somatických bodových mutací onkogenu k-ras a tumor supresorových genů p16 a p53 a dále provedena detekce ztrát heterozygozity (LOH) chromosomálních lokací 9p (gen p16) a 18q (gen DPC4).

Na základě získaných výsledků byl vytvořen čtyřstupňový algoritmus vyšetření pacientů s ložiskovým postižením pankreatu neznámé biologické povahy. Vzhledem k vysokému stupni senzitivity a specificity je na prvním stupni cytologické vyšetření FNAB aspirátu. U pacientů s nekonklusivním nálezem (10 – 30% dle zkušenosti hodnotícího cytologa) je v druhém stupni provedeno vyšetření mutací onkogenu k-ras a v případě negativity v dalších stupních vyšetření LOH chromosomu 9p a v posledním stupni i doplňkové vyšetření LOH chromosomu 18q.

Podporováno grantem IGA MZ 8027-3

160 Resekce pro časný karcinom hlavy pankreatu.

Ryska M.[1], Bělina F.[1], Strnad R.[1], Zavoral M.[2]
1) Chirurgická klinika 2. LF UK a ÚVN Praha
2) 1. Interní klinika 1. LF UK a ÚVN Praha

Pro karcinom pankreatu (CaP) je charakteristický agresivní růst a velmi špatná prognóza nemocného. Roční mortalita se blíží roční incidenci (1). Hlava pankreatu je nejčastějším místem lokalizace, karcinom těla a kaudy se vyskytuje méně často (2). Výrazná biologická agresivita CaP zapříčiňuje, že v době stanovení diagnózy má již třetina nemocných jaterní metastázy, třetina má postižené regionální lymfatické uzliny a u poloviny nemocných lze nalézt angioinvazi nádoru. Každý desátý nemocný má diseminaci nádoru po peritoneu (3).

Z výše uvedeného plyne, že pacient se většinou dostaví k chirurgovi v pokročilém stádiu onemocnění.

Radikální resekce je jedinou metodou léčby, která signifikantně prodlužuje život nemocného (4). V časných stádiích onemocnění, to je ve stádiu I a II dle japonské klasifikace (5), můžeme očekávat lepší výsledky v délce přežívání nemocných ve srovnání se skupinou ve stádiu III. Tyto výsledky uvádí i prognostický nomogram z roku 2004 vytvořený na základě 555 provedených resekcí na jednom pracovišti (6).

V našem sdělení si klademe za cíl porovnat výsledky radikálně prováděných resekcí hlavy pankreatu u naší sestavy nemocných s karcinomem hlavy pankreatu ve stádiu I, II a III.

Metodika a sestava nemocných

Diagnóza karcinomu hlavy pankreatu byla stanovena na základě předoperačně provedených zobrazovacích vyšetření, která byla u většiny nemocných (v posledních 3 letech u všech) doplněna o cytologický průkaz (Fine needle aspiration biopsy) při endoultrasonografickém vyšetření se stanovením předoperačního stagingu. Nutriční předoperační přípravu jsme neprováděli. Radikální proximální pankreatikoduodenektomii (PDE) jsme prováděli u nemocných při T1-3, N0 – 1, M0. Rozsah lymfadenektomie odpovídal tzv. „evropskému standardu“ (7) – odstranění uzlin a lymfatické tkáně v rozsahu N1-2, tj. v průběhu lig. hepatoduodenálního nad úroveň junkce d.cysticus, zprava podél portomesenterického žilního kmene kaudálně na úroveň v.renalis dx., dorzálně podél a.mesenterica sup. a podél a.hepatica propria a comm. k truncus coeliacus. Standardně jsme odebírali k peroperačnímu bioptickému vyšetření uzlinu č.12 (uzlina z oblasti junkce d.cysticus – N2), uzlinu č. 9 (uzlina z oblasti truncus coeliacus – N3) a resekční plochu krčku pankreatu. Za radikální PDE jsme považovali resekci R0.

V případě, že jsme při operaci nalezli předoperačně nerozpoznané prorůstání tumoru do v. portae či v. mesenterica sup., provedli jsme u 4 nemocných resekci stěny či části žíly. Tyto nemocné jsme však do časných stádií v souladu s námi používanou japonskou klasifikací do stádií I a II, nezařadili.

Po propuštění jsme nemocné zařadili do dispenzáře našeho pracoviště, kde byl každý nemocný pravidelně sledován podle zavedeného protokolu.

Podání adjuvantní chemoterapie u některých našich nemocných určoval onkolog, na jehož rozhodování jsme neměli žádný vliv.

Od 5/1998 do 3/2004 jsme na Klinice transplantační chirurgie IKEM v Praze – a od 4/2004 do 12/2006 na Chirurgické klinice 2. LF UK a ÚVN Praha ošetřili celkově 307 nemocných s karcinomem pankreatu

Z celkového počtu mělo 242 nemocných duktální adenokarcinom lokalizovaný na oblast hlavy pankreatu, u 65 se jednalo o tělo a kaudu slinivky. Resekční výkon jsme u nemocných s karcinomem hlavy pankreatu provedli u 77, výkon spojkový u 110 a exploraci u 55 nemocných (tab. 1).

	počet	%
radikální resekce	65	27
paliativní resekce	12	5
spojkový výkon	110	45
explorace	55	23
Celkově	242	100

Tabulka č. 1 – Operační výkony u nemocných s karcinomem hlavy pankreatu

	stadium				
	I	II	III	IVa	IVb
radikální resekce	6	15	41	2	0
paliativní resekce	0	1	3	7	2
spojka	1	10	15	32	51

Tabulka č. 2 – Rozdělení nemocných s provedenou PDE podle stádia onemocnění

Stádia onemocnění ukazuje tabulka 2.

Z tabulky č. 2 je zřejmé, že radikální PDE jsme provedli ve stádiu I a II u 21 a ve stádiu III u 41 nemocného.

Délka přežívání u těchto nemocných je v relativních hodnotách (%) patrná z tabulky 3.

Délka přežívání v měsících	I. stadium	II. stadium	III. stadium
3	100	100	88,1
6	100	79,5	83,1
9	100	75,3	69,7
12	80	58,5	63,8
15	80	54	57,5
18	80	54	47,2
21	60	49,1	39,4
24	60	44,2	39,4
27	60	44,2	39,4
30	60	29,5	39,4

Tabulka č. 3 – Délka přežívání nemocných po PDE v závislosti na stádiu onemocnění

Zatímco 60% nemocných zařazených do I. stadia onemocnění přežilo 27, resp. 30 měsíců, ve druhém stadiu přežilo pouze 44.2, resp. 29.5%, a ve třetím 39.4% resp. 39.4%.

Rozdíl v přežívání mezi stádii I a II, III je ve 30. měsíci po PDE signifikantní ($p < 0.05$)

Medián délky hospitalizace byl 16 dní (rozmezí 4 – 85).

Celkově jsme z 67 nemocných, u kterých jsme provedli PDE ztratili v časném pooperačním období, tj. do 30.POD, 2 nemocné (3%).

Diskuse

Karcinom hlavy pankreatu se ve srovnání s lokalizací v oblasti těla a kaudy klinicky projeví poměrně dříve a to především rozvojem mechanického ikteru. V souladu s literárním sdělením se za „časný karcinom“ hlavy pankreatu považuje pouze stadium I = T1N0M0, velikost T< 2 cm (8). V našich poměrech bychom vzhledem k velmi nízkému počtu nemocných nedosáhli statistické „hodnotitelnosti“. Pokud budeme stádia I a II považovat za stádia časná, ani v této skupině nemocných nenacházíme vysoké poměrné zastoupení ve srovnání se stádiem III a IV, tj. se skupinou nemocných s pokročilým onemocněním. U naší skupiny s provedenou radikální PDE se jedná celkově o 21 nemocného. Tuto skupinu však již lze srovnávat se skupinou s provedenou PDE ve stádiu III, tj. s 41 nemocným.

Nemocní, u kterých je radikální PDE provedena při velikosti tumoru < 2 cm (T1N0M0), přežívají 5 let podle starších literárních pramenů ve 20% (9), podle novějších prací ve 30% (6). V naší sestavě nemocných s velikostí tumoru T1 < 2 cm přežilo 30 měsíců 60% nemocných, u velikosti > 2 cm (T2) 29.5%. Srovnání přežívání našich nemocných ve skupině ve stádiu II a III je ovlivněno nepochybně nízkým počtem nemocných. Tak si lze vysvětlit delší přežívání nemocných ve III. stádiu onemocnění ve srovnání s nemocnými ve II. stádiu onemocnění.

Závěr

Karcinom pankreatu patří mezi biologicky velmi agresivní nádory. Jedinou léčebnou metodou, která vede k signifikantnímu prodloužení přežívání je radikální resekce, u karcinomu hlavy pankreatu radikální PDE. U těchto nemocných je vhodné indikovat adjuvantní chemoterapii, která dále signifikantně prodlužuje přežívání nemocných.

V současné době neexistuje efektivní screening karcinomu pankreatu. Čím dříve je nemocný indikován k radikální resekci, tím má větší šanci na delší přežívání. Výsledky naší sestavy tyto závěry potvrzují a jsou v souladu s uváděnými literárními údaji.

Literatura

1. Reginne, W.H., John, W.J., Mohiuddin, M.: Current and emerging treatments for pancreatic cancer. Drugs. Aging., 11, 1997: 285-295
2. Allema, J.H., Reinders, M.E., van Gulik, T.M. et al.: Prognostic factors for survival after pancreaticoduodenectomy for patients with carcinoma of the pancreatic head region. Cancer, 75, 1995: 2069-2076
3. Pasquali, C, Sperti, C., Filipponi, C. et al.: Epidemiology of pancreatic cancer in north – east Italy. Study on incidence (1990 – 1992), hospital stay and survival. 30th EPC Meeting, Thessaloniki, 1998. Digestion 59, 1998: 213
4. Friess, H., Kleeff, J., Kulli, C. et al.: The impact of different types of surgery in pancreatic cancer. Eur. J. Surg. Oncol., 25, 1999: 124-131
5. Japan Pankreas Societa. Classification of pancreatic carcinoma. First English edition. Kanehara & Co, Tokyo, 1996
6. Brennan MF, Kattan MW, Klimstra D et al: Prognostic nomogram for patiens undergoing resection for adenocarcinoma of the pankreas. Ann Surg, 2004, 240: 293-298

7. Bachmann J, Büchler MW, Friess H: Pancreatic resection for pancreatic cancor. HPB, 2006, 8: 346-351
8. Trede M, Richter A, Wendl K: Personál observations, opinions, and approaches to cancor of the pankreas and the periampullary area. Surg Clin North Am 2000, 81: 595-610
9. Nitecki SS, Sarr MG, Colby TV et al: Long-term surfoval after resection of ductal adenocarcinoma of the pancreas: IS IT REALLY IMPROVING? Ann Surg, 1994, 221: 59-66.

Prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc.
Chirurgická klinika 2. LF UK a ÚVN Praha • U vojenské nemocnice 1200 • 169 02 Praha 6 – Střešovice

161 Možnosti laparoskopie v léčbě malignit pankreatu.

Loveček M., Havlík R., Klos D., Neoral Č.
I. chirurgická klinika FN Olomouc

Cíl

Racionální a seriozní posouzení významu laparoskopie v managementu malignit slinivky.

Úvod: Incidence rakoviny slinivky je 15 na 100.000 obyvatel za rok. Pětiletá mortalita je 95-99% (1). Operabilita nemocných s rakovinou pankreatu je nízká – do 20% nově zjištěných onemocnění. Nejlepší prognózu přináší radikální odstranění tumoru. To je závislé na přesném předoperačním a peroperačním posouzení vztahu k cévním strukturám (2). Největší naději na radikální resekci má postižení Vaterské papily či hlavy slinivky, manifestující se obstrukčním ikterem. Nejhorší prognózu mají onemocnění kaudy a těla slinivky.

Metody

Předoperační diagnostika se opírá o spirální CT (senzitivita 90% specificita 99%), endoskopická ultrasonografie a laparoskopická ultrasonografie (senzitivita 77% a specificita 78%) (2), stanovení hladiny onkomarkerů (CA 19-9) (3). MRI zobrazení slinivky je excelentní pro zobrazení malých tumorozních lezí slinivky (4).

Diskuse

Laparoskopické resekční výkony na slinivce vykazují vysoký výskyt komplikací (1). Jsou prezentovány převážně jen v jednotlivých případech nebo velmi malých souborech. Prakticky se jedná o benigní léze a rozsah výkonu spočívá v distální pankreatektomii (5). Bezpečnější se zdají distální pankreatektomie s en block splenektomií či zachováním sleziny.

Pro malignitu slinivky, zejména v oblasti hlavy zůstává laparoskopie jen v pozici metody pro peroperační staging. Pro vysokou věrohodnost radiologických metod klesá diagnostická hodnota laparoskopie. Výhodou zůstává možnost získání peroperační histologické diagnózy nezbytné pro neoadjuvantní terapii (6). U nemocných radiograficky – spirální CT – potenciálně resekabilních bylo laparoskopií kolem 25% shledáno generalizovanými či s lokálně pokročilým tumorem, dalších 15% nemocných je laparoskopií hodnoceno jako falešně negativní (7). Nejnovější metodika využívající kombinaci vysoce citlivé CT a positronové emisní tomografie s využitím 18-fluorodeoxyglukózy představuje velmi citlivou metodu pro staging před resekcí slinivky. Pozitivní a negativní prediktivní hodnoty pro rakovinu slinivky byly 91% a 64%.

Závěr

Potenciál PET/CT převyšuje možnosti laparoskopie ve stagingu u rakoviny slinivky. Využití laparoskopie u resekčních výkonů pro maligní onemocnění slinivky je zatíženou vysokou mírou komplikací. V managementu rakoviny slinivky se uplatňuje laparoskopie pro získání kvalitativní – histologické diagnózy pro neoadjuvantní terapii či k výběru nemocných pro nechirurgickou terapii (ke kontraindikaci radikálního výkonu pro nedetekovanou generalizaci onemocnění).

Literatura

1. Sperlongano, P., Pisaniello, D., Piatto, A., Parmeggiani, D., Sperlongano, R., Zvenka, N., Barbarisis, A., Parmeggiani, U.: The role of laparoscopy in pancreatic surgery. Front.Biosci, 2006, 1, No.11, p.2203-2205.
2. Long, E.E., Van Dam, J., Einstein, S., Jeffrey, B., Desser, T., Bortin, J.A.: Computed tomography, endoscopic, laaproscopic, and intraoperartive sonography for assessing resectability of pancreatic cancor. Surg. Oncol., 2005, 14, 2, 105-113.
3. Grinbaum, R., Nissan, A., Beglaibter, N., Cohen, T., Peretz, T., Freund, H.R.: The prognostic value of CA 19-9 in the preoperative work-up of pancreatic cancor patiens. Harefuah, 2006, 11, 145, p. 793-794.
4. Schima,W.: MRI of the pancreas: tumours and tumour-simulating processes. Cancor Imaging. 2006, 6, No. 20, p. 199-203.
5. Pierce, R.A., Spitler, J.A., Hawkins, W.G., Strasberg, S.M., Linehan, D.C., Halpin, V.J., Eagon, J.C., Brunt, L.M., Frisella, M.M., Matthexs, B.D.: Outcomes analysis of laparoscopic resection of pancreatic neoplazma. Surg. Endosc., 2006, 16.
6. Fernandez, J.A., Parrilla, P.: Chat are the main errors made by surgeons in the management of pancreatic cancer? Cir. Esp., 2006, 4, 79, p. 215-223.

7. Ahmed, S.I., Bocharev, V., Oleynikov, D., Samson, A.R.: Patiens with pancreatic adenocarcinoma benefit from staging laparoscopy. J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech.A., 2006, 5, 16, p. 458-463.
8. Heinrich, S., Goerres, G.W., Schafer, M., Sagmeister, M., Bauerfeind, P., Pestalozzi, B.C., Hany, T.F., von Schulthess, G.K., Clavien, P.A.: Positron emission tomography/computed tomography influences on the management of resectable pancreatic cancor and its cost-effectiveness. Ann. Surg., 2005, vol. 2, No.242, p.235-243.

162 Je indikována resekce horní mezenterické a portální žíly u karcinomu hlavy pankreatu?

Gürlich R.[1], Oliverius M.[1], Lipár S.[1], Špičák J.[2], Novotný J.[3], Štirand P.[2]
1) Klinika transplantační chirurgie IKEM, přednosta: doc. MUDr. Miloš Adamec, CSc.
2) Klinika hepatogastroenterologie IKEM, přednosta: doc. MUDr. Julius Špičák, CSc.
3) Onkologická klinika 1. LF UK Praha a VFN, přednosta: doc. MUDr. Luboš Petrželka, CSc.

Úvod

V době diagnózy je resekabilních asi 20% nádorů hlavy pankreatu. Zvýšení procenta resekability můžeme dosáhnout hemipankreatoduodenektomií (PD) se současnou resekcí v. mesenterica superior (VMS), v. porta (VP), případně v. lienalis (VL). Stále probíhá diskuze, zda u tohoto technicky velmi náročného výkonu převáží onkologický prospěch nad rizikem závažných pooperačních komplikací.

Metodika a výsledky

Na našem pracovišti jsme od 4/2006 provedli PD se současnou resekcí VSM – PV u 7 nemocných. U čtyř nemocných jsme provedli částečnou resekci stěny VMS – PV, u dvou nemocných jsme resekovali úsek VMS – VP s následnou anastomózou pahýlů a u jednoho nemocného jsme defekt po resekci VMS – VP nahradili interponátem z v. jugularis interna. V našem malém souboru jsme měli nulovou mortalitu a žádnou závažnou pooperační komplikaci. Doba sledování operovaných je v intervalu 1-8 měsíců.

Závěr

Výsledky našeho souboru lze hodnotit spíše jako kazuistické zkušenosti. Přesto, v souladu s literaturou se domníváme, že PD s resekcí cév signifikantně zvyšuje procento resekability a signifikantně nezvyšuje perioperační mortalitu ani morbiditu. Přežívání dle literárních údajů je shodné s nemocnými po prosté PD. Proto se domníváme, že PD s resekcí cév by měla být ve specializovaných centrech v indikovaných případech standardní léčebnou metodou u karcinomu hlavy pankreatu.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NR 9223-3.

XVIII.
Bronchogenní karcinom

163 Léčba karcinomu plic.

Skřičková J.
Klinika nemocí plicních a tuberkulózy, LF MU, FN Brno, Bohunice

V celosvětovém měřítku zaujímá karcinom plic druhé místo mezi všemi zhoubnými nádory. V České republice je na prvním místě mezi zhoubnými nádory u mužů a na prvním místě v příčinách úmrtí na zhoubné nádory. Incidence byla v roce v 2002 u mužů 83,2/100000 obyvatel a u žen 22,6/100000. Neexistují časné varovné signály, které by umožnily zachycení choroby v počátečním stadiu. Jakmile se příznaky nemoci objeví, je už karcinom ve stádiu pokročilém a léčba je svízelná.

Pro praxi má největší význam dělení na skupinu malobuněčných karcinomů (25-30%) a skupinu nemalobuněčných karcinomů (přibližně 70-75%), protože z rozdílných biologických vlastností malobuněčných a nemalobuněčných karcinomů vyplývá i rozdílný přístup k léčbě. V anglické terminologii se používá *Small Cell Lung Cancer* pro malobuněčné bronchogenní karcinomy a *Non Small Cell Lung Cancer* pro skupinu nemalobuněčných bronchogenních karcinomů.

Malobuněčné bronchogenní karcinomy se vyznačují rychlým růstem, výrazným sklonem k časnému metastazování do kostí, jater, centrálního nervového systému, nadledvin. Jsou zpočátku velmi senzitivní na radioterapii a chemoterapii, jejich chemo- a radiosenzitiva však po čase přejde v chemo- a radiorezistenci, takže ač chemoterapie zprvu dosáhne výrazného úspěchu, tumor se časem stane rezistentním a jeho průběh již dále není chemoterapií a radioterapií ovlivnitelný.

Nemalobuněčné bronchogenní karcinomy rostou pomaleji, metastazují později, k radioterapii a protinádorové chemoterapii jsou však málo citlivé.

Léčba malobuněčného karcinomu plic (SCLC)

Doporučení léčby malobuněčného bronchogenního karcinomu se odvíjí od klinických stadií. Základními postupy léčby malobuněčného karcinomu jsou:

- chemoterapie
- radioterapie cílená na tumor a metastázy
- preventivní ozáření mozku
- chirurgické zákroky

Léčba by se měla principiálně lišit ve své intenzitě u pacientů se vzdálenými metastázami, kde má jen vysloveně paliativní potenciál, od léčby pacientů s limitovaným onemocněním, kde může mít cíl kurativní.

Základním léčebným postupem u limitovaného i extenzivního stadia onemocnění malobuněčným karcinomem plic je chemoterapie (4-6 cyklů). V jejím důsledku dochází jak ke zlepšení kvality života, tak k prodloužení života nemocných.

Standardní léčba první linie SCLC: platinové deriváty (cisplatina, karboplatina) + etoposid. U řady nemocných je cisplatina nahrazována karboplatinou pro její lepší snášenlivost. Jako třetí lék do kombinované léčby první linie se doporučuje ifosfamid. Zda do kombinované léčby zařadit dva nebo tři léky je zatím spíše věcí názoru, neboť dosud nejsou přesvědčivé výsledky o prodloužení doby přežití při užití trojkombinace.

Léčba druhé linie SCLC: U více než 95% nemocných s malobuněčným karcinomem plic dochází k relapsu po iniciální léčbě. Chemoterapie druhé linie má význam především pro paliaci příznaků a pro prodloužení délky přežití. Nemocní, u nichž nedošlo k odpovědi na léčbu první linie chemoterapie, nebo nemocní, u nichž došlo k progresi do 3 měsíců od ukončení léčby první linie, mají jen malou šanci na úspěch léčby druhé linie. Nemocným, u nichž došlo k odpovědi na léčbu první linie chemoterapie a k relapsu onemocnění později než za 3 měsíce, je indikována druhá linie léčby ve stejné kombinaci jako první linie léčby. U nemocných, u kterých došlo k relapsu dříve než za 3 měsíce a u těch, kteří neodpovídají na léčbu, je nyní doporučován především topotekan.

Vysokodávkovaná chemoterapie s podporou periferních krevních buněk je léčba, o které se předpokládalo, že bude léčbou indukční před plánovanou chirurgickou resekcí, její význam se však nepotvrdil a v současnosti je předmětem klinických studií.

Radioterapie u limitovaného onemocnění malobuněčného bronchogenního karcinomu

U limitovaného stadia onemocnění je radioterapie v kombinaci s chemoterapií dnes považována za standardní léčebný postup. Lze zvolit buď radioterapii po ukončení chemoterapie, nebo přistoupit k takzvané konkomitantní (současné) radiochemoterapii nebo chemoradioterapii. Ozařuje se v dávce 45-50 Gy. Konkomitantní chemoradioterapie způsobuje více lokálních nežádoucích účinků, ale dle některých studií dosahuje lepších výsledků. Nejednotné výsledky dosavadních studií však neumožňují jednoznačné doporučení, proto načasování radioterapie a chemoterapie závisí na názorech a zkušenostech jednotlivých pracovišť a celkovém stavu nemocného.

Radioterapie u extenzivního onemocnění malobuněčného bronchogenního karcinomu má význam pro paliaci příznaků.

Preventivní ozáření mozku u nemocných s malobuněčným bronchogenním karcinomem je v současnosti indikované u nemocných s malobuněčným karcinomem plic v limitovaném stadiu onemocnění a s kompletní remisí jako adjuvantní léčba, neboť u 20-40% pacientů jsou mozkové metastázy prvním příznakem recidivy a velmi limitují kvalitu života nemocných.

Chirurgické odstranění malobuněčného karcinomu plic bývá prováděno poměrně vzácně vzhledem k biologické povaze tohoto nádoru. Operační řešení má být tedy vyhrazeno jen pacientům se skutečně velmi limitovaným onemocněním.

U pacientů s limitovanou chorobou SULC se na některých pracovištích provádí operace po předchozí chemoterapii po dosažení kompletní nebo parciální remise. Na tento postup však není jednoznačný názor.

Za záchranný chirurgický zákrok je považována resekce nádoru s nedostatečnou léčebnou odpovědí na předchozí chemoterapii a radioterapii u pacientů v dobrém klinickém stadiu a s limitovaným onemocněním. Ani na tento postup nejsou jednoznačné názory.

Prognóza nemocných s malován **karcinomem plic**

Limitované stadium onemocnění:

Bez léčby …… medián přežití 3 měsíce
Chemoterapie …… medián přežití 12-14 měsíců
Chemoterapie + radioterapie …… medián přežití 16-20

Extenzivní stadium onemocnění:

Bez léčby…… medián přežití 6 týdnů
Chemoterapie : …… medián přežití 7,8 měsíců

Léčba nemalobuněčného bronchogenního karcinomu závisí také na klinických stádiích.

Léčba klinického stadia I a II NSCLC

Je-li v době stanovení diagnózy onemocnění klasifikováno jako klinické stadium I a II a neexistují kontraindikace z funkčního nebo interního hlediska, je podle současných doporučení indikována chirurgická léčba. Pokud nemocný není schopen hrudní operace v celkové anestezii, je indikována radioterapie. Pokud je proveden radikální chirurgický výkon u klinického stádia Ib, IIa, IIb je indikována následná **adjuvantní chemoterapie**

Léčba klinického stadia III A NSCLC

U pacientů v tomto stadiu je doporučováno operační řešení, pokud nejsou kontraindikace. Před operací se však má podat **neoadjuvantní léčba** (chemoterapie a radioterapie, buď samostatně, nebo jako konkomitantní léčba). Počet cyklů chemoterapie se před rozvahou o operačním řešení pohybuje mezi 2-4. Pokud byl nemocný léčen jen chemoterapií a po jejím ukončení byl indikován chirurgický výkon, měla by následovat radioterapie.

Léčba klinického stadia III B NSCLC

U nemocných ve stadiu III B v době stanovení diagnózy je indikována chemoterapie s následnou nebo souběžnou radioterapií. Jen ve výjimečných případech se v tomto stadiu zvažuje operace po předchozí neoadjuvantní léčbě. Pacientům v klinickém stadiu III B je však operace indikována opravdu jen zcela výjimečně.

Léčba klinického stadia IV NSCLC

U nemocných s generalizovaným nemalobuněčným bronchogenním karcinomem (klinické stadium IV) není názor na léčbu chemoterapií jednoznačný. Měla by být indikována jen u nemocných v dobrém klinickém stavu. V jejím průběhu bychom měli pečlivě sledovat, zda touto léčbou nemocnému opravdu prospíváme. Po dvou cyklech chemoterapie by měl být její efekt přehodnocen. Pokračování v léčbě do 4 až 6 cyklů je indikováno u těch nemocných, u kterých je po 2 cyklech prokazatelná odpověď na léčbu. Ověřenou pravdou zůstává, že chemoterapie u některých pacientů dočasně zmenšuje symptomy nemoci, a tak zlepšuje kvalitu života a vede i ke statisticky významnému prodloužení života, i když se jedna o týdny, zcela výjimečně o měsíce.

Chemoterapie u nemalobuněčného bronchogenního karcinomu

Základem chemoterapeutických režimů jsou platinové deriváty cisplatina nebo karboplatina. Platinový derivát lze kombinovat s dalšími cytostatiky. Pro nemalobuněčný bronchogenní karcinom to byly do počátku 90, let vinblastin, mitomycin C, ifosfamid. V 90. letech vstoupily do léčby nemalobuněčného bronchogenního karcinomu tzv. cytostatika III. generace. Jsou to především paklitaxel, gemcitabin, vinorelbin a docetaxel, irinotecan. Při použití kombinací s těmito cytostatiky je dosahováno především většího procenta objektivních odpovědí, což pro samotné nemocné znamená zlepšení kvality života. Bylo prokázáno i statisticky významné prodloužení přežití.

Radioterapie u nemalobuněčného bronchogenního karcinomu

Primární radioterapie s kurativním **záměrem**

Je indikována u inoperabilních nemocných bez průkazu vzdálených metastáz. Kurativním cílem v tomto případě myslíme zmenšení nádoru a zpomalení růstu. Do ozařovacího pole je zahrnut primární nádor, plicní hilus na postižené straně, mediastinum a při uložení nádoru v horním laloku i nadklíčkové uzliny. Aby došlo ke zmenšení nádoru, je nutno aplikovat vyšší dávky záření. Proto se ozáření provádí vysokoenergetickými zdroji (lineární urychlovač). Celková dávka záření je většinou 64 Gy. U některých nemocných lze zevní radioterapii (teleterapii) doplnit brachyterapií (zavedení zářiče intrabronchiálně).

Pooperační radioterapie

Pooperační radioterapie je indikována při N2 a N3, stejně jako u inkompletní resekce tumoru. Ozařovaný objem zaujímá původní tumor a mediastinální uzliny, dávka se pohybuje kolem 50-60 Gy /5-6 týdnů při standardním frakcionování 2 Gy/den. Výsledkem této léčby je snížení počtu lokálních recidiv o 10% a některé studie udávají i pozitivní vliv pooperační radioterapie na délku přežití.

Předoperační ozáření

Předoperační ozáření přichází v úvahu u Pancoastova tumoru, ozařovací pole zahrnuje tumor, horní část mediastina a stejnostrannou nadklíčkovou oblast. Obvykle se používá dávky 40 Gy a zbývajících 20 Gy se doplňuje po operaci.

Paliativní radioterapie

Paliativní radioterapie má za cíl mírnit komplikace způsobené tumorem. Při paliativním ozařování se aplikují dávka v rozmezí 30-50 Gy. Udává se následující účinnost paliativní radioterapie u následujících symptomů: hemoptýza 84%, bolesti 66%, uvolnění atalektázy 23%, dušnost 60%, paréza rekurentu 6%, dráždění ke kašli 60%.

Léčba 2. linie nemalobuněčného karcinomu

Cytostatická léčba 2. linie je indikována pokud 1. linií bylo dosaženo objektivní léčebné odpovědi. Cílem je především symptomatická úleva, i když je prokázáno u vhodně k chemoterapii indikovaných nemocných prodloužení přežití. Doporučená je monoterapie, vhodné léky v této indikaci jsou docetaxel nebo pemetrexed, popřípadě erlotinib.

Prognóza pacientů s nemalobuněčným **bronchogenním karcinomem**

Nejlepší prognózu mají ti nemocní, u nichž byl nádor diagnostikován v operabilním stadiu a provedena úspěšná resekce plicního tumoru. Podíl radikálně operovaných nemocných ze skupiny všech pacientů s nemalobuněčným bronchogenním karcinomem je poměrně nízký a v jednotlivých regionech České republiky může být odlišný. V celé České republice nepřesahuje 20%. Dle zahraničních údajů podíl operovaných činí 25-30%. U menšiny radikálně operovaných pacientů je prognóza závislá na TNM klasifikaci. Nejlepší prognózy dosahují nemocní, jejichž nádor byl klasifikován jako T1 N0, u nichž bývá zaznamenáno 5leté přežití větší jak 60%. I v případě, že je provedena radikální resekce nádoru a postižených uzlin, u většiny nemocných dochází k recidivě (lokální nebo vzdálené) do 2 let. Prognóza u pacientů s neoperabilním lokoregionálně pokročilým onemocněním či generalizovaným onemocněním je i přes aplikovanou léčbu špatná. Medián přežití těchto nemocných obvykle nepřesahuje 12-18 měsíců.

Paliativní léčba malobuněčného i nemalobuněčného bronchogenního karcinomu

Paliativní léčba nemocných s bronchogenním karcinomem se řídí stejnými zásadami jako u jiných nádorových onemocnění. U nemocných s rakovinou plic indikujeme paliativní léčbu především kvůli potížím, které jsou spojeny se syndromem horní duté žíly, s maligním pleurálním výpotkem a bronchiální obstrukcí.

Sledování nemocných s bronchogenním **karcinomem** má za cíl časně odhalit progresi a zahájit další léčbu. Udává-li nemocný nové potíže, je vhodné provést přešetření (restaging) ihned. Pravidelné sledování má význam i pro ty nemocné, u nichž po stanovení diagnózy nebyla zvolena léčba s kurativním záměrem. Díky pravidelným kontrolám můžeme včas zachytit nový příznak a dobře zvolenou léčbou paliativní pak můžeme zlepšit kvalitu života nemocného.

Perspektivy diagnostiky a léčby bronchogenního karcinomu

Velkou nadějí pro nemocné především s NSCLC je **biologická léčba**, která při ovlivňování přirozených regulačních mechanismů řídících metabolismus, proliferaci a migraci nádorových buněk využívá nízkomolekulární preparáty, makromolekuly i buněčné efektory imunitního typu. V současnosti existuje nejvíce informací o ovlivnění receptoru pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor = EGFR). Velmi intenzivně je zkoumána možnost inhibice intracelulární domény EGF receptoru s tyrozinkinázovou aktivitou, protože konečnými důsledky aktivace EGF receptoru je zvýšení proliferace nádorových buněk, inhibice apoptózy, zvýšení invazivity nádoru, aktivace angiogeneze, metastazování a vznik rezistence k chemoterapii i radioterapii. Jedná se o terapeutický přístup na subcelulární úrovni. Tato onkologická léčba je cílená (tzv. „targeted“) na nitrobuněčné mechanismy přenosu signálu, který vyvolává změny proliferační aktivity nádorových buněk. Jedná se o léčbu perorální, což je velmi výhodné u nemocných často značně předléčených s poškozeným a špatným stavem periferního žilního přístupu. Na základě proběhlých studií je v České republice pro léčbu NSCLC ve 2. a 3. linii doporučována Tarceva (erlotinib) a předpokládá se že v dohledné době dojde ke kategorizaci inhibitoru VEGF (vascular endothelial growth factor) Avastinu (bevacizmabu) pro první linii NSCLC současně s konvenční cytostatickou léčbou v případě, že se bude jednat o adenokarcinom.

Diagnostiku a léčbu nemalobuněčného bronchogenního karcinomu je třeba provádět ve specializovaných zařízeních, která mají potřebné zázemí technické a především personální. Neméně důležitá je i mezioborová spolupráce, která se opírá o znalost aktuálních doporučených postupů.

Literatura

1. Boral, AL., Lunch, T. (jr). Chemotherapy of Small – Cell Lung Cancer. 381-403. In: SKARIN, AT. (ed). Multimodality Treatment of Lung Cancer. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000, p. 381-403.
2. BRITISH THORACIC SOCIETY AND SOCIETY OF CARDIOTHORACIC SURGEONS OF GREAT BRITAIN AND IRELAND WORKING PARTY. Guidelines on the selection of patients with lung cancer for surgery. Torax, 2001, 56, 89-108.
3. Bunn, PA., Kelly, K. New Combination in the Treatment of Lung Cancer. A Time for Optomism. Chest, 2000, 117, p.138S-143S.
4. Bunn, PA., Mault, J., Kelly, K. Adjuvant and Neoadjuvant Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. Chest, 2000, 117, p. 119S-122S.
5. Deslauriers, J., Grégoire, J. Clinical and Surgical Staging of Non-Small Cell Lung Cancer. Chest, 2000, 117, p. 96S-103S.
6. Holli, K., Visakorpi, T., Hakama, M. Smoking and Survival from Lung Cancer. Acta Oncologica 1999, 38, p. 989-992.
7. JETT J.R., SCOTT W.J., RIVERA M.P., SAUSE W.T.: Guidelines on Treatment of Stage IIIB Non-small Cell Lung Cancer Chest, 2003, 123, 221S – 225S.
8. Kelly, K. New Chemotherapy Agents for Small Cell Lung Cancer. Chest, 2000, 117, p. 156S-162S.

9. Kolek, V., Grygárková, I., Hajdúch M, et al. Neoadjuvantní chemoterapie u hraničně operabilních stádií IIIA nemalobuněčného karcinomu plic kombinací vinorelbin a karboplatina. Následná cílená adjuvantní chemoterapie. Klinická onkologie, 2001, 14, s. 55-58.
10. LYNCH TJ, BELL DW, SORDELLA R, ET AL. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. N Engl J Med 2004; 350: 2129-2139
11. Monnerat, C., LeChevalier, T. Chemotherapy for non-small-cell lung carcinoma, a look at the past decade. Annals of Oncology, 2000, 11, p. 773-776.
12. PFISTER D.G., JOHNSON D.H., AZZOLI CH.G., SAUSE W., SMITH TJ., BAKER S. JR, OLAK J., STOVER D., STRAWN J.R., TURRISI A.T., SOMERFIELD M.R.: American Society of Clinical Oncology Treatment of Unresectable Non-Small-Cell Lung Cancer Guideline: Update 2003. Journal of Clinical Oncology, 2004, Vol. 22, Number 2, p. 330 – 353.
13. ROBINSON L.A., WAGNER H., RUCKDESCHEL J.C.: Treatment of Stage IIIA Non-small Cell Lung Cancer, Chest, 2003, 123, 202S – 220S.
14. M. PEŠEK, J. SKŘIČKOVÁ, V. KOLEK, P. ZATLOUKAL, L. PETRŽELKA: Clinical experience on EGFR tyrosine kinase inhibitor in non-small cell lung cancer, compassionate programme in Czech republic. Lung Cancer 52, Suppl. 2, 2006, S27 - S29
15. Skácel, M., Marel, M., Pospíšil, R. et al. Operace malobuněčné plicní rakoviny – hazard či standard? Klinická onkologie, 2002, 15, s. 166-169.
16. SKŘIČKOVÁ, J., ŠPELDA S., KAPLANOVÁ J. et al. Bronchogenní karcinom. In: ADAM, Z., VORLÍČEK, J., VANÍČEK J. et al. Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob. Praha, Grada, 2002, s. 33-54.
17. Zatloukal, P., Petrželka, L. Karcinom plic. Praha: Grada, 2001, 367 s.

164 Chirurgie a radioterapie u bronchogenního karcinomu.

Čapov I., Jedlička V., Peštál A., Doležel J., Veselý M.
I. chirurgická klinika LF MU a FN USA v Brně

Radioterapie (RT) sehrává v současné době nadále nezastupitelnou roli v určitých indikacích u NSCLC, z nichž profituje jak operující chirurg, tak zejména pacient. Radioterapie z pohledu chirurga je důležitá jak v neoadjuvanci, adjuvanci (prevence lokální či regionální rekurence – sterilizace mediastina), paliativní léčbě a rovněž použití u nemocných s časnými stádii NSCLC neschopnými podstoupit resekční zákrok. **Shennib (2005)** u této velmi rizikové skupiny doporučuje VATS klínovou resekci a lokální RT. **Birim (2005)** doporučuje sčítat rizikové faktory nemocných dle *Charlsonova comorbidity index*u (CCI). RT byla a je hlavní léčebnou metodou u velmi pokročilých forem NSCLC. V řadě případů však jen jako léčba paliativní (zmenšení nádorových ložisek, léčba algického Pancostova tumoru, při hemoptýze, při skeletální diseminaci či syndrom VCS **(Šlampa 2004)**. Radioterapie se rovněž doporučuje u minimal residual disease (R1).

Chirurgie je léčbou volby u nemocných s NSCLC, jehož resekabilita je úzce spjata se stádiem onemocnění. Zatímco časná stádia I a II jsou nejvhodnější k primární resekci s velmi dobrými výsledky, role chirurgie u stádia IIIA a IIIB zůstává nadále kontroverzní a samotná chirurgická léčba je zcela nedostatečná či někdy nemožná. Stejně jako stádium IIIA je i stádium IIIB velmi různorodou skupinou pacientů (IIIB se stádii T4N0-1 až T1N3. Důležitá je zde multimodalitní léčba zabírající i chirurgii pro definitivní lokální léčbu a regionální kontrolu. Optimální délka indukční chemoterapie zůstává rovněž kontroverzní. ASCO (American Society of Clinical Oncology) guidelines doporučují trvání od 2 do 8 cyklů **(Pitz 2002).** Velmi vydatnou pomocí je neoadjuvance u Pancoastova tumoru **(Sonett 2004**). RT výrazně zlepšuje výsledky léčby u těchto nemocných, které je vhodné soustřeďovat do speciálních akreditovaných center hrudní chirurgie (viz analogie KOC). Není možné, aby léčil ten koho to napadne. Radikální léčba je možná cca ve třetině případů po úspěšné neoadjuvantní léčbě s prodlouženým přežíváním. Počet resekcí po indukční CHRT u stádií IIIB se pohybují v rozmezí 24-68% **(Grünenwald 2001, Ichinose 2003, Galleta 2003).** Velmi záleží na vstupních kritériích**,** ale i na kvalitě a agresivitě chirurgických pracovišť (Japonsko, USA, Francie apod.)

Při neoadjuvantní chemoradioterapii CHRT) jsou různě intenzivně atakovány mediastinální tkáně. Neoadjuvantní multimodální léčba mění normální zánětlivou odpověď a podporuje tvorbu adhezí, dochází k fibrotizaci tkání, jež výrazně ztěžuje následnou jemnou preparaci. Jako velmi výhodná pro restaging se jeví opakovaná mediastinoskopie k posouzení úspěšnosti primární léčby (vyloučení N3). Jako alternativa se nabízí výrazně dražší PET-scan.

Nejčastěji pozorované peroperační a pooperační komplikace po CHRT jsou krvácení, bronchopleurální píštěl, empyém, pneumonitis, rozvoj ARDS **(Granetzny 2003)**. Incidence těchto komplikací je vyšší než když je podána samotná chemoterapie **(Perrot 2005**). Operační letalita pacientů po předoperační chemoradioterapii se pohybuje mezi 3- 10,4% **(Grünenwald 2001, Stamatis 1999, Ichinose 2003, Kwong 2005)**. Jako prevenci komplikací po neoadjuvantní léčbě rutině při resekčních zákrocích pojišťujeme pahýl průdušky lalokem mediastinální pleury, lalokem z mezižeberního svalu či z perikardu, přičemž průdušku šijeme vstřebatelným materiálem s prodlouženou dobou hydrolýzy (Monoplus, B.Braun či PDS, Ethicon) či materiálem nevstřebatelným. Velmi pečlivě stavíme sebemenší krvácení, jež by mohlo být zdrojem přetrvávajícího krvácení a důvodem k retorakotomii.

Možnosti hrudní chirurgie u bronchogenního karcinomu jsou víceméně vyčerpány, tj. nenabízí nic nového. Zásadní role chirurgie je v léčbě časných forem karcinomu. Zde hrudní chirurg může nabídnout VATS lobektomii či roboticky asistovanou lobektomii s mediastinální lymfadenektomií. Na druhé straně u pokročilých forem superradikální resekce s intraperikardiálními podvazy cév a superradikální oboustrannou mediastinální lymfadenektomií. I v zájmu dalších specialistů by mělo být vyhledávání těchto časných stádií se snahou radikálně je léčit. Léčba velmi pokročilých forem je ponejvíce v rukou firem chrlící na trh stále nová a nová cytostatika bez výraznějšího efektu na přežití.

165 Fluidothorax po resekci plic pro nádor.

Mitáš L., Vomela J., Hanke I., Ivičič J., Horváth T.
Chirurgická klinika FN Brno, Brno, přednosta prof. MUDr. Jindřich Vomela, CSc.

Souhrn

Cíl práce: Studium příčin ovlivňujících množství výdeje při hrudní drenáži a zhodnocení průběhu drenáže u pacientů po plicní resekci pro malignitu.

Materiál a metody: Čtyřicet jedna pacientů (31 mužů,10žen) s průměrným věkem u mužů 68 let (rozpětí 44-78let), u žen 60 let (rozpětí 33-74), kteří podstoupili plicní resekci s lymfadenektomií pro plicní malignitu.

Výsledky: Délka drenáže v hodinách /množství výdeje v mililitrech u příslušných resekčních výkonů – Lobektomie 141/1463, bilobektomie 174/2123, pneumonektomie 76/1230, rozšířená pneumonektomie 64/1350, segmentektomie 151/1302, klínovitá resekce 124/1206.

Diskuse: Výdej při hrudní drenáži je závislý na operační technice a biologických faktorech.

Závěr: Zaměření se na chirurgické a biologické příčiny množství výdeje a délky hrudní drenáže může pomoci nalézt příklady, které mohou změnit přístup k věci.

Klíčová slova: Chirurgie – fluidothorax – karcinom plic

Abstract

Purpose: To review the background and evidence relating to tube drainage output (TDO) in patients after pulmonary resection because of lung cancer.

Material and metods: Fourty one patients (31 males,10 females) mean age males 68 years (range 44-78), females 60 years (range 33-74), underwent open surgery lung resection and lymphadenectomy because of malignancy.

Results: Tube insertion (hours)/ tube output (ml) by relevant surgical intervention, respectively Lobectomy 141/1463, Bilobectomy 174/2123, Pneumonectomy 76/1230, Extented pneumonectomy 64/1350, Segmentectomy 151/1302, Wedge resection 124/1206.

Discussion: TDO depends on operation technique and biological factors.

Conclusion: Focus on surgical and biological causation of the tube drainage output amount and insertion time can help identify examples from which might be the field changed.

Key words: Lung Cancer – Pleural Effusion – Surgery

Krátký název / Short title: EF5_BOD7.

Korespondující autor / Corresponding author: MUDr. Ladislav Mitáš, e-mail: Tel. 532 232 983 Fax 532 233 900

Úvod

Rozvoj poznání přináší nové výzvy i hrudní chirurgii. Cílem této práce je hledání aktuální odpovědi na starou otázku tekuté postintervenční hrudní produkce u onkologických pacientů. V souboru 41 pacientů po plicní resekci v roce 2005 pro plicní malignitu byly sledovány délka hrudní drenáže, množství fluidothoraxu, histologický nález, typ operace, délka hospitalizace pacienta a přidružená onemocnění.

Materiál a metody

Čtyřicet jedna pacientů (31 mužů,10 žen) s průměrným věkem u mužů

68 let (rozpětí 44-78let), u žen 60 let (rozpětí 33-74), kteří podstoupili plicní resekci pro primární či sekundární plicní malignitu v roce 2005.

Výsledky

Typ resekce	Počet za rok 2005
Lobektomie	17
Bilobektomie	9
Pneumonektomie	5
Rozšířené pneumonektomie	1
Segmentektomie	2
Atypická (klínovitá) resekce	7

Tab. č. 1

Histologie	Počet za rok 2005
Spinocelulární karcinom	13
Adenokarcinom	11
Velkobuněčný karcinom	4
Typický karcinoid	3
Ostatní*	5
Plicní metastázy**	5

Tab. č. 2

Kouření	Muži	Ženy
Aktivní kuřáci	12	2
Stopkuřáci	13	3
Nekuřáci	6	5

Tab. č. 3

* karcinomy bronchoalveolární, adenoskvamózní, pleomorfní a světlobuněčný plicní
** metastázy adenokarcinomu ledvin, GIT a maligního melanomu

Resekce	Délka AHS(h)	Délka spádové drenáže(h)	Celková délka drenáže(h)	Množství výdeje (ml)	Doba poop. hospitalizace (d)
Lobektomie	79	62	141	1463	9
Bilobektomie	100	74	174	2123	9
Pneumonektomie	0	76	76	1230	10
Segmentektomie	67	84	151	1302	10
Atypická resekce	61	63	124	1206	8

Tab. č. 4 Průměrné hodnoty

Ze statistik v tabulce č. 4 byli vyřazeni 2 pacienti s hrudním empyémem.
Z pooperačních komplikací se vyskytly tyto: bronchopneumonie, hrudní empyém a chylothorax (vše jedenkrát).

Diskuse

Produkci postintervenčního fluidothoraxu a tím i tekutý výdej z hrudních drénů ovlivňuje řada faktorů:

- Biologické: věk, rozsah nemoci (stadium v klasifikaci TNM), komorbidity, stav výživy a vnitřního prostředí.
- Operační technika: šetrnost při manipulaci s tkáněmi, typ a rozsah disekce lymfatik (kompletní nebo parciální, bloková nebo frakcionovaná), typ prováděné operace (anatomická resekce, při níž jsou respektovány anatomické hranice – segmentektomie, lobektomie, pneumonektomie, nebo resekce extraanatomická, při níž tyto hranice respektovány nejsou – atypická (klínovitá) resekce).
- Využití nových technologií a to jak v technickém smyslu slova: videoasistovaná a robotická chirurgie, harmonický skalpel, využití laseru tak ve farmaceutickém významu pojmu: ovlivnění homeostázy systémovou aplikací medikamentů, např. heparin versus LWMH, tak používání přípravků pro lokální ošetření operačního pole.
- Časový faktor.
- Kvalita ošetřovatelské péče (ve smyslu prevence nozokomiálních nákaz, hlídání průchodnosti drénů, adekvátní sukce atd.).
- Stanovení a exaktní dodržování příslušných postupů (standardů) včetně lege artis odůvodněných výjimek z nich.

Solidní a nezávislé vyjádření a snaha o řád v terénu tak komplexním předpokládá bezpochyby soupeření názorů v celé řadě etáží. Aby se tak mohlo dít, je potřeba shromažďovat, studovat a správně interpretovat data.

Závěr

Již z materiálu jednoho roku (2005) vystupuje řada podnětů jak v reflexi, tak v perspektivě, ale pouze dostatečná šíře a hloubka retrospekce může zajistit relevanci konkrétních perspektivních odpovědí. I zde platí: Historia magistra vitae.

Literatura

1. Adam Z, Vorlíček J: Speciální Onkologie, 34-54 MU Brno, 2002.
2. Cerfolio RJ, Bryant AS, Singh S, Bass CS, Bartolucci AA: The Management of Chest Tubes in Patients With a Pneumothorax and an Air Leak After Pulmonary Resection, Chest 128, 816-820; 2005.
3. Ganong WF: Přehled lékařské fyziologie, 535-580; H&H, 1999.

4. R, Pafko P, Schützner J, A: Plicní rakovina – klasifikace, rizikové faktory, Sanquis 17, 45; 2001.
5. Marshall MB, Deeb ME, Bleier JIS, Kucharczuk JC, Friedberg JS, Kaiser LR,
6. Shrager JB: Suction vs Water Seal After Pulmonary Resection – A Randomized Prospective Study, Chest 121, 831-835; 2002.
7. Martin-Ucar AE, Passera E, Vaughan R, Rocco G: Implementation of a user-friendly protocol for interpretation of air-leaks and management of intercostal chest drains after thoracic surgery, ICVTS 2, 251-255; 2003.
8. Zeman M et al.: Speciální chirurgie, 157-161; Galén, 2004.

166 Postavení radioterapie v léčbě nemalobuněčného bronchogenního karcinomu.

Malinová B., Stankušová H., Pajdlhauser R.
Radioterapeuticko-onkologické oddělení Fakultní nemocnice Motol, Praha

Nemalobuněčné karcinomy (NSCLC) představují zhruba 80-85% bronchogenních karcinomů (BCA). Většinou jsou diagnostikovány v pokročilých stadiích – až 50% z nich ve stadiu III a IV, pouze 20% pacientů je resekabilních. Radioterapie (RT) spolu s chirurgií a chemoterapií patří k základním léčebným modalitám NSCLC.

Ve světe je k RT indikováno přes 70% pacientů s BCA, v ČR byla v roce 2004 RT aplikována u 42% těchto nemocných (viz tab.1 a 2).

kraj	Nové M+Ž	Celkem	Počet ozářených v r.2004	% ozářených
Hl.m.Pha +Středoč.	971+365	1336	595	44,5
Jihočeský	270+64	334	105	31.4
Plzeňský	270+79	349	94	26.9
Karlovarský	172+65	237	81	34.2
Ústecký	386+155	541	267	49.3
Liberecký	200+58	258	147	60
Královéhradecký	214+47	261	198	75.9
Pardubický	182+49	231	121	52.3
Vysočina	222+37	259	123	47.5
Jihomoravský	442+142	584	262	44.9
Olomoucký	266+56	322	128	39.7
Zlínský	222+35	257	56	21.8
Severomoravský	587+137	724	212	29.3
CELKEM	4386+1289	5675	2389	42 %

Tabulka 1

země	% ozářených pacientů
ČR 2004	42
Austrálie 2003	72
Švédsko	71

Tabulka 2: Srovnání podání RT u NSCLC v ČR a ve světě

Timing radioterapie

Radioterapie v rámci radikální léčby NSCLC může být zařazena jako léčba předoperační, pooperační, jako samostatná terapie nebo v kombinaci s chemoterapií (CHT). Paliativní RT je určena pro klinická stadia IV, pokročilá T3, T4N+, pro pacienty se závažnou komorbiditou a nízkým PS.

Předoperační RT zlepšuje resekabilitu stadií IIB, IIIA, ale současně vede ke zvýšení pooperační morbidity a mortality. Nebyl prokázán vliv na prodloužení celkového přežití (evidence based level II) s výjimkou Pancoastova nádoru, kdy předoperační chemoradioterapie má pozitivní vliv jak na resekabilitu, tak i na celkové přežití (OS).

Pooperační RT vede ke zvýšení lokoregionální kontroly. Meta analýzou více studií však nebyl prokázán efekt na OS (evedence based level I), což je dáno jednak vyšší morbiditou a mortalitou v rámci toxicity terapie, tak skutečností, že zhruba u 2/3 pacientů jsou v době operace přítomny vzdálené mikrometastázy. Pouze u pacientů s N2 postižením vede pooperační RT k malému zlepšení OS.

Samostatná RT je součástí radikální terapie lokálně pokročilých stadií a u pacientů pro komorbiditu inoperabilních. V kombinaci s chemoterapií je RT účinnější než jako samostatná léčebná modalita (evidence based level I).

Pouze jediná studie prokázala zlepšené OS: CHART (continuus hyperfractionated accelerated radiotherapy, celková dávka 54 Gy/ 1,5 Gy/ frakce 3x denně /12 dní). Tato studie byla kritizována pro nízkou dávku v kontrolním rameni (60 Gy) a zařazení až 1/3 pacientů ve stadiu I a II. Následná studie CHARTWEL (60 Gy/ 1,5 Gy/ frakce 3x denně/ 2,5 týdne) již v kontrolním rameni podávala vyšší dávky (66 Gy), a výsledky 4letého přežití (13% vs. 10%) neprokázaly statisticky významný rozdíl.

Jako nejúčinnější léčebný postup u lokálně pokročilého NSCLC se ukázala **kombinace radioterapie a chemoterapie** založené na CDDP**.** Platidiam působí jako radiosensibilizátor a vede k redukci distantních mikrometastáz.

Sekvenčně podaná chemoradioterapie umožňuje podat plnou dávku RT i CHT, je lépe tolerována, ale urychluje repopulaci TU buněk, může vést k radioresistenci a nelze vždy dodržet timing RT pro protrahovanou úpravu krvetvorby po CHT.

Konkomitantní chemoradioterapie přináší výhodu časného zařazení RT, nízké repopulace TU buněk, ale je provázena výrazně vyšší akutní toxicitou (esofagitida grade 3+4 u 40% pacientů). Konkomitantní chemoradioterapie pak vykazuje až o 10% vyšší OS 5 let než léčba sekvenční (evidence based level I).

Že radioterapie hraje důležitou roli v léčbě NSCLC bylo potvrzeno, ale které podmínky musí RT splňovat, aby byla efektivní? Stručně řečeno: podat vysokou dávku do cílového objemu při přijatelné toxicitě pro normální okolní tkáně. Je známo, že k dosažení 50%tní kontroly nádoru je třeba podat dávku 80 Gy.

První podmínkou je správná **definice cílového objemu**. Vzhledem k tomu, že radikálně léčení pacienti dostávají kombinovanou chemoradioterapii, elektivní ozáření uzlin mediastina již není indikováno a cílový objem představuje **tumor + postižené uzliny**. K definování cílového objemu (TV) je samozřejmostí kvalitní diagnostické CT vyšetření, zařazení FDG PET a jeho fúze s plánovacím CT vyšetřením umožňuje definovat TV nejpřesněji.

Rutinně používanou **technikou radioterapie** je **3D konformní radioterapie** (CRT) používající více vstupních polí tvarovaných multileaf kolimátorem, 3D plánovací systémy a moderní lineární urychlovače. Základem pro určení nejvhodnějšího plánu jsou **dávkově objemové histogramy** (DVH), zobrazující rozložení dávky v cílovém objemu a rizikových orgánech. Při 3D CRT nemalobuněčného BCA je limitem výše podané dávky plicní tkáň. Pokud dávku 25 Gy dostává více jak 30% plic, pak až u 1/4 pacientů vzniká těžká postiradiační fibrosa. Bylo zjištěno, že na rozvoji fibrosy se podílí profibrinogenní cytokin TGF β (transforming growth factor beta), který vzniká v plicní tkáni v rámci její reakce na hypoxický stres a jehož hladina je individuálně odlišná. Na tomto poznatku byl založen design studie, kdy výše hladiny TGF β po podání dávky 73 Gy určovala, zda bude RT ukončena či zda bude dávka eskalována do 86 Gy.

Technika IMRT (intensity modulated radiotherapy) nepatří k běžně používaným technikám v léčbě NSCLC. Je charakterizována inverzním plánováním, nehomogenitou dávky v cílovém objemu, radiačním zatížením velkého objemu plic nízkou dávkou. IMRT je velmi náročná pro fyzikální výpočet absorbované dávky v plicní tkáni -např. změna v hustotě z 0,4 na 0,2 $g.cm^{-3}$ způsobí snížení absorbované dávky o 6% (záření 6MV), resp. o 9% (záření 18MV). Výhodu IMRT představuje možnost podat do cílového objemu vysokou dávku, je vhodná pro techniku konkomitantního boostu, limitujícím rizikovým orgánem je jícen.

Přístrojové vybavení je základem pro kvalitní RT. Používající se lineární urychlovače se zářením X 6MV. Pokud se používá energie 18MV, vznikající sekundární elektrony způsobují v plicní tkáni těžší postiradiační poškození. Kontrola polohy pacienta se provádí portálovým zobrazením, aplikovaná dávka pak dosimetrií in vivo.

Velký pokrok pro RT plic přinesla **obrazem řízená radioterapie IGRT**, která umožňuje kontrolu zaměření RT s okamžitou korekcí polohy pacienta před každou frakcí záření. Dalšího zpřesnění bylo dosaženo zavedením **„breath-gating“ radioterapie**, kdy je pacient ozařován jen v určité fázi dechového cyklu. Tato technika dovoluje používat malé objemy a eskalovat dávku.

Na závěr bych chtěla zdůraznit nejdůležitější skutečnost: správná indikace pacienta k radikální terapii. Radikální terapii bychom měli vždy zvažovat u pacientů inoperabilních z interních důvodů. Nejvhodnějším léčebným postupem je pak konkomitantní chemoradioterapie, použitou technikou 3D konformní radioterapie, kde cílový objem představuje tumor + postižené uzliny s lemem, a dávka je eskalována podle DVH. Jedná se o léčbu velmi náročnou, vyžadující spolupráci pacienta a intenzivní podpůrnou terapii. Vysokou dávku, potřebnou k eradikaci nádoru, lze však podat jen do limitovaného objemu, a proto většina pacientů odesílaná z plicních klinik k radioterapii je vhodná pouze k léčbě paliativní.

167 Radioterapie nemalobuněčného bronchogenního karcinomu – léčebné postupy v MOÚ.

Čoupek P., Šlampa P., Čoupková I., Komínek L., Pospíšil P.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Radioterapie je hlavní léčebnou metodou inoperabilního nemalobuněčného karcinomu plic. Jen u malého procenta nemocných jde o léčbu přísně kurativní, u většiny nemocných je pokusem o kurativní léčbu, jejímž hlavním cílem je dosažení déletrvající stabilizace onemocnění.

Léčebné postupy v MOÚ Brno dle klinického stadia – zařazení radioterapie:

Stadium I, II: chirurgie, radioterapie event. chemo-radioterapie při kontraindikaci operace.
Stadium IIIA: (N2 minimal disease): operabilní – chirurgie, pooperační radioterapie: při inkompletní resekci, při pozitivních histol. okrajích, při pozitivních mediastinálních uzlinách.
Stadium IIIA: (N2 non minimal disease): inoperabilní: neoadjuvantní chemoterapie (3-6 sérií), v případě operability: operace, inoperabilní: radioterapie, chemoradioterapie
Stadium IIIB: přísně individuálně neoadjuvantní chemoterapie (+ posouzení operability), radioterapie event. chemoradioterapie, paliativní chemoterapie.
Stadium IV: individuálně posuzovaná radioterapie i chemoterapie s cílem symptomatické úlevy

Adjuvantní radioterapie po radikálním chirurgickém výkonu není v MOÚ indikována. V úvahu přichází pooperační radioterapie pouze tehdy, nebyl-li operační výkon radikální (inkompletní resekce, pozitivní histologické okraje, postižené mediastinální uzliny). U pacientů s postižením mediastinálních uzlin zlepšuje radioterapie lokální kontrolu onemocnění, ale nemá vliv na celkové přežití. Dávka pooperační radioterapie je 50 Gy, při pozitivním okraji boost 10 Gy.

Konkomitantní chemoradioterapie je indikována u inoperabilních pacientů st. III A a IIIB s relativně dobrou prognózou. Chemoradioterapie zlepšuje lokální kontrolu choroby a snižuje výskyt vzdálených metastáz. Celková dávka záření je (50-)60 Gy, limitujícím faktorem je zvýšení akutní toxicity (esofagitis, pneumonitis, myelosuprese).

Samotná radioterapie dnes vyžaduje vysoké dávky záření (65-80 Gy), kterých může být dosaženo konformní radioterapií, ovšem vždy v závislosti na velikosti tumoru a ozáření limitovaného objemu zdravé plicní tkáně. Do ozařovaného objemu se zahrnuje makroskopicky viditelný tumor a postižené lymfatické uzliny (dle CT a event. PET vyšetření). Profylaktické ozáření nepostižené části mediastina se dnes neprovádí. Využití hyperfrakcionace, případně akcelerované hyperfrakcionace, umožňuje zlepšení tolerance zdravých tkání a zvyšuje i radiobiologický efekt (aplikace vyšší dávky v kratším čase).

168 Paliativní radioterapie bronchogenního karcinomu.

Macháňová M.
Onkologie, Krajská nemocnice Liberec

Léčbě plicních nádorů je věnováno velké úsilí současné onkologie. Přes zavedení mnoha nových cytostatik i přes vývoj biologických agens má však bronchogenní karcinom stále ve vysokém procentu případů závažnou prognosu. V těchto případech bývá radioterapie s paliativním záměrem, která má za úkol odstranit symptomy, snižující kvalitu života nemocného, metodou volby.

Tato skutečnost je známa již několik desetiletí a stále zůstává platnou. Snad proto se jí nevěnuje tolik pozornosti v odborné literatuře. V databázi Medline za poslední 3 roky (2006, 2005 a 2004) bylo vyhledáno 88 odkazů při zadání „lung cancer and curative radiotherapy“ a 67 odkazů při zadání „lung cancer and palliative radiotherapy“. Uvedeno bylo však jen 9 odkazů při vyhledávání „lung cancer and palliative chest radiotherapy“. Byly-li použity deskriptory dle MeSH byla četnost vyhledaných článků v odborné literatuře za stejné období následující: „*Lung neoplasm“*/and *radiotherapy* 1512krát, ale „*Lung neoplasm“/* radiotherapy and „*Palliative care“ jen 51krát. V letech 2004 až 2006 vyšlo v evropském odborném časopisu Radiotherapy and Oncology 29 sdělení, týkajících se radikální radioterapie bronchogenního karcinomu, ale jen 3 sdělení zabývající se problematikou paliativní radioterapie metastáz bronchogenního karcinomu (2x kostní metastázy a 1x mozkové metastázy) a pouze jedna práce se věnuje paliativní radioterapii primárního plicního nálezu. Je pochopitelné, že v době, kdy nové technologie umožňují rozvoj IMRT (intenzivně modulované radioterapie), IGRT (obrazem řízené radioterapie) či plánování dle fúze CT-PET obrazů, se jednoduché, lety osvědčené techniky dostávají mimo hlavní zájem. Nelze však na ně zapomínat, neboť v paliativní péči mohou přinést úlevu od obtěžujících symptomů mnoha nemocným s primárním plicním nádorem.

Dle statistického výkaznictví bylo zjištěno, že v České republice je indikováno k radioterapii znatelně menší procento nemocných s bronchogenním karcinomem, než je tomu v jiných evropských zemích. Tento procentuální rozdíl se u diagnózy bronchogenního karcinomu projevil jako podstatně významnější ve srovnání s jinými primárními nádorovými lokalizacemi. Z tohoto

důvodu je třeba, abychom se u nás touto problematikou zabývali. Paliativní radioterapie může efektivně utlumit obtíže jako jsou bolesti na hrudi, kašel, hemoptýza, dušnost. Tím se může dosáhnout zlepšení performance status nemocného.

Bronchogenní karcinom je vhodným příkladem diagnózy, u které by léčba s paliativním záměrem měla být stratifikována na paliaci při delší očekávané délce života a na léčbu paliativní při krátké očekávané délce života. Cílem dlouhodobé paliace je kromě kontroly symptomů i dosažení stabilizace nádorového procesu či jeho parciální regrese a tím i prodloužení života nemocného. U této léčby jsou postupy a ozařovací techniky totožné s radikální radioterapií. Radioterapie je zde v indikovaných případech kombinována s chemoterapií, sekvenčně nebo konkomitantně. Při paliativní radioterapii s krátkodobým záměrem je mírněn určitý symptom nádorové choroby s výhledem, že pacient již nemá před sebou dlouhé období života. Cílem je rychlá úleva s minimálními akutními vedlejšími účinky. Pokud se akutní nežádoucí účinky vyskytnou, mají být bezvýznamné intenzity a musí odeznít v krátkém intervalu po ukončení léčby. Riziko rozvoje pozdních nežádoucích účinků radioterapie vzhledem ke krátké očekávané délce života léčeného ustupuje do pozadí.

Při paliativní radioterapii bronchogenního karcinomu je stejně jako i u jiných diagnóz v paliaci indikován nižší biologický ekvivalent celkové dávky ve srovnání s radikální radioterapií, většinou na hranici 40Gy při standardní frakcionaci 2Gy 5x týdně. V praxi se používají kratší ozařovací režimy, eventuelně i jednorázové ozáření, s vyšší dávkou na jednotlivou frakci. Nejčastěji používaná a citovaná dávkově frakcionační schémata ukazuje následující tabulka.

Celková dávka	**Počet frakcí**	**Dávka na frakci**	**Celková doba léčby**	**Poznámka**
40 Gy	20	2	4 týdny	
39 Gy	13	3 Gy	2 a půl týdne	
30 Gy	10	3 Gy	2 týdny	
20 Gy	5	4 Gy	1 týden	
20 Gy	4	5 Gy	1 týden	
14 – 17 Gy	2	7 – 8.5 Gy	1 týden	po týdnu
28 – 10 Gy	1	8 – 10 Gy	1 den	jednorázové ozáření

Tyto dávkově frakcionační režimy mají delší historii. V první polovině 90. let minulého století proběhlo několik studií, např. dva MRC trialy ve Velké Británii, které se zabývaly ozářením s minimálním počtem frakcí. První z nich porovnával schéma 10 x 3Gy s ozářením 2x po 8.5Gy v týdenním intervalu. Druhý srovnával stejné klasické schéma s jednorázovým ozářením dávkou 10Gy. Ukázalo se, že výsledky pro paliaci byly prakticky identické, co se týká ovlivnění symptomů choroby. U jednorázového ozáření byly prokázány menší projevy akutní postirradiační esofagitidy

V paliativní radioterapii bronchogenního karcinomu mají dobré uplatnění všechny typy megavoltážních teleterapeutických ozařovacích přístrojů, lineární urychlovače s fotonovým svazkem i kobaltové ozařovače. Volba ozařovacích polí, jejich uložení, velikosti a tvarování se provádí zpravidla přímo na simulátoru. Při obturaci velkých bronchů může výrazný pozitivní efekt přinést intraluminální brachyterapie, která zabrání rozvoji plicní atelektázy. Tato metoda je přínosná i po rekanalizaci bronchu pomocí laseru.

V teleterapii se používají jednoduché ozařovací techniky s menším počtem ozařovacích polí, nejčastěji dvě protilehlá pole. Při dávce přesahující dávkový ekvivalent 40Gy (např. v režimu 13 x 3Gy), počítané na bod uprostřed AP rozměru, je třeba zvážit dávku na míchu a riziko jejího radiačního postižení, pokud pole zasahují na střední čáru nebo přes ni přesahují. Blíže povrchu, často právě v hloubce míchy, bývá totiž uloženo dávkové maximum, které může překročit předepsanou dávkou o deset i dvacet procent. Tento rozdíl je více vyjádřen u pacientů s větším AP rozměrem. Řešením je pak sklopení dorzálního pole, tak aby svazek míjel míchu.

Na počátku plánování radioterapie je nutné věnovat pozornost volbě optimální ozařovací polohy, která sice zaručí dobrou reprodukovatelnost při každé frakci, současně však umožní dostatečný komfort pro nemocného a nebude zhoršovat jeho obtíže. Totéž platí o volbě fixačních pomůcek.

V literatuře staršího data, avšak při použití technik, které jsou stále aktuální, jsou uvedeny různé výsledky, hodnotící procento nemocných, kterým paliativní radioterapie přinesla úlevu od jejich obtíží. Lze shrnout, že alespoň částečný efekt se projevil minimálně u poloviny pacientů, častěji byl sledován zhruba u ľ nemocných. Četnost dosaženého zmírnění jednotlivých symptomů ukazuje následující tabulka:

Symptom	Literatura	MRC trial s jednorázovým ozářením 10Gy	Lbc 10 x 3Gy
bolesti na hrudi	45 – 90%	61%	60%
hemoptýza	50 – 85%	84%	75%
kašel	50 – 90%	86%	67%
dušnost	40 – 80%	60%	66%
Celkové % pacientů	50 – 80%	71%	74%

U ozařování plicních nálezů paliativní dávkou je z vedlejších efektů pozorována jen akutní esofagitida, a to u méně než poloviny nemocných.

Indikací paliativní radioterapie u bronchogenního karcinomu je i syndrom horní duté žíly. Bronchogenní karcinom je právě diagnóza, u které se syndrom horní duté žíly rozvíjí nejčastěji, a to v 75% jeho výskytu. Radioterapie má význam především u nemalobuněčného bronchogenního karcinomu. U malobuněčného karcinomu se více uplatňuje chemoterapie. Vstupní ozařovací pole bývá velké a do cílového objemu je zahrnut vlastní nádor a horní dutá žíla sahající od první chrupavky žeberní po třetí sternokostální skloubení. Bezpečnostní lem se musí rozšířit o dechové exkurze, které jsou při dušnosti a zapojení auxiliárního dýchacího svalstva prohloubeny. Nejlepšího paliativního účinku se dosáhne při zahájení léčby vyššími dávkami 3,5-4 Gy v prvních 3 až 4 dnech. Velmi podstatné je včasné zahájení radioterapie. Vzhledem k tomu, že se jedná o akutní stav, radioterapie by měla být započata do 24 hodin od její indikace, což je zapracováno i do standardu paliativní radioterapie v České republice. V roce 2006 byla v časopise Radiotherapy and Oncology publikována studie holandských autorů z Maastrichtu, zabývající se polohou nemocného při ozařování syndromu horní duté žíly. Nemocní pro svou dušnost velmi často nemohou zaujmou polohu vleže a je nutno je ozařovat vpolosedě až vsedě. Výše uvedené pracoviště vyrobilo pro tuto polohu speciální křeslo. Při plánování radioterapie u 10 nemocných autoři zjistili, že v poloze vsedě je signifikantně větší objem celé plíce než při poloze vleže (3914 ± 292 cm^3 oproti 3162 cm^3, $p = 0.028$), avšak nebyly zjištěny rozdíly ve velikosti objemu ozářeného mezi těmito dvěma polohami. Z tohoto vyplývá, že v poloze vsedě dojde ke zmenšení procenta ozářeného objemu zdravé plicní tkáně ve srovnání s polohou supinační vleže (11 ± 1% oproti 15.5 ± 2.0%, $p = 0.013$).

Cílem podaného přehledu je připomenout význam paliativní radioterapie u bronchogenního karcinomu. Zvýšením počtu nemocných indikovaných k této léčebné modalitě bychom se měli přiblížit k procentu ozařovaných nemocných s plicním nádorovým nálezem v jiných evropských zemích, ale zejména bychom tím přinesli úlevu od nepříjemných symptomů našim pacientům. Tato metoda neklade mimořádné nároky na sofistikovanou moderní ozařovací techniku, ale třeba na ni myslet a ve vhodných případech ji indikovat.

169 Cesty ke zlepšení výsledků radioterapie u nemalobuněčného karcinomu plic.

Feltl D.
Radioterapeutická klinika FN Ostrava

Úvod

Inoperabilní nemetastatický nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC) zůstává i v dnešní době terapeutickým problémem, léčebné výsledky jsou velmi neuspokojivé a mortalita značná. Nosnou léčbou nadále zůstává radioterapie; za zlatý standard léčby je v současnosti považována kombinace chemoterapie a radioterapie, přičemž konkomitantní podání se preferuje před podáním sekvenčním. Argumentem je lepší lokální kontrola i celkové přežití (pro přehled viz např. (1)). Je ovšem nutné se především zamyslet nejen nad časováním obou léčebných modalit, ale především nad kvalitou jejich provedení. Klíčovou je přitom kvalita radioterapie, neboť obsahuje vysoké množství proměnných – jednotlivá dávka, celková dávka, cílový objem, přesnost lokalizace a nastavení. Radioterapie karcinomu plic patří mezi nejobtížnější segmenty radiační onkologie, proto je třeba si položit otázku, do jaké míry ovlivňuje preciznost provedení radioterapie léčebné výsledky.

Následující řádky by měly pomoci tuto nelehkou otázku zodpovědět.

Jaký je skutečný přínos konkomitantní radiochemoterapie?

Koncem roku 2004 byl publikována rozsáhlá analýza Cochrane Database, která hodnotila randomizované studie srovnávající konkomitantní a sekvenční radiochemoterapii, případně konkomitantní radiochemoterapii se samostatnou radioterapií u NSCLC stádia I-III. Analyzováno bylo celkem 14 prospektivních randomizovaných studií s celkovým počtem 2393 pacientů. Výsledkem této vysoce reprezentativní metaanalýzy je, že konkomitantní radiochemoterapie ve srovnání se sekvenčním podáním dosahuje vysoce signifikantních 14% redukce rizika úmrtí na NSCLC (95% interval spolehlivosti 0,78 – 0,95; P = 0,003), zatímco ve srovnání se samostatnou radioterapií byla redukce rizika pouze sedmiprocentní (95% interval spolehlivosti 0,88 – 0,98; P = 0,01). Tento zjevný rozpor se nepodařilo uspokojivě vysvětlit. Signifikantně vyšší je ovšem i toxicita konkomitantní radiochemoterapie ve smyslu ezofagitidy, anémie a neutropenie. Autoři uzavírají, že (citujeme) „doporučujeme zdrženlivost při implementaci konkomitantní radiochemoterapie jako nového standardu léčby, protože reálný přínos oproti sekvenční léčbě je nejistý. Rovněž zatím není znám optimální režim chemoterapie (2).“

Je dávka radioterapie dostatečná?

V dobách minulých, kdy v léčbě inoperabilního NSCLC dominovala samotná radioterapie, vládl ohledně léčebných výsledků terapeutický nihilismus, z větší části oprávněný vzhledem k omezeným technickým možnostem radioterapie a špatným léčebným výsledkům. Terapeutická dávka záření se pohybovala kolem 60 Gy s jasně paliativním záměrem. S rozmachem chemoterapie v pneumoonkologii se sice terapeutický přístup poněkud změnil, ale zcela nepatřičně byla předmětem výzkumu téměř výhradně chemoterapeutická schémata, jejich dávkování a timing. Na radioterapii se „zapomnělo“, přestože právě ona je nosnou léčebnou modalitou u kombinované léčby. Nadále se proto aplikovala a aplikuje dávka 60, maximálně 66 Gy. Není třeba nijak hlubokých

radiobiologických znalostí abychom pochopili, že tato dávka je na makroskopický epidermoidní karcinom či adenokarcinom měřící několik centimetrů a obsahující mnoho miliard klonogenních buněk absolutně nedostatečná. Léčebné výsledky u karcinomu cervixu nebo středně pokročilých nádorů hlavy a krku jsou tak dobré právě proto, že dávka ionizujícího záření je podstatně vyšší a to jak fyzikálně, tak biologicky – alternativními frakcionačními schématy (hlava, krk) či brachyterapií (cervix).

Je radioterapie prováděna správně?

Radioterapie karcinomu plic je jedním z nejobtížnějších segmentů radiační onkologie. Je totiž extrémně citlivá na správnou definici cílového objemu, ozařovací techniku, toleranci kritických struktur (míchy a plic) a dobré technické vybavení pracoviště. V úvahu je třeba vzít i pohyb tumoru během ozařování a tedy správnou volbu bezpečnostního lemu kolem cílového objemu. Zásadně nevhodný pro kurativní radioterapii plicních nádorů je kobaltový ozařovač pro velké nehomogenity dávky v cílovém objemu při současné vysoké zátěži kritických struktur. Méně známý je fakt, že nejsou vhodné ani fotonové energie nad 10 MV, protože u nich dochází až k desetiprocentnímu poddávkování na periferii cílového objemu vzhledem ke ztrátě elektronové rovnováhy v plicní tkání (3). Tato fakta zásadně ovlivňují léčebné výsledky a musí být brána v úvahu při hodnocení srovnávacích studií. Podíváme-li se na publikace, jejímiž výsledky se argumentuje ve prospěch konkomitantní radiochemoterapie, nemůžeme si nevšimnout, že detailní popis provedení radioterapie buď úplně chybí, nebo je zcela nedostatečný. Výsledky takových publikací se pak dají stručně interpretovat tak, že „špatná radioterapie se simultánní chemoterapií fungují lépe než sekvenční chemoterapie a špatná radioterapie“. To ovšem nelze považovat za důkaz nadřazenosti konkomitantní chemoterapie. Nelze vyloučit, že srovnání s perfektní radioterapií by dopadlo úplně jinak. Jako důkaz může posloužit výsledek prospektivní randomizované studie CHARTWEL-Bronchus (ARO 97-1), jejímž spoluřešitelem byl i autor tohoto textu. Výsledek studie porovnávající hyperfrakcionovanou akcelerovanou radioterapii s konvenční radioterapií 66 Gy byl negativní díky excelentním výsledkům v kontrolním rameni (nepublikováno, osobní komunikace), danými mimořádnými nároky na provedení radioterapie včetně vícestupňové kontroly provedení léčby.

Jsou všechny nemalobuněčné karcinomy stejné?

Léčebná strategie u adenokarcinomu a epidermoidního karcinomu jako nejčastějších typů NSCLC je v současné době identická. Přitom radiobiologicky se jedná o naprosto rozdílné nádory s velmi odlišným biologickým chováním. Epidermoidní karcinom je radiobiologicky „čitelnější“, známým jevem je akcelerovaná repopulace klonogenních buněk koncem třetího týdne frakcionované radioterapie a tudíž senzitivita k časovému faktoru v radioterapii; akcelerované režimy dosahují lepších výsledků než režimy protrahované. Naproti tomu adenokarcinom je radiobiologicky nevyzpytatelný, časový faktor hraje relativně malou roli a klinické průběhy bývají podstatně méně předvídatelné než u epidermoidního karcinomu. Teoretické předpoklady tedy hovoří pro individualizaci léčby podle histologie, ale relevantních klinických dat je zatím minimum. Jedinou výjimkou je proslulá britská studie CHART (4), která podobně jako výše zmíněná studie CHARTWEL porovnávala hyperfrakcionovanou akcelerovanou radioterapii s konvenční radioterapií. Tato studie prokázala signifikantní redukci rizika úmrtí na karcinom plic o 22% a zlepšení dvouletého přežití o 13% v experimentálním rameni. Detailní analýza ovšem ukázala, že benefit je omezen na epidermoidní karcinom, zatímco pacienti s adenokarcinomem z akcelerované radioterapie neprofitovali. Jedná se tak o první klinický důkaz radiobiologické odlišnosti obou hlavních typů NSCLC. Tyto výsledky si rozhodně zasluhují podrobnější zkoumání v dalších klinických studiích.

Jaké jsou dosavadní zkušenosti s eskalací **dávky u NSCLC?**

Koncept navýšení dávky záření u NSCLC byl opakovaně testován. Výsledky z časnějších fází klinického zkoušení jsou velmi slibné (5-8) a nepochybně by měly vstoupit do prospektivního testování proti konkomitantní radiochemoterapií. Problémem je malá komerční atraktivnost radioterapeutických studií a s tím spojený neuspokojivý nábor pacientů. Důkazem je studie fáze III americké skupiny ECOG srovnávající standardní a akcelerovanou radioterapii po neoadjuvantní chemoterapii u inoperabilního NSCLC stádia III. Studie se potýkala s nízkým náborem pacientů a byla uzavřena při 141 pacientech. Přesto jsou výsledky pozoruhodné: střední doba celkového přežití je 20 měsíců pro akcelerovanou radioterapii a 14 měsíců pro standardní léčbu. Dvouleté přežití je 44% pro akceleraci a 34% pro standard(9). Vzhledem k nízkému počtu pacientů však výsledky těsně nejsou statisticky signifikantní.

Závěr

Podrobíme-li současnou léčbu inoperabilního NSCLC kritickému zkoumání, jsme nuceni připustit, že zatím neexistuje zlatý standard léčby. Klinické studie trpí buď nedokonalostí provedení, nebo malým počtem pacientů. Je proto třeba koordinovat budoucí výzkumné aktivity napříč velkými světovými skupinami (ECOG, RTOG, EORTC apod.) k získání co největšího množství relevantních dat. Z pohledu radiačního onkologa je absolutní prioritou velmi přísná kontrola provádění radioterapie jako jediné možné cesty k odstranění námitek ke kvalitě klinického výzkumu v pneumoonkologii.

Literatura

1. Rigas JR, Lara PN. Current perspectives on treatment strategies for locally advanced, unresectable stage III non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2005 Dec;50 Suppl 2:S17-24.
2. Rowell NP, O'Rourke NP. Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. Cochrane Database Syst Rev 2004 Oct 18;(4):CD002140.
3. DesRosiers PM, Moskvin VP, DesRosiers CM, *et al*. Lung cancer radiation therapy: Monte Carlo investigation of „under dose" by high energy photons. Technol Cancer Res Treat. 2004 Jun;3(3):289-94.
4. Saunders MI, Dische S, Barrett A, *et al*. Continuous, hyperfractionated, accelerated radiotherapy (CHART) versus conventional radiotherapy in non-small cell lung cancer: mature data from the randomised multicentre trial. CHART Steering committee. Radiother Oncol. 1999 Aug;52(2):137-48.
5. Wu KL, Jiang GL, Liao Y, *et al.* Three-dimensional conformal radiation therapy for non-small-cell lung cancer: a phase I/II dose escalation clinical trial. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003 Dec 1;57(5):1336-44.
6. Belderbos JS, De Jaeger K, Heemsbergen WD *et al*. First results of a phase I/II dose escalation trial in non-small cell lung cancer using three-dimensional conformal radiotherapy. Radiother Oncol. 2003 Feb;66(2):119-26.
7. Maguire PD, Marks LB, Sibley GS *et al*. 73.6 Gy and beyond: hyperfractionated, accelerated radiotherapy for non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol. 2001 Feb 1;19(3):705-11.
8. Ishikura S. A pilot study of hyperfractionated accelerated radiotherapy following induction cisplatin and vinorelbine for stage III non-small cell lung cancer. Proc.Am.Soc.Clin.Oncol. 2002;21:a1283.
9. Belani CP, Wang W, Johnson DH, *et al*. Phase III Study of the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG 2597): Induction Chemotherapy Followed by Either Standard Thoracic Radiotherapy or Hyperfractionated Accelerated Radiotherapy for Patients With Unresectable Stage IIIA and B Non-Small-Cell Lung Cancer. J Clin Oncol. 2005 Jun 1;23(16):3760-7.

170 Porovnání dozimetrické a biologické predikce akutní toxicity při léčbě lokálně pokročilého NSCLC chemoradioterapií s eskalací dávky záření.

Stejskal J.[1], Dvořáková D.[1], Vaňásek J.[1], Ulrych V.[1], Kudelka K.[1], Kheck M.[2], Svoboda V.[3]
1) Oddělení radiační onkologie, Krajská nemocnice Pardubice
2) Patologicko-anatomické oddělení, Nemocnice Jihlava
3) Klinika onkologie a radioterapie, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Východiska a cíle Lokálně pokročilá stádia nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC) patří mezi onemocnění s velmi nepříznivou prognózou. V současnosti je možno za standardní léčebný přístup považovat kombinaci radioterapie a chemoterapie. 3D konformní radioterapie umožňuje eskalaci dávky záření nad konvenční schéma (60 Gy / 2 Gy). Různé způsoby chemoradioterapie a eskalace dávky záření jsou však limitovány vzestupem akutní toxicity léčby, především radiační pneumonitidy a akutní esofagitidy. Možnosti dozimetrické, fyzikální (modelové) a biologické predikce klinické toxicity umožňují výběr pacientů s nižším rizikem vývoje komplikací. Základem dozimetrické predikce jsou údaje z objemových histogramů (DVH). Pro radiační pneumonitidu je hodnotícím parametrem *MLD* (mean lung dose) – střední dávka v obou plicích po odečtení objemu GTV (Seppenwoolde et al. 2004) a parametr V_{20} – procento z objemu celé plicní tkáně, které obdrží dávku větší než 20 Gy (Rosenzweig et al. 2004). Pro predikci incidence akutní esofagitidy jsou posuzovány následující prediktory: *délka jícnu, povrch jícnu, procento objemu jícnu, konkomitantní chemoterapie* (Hirota et al. 2001, Singh et al. 2003, Bradley et al. 2004). Při aplikaci maximální tumorozní dávky a minimalizaci komplikací zdravých tkání je nutné přihlédnout k fyzikálním modelů *NTCP* (Normal Tissue Complication Probability), (Seppenwoolde et al. 2003). Sledování plasmatických hladin transformujícího růstového faktoru beta 1 ($TGF–\beta_1$) jako endogenního biologického prediktoru vykazuje vysokou senzitivitu ve vztahu k pravděpodobnosti výskytu postradiační toxicity plicní tkáně a umožňuje výběr pacientů podle rizika poškození (Anscher et al. 1998, Anscher et al. 2001). Predikovanou akutní, ale i pozdní toxicitu léčby může redukovat radioprotektivní látka amifostin. Cílem naší práce bylo porovnání dvou skupin pacientů souboru, kteří byli léčeni neoadjuvantní chemoterapií a konkomitantní chemoradioterapií s ozářením residua choroby vyšší dávkou než konvenční. Ve skupině A byla cíleně prováděna radioprotekce amifostinem, skupina B byla bez podání radioprotektivní látky. Zkoumány byly možnosti dozimetrické predikce s fyzikálními modely a vývoj plasmatických hladin $TGF–\beta_1$ a jejich korelace s histopatologickou expresí radiační pneumonitidy.

Materiál a metody

V období 1999 – 2005 jsme léčili pacienty s lokálně pokročilým NSCLC stádia IIIA a IIIB. Pacienti byli náhodně rozděleni do dvou skupin: skupina A a skupina B. Obě skupiny podstoupily identickou léčbu neoadjuvantní chemoterapií: paclitaxel 175 mg/m^2 i.v. 3 hod. inf. den 1 a cisplatina 75 mg/m^2 i.v. inf. den 1. Konkomitantní chemoradioterapie byla aplikována: paclitaxel 175 mg/m^2 i.v. 3 hod. inf. den 1 a cisplatina 75 mg/m^2 i.v. inf. den 2). Všichni pacienti byli léčeni 3D konformní radioterapií a ozářeni dávkou v rozmezí 64 – 69,8 Gy. ICRU referenční bod pro PTV objemy byl zadán ve středu obrysu PTV v řezu, který

odpovídal středu kraniokaudálního rozsahu zadání všech PTV objemů (ICRU 1993, ICRU 1999). Počet ozařovaných polí byl volen v rozmezí 5 – 8 v každém ozařovacím plánu. Pro jednotlivá ozařovaná pole byla použita energie 6 MV a 18 MV. Výpočet dávky záření a objemové histogramy pro potřeby analýzy byly prováděny na vzájemně kompatibilních plánovacích systémech (CadPlan a Eclipse, Varian, Palo Alto, California, USA) a k analýze NTCP použit program BioGray (Slovensko). Pacientům skupiny A byla navíc během radioterapie cíleně prováděna radioprotekce amifostinem (Ethyol 500mg) i.v. denně 15 minut před ozářením (Ethyol, Shering-Plough Central East AG, Lucern, Švýcarsko). Hodnocení klinických projevů radiační pneumonitidy a akutní esofagitidy bylo prováděno podle systému Common Toxicity Criteria, verze 2.0. Histopatologické vyšetření bylo provedeno po patologickoanatomické pitvě pacientů. Vzorky plicní tkáně byly odebrány u každého pacienta ze dvou odlišných míst. Vzorky A_{max} a B_{max} byly získány z oblasti uvnitř rekonstruovaného objemu PTV2. Referenční vzorky A_{ref} a B_{ref} intaktní plicní tkáně byly odebrány z místa nejvíce vzdáleného od rekonstruované hranice objemu PTV1. Základní barvení bylo provedeno na hematoxylin-eosin. Histopatologické hodnocení preparátů a měření šířek alveolokapilárních sept bylo provedeno na světelném mikroskopu (Leica DM LB2) s analyzátorem obrazu (IM 500) a digitální snímací kamerou (Leica DFC 320), (Leica micro-systems GmbH, Bad Dürkheim, Deutschland). Pro statistické zpracování naměřených hodnot šířek alveolokapilárních sept jsme použili Studentův T test a pro hladinu statistické významnosti zvolena úroveň $p < 0,05$. Krev na detekci plasmatických hladin TGF–β_1 byla odebírána před chemoterapií, před radioterapií, 4. týden při radioterapii, na konci radioterapie. Detekce TGF–β_1 byla stanovena metodou ELISA analyzátorem MULTISCAN-EX (Labsystems, Helsinki, Finland) pomocí monoklonální protilátky specifické pro TGF–β_1 – Immunoassay Kit KAC 1688, Multispecies TGF–β_1 (BioSource International, Inc., Camarillo, California, USA). Analýza celkového přežití pacientů souboru byla provedena metodou Kaplan-Meierové (Kaplan a Meier 1958). Rozdíl v přežití mezi oběma skupinami byl zjišťován Log-rank testem (univariátní analýza), statistický program NCSS 2004 (NCSS 2004, Kaysville, Utah, USA).

Výsledky

V období 1999 – 2005 jsme léčili a následně hodnotili 18 pacientů. Ve skupině A bylo léčeno 9 pacientů a těmto pacientům byl před ozářením aplikován amifostin. Ve skupině B (bez aplikace radioprotektivní látky) bylo léčeno rovněž 9 pacientů. Věkové rozmezí pacientů celého souboru bylo 45 – 68 let, medián činil 58 let. Všichni pacienti měli před ozářením aplikovány 4 cykly neoadjuvantní chemoterapie. Střední dodaná dávka zevního ozáření činila 66,2 Gy a byla aplikována v rozmezí 64 – 69,8 Gy. Střední dávka v obou plicích (MLD) činila u pacientů souboru A 29 Gy s rozmezím 23 – 33 Gy, respektive 24 Gy s rozmezím 19 – 31 Gy u souboru B. Procento plicní tkáně, které obdrželo dávku záření ≥ 20 Gy vyjádřené parametrem V_{20}, bylo zjištěno u pacientů souboru A ve výši 39% s rozmezím 19-41%, respektive 28% s rozmezím 17-34% u souboru B.

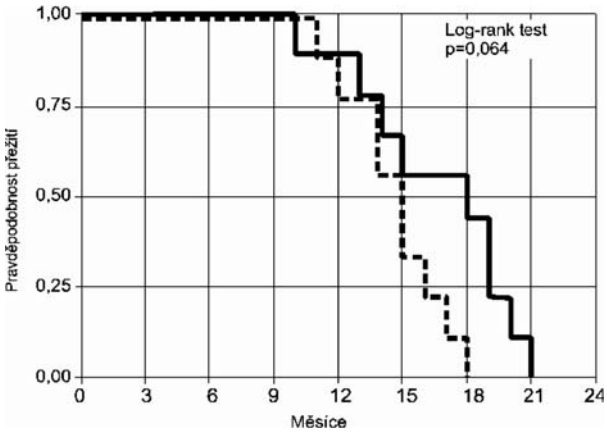
Výskyt **radiační pneumonitidy** (RP) sledovaného souboru byl klasifikován podle CTC. RP stupně 1/2 byla hodnocena u 6 pacientů s amifostinem (skupina A) a u 3 pacientů bez radioprotekce (skupina B). Stupeň toxicity 3/4 byl zaznamenán u 3 pacientů skupiny A a u 6 pacientů skupiny B. Ve skupině pacientů bez radioprotekce (B) jsme zaznamenali větší podíl pacientů s vyšším stupněm toxicity oproti skupině pacientů chráněných amifostinem. Naopak ve skupině A byl pozorován větší podíl pacientů s nižším stupněm toxicity.

Výskyt **akutní esofagitidy** (AE) sledovaného souboru byl rovněž klasifikován podle CTC. AE stupně 1/2 byla hodnocena u 7 pacientů s amifostinem (skupina A) a u 3 pacientů bez radioprotekce (skupina B). Stupeň toxicity 3/4 byl zaznamenán u 2 pacientů skupiny A a u 6 pacientů skupiny B. Ve skupině pacientů bez radioprotekce jsme v 1 případě v průběhu léčby zaznamenali toxicitu stupně 4 a u 5 pacientů toxicitu stupně 3. Projevy akutní klinické toxicity stupně 3/4 u pacientů ve skupině B a stupně 3 ve skupině A měly přechodné trvání a nebyly důvodem k ukončení léčby podle protokolu.

Při detekci **plasmatických hladin TGF–β_1** jsme 4. týden při radioterapii ve skupině pacientů A zaznamenali medián plasmatických hladin TGF–β_1 16,1 ng/ml (6,9 – 36,8 ng/ml) a ve skupině pacientů B jsme zaznamenali medián TGF–β_1 24,8 ng/ml (6,3 – 44,3 ng/ml). Rozdíl mezi těmito mediány plasmatických hladin TGF–β_1 nedosáhl hladiny statistické významnosti. Retrospektivně jsme hodnotili stupně vyjádřené RP v obou skupinách pacientů ve vztahu k hladinám TGF–β_1 detekovaným 4. týden při konkomitantní chemoradioterapii. Pacienti s amifostinem (skupina A) se symptomy RP stupně 1/2, respektive 3/4 měli nižší hladiny TGF–β_1 s mediánem 11,9 ng/ml, respektive 19,8 ng/ml. Pacienti bez amifostinu (skupina B) s RP stupně 1/2, respektive 3/4 měli vyšší detekované hladiny TGF–β_1 s mediánem 18,7 ng/ml, respektive 27,9 ng/ml. Elevace plasmatických hladin TGF–β_1 u pacientů skupiny bez amifostinu souvisela s vyšším výskytem klinické toxicity, především radiační pneumonitidy, ale i akutní esofagitidy.

U odebraných vzorků plicní tkáně od obou skupin pacientů (A_{max}, B_{max} a A_{ref}, B_{ref}) byl proveden popis **histopatologických nálezů** a změřeny šířky alveolokapilárních sept. Pacienti s radioprotekcí amifostinem (skupina A) měli zjištěné rozměry alveolokapilárních sept (A_{max}) v rozmezí od 2,1 μm do 11,2 μm (medián 8,8 μm). U pacientů bez podání radioprotektivní látky (skupina B) byly naměřené šířky alveolokapilárních sept (B_{max}) v rozmezí od 10,2 μm do 71,4 μm (medián 49,8 μm). Při porovnání šířek alveolokapilárních sept byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami (A_{max} a B_{max}) na hladině statistické významnosti (T test, $p = 0,0001$).

Medián **celkového přežití** pacientů s lokálně pokročilými NSCLC stádia IIIA a IIIB činil ve skupině A 18 měsíců v rozmezí 10-21 měsíců a ve skupině B 15 měsíců v rozmezí 11 – 18 měsíců. Přežití pacientů skupiny A a skupiny B se nelišilo (Log-rank test, p = 0,064) – viz graf (Graf 1). Pravděpodobnost jednoletého přežití pacientů u skupiny A byla 89%, respektive 78% u skupiny B.



Graf 1 *Pravděpodobnost přežití pacientů: skupina A (plná křivka), skupina B (přerušovaně)*

Závěry

Hlavním cílem naší práce bylo srovnat, zda aplikace radioprotektivní látky amifostin povede ke snížení projevů predikované klinické toxicity při léčbě lokálně pokročilého NSCLC neoadjuvantní chemoterapií s následnou konkomitantní chemoradioterapií provedenou konformní 3D technikou s eskalací dávky záření. Zkoumány byly možnosti dozimetrické predikce s fyzikálními modely a vývoj plasmatických hladin TGF–β_1 a jejich korelace s histopatologickou expresí radiační pneumonitidy.

U všech pacientů jsme zaznamenali různý stupeň rozvoje akutní toxicity léčby. Amifostin vedl ke snížení incidence radiační pneumonitidy vyššího stupně, když ve skupině s amifostinem bylo postiženo o polovinu méně pacientů než ve skupině bez radioprotekce. Při porovnání klinických projevů radiační pneumonitidy s histopatologickými nálezy byly ve skupině pacientů s amifostinem zjištěny minimální patologické změny plicní tkáně a normální šířky alveolokapilárních sept. Histopatologické změny dokladují protektivní efekt amifostinu. U pacientů bez radioprotekce bylo patrno výrazné rozšíření alveolokapilárních prostorů a zjištěny výrazné fibroproduktivní změny. Rozdíly v šířkách alveolokapilárních sept mezi oběma skupinami byly statisticky významné. U pacientů s amifostinem jsme dosáhli snížení projevů akutní esofagitidy vyššího stupně. Pacienti léčbu lépe tolerovali a zlepšila se jejich kvalita života.

Potvrdili jsme prediktivní význam plasmatické hladiny TGF–β_1 v rozvoji radiační pneumonitidy. Elevace hladin TGF–β_1 4. týden při chemoradioterapii u pacientů skupiny bez radioprotekce souvisela s výskytem radiační pneumonitidy vyššího stupně. Vedle TGF β_1 jako endogenního faktoru predikce postradiační toxicity plicní tkáně je nutno přihlédnout také k faktorům dozimetrické predikce. Všeobecně uznávaný parametr MLD používaný pro dozimetrickou predikci jsme jako prediktivní faktor pro radiační pneumonitidu nepotvrdili. Parametr V_{20} byl uznán jako prediktivní faktor ve vztahu k radiační pneumonitidě ve skupině pacientů bez radioprotekce. Ověření dozimetrických parametrů s fyzikálními modely (NTCP) korelovalo s incidencí radiační pneumonitidy vyššího stupně.

Celkové přežití pacientů v obou souborech bylo srovnatelné. Medián ve skupině s amifostinem činil 18 měsíců a ve skupině bez radioprotekce 15 měsíců a pravděpodobnost jednoletého přežití u pacientů s amifostinem byla 89%, respektive 78% u pacientů bez radioprotekce.

Výsledky naší práce potvrzují, že v případě kurativního léčebného záměru s eskalací dávky záření je nutno přihlédnout k možnostem predikce léčebné toxicity a individuálně posoudit využití radioprotektivní látky amifostin.

171 Reiradiace lokoregionálních recidiv bronchogenního karcinomu.

Cwiertka K.[1], Kolek V.[2], Zatloukal J.[2], Čecháček M.[2], Václavík A.[2], Přidal I.[3]
1) Onkologická klinika LF UP Olomouc a FN Olomouc
2) Klinika tuberkulózy a respiračních nemocí LF UP Olomouc a FN Olomouc
3) Oddělení lékařské fyziky a radiační ochrany FN Olomouc

Úvod

K lokoregionálním recidivám po předchozí radioterapii dochází u 50-65% nemocných. U 25-30% nemocných jsou tyto recidivy jediným projevem nemoci a jsou spojeny se závažnou symptomatologií, která zhoršuje kvalitu života nemocných [Perez 1987]. Je relativně málo publikací zabývajících se proveditelností a vedlejšími nežádoucími účinky reiradiace.

Soubor pacientů

Endobronchiální brachyterapii jsme indikovali u 33 nemocných, kteří měli recidivu po iniciální léčbě, jejíž součástí byla zevní radioterapie a 15 pacientů bylo léčeno pro intrabronchiální recidivu po předchozí HDR brachyterapii. Brachyterapii jsme prováděli pomocí afterloadingového přístroje Micro Selectron se zdrojem záření ^{192}Ir. Median doby do intrabronchiální progrese po předchozím ozáření byl 10,7 týdne. Hodnocení výsledků a komplikací jsou uváděny pro každou skupinu zvlášť a to s ohledem na odlišnou prognózu a riziko komplikací.

Výsledky

Ve skupině 33 nemocných léčených iniciálně zevní radioterapií si před zahájením léčby maligní stenózy si stěžovalo 26 nemocných na dušnost. Čtyři nemocní se nedostavili k plánované kontrole. Symptomatický efekt mohl být hodnocen u 22 pacientů. K vymizení potíží došlo u 3 (13,6%) a k významnému zmírnění intenzity u 15 (68,2%) nemocných. U 4 (18,2%) pacientů nedošlo ke změně intenzity potíží ve srovnání se stavem před léčbou. Dvacet devět pacientů si stěžovalo před zahájením léčby na intenzivní dráždivý kašel. Výsledky jsou přehledně znázorněny v tabulce 1.

Před léčbou		Symptomatický efekt				
	hodnoceno	Vymizení	Zlepšení	**RR**	Beze změn	zhoršení
Dušnost	22	3 (13,6%)	15 (68,2%)	**81,2%**	4 (18,2%)	0
Kašel	23	7 (30,4%)	13 (56,5%)	**86,9%**	3 (13,1%)	0
Hemoptýza	9	5 (55,6%)	3 (33,3%)	**88,9%**	1 (11,1%)	0
Záněty	4	4 (100%)	0	**100%**	0	0

Tabulka 1: Ovlivnění maligní stenózy bronchů u nemocných léčených pro recidivu po předchozí zevní radioterapii.

Median do intrabronchiální progrese byl 10,7 týdne (rozpětí 1 – 309+ týdnů). Median přežití byl 24 týdnů od zahájení brachyterapie pro maligní stenózu (rozpětí 1 – 309+ týdnů). 15 nemocných žilo déle než 6 měsíců, 7 déle než rok a 1 déle než 2 roky od zahájení brachyterapie. Celkové přežití od stanovení diagnózy bylo 34 – 336+ týdnů (median 90 týdnů).

Před léčbou		Symptomatický efekt				
	hodnoceno	Vymizení	zlepšení	**Celkem**	Beze změn	zhoršení
Dušnost	10	3	6	**9**	1	0
Kašel	11	4	3	**7**	4	0
Hemoptýza	5	4	0	**4**	1	0

Tabulka 2:
Ovlivnění symptomů maligní stenózy bronchů u nemocných léčených pro recidivu po předchozí HDR brachyterapii.

Komplikace v souvislosti s prováděnou léčbou se vyskytly u 5 nemocných -pneumonie (2), postradiační pneumonitida (1), edém a zúžení (1), dráždivý kašel (1). U 3 pacientů došlo k fatální terminální hemoptýze – 72 dní od zahájení brachyterapie (samostatná brachyterapie 2x8 Gy pro recidivu v pravém spojném bronchu, zahájena 126 dní od ukončení zevního ozáření do dávky 46 Gy v rámci 1. linie léčby), 163 dní (rekanalizace laserem, chemoterapie cisplatina + etoposid s následným zevním ozářením do dávky 58 Gy, léčba ukončena 92 dní před aplikací 1 frakce brachyterapie 8 Gy, brachyterapii předcházelo ošetření laserem) a 465 dní od zahájení terapie maligní stenózy (685 dní od ukončení primární radioterapie – kombinace zevního ozáření do 46 Gy

a LDR brachyterapie ^{226}Ra – 15 Gy, při ošetření recidivy byla provedena samostatná brachyterapie – 1 frakce, dávka 10 Gy v 1 cm od osy zářiče).

Z patnácti nemocných, u kterých jsme opakovaně prováděli aplikaci brachyterapie mělo známky dušnosti 10 nemocných, 11 pacientů obtěžoval dráždivý kašel a 5 pacientů mělo opakované hemoptýzy. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky.

Median přežití byl 25,6 týdnů od zahájení brachyterapie pro recidivy maligní stenózy (rozpětí 2,6 – 266,5 týdnů). 7 nemocných žilo déle než 6 měsíců a 2 déle než rok od provedení brachyterapie pro recidivu. Celkové přežití od stanovení diagnózy bylo 38,5 – 296,7 týdne (median 73 týdnů).

Komplikace v souvislosti s prováděnou léčbou se vyskytly u 5 nemocných -přechodná hemoptýza (3x), polykací obtíže (1x) a dráždivý kašel (1x). U 2 pacientů došlo k terminální hemoptýze (114 dní a 232 dní od brachyterapie pro recidivu).

Diskuse

Brachyterapie má své významné místo v léčbě recidiv bronchogenního karcinomu s intrabronchiální složkou, zvláště tehdy, když součástí léčby 1. linie bylo i zevní ozáření. V těchto případech z důvodu tolerance zdravých tkání již většinou nelze aplikovat dostatečnou dávku z teleterapie. V našem souboru jsme léčili 48 nemocných pro intrabronchiální recidivu – median přežití nemocných byl 24 týdnů. Dobrého, i když většinou krátkodobého symptomatického efektu jsme dosáhli i u nemocných s recidivou po předchozí brachyterapii.

Bedwinek et al., v souboru 38 pacientů s recidivami po předchozím zevním ozáření do dávky 50 Gy a více, aplikoval 3 frakce po 6 Gy v 1 cm. Symptomatické úlevy dosáhl u 29 nemocných (76%). Rozdíly v odpovědi byly mezi pacienty s tumorem <5 cm (zlepšení u všech 15) a >5 cm (zlepšení u 2 z 8). Doba do progrese endobronchiální nemoci byla 7,5 měsíce. Bronchoskopický nález po 3 měsících od brachyterapie byl u 41% zcela negativní a u 41% výrazně zlepšený. Terminální hemoptýza jako příčina smrti se vyskytla mezi 2 a 56 týdny (median 10 týdnů) u 12 pacientů (32%) [Bedwinek 1992].

Gauwitz et al. léčili 24 pacientů s recidivami po zevním ozáření. Aplikoval 2 frakce po 15 Gy v 6 mm (odpovídá přibližně 9 Gy v 1 cm). U 88% nemocných dosáhli významné symptomatické úlevy a u 83% významné reventilaci atelektatické plíce. Paliativní efekt trval 7-40 týdnů (median) 26 týdnů. 1 pacient zemřel na terminální hemoptýzu 3 měsíce po léčbě. Mimo studii provedli brachyterapii i u 5 nemocných, kteří v důsledku nemoci trávili více než polovinu dne v klidu (performance status 2) – všichni zemřeli do jednoho měsíce. Autoři vyslovují pochybnost o vhodnosti indikace brachyterapie u nemocných v horším celkovém stavu [Gauwitz 1992].

Seagren et al. u 20 pacientů s recidivujícím bronchogenním karcinomem aplikovali jednu 10 Gy v 1 cm (^{60}Co), u 4 nemocných předcházela brachyterapii rekanalizace laserem. Symptomatické úlevy bylo dosaženo u 90% nemocných. Popisují 12 recidiv symptomů se střední dobou do progrese 4,3 měsíce (rozpětí 1-9 měsíců). Bronchoskopicky bylo dosaženo 30% endoskopických kompletních remisí a 55% parciálních remisí. Terminální hemoptýza byla příčinou smrti u 5 nemocných (25%). Median přežití byl 9 měsíců [Seagren 1985].

Opakovaná radioterapie pomocí brachyterapie, laserová resekce a fotodynamická terapie jsou použitelné zvláště v případech intrabronchiálního růstu nádoru. Bohužel v případě šíření mimo tracheu či bronchy použití těchto přístupů je velmi omezené [Morris 2002, Metz 2001]. Ošetření laserem vede k rychlému ústupu potíží, výhodná je kombinace laserové resekce s brachyterapií, která nabízí dvoj- až trojnásobné prodloužení paliativního efektu ve srovnání se samotnou laserovou resekcí [Schray 1988]. Paliativní efekt je dosahován u 67% nemocných po brachyterapii [Speiser 1990].

Opětovné zevní ozáření je další možností, nicméně obecně je přijímán názor, že je zde velké riziko překročení toleranční dávky zvláště pro plicní parenchym a míchu. Hlavními indikacemi pro opětovné ozáření jsou syndrom horní duté žíly, dušnost, opakované hemoptýzy, kašel a bolest. Ke zmírnění symptomů dochází ve 48-75% případů. Nejlepší symptomatický efekt je dosahován v případě syndromu horní duté žíly a hemoptýzy, horší výsledky (cca ve 45%) jsou dosahovány v případě zmírnění dušnosti či kašle. Hypofrakcionované režimy např. 2x8 Gy nabízí výsledky srovnatelné s ozařováním do vyšší dávky. Median přežití nemocných po opětovné radioterapii pro recidivu se pohybuje mezi 3-5.6 měsíci [Green 1982, Jackson 1987, Montebello 1993, Gressen 2000, Okamoto 2002, Kramer 2004]. Srovnání jednotlivých frakcionačních schémat z pohledu paliativního efektu je téměř nemožné. Důvodem je značná subjektivita hodnocení a paliativně symptomatický efekt je ovlivňován i souběžnou medikamentózní terapii, o které se z publikovaných studií prakticky nedovídáme. Velmi důležitým faktorem je délka trvání paliativní odpovědi. Za optimální lze považovat zmírnění příznaků a zlepšení kvality života, které trvá až do smrti nemocného [Bleehen 1991]. Výsledek léčby je mimo jiné ovlivněn i dobou, která uplynula od iniciální terapie.

Závažnou komplikací zvláště u nemocných s hemoptýzou je masivní terminální hemoptoe. Ve většině studií je zdůrazňovaná skutečnost, že základní příčinou terminálního krvácení je lokální progrese nádoru a nikoliv poškození zářením. V případě kombinované laserové resekce a radioterapie je závažnou komplikací vznik bronchoesofageální píštěle. Za základní rizikový faktor je považovaná doba, která uplyne mezi opakovanou radioterapií a laserovou resekcí [Khanavkar 1991]. Klinicky významná postradiační pneumonitida se vyskytuje v různých studiích v rozpětí mezi 0-60%. Např. Okamoto (2002) popisuje výskyt pneumonitidy 2. – 3. stupně u 19 nemocných ze 34 ozářených. Ve studii nepozoruje žádný vztah mezi velikostí pole a výskytem pneumonitidy. Montebello (1993) uvádí jeden případ s klinicky významnou pneumonitidou u nemocného, který byl znovu ozářen dávkou 51 Gy v 17 frakcích. Gressen (2000) uvádí jednu fatální pneumonitidu v souboru 23 nemocných, kteří podstoupili opakovanou radiaci do dávky vyšší než 30 Gy kombinovanou navíc s konkomitantní a následnou chemoterapií. Podobně Kramer uvádí ojedinělý výskyt této komplikace po ozáření 2x8 Gy.

Závěr

Opětovné ozáření intrabronchiálních recidiv významným způsobem ovlivňuje kvalitu života nemocných s bronchogenním karcinomem. U většiny pacientů je dosaženo významné symptoamtické úlevy. Tuto léčbu lze provést s přijatelnými riziky komplikací.

Literatura

1. Bedwinek J., Petty A., Bruton C., et al.: The use of high dose rate endobronchial brachytherapy to palliate symptomatic endobronchial recurrence of previously irradiated bronchogenic carcinoma. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys 22 : 23-30, 1992.
2. Bleehen, N.M., Girling, D.J., Fayers, P.M., et al.: Inoperable nonsmall-cell lung cancer (NSCLC): A Medical Research Council randomised trial of palliative radiotherapy with two fractions or ten fractions. Br J Cancer 1991, 63, s. 265-270.
3. Gauwitz M., Ellerbroek N., Komaki R., et al. : High dose endobronchial irradiation in recurrent bronchogenic carcinoma. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 23:397-400, 1992.
4. Green, N., Melbye, R.W.: Lung cancer: Retreatment of local recurrence after definitive irradiation. Cancer 1982, 49, 865-868.
5. Gressen, E.L., Werner-Wasik, M., Cohn, J., et al.: Thoracic reirradiation for symptomatic relief after prior radiotherapeutic management for lung cancer. Am. J. Clin. Oncol. 2000, 23, s. 160-163.
6. Jackson, M.A., Ball, D.L.: Palliative retreatment of locally recurrent lung cancer after radical radiotherapy. Med. J. Aust. 1987, 147, s. 391-394.
7. Khanavkar, B., Stern, P., Alberti, W., et al.: Complications associated with brachytherapy alone or with laser in lung cancer. Chest 1991, 99, s. 1062-1065.
8. Kramer, G.W.P.M., Gans, S., Ullmann, E., van Meerbeeck, J.P., Legrand, C.C., Leer, J-W. H. : Hypofractionated external beam radiotherapy as retreatment for symptomatic non-small-cell lung carcinoma: an effective treatment? Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2004, 58, s. 1388-1393.
9. Metz, J.M., Friedberg, J.S.: Endobronchial photodynamic therapy for the treatment of lung cancer. Chest Surg. Clin. North. Am. 2001, 11, s. 829-839.
10. Montebello, J.F., Aron, B.S., Manatunga A.K., et al.: The reirradiation of recurrent bronchogenic carcinoma with external beam irradiation. Am. J. Clin. Oncol. 1993,16, s. 482-488.
11. Morris, C.D., Budd, J.M., Godette, K.D., et al.: Palliative management of malignant airway obstruction. Ann. Thorac. Surg. 2002, 74, s. 1928-1932.
12. Okamoto, Y., Murakami, M., Yoden, E., et al.: Reirradiation for locally recurrent lung cancer previously treated with radiation therapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2002, 52, s. 390-396.
13. Perez, C.A., Pajak, T.F., Rubin, P., et al.: Long-term observations of the patterns of failure in patients with unresectable nonoat cell carcinoma of the lung treated with definitive radiotherapy: Report by the Radiation Therapy Oncology Group. Cancer 1987, 59, s. 1874-1881.
14. Seagren S.L., Harrel J.H., Horn R.A.: High dose rate intraluminal irradiation in recurrent endobronchial carcinoma. Chest 88:810 – 814, 1985.
15. Schray M.F., Mc Dougall J.C., Martinez A., et al.: Management of malignant airway compromise with laser and low dose rate brachytherapy. The Mayo Clinic experience. Chest 93:264 – 269, 1988.
16. Speiser B., Spratling L.: Intermediate dose rate remote afterloading brachytherapy for intraluminal control of bronchogenic carcinoma. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.18: 1443-1448, 1990.

172 Prognostické faktory ovlivňující přežití při chemoradioterapii inoperabilního nemalobuněčného karcinomu plic.

Zemanová M., Petruželka L., Zatloukal P., Judas L., Marel M., Tomancová V.
1) Onkologická klinika VFN 1. LF UK, Praha
2) Klinika pneumologie a hrudní chirurgie 3. LF UK a FNB, Praha
3) Klinika tuberkulózy a respiračních onemocnění VFN 1. LF UK, Praha
4) Oddělení radiační ochrany VFN, Praha

Úvod

Bronchogenní karcinom je příčinou přibližně 6000 úmrtí v České Republice ročně. Nemalobuněčný karcinom tvoří většinu 80% všech plicních tumorů a přibližně 35% těchto pacientů má lokálně pokročilé, ale nikoli metastatické onemocnění v době diagnózy. Základní léčebnou modalitou v tomto stadiu je od 80tých let minulého století radioterapie (RT). Jak prokázala metaanalýza v BMJ z roku 1995 (1), přidání sekvenční chemoterapie (CHT) k radikální radioterapii prodlužuje přežití. Ovšem prognóza těchto pacientů zůstává špatná s 3-letým přežitím přibližně 14%. V současné době se zdá být účinnější konkomitantní chemoradioterapie (CHRT) než sekvenční postup (2,3,4), nebo než radioterapie samotná (5). Dosud však není definován optimální

léčebný režim a je nastolena celá řada otázek týkajících se kombinace a dávek použitých cytostatik, délky terapie, dávky a frakcionace radioterapie, o začlenění cílené biologické léčby do algoritmu ani nemluvě. Jednou z řešených otázek v užití konkomitantní CHRT je, zda je účinnější zařadit radioterapii na samý začátek léčby, nebo až po několika cyklech indukční chemoterapie. Jednoznačnou odpověď zatím klinický výzkum nepodává, i když některé prezentované studie (6) svědčí ve prospěch časného zahájení RT, podobně jako se osvědčilo v případě malobuněčného karcinomu. Obvyklejším postupem je podání 2 cyklů indukční chemoterapie a následné konkomitantní CHRT (7).

Cílem této retrospektivní studie u souboru nemocných s pokročilým NSCLC léčených konkomitantní chemoradioterapií na našem pracovišti od roku 1996 je analýza celkového přežití ve vztahu ke klinickým a léčebným proměnným (pohlaví, věk, PS, stadium, histologický typ, stupeň anemie, dávka záření, interval mezi zahájením CHT a RT, režim chemoterapie).

Materiál a metody

V období 4/1996 až 9/2005 bylo na Onkologické klinice VFN Praha indikováno k radioterapii s radikálním léčebným záměrem s konkomitantně podávanou chemoterapií pro inoperabilní NSCLC 101 nemocných (72 mužů, 29 žen) o průměrném věku 61 let. Střední doba sledování je 72 měsíců, s rozmezím 17 – 123 měsíců. Stadium IIIA a výjimečně IIB bylo zastoupeno v 25%, 76% představovalo stadium IIIB. Všechny případy byly morfologicky verifikovány se zastoupením epidermoidního karcinomu v 50%, non-skvamózního 26% (adenokarcinom 21%, velkobuněčný 3%, adenoskvamózní 2%) a ve 24% šlo o nediferencovaný NSCLC. Hodnocení výkonnostního stavu dle WHO stanovilo u 30% performance status (PS) 0, u 65% PS 1 a u 5% bylo zjištěno PS 2. Radioterapie byla předepsána v dávce 59,4-60Gy/ 30-33 frakcích v denní frakcionaci. Chemoterapie byla nejčastěji (69%) podávána ve složení cisplatina 80 mg/m^2 1. den cyklu + vinorelbin 25 mg/m^2 den 1,8,15 ve čtyřtýdenním cyklu, od roku 2002 také cisplatina 80 mg/m^2 1. den cyklu + vinorelbin 25 mg/m^2 den 1 + 8 v třítýdenním cyklu (22%), po dobu 4 cyklů. Během radioterapie byla dávka vinorelbinu redukována na 12,5 mg/m^2 ve 4 týdenním a na 15 mg/m^2 v třítýdenním cyklu. V 9% případů byl konkomitantně podávaným cytostatikem paclitaxel 60 mg/m^2 1xtýdně, ve 4% samostatně, v 5% předcházela nebo následovala chemoterapie s platinovým derivátem, v počtu 2-4 cyklů. Zahájení radioterapie bylo optimálně navrženo od počátku 2. cyklu CHT. Skutečný interval mezi prvním dnem podání chemoterapie a zahájením radioterapie byl v rozmezí 0 – 121 dní, s mediánem 32 dní. 50% nemocných mělo interval 26-38 dní. Individuálně byla po ukončení CHRT po celkovém zhodnocení rozsahu residuální choroby a stavu pacienta indikována operace. Celkové přežití bylo podrobeno univariační analýze podle těchto kriterií: pohlaví, věk nad versus pod mediánem, PS 0 versus 1 versus 2, stadium IIIB versus nižší, T-stadium T1-3 versus T4, N-stadium 0-2 versus 3, histologický typ – dlaždicový versus non-squamosní versus nediferencovaný, stupeň anemie dle WHO definovaný jako nadir v průběhu léčby, dávka záření nad 95% versus 90-95% versus pod 90% plánované dávky, interval mezi zahájením CHT a RT pod versus nad mediánem a režim chemoterapie 3týdenní cisplatina plus vinorelbin versus 4týdenní stejný režim versus paclitaxel weekly. Interval mezi CHT a RT byl analyzován také po rozdělení celého souboru na kvartily, t.j. čtyři přibližně stejně početné skupiny s intervalem 0-25 dní (první kvartil = percentil 0-25), 26-32 dní (druhý kvartil = percentil 26-50), 32-38 dní (třetí kvartil = percentil 51-75) a 39 – 121 dní (čtvrtý kvartil = percentil 76-100). Všechny tyto proměnné byly podrobeny Coxově regresní analýze. Statistická analýza dat byla provedena v programu Statistika verze 7.0 (StatSoft, Inc. 2004).

Výsledky

V celém souboru byl zjištěn medián přežití 17,1 měsíců a medián doby do progrese 13,5 měsíců. 3-leté přežití je 27%, 5-leté přežití odhadované je 18%, skutečné 5-leté přežití u 61 nemocných s mediánem sledování nad 60 měsíců je 23%. K 1.2.2007 zemřelo 80% nemocných, z toho 10% prokazatelně bez progrese. Ve třech případech došlo k úmrtí v průběhu terapie – 1x na embolizaci, 2x na komplikace terapie. Plánovaná terapie nebyla dokončena u dalších 6 pacientů – 2x pro tracheoesofageální píštěl, 2x pro časnou lokální progresi, 2x pro metastázy v mozku. Recidiva nastala u 77% nemocných, a to v 17% jen lokálně, v 13% došlo současně k lokální progresi i vzdálené diseminaci a v 29% případů byly prvním místem recidivy vzdálené metastázy. V 21% nebyla lokalizace recidivy zjištěna. CNS bylo prvním a s jednou výjimkou také jediným místem recidivy v 16% případů.

Po dokončení chemoradioterapie podstoupilo 14 pacientů (14%) thorakotomii. Ve 3 případech byla operace ukončena jako explorativní výkon. U 11 pacientů proběhla R0 resekce, z toho ve třech případech byl nalezen residuální tumor v rozsahu T1-T2, lymfatické uzliny byly vždy negativní, v 8 případech byla potvrzena patologicky kompletní remise

Při univariační analýze bylo zjištěno signifikantně delší celkové přežití pro N-stadium N0-N2 (p=0,03), pro delší interval mezi zahájením CHT a RT (p=0,03), a pro nemocné s radikální R0 resekcí (p=0,00006). Při rozdělení intervalu CHT-RT na kvartily měla univariační analýza trend k významnosti (0,069), při tom nápadný rozdíl byl mezi druhým a třetím kvartilem (těsně nad a pod mediánem). V multivariační analýze byl potvrzen vliv delšího intervalu mezi zahájením CHT a RT na přežití (p=0,003), i prognostický význam resekce (0,00009), navíc jako nezávislé faktory pro delší přežití byly stanoveny tyto parametry: ženské pohlaví (p=0,025), vyšší (resp. blížící se plánovaným 100%) dávka RT (p=0,02). Nesignifikantní trend byl shledán ve prospěch třítýdenního cyklu (p = 0,079) a ve prospěch pacientů vyššího věku (nad mediánem) (p = 0,08).

Závěry

Faktory spojené s horší prognózou přežití v jednorozměrné analýze jsou: N-stadium N3 a interval mezi zahájením CHT a RT kratší než medián 32 dní.

Ve vícerozměrné analýze nebyla potvrzena statistická významnost N-stadia, ale byl potvrzen pozitivní význam delšího intervalu mezi zahájením chemoterapie a radioterapie.

Interval CHT-RT hraje roli, ale vysvětlení pro tak velký rozdíl v délce přežití při malé změně intervalu mezi začátkem chemoterapie a radioterapie dosud nemáme. Vícerozměrná analýza předpokládá oproti univariační analýze další významné faktory pro délku přežití a to ženské pohlaví a maximální plánovanou dávku radioterapie.

Význam operace jako pozitivního prognostického faktoru pro přežití v našem souboru je nutno hodnotit obezřetně. Spíše než resekce samotná je zřejmě významný fakt, že operace byla indikována u pacientů ve velmi dobrém celkovém stavu, s žádným (8x patologická CR) nebo velmi malým residuem choroby.

Literatura

1. Anonymous. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: A metaanalysis using updated data on individual patients from 52 randomized trials. Non-Small Cell Lung cancer Collaborative Group. Br Med J 1995, 311:899-909
2. Curran WJ, Scott CB, Langer CJ, et al. Long-term benefit is observed in a phase III comparison of sequential vs concurrent chemoradiation for patients with unresected stage III NSCLC: RTOG 9410. J Clin Oncol (Meeting Abstracts) 2003,22:621 (abstr 2499)
3. Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M, et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 1999, 17: 2692-2699
4. Zatloukal P, Petruželka L, Zemanová M, et al. Concurrent versus sequential chemoradiotherapy with cisplatin and vinorelbine in locally advanced non-small cell lung cancer: a randomized study. Lung Cancer, 2004, 46, 1, s. 87-98
5. Auperin A, Le Pechoux C, Pignon JP, et al. Concomitant radio-chemotherapy based on platin compounds in patients with locally advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): A meta-analysis of individual data from 1764 pateints. Annals of Oncology, 2006, 17:473-483
6. Bonomi P, Curran W, Choy H, et al. Randomized 3-arm phase II study of paclitaxel, carboplatina, and thoracic radiation for patients with stage III non-small cell lung cancer (NSCLC). Report of Locally advanced Multimodality protocol (LAMP)-ACR 427. Lung Cancer, 2003, 41, supl.2, S77
7. Vokes E, Herndon JE, Crawford J, et al. Randomi zed Phase II Study of Cisplatin With Gemcitabine or Paclitaxel or Vinorelbine as Induction Chemotherapy Followed by Concomitant Chemoradiotherapy for Stage IIIB Non-Small-Cell Lung Cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9431 *J Clin Oncol 2002, 20:4191-4198.*

173 Mají nádorové markery prognostický význam u nemocných radikálně operovaných pro nemalobuněčný plicní karcinom? (Pilotní studie).

Šafránek J.[1], Holubec L.[3], Topolčan O.[3], Klečka J.[1], Špidlen V.[1], Vodička J.[1], Šimánek V.[1], Fínek J.[4], Časová M.[3], Pešek M.[2]
1) Chirurgická klinika FN a LF UK Plzeň
2) Klinika TRN FN a LF UK Plzeň
3) II. Interní klinika, FN Plzeň a Centrální izotová laboratoř, LF UK Plzeň.
4) Onkologické a radioterapeutické odd. FN Plzeň

Cíl

Cílem studie bylo zjistit prognostický význam nádorových markerů u nemocných operovaných s diagnózou nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) na chirurgické klinice FN Plzeň.

Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 34 nemocných s NSCLC ve věku 52-75 let. Klinické sledování probíhalo po dobu 18 měsíců od operace. Dle follow up jsme rozdělili pacienty do dvou skupin: 22 nemocných bez známek progrese a 12 nemocných s progresí nádoru. Hodnoceny byly následující nádorové markery: Tymidinkináza (TK), tkáňový polypeptidový specifický antigen (TPS), karcinoembrionální antigen (CEA), neuron specifická enoláza (NSE) a fragment cytokeratinu 19 (CYFRA 21-1. Vyšetření nádorových markerů bylo prováděno před operací, týden po operaci a 6 a 12 měsíců po operaci. Statistická analýza byla provedena využitím software CRAN release 2.4.0.

Výsledky

Před operací jsme prokázali signifikantně zvýšenou frekvenci hodnot nad cut off u thymidinkinázy, TPS a CYFRA 21-1 a současně i zvýšený medián ve skupině nemocných s progresí nádoru. Bezprostředně po operaci docházelo k signifikantnímu zvýše-

ní thymidinkinázy a TPS u obou skupin nemocných a signifikantnímu poklesu CYFRA 21-1. Vzestup TK a TPS, který jsme ověřili je nespecifický a souvisí s regeneračními pochody po provedeném chirurgickém zákroku a nikoliv se závažností maligního onemocnění. Důkazem toho mimo jiné je i neexistující rozdíl mezi pooperačními hladinami TK a TPS v obou skupinách. Statisticky významný rozdíl v sérových hladinách nádorových markerů mezi oběma skupinami byl prokázán rok po operaci u TK (p=0,0176), TPS (p=0,0378) a CYFRA 21-1 (p=0,0179). Významnou rozdílnost ve frekvenci překročení cut off vykazuje pouze CYFRA 21-1 a to v období půl roku (p=0,0105) a rok po operaci (p=0,0263). Při sledování vztahu nádorových markerů k histologickému typu nádoru jsme prokázali, že CYFRA 21-1 (p=0,0202) v období rok od operace predikuje riziko recidivy u epidermoidní formy NSCLC a CEA (p=0,0357) u adenokarcinomu plic.

Závěr

Na základě naší pilotní studie se jeví TK a TPS a CYFRA 21-1 jako prognostické markery u nemocných s NSCLC a zdají se být vhodnými parametry pro follow up. CEA a CYFRA 21-1 korelují s histologickým typem nádoru.

Tato práce byla podpořena grantem IGA NR 9343-3 a výzkumným záměrem VZ MSM 0021620819.

XIX.
Nádory hlavy a krku

174 Karcinom rtu.

Peřina V., Liberda O., Machálka M., Bulik O.
Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie FN Brno

Karcinomy rtů jsou v orofaciální oblasti relativně časté, dominujícím histologickým typem jsou spinocelulární karcinomy. V letech 2000 až 2005 bylo na Klinice ústní, čelistní a obličejové chirurgie FN Brno léčeno pro tuto diagnózu 32 pacientů z celkového počtu 215 pacientů s karcinomy orofaciální oblasti. Četnější byla jen lokalizace v oblasti jazyka a ústní spodiny se 106 výskyty. Vzhledem k lokalizaci tumoru na vizuálně exponovaném místě, nejčastěji na dolním rtu, je většina pacientů zachycena a léčena v prvním klinickém stádiu (T1N0M0), nebyla-li afekce odstraněna již jako prekanceróza. Lymfogenní rozsev je většinou pozdní, variabilně do submentálních, ipsilaterálních i kontralaterálních submandibulárních lymfatických uzlin.

Spinocelulární karcinom rtu se vyskytuje v endofytické nebo exofytické formě. Dle TMN klasifikace jsou tumory do průměru 2 cm klasifikovány jako T1, 2 – 4 cm jako T2, více jako 4 cm T3 a při prorůstání do okolních tkání jako T4. Rozvoji spinocelulárního karcinomu in situ a invazivních karcinomů většinou předchází výskyt různých forem hyperkeratózy, potencující účinek má zejména sluneční záření a kouření. Různé klinické nálezy budou ve sdělení dokumentovány fotografiemi.

Terapie karcinomů rtu je až na řídké výjimky chirurgická. Podle rozsahu tumoru se volí typ exscize od povrchového lip shavingu u prekanceróz, přes V a W exscize, exscize s rekonstrukcí lokálním posunem (Szymanowského plastika), až po komplexní výkony s rekonstrukcí lalokovými plastikami. Jednoduché V a W exscize lze s dobrým kosmetickým efektem provést u tumorů nezajímajících více než 1/3 délky rtu. U pokročilých klinických stádií je výkon nutno doplnit o resekci postižených přilehlých tkání (svaly, kůže, část čelisti) a při průkazu uzlinových metastáz o exenteraci příslušného prostoru. Operační postup bude ve sdělení dokumentován fotografiemi.

Karcinomy rtu nejsou příliš frekventním onemocněním, ale vzhledem ke snadné včasné diagnostice a možnosti kurativní chirurgické léčby je třeba jejich včasnému záchytu věnovat pozornost. Terapie prekanceróz i počátečních stadií invazivních karcinomů pacienta příliš nezatěžuje (výkon lze mnohdy provést i v lokální anestézii) a funkční i estetické změny jsou minimální. Prezentované sdělení je součástí vznikajícího interaktivního atlasu stomatologické chirurgie.

175 Záchovný protokol u karcinomů laryngu a hypofaryngu – výzva pro cílenou biologickou terapii.

Neuwirthová J.[1], Mechl Z.[2]
1) Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, FN u sv. Anny, Brno
2) Oddělení klinické a radiační onkologie, FN u sv. Anny, Brno

Karcinomy hrtanu patří svojí vysokou incidencí k nejvýznamnějším v oblasti ORL onkologie. V lokálně pokročilých stadiích je chirurgickým řešením totální laryngektomie, která snižuje kvalitu života ztrátou hlasu a trvalým nosičstvím kanyly. U mnoha nádorů, zasahujících hypofarynx, je jedinou chirurgickou možností rozsáhlá operace s mutilujícími následky. Z toho důvodu vznikla potřeba vývoje orgán zachovávajících metod, které však v současnosti nepřinášejí dostatečně uspokojivé výsledky a jejich nedostatky jsou výzvou k dalším studiím. Nabízející se slibnou možností zlepšení procenta lokoregionální kontroly je přidání biologické cílené léčby, která nezvyšuje toxicitu standardní onkologické terapie ani neovlivňuje pooperační hojení ran. Její výhodou je i možnost dlouhodobějšího podávání. Cílovou strukturou je receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR), jehož signální cesta vede v kancerogenezi k inhibici apoptózy nádorových buněk, aktivaci buněčného dělení, angiogenezi a metastazování, zaznamenána byla i rezistence na chemoterapii a radioterapii. Léčba, založená na blokádě EGFR, představuje perspektivní metodou, neboť při konkomitantním podání se standardní onkologickou terapií vykazuje supraaditivní efekt při nezvyšování jejích nežádoucích účinků. Spinocelulární karcinomy hlavy a krku (HNSCC) vykazují pozitivní expresi EGFR v 70 až 100% případů a zařazují se proto k nádorům s nejvyšší expresí. Některé preparáty již byly v indikaci HNSCC schváleny pro léčbu recidivujícího/metastazujícího onemocnění, nedávno byly v kombinaci s radioterapií zavedeny také do léčby první linie inoperabilních onemocnění (cetuximab) a slibné výsledky dále vybízejí ke studiím i pro orgán záchovný protokol. Požadavkem přidání inhibitorů EGFR ke standardní onkologické terapii je zlepšení kvality života a racionální podklad spočívá ve studiích, prokazujících účinnost u HNSCC. Pro vytvoření záchovného protokolu s cílenou léčbou nám byla podkladem především subanalýza randomizované studie Bonnera a spol., prokazující zvýšení procenta zachování hrtanu při přidání cetuximabu k radioterapii (3. rok 87% vs 77%) u pacientů s laryngeálními a hypofaryngeálními karcinomy klinických stadií III a IV. Konkomitantní přidání cílené léčby ke standardní onkologické léčbě je v indikaci lokálně pokročilých HNSCC relativně novou a slibnou možností, vlastní návrh integrace do záchovného protokolu spočívá v kombinaci radioterapie s cisplatinou a inhibitory EGFR. Součástí protokolu je i stanovení molekulárně-genetických markerů predikce účinnosti inhibitorů EGFR, které jsou nezbytné pro výběr vhodných pacientů. Výzkumy v tomto směru ukazují na klíčový význam mutace genu k-ras, kódující jeden z proteinů EGFR signální cesty. Při jeho mutaci dochází k aktivaci signální cesty nezávisle na inhibici receptoru. Mutace k-ras se v určitém procentu vyskytuje i u HNSCC a její detekce se jeví vhodná jako jeden z prediktorů negativní terapeutické odpovědi na inhibitory EGFR. Další markery jsou předmětem diskuzí. Ve smyslu predikce pozitivní odpovědi na léčbu byla prokázána souvislost s amplifikací EGFR genu. Přímá

úměra mezi terapeutickou účinností a stupněm exprese samotného receptoru prokázána nebyla. Integrace biologické léčby do terapie karcinomů hlavy a krku znamená nákladnou, avšak dle dostupných studií efektivní léčbu, která by v léčbě první linie HNSCC v rámci záchovného protokolu mohla v budoucnosti získat své nezastupitelné místo.

176 Intersticiální brachyterapie nádorů hlavy a krku.

Nováková R., Neumanová R., Knéslová A., Müllerová J., Farná J., Beňová V.
FN, Obilní trh, Brno

Nádory hlavy a krku tvoří heterogenní skupinu, kterou spojuje jejich topografická blízkost. Jedná se o komplexní léčbu, jejíž součástí je nejen chirurgie hlavy a krku, ale i plastická a rekonstrukční chirurgie, radiační a klinická onkologie, nutriční podpora, rehabilitace, patologie, radiodiagnostika a podpůrná terapie.

Radikální léčba nádorového onemocnění ORL oblasti je možná díky chirurgickému výkonu, radioterapii a chemoterapii. Chirurgický výkon bývá často mutilující, proto může být nahrazen kurativní radioterapií. Důležitou roli hraje lokalizace a rozsah nádoru, celkový stav pacienta, preference pacienta, zkušenost operatéra a dostupnost kvalitní radioterapeutické péče.

Moderní radioterapie využívá zevní konformní radioterapii, radioterapii s modulovanou intenzitou svazku (IMRT) a brachyterapii. Brachyterapie může být jako primární léčba použita buď samostatně nebo v kombinaci s teleradioterapií, ale převážně se jí využívá u recidivujících tumorů.

Výhodou brachyterapie je aplikace vysoké dávky záření do tumoru či jeho lůžka s prudkým poklesem dávky do okolí, dokonalá fixace plastikových trubiček v dané geometrii během ozáření, čímž se výrazným způsobem šetří okolní zdravé tkáně. Ozáření probíhá v krátkém ozařovacím čase, řádově v minutách. Výsledný kosmetický efekt je velmi dobrý.

Částečnou nevýhodou je, že v některých případech se jedná o invazivní metodu doprovázenou nutností hospitalizace.

Kontraindikací těchto aplikací jsou rozsáhlé tumory, tumory s vysokou tendencí k regionálnímu metastazování, tumory obtížně dostupné a s obtížně zhodnotitelnými okraji. Nádory invadující do kosti nebo ležící v těsné blízkosti kosti (méně jak 5 mm).

Zevní radioterapie s intersticiálním boostem pomocí plastikových trubiček lze použít u nádorů prvních dvou třetin jazyka, baze jazyka, měkkého patra, tonsil, rtu, spodiny dutiny ústní a bukální sliznice. Vzhledem k vysoké incidenci vzniku metastáz v krčních uzlinách může být brachyterapie použita jako boost k zevní radioterapii na oblast nádoru a na svodnou regionální oblast.

Ve své prezentaci se zaměřím na nádorové onemocnění předních dvou třetin jazyka. Důležitým faktorem je nejen lokální kontrola onemocnění, ale i kvalita života.

Samostatná brachyterapie intersticiálními plastikovými trubičkami je indikována při stádiu onemocnění I- II, v tomto případě je léčba možná i chirurgicky. Při stadiích onemocnění II- III se brachyterapie kombinuje se zevní teleradioterapií.

Před intersticiální aplikací je nezbytné pečlivé fyzikální vyšetření, popřípadě i vyšetření v celkové anestesii, endoskopie, CT, MR, UZ, rentgenové snímky k vyloučení destrukce skeletu a interní vyšetření, protože zákrok je prováděn v celkové anestezii.

Pacient je na počátku léčby seznámen s léčebným postupem, je poučen písemně i ústně o vedlejších účincích léčby a svým podpisem dá souhlas s výkony.

Při intersticiální aplikaci na oblast jazyka se jedná o zavedení krytů zářiče ve formě plastikových trubiček do dané oblasti, zavádějí se paralelně v několika řadách a v souladu s pravidly Pařížského dosimetrického systému.

Vzhledem k náročnosti výkonu je tato aplikace prováděna na operačních sálech ORL klinik za účasti radioterapeuta, lékaře ORL a anesteziologa. Lékař našije pomocí dutých kovových jehel plastikové trubičky. Správné zavedení a uložení je nezbytné pro správnou geometrii a následné naplánování dávky záření. Plastikové trubičky by měly přesahovat povrch jazyka o 4- 5 mm, aby se předešlo vzniku „ studených“ bodů. Fixace intersticiálních trubiček je provedena pomocí speciálních knoflíků zevně ke kůži. Cílový objem a kritické orgány se stanoví na základě palpačního vyšetření, CT nálezu, popřípadě magnetickou resonancí. Doporučuje se minimálně 5-10mm bezpečnostní lem.

Na našem pracovišti je pro aplikace high– dose– rate používán automatický afterloadingový přístroj Gammamed. Jedná se o přístroj s vysokým dávkovým příkonem, jehož náplní je izotop irridia 192 s poločasem rozpadu 74 dnů.

Před zahájením provozu na Gammamedu je nutné provést denní zkoušku provozní stálosti a zkontrolovat rentgenový přístroj.

Přibližně po 2- 3 dnech se rána zklidní, otok zmizí a pacient je převezen na naše oddělení, kde je připravena vlastní aplikace. Zdravotní sestra uloží pacienta na aplikační stůl a asepticky ošetří ránu. Radiologický asistent s fyzikem provede zakrácení plastikových trubiček na délku příslušných přenosových hadic. Do trubiček jsou následně zavedeny rentgenkontrastní markery. Radiologický asistent provede pomocí C– ramene rentgenové snímky v semiortogonální projekci. Jedná se o snímek předozadní a laterolaterární.

Lékař zadá na rentgenových snímcích referenční body, tj. ty kterými má procházet referenční izodoza (minimální ložisková dávka) a body na kritických orgánech (kůže a mandibula). Fyzik provede pomocí digitizeru a plánovací konsoly prostorovou rekonstrukci intersticiální aplikace. Následně provede výpočet ozařovacího času pro požadovanou dávku, rozložení dávky záření v okolí plastikových trubiček, stanoví dávky na referenčních bodech pro kritické orgány.

Při samostatné HDR aplikaci se využívá nižších dávek na frakci (2-3 Gy), zpravidla se využívá hyperfrakcionace, to znamená, že se ozáření provádí 2x denně s šestihodinovým intervalem mezi frakcemi, např. 18x 3 Gy 2x denně. Reiradiace s HDR BRT

8-10x 3-4 Gy 2x denně. Kombinovaná HDR se zevní radioterapií 2-6x 3 Gy 2x denně + 45-60 Gy (2 Gy na frakci) a nebo 4-6x 4 Gy + 50 Gy.

Před zahájením ozařování fyzik a radiologický asistent připojí pomocí přenosových hadic aplikátor ke Gammamedu, lékař zkontroluje a svým podpisem schválí ozařovací plán.

Pacient je seznámen s průběhem ozáření, po té jsou uzavřeny dveře ozařovny a spuštěn Gammamed. Kontakt s pacientem je po dobu ozařování zajištěn audiovizuálním systémem.

Pacient je poučen o důležitosti dentální hygieny nejen během léčby, ale i po jejím skončení. Je důležité šetření před chemickým, fyzikálním a mechanickým drážděním. Během ozařování se může vyskytnout akutní kožní reakce v podobě erytému, mukositida a operační otok. Nutná je vhodná analgetizace. Postradiční reakce v podobě fibrózy podkoží se může projevit v odstupu 6-12 měsíců.

Po skončení posledního ozáření zdravotní sestra připraví sterilní stolek s nástroji, lékař provede odstranění zavedených plastikových trubiček, zdesinfikuje a ošetří ránu. Na závěr je ozařované místo sterilně kryto.

Dispenzarizace je po léčbě prováděna na pracovišti, kde byl pacient léčen, tj. na ORL a na ORO.

177 RT v oblasti CNS a krku – vedlejší účinky.

Bobková L.
KN Liberec- radioterapie

RT má nezastupitelné místo v léčbě nádorových chorob. Má za úkol dva cíle: prodloužit život pacienta nebo snížit analgetický syndrom, kterým nemocný trpí. U řady primárních nádorů má RT nejen analgetický efekt, nýbrž je podána hlavně s cílem tumor zmenšit, eventuelně umožnit operační řešení. I když je léčebný záměr u mnohých pokročilých primárních nádorů dlouhodobý, ozařuje se dávkou radikální. Nežádoucí účinky RT lze rozdělit na akutní a pozdní.

Akutní nežádoucí účinky se projevují v průběhu RT a ustupují po jejím skončení. Mohou však plynule přejít do formy subakutních až chronických nežádoucích účinků.

Pozdní nežádoucí účinky nastupují s odstupem měsíců až let po skončení RT. V oblasti CNS se v krátkém odstupu po RT může objevit časný přechodový mozkový edém s nauzeou a epileptickými záchvaty, vyjímečně až ložisková demyelinizace. V oblasti krku dochází kromě erytému též k mukositidě, silné bolesti bránící v polykání, u pacienta hrozí následný váhový úbytek.

Kombinace RT a CHT zvyšuje toxický účinek léčby.

178 Verifikace ozáření při radioterapii CNS – hlavy a krku.

Drozenová M., Bobková L.
Nemocnice Liberec, radioterapie

Přesnost a reprodukovatelnost nastavení nemocných při každé frakci je jednou ze základních podmínek kvalitní a účinné radioterapie. Toho jsou si vědomi i výrobci lineárních urychlovačů a proto je vybavují přídatnými zařízeními pro kontrolu nastavení polohy pacientů. Na našem pracovišti jsou dva lineární urychlovače (jeden z r. 2002), který je vybaven digitálním portálovým zobrazením a druhý (z r. 2005), který má navíc kilovoltážní rameno pro obrazem řízenou radioterapii.

Při léčbě onemocnění karcinomu hlavy a krku se používají fixační pomůcky (masky, fixace masky ke stolu). Je snahou dosáhnout co nejmenších nepřesností a odchylek. Problémem jsou pacienti, kteří nejsou schopni uležet ozařovací čas nebo trpící klaustrofobií. Tito se často medikují zklidňujícími léky

Přesné nastavení má význam nejen pro správnou aplikaci požadované dávky do cílového objemu, ale i pro šetření okolních tkání a kritických orgánů a tím snižování vedlejších účinků léčby.

179 Nežádoucí účinky radioterapie hlavy a krku.

Linhartová H., Opluštilová P.
FTN Praha Krč, oddělení radioterapie

Radioterapie patří k nejmladším lékařským oborům, má nezastupitelné místo v léčbě nádorových onemocnění. Tato léčebná metoda využívá působení ionizujícího záření na buňky. Jejím úkolem je zničit co největší objem nádorových buněk a co nejméně poškodit okolní tkáň, a proto je radioterapie provázena rizikem vzniku některých nežádoucích účinků.

Nežádoucím účinkům je věnováno mnoho kapitol odborné literatury a bylo napsáno mnoho článků, ale neustále je to aktuální téma v oboru radioterapie.

Nejprve bych se ráda zmínila o účinku ionizujícího záření na buňky z hlediska radiobiologického. V radioterapii vždy ozařujeme spolu s nádorovou tkání i tkáň zdravou. Radioterapeut musí znát účinek záření na zdravou tkáň a toleranční dávky pro jednotlivé tkáně a orgány. Charakteristika citlivosti buněk k záření je již zformulována v radiobiologickém zákonu z roku 1906 francouzskými vědci Bergonie a Tribondesuovou říká, že radiosenzitivní tkáň je tkáň s velkým počtem rychle se dělících málo diferencovaných buněk. Naopak radiorezistentní jsou tkáně s málo dělícími nebo nedělícími se diferencovanými buňkami.

Z hlediska buněčného cyklu je důležité, ve které fázi se buňka nachází při ozáření. Buněčný cyklus se skládá ze čtyř fází. První postmitotická fáze G1 je charakterizována syntézou RNA, proteinů a prekurzorů DNA. V této fázi se rozhoduje, zda buňka bude pokračovat v cyklu dělení, diferenciaci, zániku nebo se dostane do klidové fáze G0, ve které se nedělí. Na konci fáze G1 je buňka nejvíce radisenzitivní a přechází do fáze S. V této fázi má naopak nejnižší radiosenzitivitu. Dochází ke zdvojení DNA v jádře. Poté následuje fáze G2, během ní radiosenzitivita narůstá. Fáze G2 končí v okamžiku mitózy. Fáze M je sice nejkratší, ale je to druhé maximum radisenzitivity.

Radiosenzitivita přímo závisí na reprodukční aktivitě buněk a je nepřímo úměrná stupni diferenciace. Mezi tkáně rychle rostoucí a málo diferencované tzv. hierarchální typ patří sliznice, střevní epitel, hemopoetický systém, testes.

Naopak tkáně dobře diferencované a pomalu rostoucí tzv. flexibilní typ jsou plíce, mozek, cévy, uropoetický systém.

Obecně se orgány v otázce tolerance k záření dělí na 3 třídy.

1. třída – jejich poškození může vést k smrti
2. třída – vyjímečně vede k smrti
3. třída – ostatní orgány

Rychle reagující tkáně jsou odpovědné za akutní reakci po ozáření. Pomalu se obnovující tkáně jsou odpovědné za pozdní změny (late effect).

Tolerance tkání a orgánů na ozáření je ovlivněna:

- individuální citlivostí buněk a schopností jejich reparace
- frakcionací (velikostí a časovým rozložením dávky)
- celkovou aplikovanou dávkou
- druhem ionizujícího záření
- velikostí ozařovaného objemu
- zásobení kyslíkem
- předchozí léčbou (chirurgická, chemoterapie)
- věkem a celkovým stavem (mladší tkáň je obecně citlivější).

Při ozáření jakéhokoliv biologického objektu dojde v průběhu času ke změnám. Podle časového průběhu jsou tyto změny fyzikální, chemické a biologické. K fyzikálním tzv. přímým účinkům patří excitace a ionizace, k chemickým vytvoření volných radikálů a dochází již k primárnímu poškození biologických struktur. Podstatou biologických dějů je snaha buněk o reparaci.

Smrt buněk se projevuje časnými změnami po ozáření, které nastupují v době prvních týdnů. 2-3 měsíce po ozáření se začínají tvořit chronické postiradiační změny. Může dojít i k velice pozdním změnám (odstup a několik let).

Základním problémem je vztah a optimalizace vztahu mezi biologickými a fyzikálními faktory ve vztahu k ozařované tkáni (kdy aplikovat, kolikrát, aby nedošlo k poškození). Vztah mezi dávkou jednotlivou, celkovou a jejím časovým rozlišením se nazývá FRAKCIONACE.

- hyperfrakcionace – menší jednotlivé dávky záření vícekrát denně. Tento způsob má významný ochranný účinek na zdravé tkáně (ve smyslu pozdních změn), ale přináší větší akutní změny.
- hypofrakcionace – aplikace vyšší jednotlivé dávky v delších intervalech
- normofrakcionace – akcelerovaná frakcionace – zkrácení celkové doby ozáření

Nežádoucí účinky se rozdělují z několika hledisek. Podle časového to jsou akutní, pozdní a velmi pozdní. Z hlediska rozsahu to jsou místní a celkové.

K nádorů krku a hlavy patří nádory dutiny ústní, orofarynxu, nosohltanu, hrtanu a hypofarynxu, nosní dutiny, paranasálních dutin, ucha, oka, štítné žlázy, nádory slinných žláz.

Akutní reakce při ozařování v oblasti hlavy a krku

Akutní reakce se vytvářejí již během ozařovací série, ale po ukončení většinou mizí během několika týdnů nebo přecházejí do chronického stádia.

Postižení kůže.

Po určité dávce ionizujícího záření se na kůži objeví zčervenání (erytém), které je způsobeno jednak rozšířením vlásečnic, tak zánětem. Změny po ozáření na kůži nazýváme radiodermatitis. Mohou být reverzibilní či ireverzibilní. Charakteristické pro ně jsou na rozdíl od jiných zánětů kůže doba latence a prodloužená doba hojení.

V dnešní době jsou akutní reakce po ozáření na kůži mnohem méně časté díky používání vysokoenergetického záření s efektem šetření kůže.

Akutní reakce na kůži při ozařování se objevuje v několika podobách:
Radiodermatitis erythematosa(erytém). Vzniká jako reakce 1. stupně po ozáření již za 24 hod. až za několik dní latence.
Radiodermatitis bullosa (vlhká deskvamace). Ozařovaná kůže je edematózní a vznikají zde jizvy.
Radiodermatitis escharotica (časný vřed). Je to vředovitá forma, mokvavá a bolestivá. Při radioterapii zhoubných nádorů můžeme připustit reakci na kůži 1. a 2. stupně. 3. stupeň – akutní vřed je následkem nevhodně volené techniky či předávkování(ať již vědomé či nevědomé)

Změny na kožních adnexech po ozáření.
Epilace, alopecie. Vypadávání vlasů a vousů začíná již ze tři týdny po ozáření. U většiny nemocných se vlasová pokrývka obnoví do tří měsíců. Nestane-li se tak do šesti měsíců, je alopecie trvalá. Kvalita nově narostlých vlasů a někdy i jejich barva je odlišná od původních. Obvykle jsou jemnější.

Oko
Nejcitlivějším na ozáření je oční čočka. Již po jednorázové dávce 2 Gy či při frakcionacii 4 Gy může vzniknout radiační katarakta – zákal oční čočky. Katarakta způsobuje poruchu vidění až slepotu.
Poškození rohovky, keratitis po 30 Gy má přechodný ráz a projevuje se drobnými vřídky po několika týdnech po skončení léčby zářením. Po vyšších dávkách trvá keratitida s edémem rohovky déle. Při dávce 50 Gy. Vzniká opacifikace(ztráta průzračnosti) rohovky v důsledku vrůstání cév do vředů na rohovce. Při této dávce vzniká též krvácení do sítnice. Objevuje se radiační konjuktivitida v suchém spojivkovém vaku z postižení funkce slzných žláz. Vzniká iridocyklitida – zánět duhovky, glaukom a bolestivá kontrakce bulbu.

Ucho
K nežádoucím účinkům ozáření zevního ucha patří bolestivý zánět chrupavek. Při ozáření středního ucha může dojít k otoku, k poruše sluchu. Vnitřní ucho je radiorezistentní.

Dutina ústní a hltan
Poškození rychle se dělícího slizničního epitelu se projeví stomatitidou, která je velmi nepříjemná. Omezuje příjem stravy a je limitujícím faktorem dalšího ozařování.
Jsou bolesti při polykání a xerostomie.
Poměrně rychlý pokles slin se projevuje po prvním týdnu radioterapie(po dávce nad 10 Gy.). Ke vzniku xerostomie přispívá dehydratace a některá léčiva tricyklická antidepresiva, antihistaminika, diuretika aj.
K časnému obnovení salivace dochází (podle obdržené dávky) se značným časovým odstupem(měsíce), někdy je xerostomie trvalá. Po dávce mezi 20-40 Gy způsobuje až u 90% nemocných úplnou ztrátu chuti- ageuzije. Na jejím vzniku se může podílet deficit zinku, popřípadě mědi a niklu.

Hrtan
Při postižení hrtanu dochází k otoku hlasivek, k chrapotu.

Štítná žláza
Běžná komplikace při ozařování na krku je vznik snížené funkce štítné žlázy.

Pozdní změny po radioterapii v oblasti hlavy a krku
Nastávají v pomalu proliferujících tkáních a mohou se tedy objevit jako relaps, vznikají nejdříve za půl roku, někdy latence až za několik let.

Pozdní změny kůže
Po akutní reakci 2.- 3. stupně vzniká indurace, atrofie kůže- netvoří se pot ani maz.
Vznikají teleangiektáze, které jsou způsobeny rozšířením kapilár. Dochází ke změnám rozložení pigmentu, k hyperpigmentaci či hypopigmentaci.

Oko
Vyvíjí se pomalu katarakta.

Ucho
Dochází k zánětům chrupavek, k vředům až k ulceraci.

Ústa a nos
Atrofie sliznice se suchostí, vznikají vředy až osteoradionekroza.

Hrtan
Může dojít k zánětu chrupavek, k otoku až dušení.

Štítná žláza
Hyperthyreóza – změna nenávratná, ale snadno se upravuje.

Radioterapie je velmi účinná v léčbě nádorových onemocnění. Ale v každém případě se vždy setkáme s nežádoucími účinky. Jak lékař, tak radiologický asistent se snaží zvýšit ozařovací komfort pacienta a co nejefektivněji omezit nebo předcházet těmto účinkům.

180 Množství, aktivita a genetický polymorfizmus Pro197Leu glutation peroxidázy u spinocelulárního karcinomu hlavy a krku – předběžné výsledky.

Salzman R.[1], Pácal L.[2], Kaňková K.[2], Tomandl J.[3], Horáková Z.[1], Kostřica R.[1]
1) Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku FN u sv. Anny v Brně a LF Masarykovy Univerzity, Brno,
2) Ústav patologické fyziologie
3) Biochemický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Brno, přednosta: prof. MUDr. R. Kostřica, CSc.
Adresa pro korespondenci: MUDr. Richard Salzman, Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, FN u sv. Anny, Pekařská 53, Brno

V posledních letech je pořád lépe dokládána úloha oxidativního stresu v kancerogenezi. Cílem výzkumu bylo posoudit vztah mezi jednotlivými genetickými variantami genetického polymorfizmu Pro197Leu pro glutation peroxidázu 1 (GPx), její aktivitou a množstvím, dále hladinami parametrů oxidativního stresu a onkologickou charakteristikou pacientů se spinocelulárními karcinomy hlavy a krku.

Do prospektivní studie bylo zahrnuto 88 pacientů (78 mužů, 10 žen, průměrný věk 59,038.79 roku), kteří prodělali chirurgickou léčbu pro spinocelulární karcinom hlavy a krku na Klinice otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku FN u sv. Anny v Brně od července 2004 do ledna 2006. V periferní krvi odebrané časně pooperačně po chirurgické resekci nádoru byl stanovován malondialdehyd (MDA) jako marker lipidové peroxidace metodou kapalinové chromatografie dle Khoschsorura, tumor nekrosis faktor alfa (TNF) ELISA komerčním kitem firmy R&D System, množství GPx v plazmě (p-GPx) komerčním kitem firmy Merck Biosciences (Calbiochem) a dále aktivita GPx v erytrocytech (ery-GPx) komerčním kitem firmy Cayman Chemical Company. Navíc jsme stanovovali aktivitu GPx i v alveolárních makrofázách (AM-GPx) obdobným postupem jako v erytrocytech. Stanovování genotypů polymorfizmu Pro197Leu pro glutation peroxidázu 1 bylo provedeno polymerázovou řetězovou reakcí následovanou štěpením amplikonu restrikční endonukleázou podle metody popsané Hu a Diamondem. Hardy-Weinbergova rovnováha a testování rozdílu významnosti ve frekvencích genotypů resp. alelických frekvencích bylo provedeno 2 test a Fisher-exact testem. K porovnání ostatních proměnných byly použity běžné neparametrické testy (Mannův-Whitney, Kruskal-Wallis ANOVA a Spearmanovy korelační koeficienty). Ke srovnání délky bezpříznakového intervalu v závislosti na genotypů jsme použili Kaplan-Meierovu analýzu přežívání a log-rank test. Hladinu $P<0.05$ jsme považovali za statisticky signifikantní.

Alelické frekvence GPx byli 62,2% pro prolin a 37,8% pro leucin. Frekvence genotypů byli v souladu s Hardy-Weinbergovou rovnováhou ($p>0,05$, χ^2 test). V našem souboru jsme neprokázali souvislost mezi jednotlivými genetickými variantami a TNM klasifikací.

Nižší hladinu p-GPx jsme nalezli u genetické varianty Leu/Leu než u wild-type homozygota a heterozygota (p=0,03, Pro/Pro+Pro/Leu vs Leu/Leu, Mann-Whitney). Obrácený vztah jsme prokázali u AM-GPx, které vyšší aktivity jsme nalezli u heterozygota a homozygota Leu/Leu (p=0,04, Pro/Pro vs Pro/Leu, Mann-Whitney). Podobnou tendenci i když bez statistické významnosti jsme naměřili i u MDA.

Při srovnávání TNM klasifikace s parametry oxidativního stresu jsme zjistili, že pacienti s T1-2 mají vyšší aktivitu ery-GPx než pacienti s pokročilými nádory (p=0,03, Mann-Whitney). Diferenciace nádorů negativně korelovala s p-GPx (p=0,02), MDA (p=0,05) a pozitivně korelovala s AM-GPx (p=0,001) a hraničně s GPx ery (0,12, vše Spearman).

Z celého souboru 4 pacienti nedosáhli kompletní remisi (CR). Ze zbývajících 84 pacientů se projevila recidiva do 24 měsíců po operaci u 14 pacientů a 70 dalších zůstalo v CR. Zvýšenou hladinu MDA jsme našli u pacientů, u kterých se projevila recidiva nádorového onemocnění (p=0,01, Mann-Whitney). Pacienti s MDA měřeným v perioperačním období může predikovat recidivu nádoru. Pacient s MDA<medián má 6krát vyšší riziko výskytu recidivy než pacient s MDA<=medián (p=0,007, Fisher exact test). Obdobný rozdíl je i v délce bezpříznakového intervalu (p=0,10, Log rank test).

Závěr naší práce v souladu s množícím se dalšími pracemi doplňuje důkazy o úloze oxidativního stresu v problematice nádorů hlavy a krku. Praktický přínos po potvrzení našich výsledků na větším souboru může mít korelace aktivity GPx s diferenciací a zejména význam MDA jako markeru oxidativního stresu v buňce pro predikci recidivujícího průběhu spinocelulárního karcinomu hlavy a krku.

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR NR/7996-3 a NR/9200-3.

181 Analýza obsahu metalothioneinu v tumoru a zdravé tkáni pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku.

Tóthová E., Horáková Z., Salzman R., Binková H., Slabotínská D., Wágnerová D., Adam V., Kizek R.
Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku, FN u sv. Anny, Brno
Oddělení chemie a biochemie, Fakulta agronomie Mendlovy zemědělské a lesnické univerzity, Brno

Úvod

Metalothionein (MT) je ubikvitní, nízkomolekulární, intracelulární protein, bohatý na cystein, učastnící se homeostázy a detoxikace těžkých kovů, učastní se protekce vůči oxidativnímu stresu a diferenciace a proliferace buněk. Je intenzivně studován jako nádorový marker karcinomů různých lokalizací. Jeho role u karcinogezi zatím není úplně objasněna. Cílem naší startovní studie bylo zjistit vztah koncentrace MT v nádorové a zdravé tkáni a krvi ke klinickopatologickým ukazatelům nádorového onemocnění.

Metody

Ve vzorkách tumoru, sliznice, svalu a krve pacientů se spinocelulárním karcinomem hlavy a krku jsme elektrochemicky stanovovali koncentraci MT. Výsledky krve onkologických pacientů jsme srovnávali s výsledky krve zdravých jedinců. Vzorky byly nejdříve homogenizovány, zředěny a analyzovány postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulzní voltametrií (DPV). K statistickému vyhodnocení jsme využili Spearmanova koeficientu korelace a Mann-Whitneyho testu.

Výsledky

V sledovaném souboru bylo 21 onkologických pacientů, 18 mužů, 3 ženy, průměrný věk 46,7 ± 7,2 let, u všech byl verifikován spinocelulární karcinom hlavy a krku, středně diferencovaný (10 pacientů), nízce (6), nediferencovaný (1), dobře diferencovaný (1). Nejčastější lokalizací byl orofarynx (10 pacientů), larynx (7), hypofarynx, dutina ústní, přínosové dutiny, neznámé primum s metastatickým postižením uzlin – jednotlivě.

Zjistili jsme statisticky významnou inverzní korelaci mezi hladinou metalothionein v krvi a v tumorozní tkáni, p=0,04. Při srovnání hodnot v tumoru s dalšími parametry – N status, staging, grading, nenašli jsme signifikantní rozdíl.

	tumor	sval	sliznice	krev
Průměr	8,67225593	10,1824299	5,17324254	6,60572821
Median	7,18760922	4,58712657	4,48310726	4,15492594
SmOdch	6,05840666	9,93584432	3,35641463	7,09808123
Min	1,36344137	1,36306066	1,36297745	0,14581138
Max	21,4174503	3 3,8165516	12,3261629	22,2443088

Závěr

V ORL oblasti dosud chybí nádorový marker, který by měl praktické využití. V posledních letech byla u malignit hlavy a krku i jiných lokalizací studována exprese MT se slibnými výsledky. Overexprese byla většinou asociována s vyšší proliferační aktivitou a horší prognózou onemocnění. Tyto výsledky se opíraly o imunohistochemické stanovení MT v tkáních.

V naší pilotní studii jsme měřili koncentraci MT ve vzorcích elektrochemicky. Zjistili jsme inverzní korelaci MT hladiny v krvi a v tumoru. Další korelace s prognostickými parametry se nejevili statisticky významně. Pro objektivizaci výsledků bude nutné zhodnocení většího souboru pacientů, při větším počtu pacientů i homogenizace souboru, delší sledování a srovnání s imunohistochemickým vyhodnocením pro validizaci metody.

XX.
Nádory centrálního nervového systému

182 Možnosti neuroendoskopie v léčbě tumorů oblasti III. mozkové komory.

Novák Z.[1], Chrastina J.[1], Feitová V.[2], Jančálek R.[1], Lžičařová E.[3], Říha I.[4]
1) Neurochirurgická klinika LF MU, FN u sv. Anny v Brně, Brno
2) Klinika zobrazovacích metod LF MU, FN u sv. Anny v Brně, Brno
3) Oddělení onkologické a experimentální patologie, MOÚ, Brno
4) Ústav biomedicínského inženýrství, FEKT VUT, Brno

Úvod

Operační výkon pro tumor v oblasti III. mozkové komory zůstává výzvou pro neurochirurga i v období třetího milénia. Rozsáhlá literatura, reprezentovaná například monografií Apuzza (1), popisuje výhody i nevýhody četných otevřených mikrochirurgických přístupů do této kritické oblasti. Obtížnost volby optimální léčebné strategie u tumoru v oblasti III. komory je daná i jejich histologickou heterogenitou.

Klinická symptomatologie může být dána jak lokálním postižením struktur v okolí tumoru, tak i blokádou mokových cest s následným vznikem obstrukčního hydrocefalu. Do úvahy je nutno vzít především těsný vztah tumoru k fyziologickým úžinám mokového prostoru, ohraničujícím III.komoru – foramina Monroi a ústí Sylviova mokovodu s jejich blokádou a vznikem obstrukčního hydrocefalu. Klinická symptomatologie, vyplývající z postižení III.komory – jmenovitě její spodiny (zahrnující hypothalamus a oblast infundibula) a stěn se vztahem k thalamickým jádrům a kapsulárním drahám, je často provázena i poruchami paměti, která mohou vyplývat jak z postižení paměťových drah Papezova okruhu, tak i z dilatace III. komory a komprese okolních struktur. Zároveň je změna hormonální sekrece.

Principem minimálně invazivní léčby v neurochirurgii je využití mokových prostorů k přístupu k patologickému procesu a jeho odstranění bez porušení okolních struktur. Neuroendoskopie splňuje tuto podmínku díky možnému přístupu do oblasti III. komory právě s využitím komorového systému jako přirozené přístupové trajektorie do III.komory. Podstatu neuroendoskopického výkonu je odstranění patologické tkáně v rozsahu, daném blízkostí struktur centrálního nervového systému, obnovení průchodnosti mokových cest a především histologická verifikace, klíčová pro rozhodnutí o další léčebné strategii s následnou onkologickou léčbou.

Cílem sdělení je prezentace souboru nemocných s endoskopicky ošetřenými tumory v oblasti III komory z hlediska operační techniky, histologické diagnostiky a pooperačního průběhu.

Soubor nemocných

Od r. 1997 (zavedení techniky navigované neuroendoskopie) bylo na pracovišti neurochirurgické kliniky FN MU FN u sv. Anny v Brně provedeno přes 450 neuroendoskopických operací, z toho 39 pro patologický proces v oblasti III. komory. V souboru bylo celkem 20 mužů, 19 žen, průměrný věk 43,3 let, rozmezí od 6 do 80 let věku.

V klinické symptomatologii dominovaly příznaky intrakraniální hypertenze, především bolesti hlavy, dále změny psychiky včetně poruch paměti, poruchy okohybných nervů, poruchy rovnováhy a endokrinní dysbalance.

Operační technika

Technika navigované neuroendoskopie využívá kombinaci precizního zaměření pomocí stereotaktického systému nebo neuronavigace. Od r.1997 byl využíván stereotaktický systém v kombinaci s titanovým kruhem nebo později MRI kompatibilním keramickým rámem Leibinger a navigačním softwarem Praezis Plus (Tatramed). Od r.2004 pak k navigaci neuroendoskopických operací užíváme navigační systém Brain Lab Vector Vizion Sky. Vzhledem k vlastnostem obou zobrazovacích metod preferujeme MRI jako zdroj dat pro neuronavigační a stereotaktické systémy (standardní MRI sekvence T1 WI, tloušťka scanu 1,2 mm, možno připojit angiografická vyšetření jak arteriální, tak žilní fázi a další vyšetření dle definovaného typu léze).

Kraniofaryngeom	5 nemocných
Pinealoblastom	5 nemocných
Metastatický tumor	4 nemocní
Multiformní glioblastom	1 nemocná
Astrocytom G II	1 nemocný
Gangliogliom	1 nemocná
PNET	1 nemocný
Dermoid	1 nemocný
Lipom	1 nemocný
Celkem	20 nemocných

Tab. 1: Tumory III. komory

Výsledky

Přehled patologicko anatomických nálezů přináší následující přehled, kdy v první části jsou uvedeni nemocní s nádorovým postižením III. komory, v části následující pak nemocní s non tumorózními histologiemi

Koloidní cysta	6 nemocných
Gliální cysta	5 nemocných
Pineální cysta	2 nemocná
Suprasellární cysta	2 nemocní
Cysta Rathkeho výchlipky	1 nemocný
Lymfocytární hypofysitida	1 nemocný
Kavernom (inspekce)	2 nemocní
Celkem	19 nemocných

Tab. 2: Ostatní patologické procesy, postihující III. komoru

Nejčastější endoskopicky řešenou patologií v oblasti III.komory byla koloidní cysta. Jedná se o histologicky benigní lézi, ale její těsný vztah ke strukturám v okolí foramen Monroi (fornix, plexus chorioideus, v. thalamostriata) a stropu III.komory s kmeny vv. cerebri internae z ní činí výzvu jak pro neurochirurgickou, tak pro neuroendoskopickou operaci. U všech nemocných bylo možno provést fenestraci cysty, aspiraci jejího obsahu, resekci stěny a koagulaci zbytkových struktur. Pooperační průběh byl u všech nemocných nekomplikovaný zcela nekomplikovaný. Přechodná lehká akcentace již před operací pozorované kognitivní poruchy byla pozorována u jediné nemocné.

Pokud se jednalo o gliální cysty, jednalo se o procesy, vycházející ze stropu III.komory a z jejich stěn (zadní část třetí komory při ústí akveduktu a v její přední části mezi fornixy). Pooperační průběh po endoskopické fenestraci cyst s pojistnou endoskopickou třetí ventrikulostomií byl nekomplikovaný u všech uvedených nemocných.

Principem neuroendoskopické operace pro kraniofaryngeom je fenestrace tumorózní cysty, aspirace jejího obsahu, resekce stěny cysty v bezpečném rozsahu a dle možností i řešení solidní porce. Zohlednit je nutné vztahy k vitálním strukturám a vrůstání tumoru do stěn hypothalamu. Zvláště pak prorůstání tumoru do hypothalamických struktur je limitem chirurgických možností při jakémkoliv operačním přístupu. Právě neuroendoskopický výkon umožnil vyřešit rozsáhlý tumor postihující III. komoru, včetně její spodiny, s prorůstáním do komory postranní, u polymorbidní nemocné v 8. deceniu věku, přijaté s kvantitativní poruchou vědomí na úrovni soporu.

U nemocných s metastatickými tumory bylo možno vždy provést obnovení průchodnosti mokových cest a vyřešit tak obstrukční hydrocefalus. Navíc ventrikuloskopie prokázala i metastatická depozita ve spodině III.komory, která nebylo možné identifikovat na předoperační MRI navigační studii.

U rozsáhlých pinealoblastomů u nemocných všech věkových kategorií, postihujících vždy stěny zadní části III.komory, byl výkon zaměřen na obnovení průchodnosti mokových cest, histologickou verifikaci tumoru a jeho zmenšení. Již intraoperační obraz ukazoval maligní charakter tumoru. Díky histologické verifikaci a zabezpečení mokových cest bylo možné zahájit cílenou onkologickou léčbu.

U obou nemocných s pineální cystou po její endoskopické fenestraci došlo ke kompletní regresi potíží nemocných(intrakraniální hypertenze a výrazná cefalea při ventilovém mechanismu).

U nemocné s rozsáhlým PNET ani kombinovaná operace – endoskopická biopsie s ventrikuloskopií a ETV, následovaná otevřenou operací ze subfrontálního přístupu s resekcí suprasellární porce tumoru a následující komplexní léčba nevedla ke kontrole progrese maligního onemocnění.

Klinický průběh byl velmi dobrý u nemocných operovaných pro cystu Rathkeho výchlipky, suprasellární cysty a lipom ve spodině III.komory.

Vzhledem k rozsahu a konzistenci tumoru byla původní endoskopická operace pro suprasellární dermoid, vyplňující celou třetí komoru konvertována na otevřenou mikrochirurgickou operaci, s velmi dobrým výsledkem.

U dalších 2 nemocných bylo nutné v jedné době po provedené ventrikuloskopii a odběru histologie pro rozsah nádoru přistoupit ke konverzi výkonu. U dalších 2 nemocných byla operace dokončena ve druhé době (nemocný s rozsáhlým solidním kraniofaryngeomem a již zmiňovaná nemocná s PNET). Důvodem ke konverzi výkonu nebylo nikdy nezvladatelné krvácení. Již při předoperačním plánování jsou učiněna opatření, umožňující případnou konverzi.

Diskuse

Expanze postihující III. komory jsou relativně vzácné nálezy, histologicky i biologicky velmi heterogenní. Lejeune se spolupracovníky ve svém sdělení, zabývajícím se neurochirurgickou léčbou tumorů III. komory, studovali soubor 262 nemocných, operovaných na všech francouzských neurochirurgických pracovištích. Nejčastěji se jednalo o koloidní cystu III.komoru. Z dalších tumorů byly přítomny především low grade astrocytomy, pilocytické astrocytomy, ependymomy, subependymomy, gigantobuněčné subependymální astrocytomy, gangliogliomy a oligodendrogliomy. Z tumorů negliálního původu byly popisovány

zvláště kraniopharyngeomy a papilomy chorioidálního plexu, dále pak lymfomy, metastázy a epidermoidní cysty. Jednalo se velmi heterogenní skupinu nemocných, u nichž byly využity různé způsoby chirurgické léčby – mikrochirurgická exstirpace, stereotaktická biopsie, drenážní systémy pro hydrocefalus a neuroendoskopie. Sami autoři zdůrazňují výhodnost exaktní neuroendoskopické léčby především u koloidních cyst. V našemsouboru jsou nejčastějším nálezem koloidní cysty, následovány cystami gliálními. Zdůrazňujeme nutnost adekvátní histologické verifikace při chirurgickém řešení těchto patologií, především k vyloučení cystických gliomů (2).

Souweidane ve svém sdělení (3), zabývajícím se endoskopickou histologickou verifikací u 12 pediatrických nemocných s tumorem ve III komoře uvádějí, že neuroendoskopická histologická verifikace umožnila se vyhnout otevřené mikrochirurgické operaci u 83% nemocných. V souladu s našimi výsledky zdůrazňují nutnost obnovení průchodnosti mokových cest, i když se u překvapivě vysokého počtu nemocných nevyhnuli nutnosti zavedení drenážního systému. Výsledek endoskopické histologické verifikace přímo ovlivnil další léčebný postup u 92% jejich nemocných.

Lokální rozsev tumoru v okolí trajektorie zavedení endoskopu, popisovaný u nemocného s germinomem (4), jsme v našem souboru nemocných nepozorovali, stejně tak implantační metastázy.

Kromě histologické verifikace, resekce patologického procesu a obnovení průchodnosti mokových cest je nutno zmínit i další přínos neuroendoskopie v řešení patologických procesů v oblasti III.komory. Jedná se o řešení farmakoresistentní epilepsie především u dětských pacientů s hamartomy, postihujícími oblast hypothalamu. Literární data popisují velmi dobré výsledky po neuroendoskopické resekci patologické tkáně a deaferentaci tumoru (5,6). Podobnou zkušenost jsme získali u nemocného s farmakoresistentní epilepsií s bifrontálním postižením a gliální cystou přední části III. komory, kdy po endoskopickém výkonu prakticky vymizely epileptické záchvaty.

Neuroendoskopie umožňuje i řešení suprasellárních patologických procesů, vtlačujících se do dutiny III. komory, kdy je možné provést bezpečnou fenestraci její spodiny, aspiraci obsahu cystického procesu a širokou resekci stěny cysty. V souladu s literárními údaji je možno potvrdit velmi dobré výsledky u nemocných se vzácnou cystou Rathkeho výchlipky řešené transventrikulárním přístupem (7, 8, 9).

U rozsáhlých patologických procesů – Gaab a Schroder uvádějí hranici 2 cm (10), ovšem je nutno zmínit i jiné faktory než vlastní velikost tumoru- konsistenci, cévnatost – lze využít i výhodnou kombinaci endoskopie a otevřené mikrochirurgické operace. Jedná se o endoskopicky asistovanou mikrochirurgii – vlastní manipulace pod kontrolou operačního mikroskopu využívá endoskopu ke kontrole oblastí, skrytých mikroskopu. Další možností je endoskopicky kontrolovaná mikrochirurgie – manipulace mikroneurochirurgickými nástroji probíhá pod kontrolou neuroendoskopu. Někteří autoři využívají i biportální endoskopický přístup, zlepšující jako možnost endoskopické inspekce, tak i manipulace při vlastním operačním výkonu (11).

Atraktivní možností je endoskopické řešení blokády mokových cest při metastatickém postižení III. komory nebo při postižení III.komory germinomem. I v terénu, změněném růstem tumoru, je možné identifikovat orientační body po snesení tumorózních náletů a provést fenestraci spodiny III.komory. Problémem zůstává kombinace hydrocefalu obstrukčního a poruchy resorbce moku při metastatickém postižení subarachnoidálních prostorů (12).

Využití neuronavigace nebo stereotaktického rámového systému umožňuje volbu optimální trajektorie z hlediska operačního řešení patologického procesu i obnovení průchodnosti mokových cest. Neuronavigace nebo stereotaktický systém zlepšuje možnosti operačního výkonu v nedilatovaném komorovém systému (13).

Závěry

Neuroendoskopie je v současné době esenciální součástí komplexního diagnosticko terapeutického algoritmu při řešení procesů v oblasti III. komory mozkové. Je možné identifikovat radiologicky skryté patologické procesy, například dle MRI nepředpokládaný metastatický rozsev. Neuroendoskopie napomáhá řešení patologického procesu, umožňuje dokonalou vizuální inspekci a může nahradit i mikrochirurgickou exstirpaci. Nelze ovšem ignorovat potenciální rizika spojená s výkony ve III.komoře a využít veškerých možností současné technologie při plánování operací ve III.komoře a při jejich následné léčbě v interdisciplinární spolupráci

Literatura

1. Apuzzo MLJ. Surgery of the third ventricle. Lippincott Williams and Wilkins, 2-nd Edition, 1998.
2. Lejeune J, Le Gars D, Haddad E.[Tumors of the third ventricle: review of 262 cases] Neurochirurgie 2000; 46:296 – 313. 1.3. Souweidane MM, Sandberg DI, Bilsky MH, Gutin PH. Endoscopic biopsy for tumor of the third ventricle. Pediatr Neurosurg 2000;33:132 – 7.
3. Haw C, Steinbok P. Ventriculoscope tract recurrence after endoscopic biopsy of pineal germinoma. Pediatr Neurosurg 2001;34:215 – 17
4. Akai I, Okamoto K, Iizuka H, Kakinuma H, Nojima T. Treatments of hamartoma with neuroendoscopic surgery and stereotactic radosurgery. A case report. Minimally Invasive Neurosurgery 2002;45:235 – 239
5. Fohlen M, Lellouch A, Delalande O. Hypothalamic hamartoma with refractory epilepsy: surgical procedures and results in 18 patients Epileptic Disord 2003;5:267 – 73

6. Novák Z, Krupa P, Chrastina J, Říha I, Jančálek R. Supraselární expanze zasahující do třetí komory a jejich endoskopické řešení. Sjezd České a slovenské neurochirurgické společnosti s mezinárodní účastí, 2002, s.19 – 20, ISBN 80 – 238 – 8751 – 3.
7. Nakahara M, Maeda K, Koga H, Tabuchi K. Neuroendoscopic treatment for Rathke's cleft cyst: Transventricular approach to suprasellar cystic lesion No Shinkei Geka 2003;31:1207-12.
8. Novák Z, Chrastina J. Neuroendoskopie Praha: Maxdorf Jesenius 2005
9. Gaab MR, Schroeder HWS. Neuroendoscopic approach to intraventricular lesions. Neurosurg Focus 1999 ; 6: Article 5.
10. Horvath Z, Veto F, Balas I, Doczi T. Complete removal of colloid cyst via CT-guided stereotactic biportal neuroendoscopy. Acta Neurochir (Wien) 2000;142:539 – 545.
11. Husain M, Jha D, Thamann D, Husain N, Gupta RK. Ventriculostomy in a tumor involving the third ventricular floor. Neurosurg Review 2004;27:70-72
12. Souweidane MM. Endoscopic surgery for intraventricular brain tumors in patients without hydrocephalus Neurosurgery 2005;57:312 – 18.

183 Low grade gliómy – indikácie a úskalia rádioterapie.

Bolješíková E.[1], Chorváth M.[1], Belan V.[2], Ondrušová M.[3]
1) Klinika Rádioterapie, Onkologický Ústav Sv. Alžbety, Bratislava
2) Rádiodiagnostická klinika, Dérerova nemocnica, Bratislava
3) Národné centrum zdravotníckych informácií, Bratislava

Incidencia nádorov CNS v SR(2002) je M 5,7/100 000, Ž 4,7/100 000 v absolútnych číslach(M 150, Ž 130), z toho 80% predstavujú gliómy. Podiel low grade(LG) gliómov je 10%.

Indikácia rádioterapie u LG gliómov je kontroverzná. Väčšinou sa jedná pomaly rastúce nádory u mladších pacientov v dobrom výkonnostnom stave s veľkou pravdepodobnosťou prežívania 5-10 rokov, u ktorých potenciálna možnosť neskorých postradiačných zmien v zmysle radiačnej nekrózy predstavuje významné zníženie kvality života. Príspevok analyzuje: kedy indikovať rádioterapiu, s akou dávkou na frakciu, celkovou dávkou, ožarovaným objemom a radiačnou technikou. Analyzujú sa i potenciálne neskoré komplikácie radiačnej terapie ako aj možnosti ich redukcie.

Za negatívne prognostické faktory sa považuje: vek>40 rokov, astrocytóm bez oligokomponenty, priemer nádoru > 6.0 cm., nádor presahujúci cez stredočiarové štruktúry, prítomnosť neurologického deficitu pred chirurgickou liečbou. Ak má pacient viac ako 2 faktory patrí do high risk skupiny.

Je vhodné, aby rozhodnutie o optimálnom terapeutickom postupe u pacientov s low grade gliómami bolo prijímané na multidisciplinárnej komisii zloženej z neurochiruga, patológa, neuronkológa, radiačného onkológa a rádiodiagnostika, nakoľko rozhodnutie sa opiera o novšie diagnostické metódy ako magnetickorezonančná spektroskopia (MRS), perfúzne a difúzne MR.

Grant VEGA č. 1/3430/06

184 Ozáření kránia pro metastázy do mozku při karcinomu plic – zhodnocení přežití.

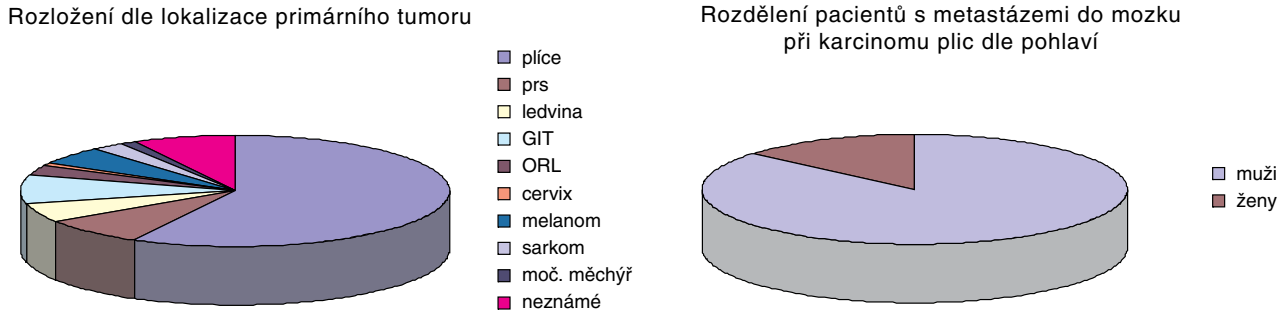
Hlávka A., Vaňásek J., Ulrych V., Klimešová M.
ORO KN Pardubice a Multiscan, Radiologické centrum Pardubice
www.nem.pce.cz, www.multiscan.cz

Disseminace solidních tumorů do mozku představuje obtížně řešitelný terapeutický problém. Solitární ložiska lze v některých případech řešit chirurgicky případně v kombinaci s radioterapií. U většiny nemocných jsou však terapeutické možnosti omezeny na symptomatickou léčbu, někdy je možné paliativní ozáření. Prognóza těchto pacientů je velmi špatná. Cílem naší práce je uvést zkušenosti s paliativní léčbou těchto nemocných radioterapií.

Na našem pracovišti jsme v období 2 let (od 4/2004 do 4/2006) provedli ozáření kránia u 114 pacientů s metastatickým postižením mozku. Lokalizace primárního tumoru byla v 58% (66 pacientů) v plicích, v 9% v tlustém střevu a konečníku (10), v 8% v prsu (9), v 5% v ledvině (6) či se jednalo o melanom (6), ve 2.5% se jednalo o sarkom (3) či nádor ORL oblasti (3), v 1% o močový měchýř (1) a cervix uteri (1) a v 8% o neznámé primární ložisko. Další část výsledků uvedených v prezentaci je věnována již pouze pacientům s primárním tumorem plic.

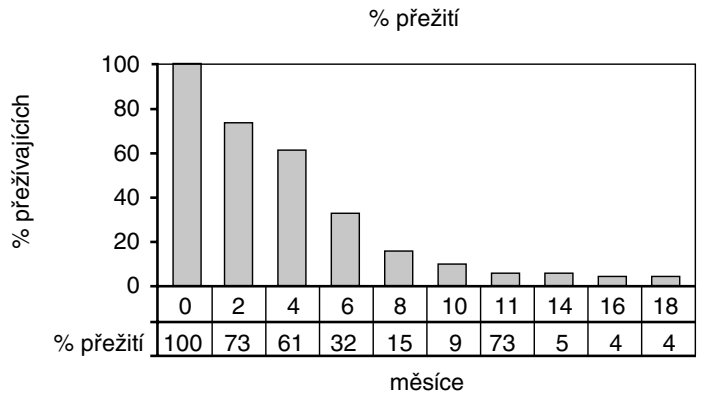
Průměrný věk souboru je 66 let (43-82 let), jednalo se o 57 mužů (86%) a 9 žen (14%).

Pacienti byli ozařováni lineárním urychlovačem Varian CLINAC 2100 C/D energií 6MV technikou 2 protilehlých MLC tvarovaných kontrapolí. S výjimkou 3 pacientů, kde byla užita frakcionace po 2Gy (40Gy/20 frakcí + dozáření zmenšenými poli do celkové dávky 56Gy/28 frakcí – nízký věk a výborný celkový stav), byla u všech ostatních použita frakcionace 10x3Gy.



Obr. Ozařovací techniky: 1-6

Z tohoto souboru jsme provedli hodnocení přežití 2, 4, 6, 6,8, 10, 12, 14, 16 a 18 měsíční, je uvedeno v následujícím grafu:



Závěr

Mezi pacienty s metastázami do mozku výrazně převládají pacienti s primárním tumorem plic. Přežití těchto pacientů není dlouhé, roční přežití v našem souboru bylo pouze 5%. Tolerance léčby byla velmi dobrá. U části nemocných došlo ke zmírnění symptomatologie způsobé metastatickým postižením mozku, polovina pacientů však zemřela do 5 měsíců. Počet přežívajících po iradiaci kránia klesá lineárně do doby 1 roku, další pokles je již velmi mírný. Mezi udávanými příčinami smrti u pacientů zemřelých do 5 měsíců od iradiace převažuje mozkové postižení (do 2 měsíců to bylo ve 100%), u přežívajích déle je za příčinu smrti označována progrese primárního tumoru a metastáz v ostatních lokalizacích či jiné příčiny.

185 Autokrinný a parakrinný mechanizmus účinku VEGF u astrogliálnych nádorov.

Knížetová P., Hlobilková A., Ehrmann J., Krejčí V., Kolář Z.
Laboratórium molekulárnej patológie, Ústav patológie, Lekárska fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc

Výrazná angiogenéza, ako aj zvýšená proliferácia buniek sú kľúčovými histopatologickými črtami jedného malígneho nádoru astrogliálneho pôvodu – glioblastómu. Angiogenéza zohráva vo všeobecnosti významnú úlohu v progresii nádorov. Vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF) je multifunkčný cytokín zodpovedný za fyziologickú a patologickú angiogenézu. VEGF je nadmerne produkovaný gliálnymi elementmi u „high grade“ gliómov, čo poukazuje na jeho prognostický význam z hľadiska progresie nádoru.

Výsledky imunohistochemickej analýzy nám potvrdili expresiu VEGF a jeho dvoch receptorov Flt-1 a KDR v endoteliálnych, ako aj gliálnych elementoch u súboru „low grade“ a „high grade“ gliómov. Expresia Flt-1 a KDR sa v závislosti od „grade“ nádoru nezvyšovala, zatiaľ čo v prípade VEGF sme potvrdili koreláciu zvýšenej expresie s progresiou nádoru. Pomocou imunohistochemickej analýzy sme stanovili expresiu CD34 antigénu v endoteliálnych elementoch a expresiu nestínu v gliálnych a endote-

liálnych bunkách na vyššie uvedenom súbore. Prítomnosť CD34+/nestín+ „primitívnych“ cievnych elementov bola zaznamenaná v korelácii so zvýšenou expresiou VEGF u skupiny „high grade“ gliómov. Nemožno teda vylúčiť, že zvýšená expresia a následná sekrécia VEGF u astrogliálnych nádorov stimuluje tvorbu nezrelých cievnych elementov v zmysle svojho parakrinného pôsobenia u „high grade“ gliómov.

Preukázali sme koexpresiu VEGF a jeho receptorov na *in vitro* kultivovaných astrogliálnych líniách (A172, U87MG, T98G, SPF126, U251G a U373G), čo nám umožnilo rozvinúť hypotézu o nielen parakrinnom, ale aj autokrinnom mechanizme pôsobenia VEGF u astrogliálnych nádorov. Stimulácia bunkových línií s exogénnym VEGF121 viedla k aktivácii Ras/c-Raf/ERK1/2 signálnej dráhy s následným zvýšením proliferácie a motility buniek.

Záverom našej štúdie je nový pohľad na úlohu VEGF, ktorý pôsobí nielen v smere formovania nezrelých cievnych elementov, ale aj ako stimulátor proliferácie a motility nádorových buniek u astrogliálnych nádorov.

Táto práca bola financovaná grantom IGAMZCRNR/7828-3 a MSM6198959216.

XXI.
Sarkomy

186 Léčba skupiny extraoseálních nádorů Ewingova sarkomu a PNET (periferní neuroektodermový tumor) dle protokolu EURO-E.W.I.N.G 99 u dospělých nemocných.

Kubáčková K.[1], Prausová J.[1], Linke Z.[1], Malinová B.[1], Pipková R.[2], Bělohlávek M.[3], Kodet R.[4], Campr V.[4], Kozák T.[5]
1) Radioterapeuticko- onkologické oddělení, FN v Motole, Praha
2) Klinika zobrazovacích metod, II. LF UK, FN v Motole, Praha
3) PET Centrum, Nemocnice na Homolce, Praha
4) Ústav patologie a molekulární medicíny, II. LF UK, FN Motol, Praha
5) Hemato- onkologické odd., FN Královské Vinohrady, Praha

Skupina nádorů Ewingových sarkomů/PNETů je charakterizována jako tumory z malých, modrých kulatých buněk různého stupně neurální diferenciace. Ewingovy sarkomy, maligní PNET/Akinovy tumory a atypické Ewingovy sarkomy jsou zařazovány do skupiny Ewingových sarkomů. U 9% těchto tumorů najdeme přestavbu 22 chromozomu, nejčastěji ve formě translokace 11;22. Důsledkem této přestavby je exprese onkogenního transkripčního faktoru EWS-Flil. Ewingovy tumory jsou systémovým onemocněním, z čehož vycházejí nejnovější léčebné strategie. 5-leté přežívání u lokalizovaného onemocnění se pohybuje mezi 55%- 65%. Mezi nejcitlivější cytostatika patří vinkristin, actinomycin D, cyclofosfamid, doxorubicin a ifosfamid. Pro primárně generalizované onemocnění lze konvenční systémovou léčbou dosáhnou pouze u 10%-20% krátkodobé remise a do jednoho až dvou let dochází k relapsu onemocnění. Některé protokoly zavedly proto konsolidační vysokodávkovanou chemoterapii k eradikaci minimální residuální choroby s dosažením přežívání ve třech letech až u 35% nemocných. Prokol EURO- E.W.I.N.G. vychází z předchozích zkušeností intenzifikované terapie studií fáze II s důrazem na dávkovou intenzitu s nutností minimálního odkladu následného cyklu. Léčba je stratifikována na základě přítomnosti několika prognostických faktorů jako je přítomnost plicních a pleurálních metastáz, velikost primární inoperabilního tumoru, možnost lokální léčby s předchozí odpovědí na systémovou chemoterapii. Indukční léčba spočívá v podání 6 cyklů chemoterapie dle kombinace VIDE (vinkristi, ifosfamid, etoposid, doxorubicin). U lokalizované choroby poté následuje resekční výkon a dle léčebné odpovědi se pokračuje v konsolidační systémové léčbě v kombinaci VAC (vinkristin, aktinomycin, cyclofosfamid) či VAI (vinkristin, aktinomycin, ifosfamid) s konkomitantním ozářením lůžka primárního tumoru. U primárně pokročilého onemocnění se konsolidačně zařazuje standardní či vysokodávkovaná chemoterapie s akinoterapii primárního tumoru či plic, pokud nemocný nepodstoupil přípravný režim s busulfanem.

V letech 2003-2006 jsem na našem pracovišti léčili celkem 8 nemocných s diagnózou Ewingova sarkomu/PNETu. U 4 jedinců se jednalo o primárně končetinové tumory, u dvou nemocných byl primární nádor lokalizován v malé pánvi a u jednoho nemocného se jednalo o primární PNET ledviny. Medián věku byl 29 let (23-41). Indukční chemoterapie byla u všech nemocných provázená febrilní neutropenii stupně 3 a 4 i se standardním podávání růstových faktorů. Pouze u dvou nemocných hematologická toxicita byla provázena komplikující mukositidou trávicího traktu stupně 3. Čtyři nemocní podstoupili konsolidační vysokodávkovanou chemoterapii s přípravným režimem busulfan, melfalan. Vysokodávkovaná chemoterapie byly provázena minimální toxicitou. U jednoho nemocného dva měsíce po podání konsolidační chemoterapie byla diagnostikována plicní mykobakterióza a byl přeléčen antituberkulotiky. U jedné nemocné nedošlo k přihojení štěpu a nemocná umírá 35 den po převodu periferních kmenových buněk bez známek onemocnění. Tři nemocní, které dosáhly kompletní remise, je medián přežívání 25 měsíců. U 3 nemocných, kteří umírají na generalizaci onemocnění, dochází k progresi choroby v mediánu 5 měsíců po skončení vysokodávkované chemoterapie. 6 nemocných podstoupilo konsolidační aktinoterapii místa primárního tumoru v dávce 45- 54 Gy.

Skupina Ewingových sarkomů představuje skupinu velmi agresivních systémových malignit, které vyžadující agresivní terapeutický přístup, jehož základem je kombinovaná intenzifikovaná chemoterapie. I přes vysoký počet výskytu hematotoxicity stupně 3 a 4 je tento přístup při současných standardech podpůrné léčby dobře tolerován s minimální nutností redukce či odkladů léčby, které představuje závažný rizikový faktor pro selhání léčby.

187 Imatinib mesylate a sunitinib malate – efektivní bioterapie GIST.

Kocáková I., Kocák I., Špelda S., Opletal P., Vyzula R.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Úvod

Gastrointestinální stromální tumory (GIST) jsou histopatologicky definovány jako vřetenobuněčné nebo epiteloidní, výjimečně pleiomofní mezenchymální nádory, exprimující protein KIT, transmembránově uložený receptor pro cytokin, známý jako růstový faktor pro kmenové buňky s intracytoplasmatickou tyrosinkinázovou aktivitou. GISTy ačkoliv jsou nejčastějšími sarkomy trávicího ústrojí, z celkového počtu sarkomů představují přibližně jen 5%. Roční incidence se odhaduje na 10-20 případů na 10^6 obyvatel. Průměrný věk při stanovení diagnózy je 60 let. Nejčastěji jsou lokalizovány v žaludku (40-70%), dále následuje tenké střevo (20-40%), tlusté střevo (5%) a jícen (<5%). [1,2] V klinice se vyskytují od malých indolentních nádorů, které jsou

léčitelné pouhou excizí až po nádory maligní povahy, které představují 20-30%.[2] Nejčastějšími místy metastáz jsou játra a peritoneum.[3]

Biologické způsoby léčby si vydobývájí místo mezi běžnými terapeutickými postupy u některých solidních nádorů, patří mezi ně i chemo a radiorezistentní gastrointestinální stromální tumory. Inhibitory receptorů tyrosinkinázy – imatinib a sunitinib, představují perspektivní molekuly, které zcela zásadně změnily náš postoj k terapii GIST.

Imatinib mesylate – (Glivec®) je malá molekula, která soutěží s ATP na jeho vazebném místě na kináze KIT, a zabraňuje tak přenosu fosfátu z ATP na tyrosinové zbytky substrátu. To zapříčiňuje usměrněnou signalizaci z kinázy, čímž se mimo jiné vychyluje rovnováha směrem k apoptóze. Imatinib vykazoval ve dvou studiích provedených v USA a ve Finsku (CSTI571 B2222 protokol) vysoké procento léčebných odpovědí u c-KIT pozitivních metastatických nebo inoperabilních GISTů. Bylo dokumentováno 54% léčebných odpovědí u 147 nemocných léčených denní dávkou 400 mg nebo 600 mg. U dalších 28% léčených bylo dosaženo stabilizace nemoci, a jen 14% vykazovalo primární rezistenci na léčbu. Podobné výsledky poskytla studie Evropské organizace pro výzkum a léčení nádorových onemocnění (European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC), v níž bylo léčeno 36 nemocných s pokročilým onemocněním denní dávkou 400 – 1000 mg. U 53% byla potvrzena částečná odpověď, u 17% nebyla tato částečná odpověď dostatečně potvrzena nebo došlo k více než 20% regresi nádoru, a jen u 11% nádor vykazoval progresi. V těchto studiích bylo u 90% nemocných s vyjádřenou symptomatologií nemoci pozorováno výrazné zmírnění nebo vymizení těchto příznaků. Medián času do léčebné odpovědi byl asi 13 týdnů. [4-8]

Sunitinib malate (SU11248, Sutent®) představuje další lék ze skupiny inhibitorů tyrosinkinázy, váže se na tyrosinkinázové domény receptorů pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR), PDGF, KIT, RET, FLT3, a inhibuje tak aktivaci několika signálních drah v buňce a má jak antiangiogenní, tak protinádorový účinek. -V klinických studiích prokázal významnou protinádorovou účinnost u metastazujícího GISTu rezistentního na léčbu imatinibem. Do randomizované, multicentrické, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované studie III. fáze bylo zařazeno celkem 312 pacientů. Nemocní byli léčeni sunitinibem (50mg/den po 4 týdny, 2 týdny přestávka), nebo dostávali placebo. Medián času do progrese tumoru (TTP) byl 4krát delší ve skupině sunitinibu (27,3 vs 6,4 týdne, HR: 0,33, p<0,001). Částečné odpovědi na léčbu bylo doaženo u 6,8% pacientů na sunitinibu vs ?0% na placebu, ke stabilizaci onemocnění na dobu 22 týdnů došlo u 17,4% ve skupině suniitinibu a u 1,9% ve skupině placeba. Ve skupině léčených sunitinibem byl pozorován trend k lepší úlevě od bolesti (17,4% vs 9,5%, p<0,064). Tato klinická studie prokázala, že sunitinib je účinný a bezpečný v léčbě metastazujícího nebo lokálně pokročilého gastrointestinálního tumoru rezistentního na léčbu imatinibem. [9-12]

V následující kazuistice prezentujeme významnou protinádorovou účinnost imatinibu a sunitinibu u pacientky s metastatickým GIST léčené v MOÚ.

Popis případu

Pacientka ve věku 51 let prodělala v únoru 2003 na chirurgickém pracovišti ve FN v Bohunicích resekci tenkého střeva, HYE, adnexektomii, peroperačně byla konstatována karcinomatosa peritonea, z histologického vyšetření byl diagnostikován gastrointestinální stromální tumor tenkého střeva, vykazující částečnou pozitivitu CD 34 a silnou expresi CD 117. Na pooperačním CT vyšetření břicha a pánve nebyla měřitelná léze onemocnění, pacientka byla mimoústavně léčena paliativní systémovou chemoterapii s 5-fluorouracilem, leukovorinem a cisplatinou, bylo aplikováno 6 cyklů chemoterapie a léčba byla ukončena v červnu 2003. Na kontrolním CT vyšetření nebyl doklad o aktivitě nemoci. O tři měsíce později došlo k masivní intraabdominální diseminaci onemocnění provázené abdominálním dyskomfortem a váhovým úbytkem. Bylo vyžádáno onkologické konzilium v MOÚ.

Pacientka přichází do MOÚ 4.9. 2003. RTG a CT plic neprokazují metastatické onemocnění. Na CT břicha jsou parenchymatózní orgány beze změn. V retroperitoneu ani v pánvi nebyly prokázány evidentní patolologické zvětšené uzliny. V dutině břišní byla popsána rozsáhlá velmi nepravidelná infiltrace s maximem ve středním a pravém mezo- a hypogastriu, postihující především mezenteriální tuk, střevní, především tenké, kličky, peritoneum a omentum. V celkovém rozsahu nádorová infiltrace složená z menších porcí dosahuje vel. až cca 20 x 10 x 25 cm, kaudálně dosahuje až k pravé stěně močového měchýře. Při tomto rozsahu onemocnění zůstávají hematologické a biochemické parametry v normě.

Vzhledem k histologicky stanovené diagnóze GIST byla zahájena terapie imatinibem 11. 9. 2003. Imatinib byl podáván v dávce 4 tbl. denně za pravidelného monitorování hematologických a biochemických parametrů. Již v průběhu prvních dvou týdnů zavedené medikace dochází k vymizení algického syndromu a postupně váhovému přírustku.

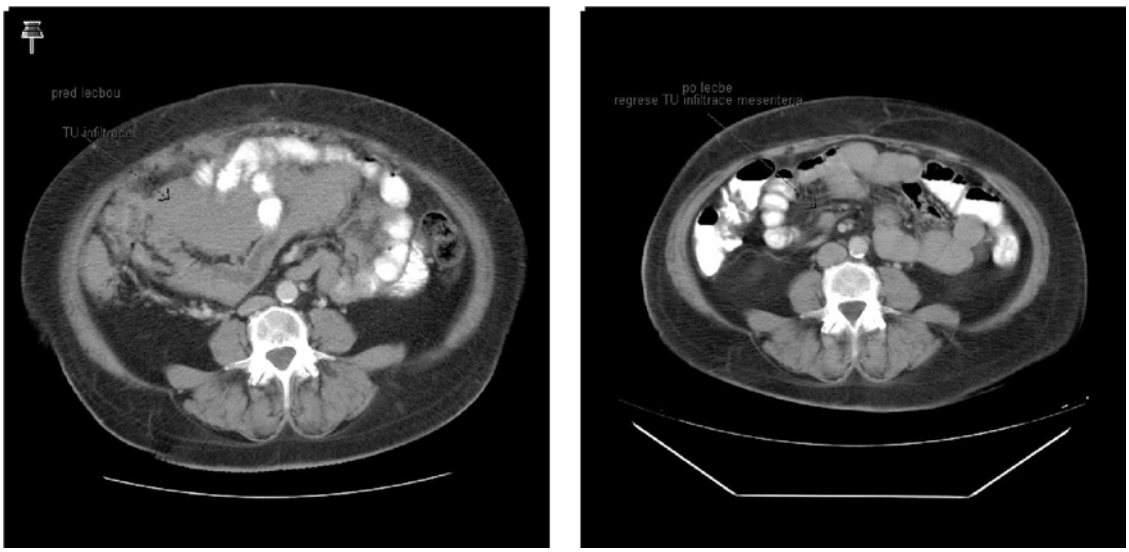
První hodnocení efektu bylo provedeno po 3 měsících léčby. Dle CT vyšetření 18.12. 2003 zůstávají játra a ostatní parenchymové orgány a struktury bez nálezu patologických změn. V retroperitoneu ani v pánvi neshledány patologické uzliny nebo jiné ložiskové změny. Je dokumentována úplná regrese infiltrace omenta, mezenteriálního tuku a tenkých kliček. Tolerance léčby byla velmi dobrá. Přechodně se vyskytly perimaleolární otoky zvládnutelné malou dávkou diuretik a objevil se herpes zoster na hrudníku, v.s. nesouvisející s léčbou imatinibem.

V terapii imatinibem bylo v dávce 4 tbl. denně pokračováno až do prosince 2005, kdy při CT vyšetření byla konstatována v pravém mezogastriu recidiva Tu cca 5 cm v průměru (5,5 x 5,6 cm), navazující na tenkou kličku. V retroperitoneu ani v pánvi neshledány další patologické změny. Komise digestivní onkologie indikuje operační revizi s pokusem o reresekci recidivy. Pacientka byla přijata na chirurgické oddělení MOÚ 3.2.2006. Peroperačně nález odpovídá CT vyšetření, hlavní masa tumoru vyrůstá z mesenteria terminálního ilea odkud resekována, poté prokázána řada implantačních metastáz v omentu různé velikosti od několika mm do cca 1 cm, proto bylo omentum z větší části resekováno, další metastáza byla nalezena při kopuli céka – taktéž pro-

vedena resekce. Palpační revize jater byla bez průkazu diseminace, makroskopicky není zbytků tu v dutině břišní. Histologické vyšetření recidivy onemocnění prokazuje maligní gastrointestinální stromální tumor, c-kit pozitivní. Resekční linie střeva je masivně infiltrována tumorem. Metastázy na omentu a seróze střeva. Vzhledem k peroperačně neprůkaznému onemocnění a předchozí prokázané rezistenci na imatinib, byla pacientka v dalším období sledována.

V srpnu 2006 byla při CT vyšetření dokumentována masivní infiltrace v abdominální dutině a pánvi s infiltrací střevních kliček a mesenteria. Jelikož byla pacientka již refrakterní na imatinib, byla indikována paliativní terapie II. linie v rámci specifického léčebného programu preparátem Sutent® (sunitinib). Před zahájením terapie byla pacientka v celkově dobrém stavu, PS 1, v laboratoři mírná elevace kreatininu a normocytární normochromní anemie při základním onemocnění. Sunitinib byl podáván formou tablet v dávce 50 mg (2 tbl á 25 mg) 1x denně po 4 týdny, následující 2 týdny přestávka.

Po 2 cyklech terapie bylo provedeno kontrolní CT vyšetření. V dutině břišní byla zaznamenána výrazná regrese peritoneální metastatické diseminace, jsou diferencovatelné jen dvě drobné reziduální léze v pravém mezogastriu vel. kolem 12 mm. Pacientka tolerovala sunitinib dobře. Vyskytly se pouze nespecifické dyspeptické potíže, které po vysazení souběžné antidepresivní léčby pominuly, trombocytopenie G1 a typické kožní změny – prožloutnutí kůže, vybělení vlasů a obočí. Biochemické parametry zůstávají v normě. Pacientka dosud (k 31. 1. 2007) v léčbě pokračuje.



CT vyšetření před léčbou CT vyšetření po 12 týdnech léčby – CR

Obr. č. 1: Hodnocení efektu Imatinibu po 2 cyklech terapie

CT vyšetření před léčbou CT vyšetření po 2 cyklech terapie

Obr. č. 2: Hodnocení efektu Sunitinibu po 2 cyklech terapie

Závěr

Imatinib přinesl zásadní zvrat v léčbě gastrointestinálních stromálních tumorů a v současné době představuje v mnoha vyspělých zemích světa lék první léčebné linie pro léčbu lokálně pokročilých a metastatických GISTů. Sunitinib představuje další účinnou a dobře tolerovatelnou alternativu pro léčbu imatinib refrakterního metastatického nebo inoperabilního onemocnění. Pro tuto indikaci je v České republice zaregistrován.

V tomto směru nabízejí oba výše zmíněné inhibitory receptorů tyrosinkinázy značné naděje pro pacienty s GIST. Užívání tablet umožňuje ambulantní léčbu bez jakýchkoli složitých aplikačních systémů, s minimem nežádoucích účinků a tedy při zachování dobré kvality života léčených pacientů.

Literatura

1. Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M (2000): Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a special reference to CD 117 (KIT). Mod Pathol 13, 1134-1142.
2. Miettinen M, Lasota J (2001): Gastrointestinal stromal tumors-definition, clinical, histological, immunohistochemical and molecular genetic features and differential diagnosis. Virchows Arch 438, 1-12
3. DeMatteo RP, Lewis JJ, Lejny D, et al. (2000): Two hundred gastrointestinal stromal tumors: recurrence patterns and prognostic factors for survival. Ann Surg 231, 51-58
4. Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, et al. (2002): Efficacy and safety of imatinib mesylate (ST1571) in metastatic gastrointestinal stromal tumors. N Engl J Med, 347: 472-480.
5. Rankin C, Von Mehren M, Blanke C, et al. (2004): Dose effect of imatinib (IM) in patients (pts) with metastatic GIST – Phase III Sarcoma Group Study S0033. J Clin Oncol (Meeting Abstracts). 22(14 Suppl): 9005.
6. Verweij J, van Oosterom A, Blay JY, et al. (2003): Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stroma tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. Eur; J Cancor 39:2006-2011.
7. Verweij J, Casali PG, Zalcberg J, et al. (2004): Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomized trial. Lancet, 364: 1127-1134.
8. Demetri GD, Benjamin R, Blanke CD, et al. (2004): NCCN Task Force Report: Optimal management of patients with gastrointestinal stromal tumor (GIST) — Expansion and Update of NCCN Clinical Practice Guidelines. JNCCN, 2: S1-S26.
9. Demetri GD, Desai J, Fletcher JA, et al. (2004): SU11248, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, can overcome imatinib (IM) resistance cause by diverse genomic mechanisms in patients (pts) with metastatic gastrointestinal stromal tumor (GIST). J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 22 (14 Suppl): 3001.
10. Maki RG, Fletcher JA, Heinrich MC, et al. (2005): Results from a continuation trial of SU11248 in patients (pts) with imatinib (IM)-resistant gastrointestinal stromal tumor (GIST). J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 23 (16 Suppl): 9011.
11. Demetri G, van Oosterom A, Garrett C, et al. (2006): Improved survival and sustained clinical benefit with SU11248 (SU) in pts with GIST after failure of imatinib mesylate (IM) therapy in a phase III trial. 2006 Gastrointestinal Cancers Symposium. Abstract No: 8.
12. Casali PG, Garrett CR, Blackstein ME, et al. (2006): Updated results from a phase III trial of sunitinib in GIST patients (pts) for whom imatinib (IM) therapy has failed due to resistance or intolerance. J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 24(18_suppl):9513.

188 Maligní schwannom retroperitonea.

Louda M., Pacovský J., Holub L., Broďák M., Baker K.
Urologická klinika FN a LF UK v Hradci Králové

Úvod

Retroperitoneální maligní schwannom tvoří 0,01% retroperitoneálních nádorů s přežitím 5 roků méně jak 50% pacientů po radikální extirpaci(3).

RA: bez maligních onemocnění a pozoruhodností OA: stav po zánětu mozkových blan před 50 lety, hypochromní anemie, jinak se s ničím neléčil. Nekuřák, bez abusu návykových látek.

PA+SA: zámečník, žije s družkou

Anamnéza:

Pacient, 59 roků, vyšetřen na urologické ambulanci pro pravostrannou varikokelu. V rámci dovyšetření byla provedena ultrasonografie břicha. Zjištěn objemný tumor v oblasti pravé poloviny retroperitonea. Doplněno CT vyšetření, které potvrzuje nádorovou masu od renálních cév po oblast malé pánve k močovému měchýři. Odebrána perkutánní biopsie na spádovém pracovišti. Dle histologie vyslovena diagnóza neurinomu.

Vyšetření

RTG plic: bez metastáz

UZ retroperitonea: tumor retroperitonea vpravo, ledviny bez pozoruhodností

CT retroperitonea: tumor retroperitonea velikosti 28 cm, v jeho okolí velké množství tuku, svojí velikostí vytlačuje obsah pravé poloviny dutiny břišní do levé poloviny. Intimní vztah k dolní duté žíle.

Operace: extirpace tumoru retroperitonea vpravo

Histologie: nádor 250x170x150 mm, hmotnost 2978 g, uzlovitého vzhledu, makroskopicky dobře opouzdřen, v jeho okolí tuková tkáň.

Histologicky se nejspíše jedná o maligní schwannom-vřetenité buňky, jaderná pleomorfie a mitotická aktivita vysoká. Imunohistochemicky negativní průkaz S100 proteinu, Leu7, silně pozitivní vimentin, fokálně exprese desminu, proliferační antigen Ki 67 exprimován v 40-50% buněčných elementů (velmi vysoká proliferační aktivita). Jde o vysoce maligní sarkom, není možné jednoznačně rozlišit mezi maligním fibrózním histiocytomem-pleomorfní variantou, maligním nádorem z periferních nervů (maligní schwannom) a dediferencovaným liposarkomem. Vzhledem k fokální expresi PGP 9 a storiformnímu uspořádání s neurogenními rysy se kloníme k názoru, že jde o maligní schwannom.

Laboratoř: urea 4,5, krea 51, kyselina močová 282, jaterní testy v normě. KO: WBC 14,9, RBC 4,74, HGB 107, HCT 33%, PLT 488. Výsledek léčby:

Vzhledem k peroperačnímu a histologickému výsledku vyšetření se jednalo o radikální odstranění fokusu. Doporučena onkologická adjuvantní léčba. Pacientovi nabídnuta systémová léčba chemoterapií, v kombinaci MAID (uromitexan, doxorubicin, ifosfamid, dakarbazin), tuto opakovaně odmítnul. UZ břicha a retroperitonea pooperačně bez patologického nálezu. Po 3 měsících při pooperační kontrole provedeno CT břicha, na kterém nově nález infiltrace v mezenteriu tenkého střeva, velikosti 6x6 cm, zavzata i arteria mesenterica superior, nález operačně neřešitelný. Po 2 měsících kontrolním CT břicha potvrzena další progrese infiltrátu radixu mesenteria velikosti 9x7,5 cm s nárustem počtu uzlin v uvedeném prostoru, tyto do velikosti 10 mm, retroperitoneum a původní lůžko nádoru bez recidivy.

Závěr

U pacienta se jedná o maligní schwannom retroperitonea s časnou metastatickou progresí mimo původní lokalizaci nádoru. Adjuvantní onkologická léčba minimálně účinná(1). Pro lokalizaci vzdaleného ložiska není možná ani chirurgická terapie, která je jinak kurativní možností. Původně benigní histologická diagnóza neurinomu není v literatuře vyjímkou(2). Pacient bude dále uroonkologicky sledován.

Literatura

1. Pirayesh A., Chee Y., Helliwell T.R. et al.: The management of retroperitoneal soft tissue sarcoma: a single institution experience with a rewiew of the literature. Eur. J. Surg. Oncol., 2001, 27 (5), s. 491-7.
2. Saito R. et al.: Retroperitoneal malignant Schwannoma in the pelvis: a case report. Hinyokika Kiyo, 1997, 43, s. 25-8.
   Trifero M., Frattaroli F.M. Ciccone A.M. et al.: Retroperitoneal malignant schwannoma. Tumori, 1994, 80, s. 238-40.

XXII.
Nádory ledvin

189 Indikace radikální nefrektomie pro adenokarcinom ledviny klinických stadií III a IV.

Pernička J.
Urologická klinika Fakultní nemocnice Olomouc, přednosta: doc. MUDr. Vladimír Študent, Ph.D.

klíčová slova: nádory ledvin – radikální nefrektomie – adenokarcinom ledvin – přežití

Souhrn

Úvod
Při indikaci radikální nefrektomie u pokročilých a metastatických nálezů vyvstává otázka, zda náročným výkonem prodloužíme život a zlepšíme jeho kvalitu nebo jej náročnou operací pouze zatížíme bez výraznějších výhod.

Cíl
Cílem práce je předložit poznatky, které by na základě vyhodnocení a srovnání tříletého a pětiletého přežití nemocných v klinickém stadiu III a IV po radikální nefrektomii a bez ní, přispěly k rozhodování o indikaci operace lokálně pokročilých a generalizovaných světlobuněčných renálních karcinomů.

Materiál a metodika
Zpracována byla data nemocných klinických stadií III a IV, kteří byli vyšetřeni pro světlobuněčný renální karcinom v letech 1988 – 1999. Stadia byla přehodnocena dle TNM klasifikace z roku 2002. Je porovnáváno tříleté a pětileté korigované přežití v závislosti na provedení radikální nefrektomie. Při vyhodnocení byla použita Kaplan – Meierova metoda.

Výsledky
Při srovnání korigovaného přežití nemocných klinického stadia III s radikální nefrektomií a bez ní bylo zjištěno vyšší přežití nemocných po operaci o 49 měsíců, rozdíl však nebyl statisticky významný (p = 0,200). Stejné srovnání v klinickém stadiu IV prokázalo přežití 18,1 měsíců ku 14,6 měsícům ve prospěch nemocných po radikální nefrektomii. Statistická významnost rovněž nebyla prokázána (p = 0,215). Nemocní bez metastáz přežívají déle (po operaci 2,5 krát, bez operace 2 krát) než pacienti s generalizací.

Závěr
Na základě získaných výsledků lze u pokročilého nádoru ledviny operaci doporučit v klinickém stadiu III. I v klinickém stadiu IV může mít nemocný bez metastáz z operace prospěch. Indikace je vhodná u solitárních plicních metastáz a u ostatních plicních metastáz s možností adjuvantní léčby. Operace při vzdálených metastázách ve více orgánech není pro nemocného přínosem.

190 Radiologie v paliativní léčbě tumorů ledvin.

Válek V., Boudný J., Kiss I., Kala Z., Čermák A.
FN Brno

Možnost paliativní léčby nádorů ledvin radiologickými metodami je dvojí. První, již několik desítek let používanou metodou je embolizaci či chemoembolizace tumorů ledvin cestou ledvinně tepny. V posledních letech se využívá především chemoembolizace. K chemoembolizaci cestou renální tepny přistupujeme u nemocných s výrazně prokrveným primárním či sekundárním nádorem. K výkonu indikujeme nemocné s recidivou tumoru a nebo s radikálně neřešitelným nádorem. Princip chemoembolizace spočívá v aplikaci suspenze embolizačního materiálu (v tomto případě nejčastěji Lipiodol Fluid – LF nebo Lipiodol Ultra Fluid – LUF) a cytostatika. LUF (André Guerbet, Francie) je směs iodizovaného ethyl esteru (60%) a glycerin esteru (40%) makového oleje. Do renální tepny byl Lipiodol poprvé podán v osmdesátých letech. Lipiodol má dva hlavní efekty – zpomaluje arteriální cirkulaci a je koncentrován v nádorové tkáni. Suspenze Lipiodolu + cytostatika se při selektivní chemoembolizaci dostává do kapilár a tumor zcela vyplní. Postupně cévní kanály zcela blokuje a působí tak ischémii embolizované části tkáně, tedy především maligních ložisek. Cytostatikum podané arteriální cestou je účinnější než systémová chemoterapie. Chemoembolizaci provádíme katétrem, zavedeným koaxiálně Seldingerovou technikou do větví arteria renalis. Cytostatikum se obvykle smíchá s Lipiodolem v poměru 1:2. Množství podaného Lipiodolu nemá v jednom sezení přesáhnout 30ml. Suspenzi se snažíme podávat až do plného nasycení nádorové tkáně. Výkon zakončíme embolizací tepny Spongostanem. Výkon není trvalý, uzavření tepen je jen dočasné a výkon lze opakovat. Vhodný interval je 3 – 12 týdnů.

Mezi možné komplikace patří bolesti na hrudi či pod mečovitým výběžkem, dechové potíže, zhoršení jaterních testů, vznik abscesu, hematomu, plicní embolie a krev v moči.

Vedle embolizaci či chemoembolizace se v posledních letech jako paliativní výkon u nemocných s tumorem ledviny začíná prosazovat radiofrekvenční ablace (RFA). Při RFA tumorů ledvin se používá energie 150 W a frekvence proudu 300 – 500 kHz. K vlastní likvidaci tumoru dochází teplem, které vzniká při vibraci elektronů uvnitř tkáně, což podmiňuje právě vysokofrekvenční proud. Buňky v okolí nekryté elektrody jsou zahřívány na teplotu 50°C a více. Při této teplotě se začínají „rozpouštět a praskat" buněčné membrány a dochází k postupné denaturaci bílkovin a ireverzibilnímu zničení buněk. Při RFA dosahujeme v ložisku podle typu přístroje optimálně teploty mezi 70-90°C. Vlastní přístroj se skládá z radiofrekvenčního generátoru, aktivní a dispersivní elektrody. Jednotliví výrobci se především liší podle typu elektrody. Pochopitelnou snahou všech je zničit v játrech v co nejkratším čase co největší ložisko. Aktivní elektroda má tvar jehly o průměru 14-21 gauge. Jehlu zavádím pod kontrolou ultrazvuku, CT nebo magnetické rezonance. Elektroda může být monopolární nebo bipolární. Monopolární elektroda je při RF používaná běžně. Tato elektroda se zavádí tak, aby neizolovaný hrot byl v místě, kde je cílová léze. Přitom je nutné druhou velkou disperzní elektrodu přilepit pacientovi na kůži (většinou na stehno). Při použití bipolární elektrody je hrot druhé (uzemňovací, pasivní elektrody) umístěný asi 5 cm od aktivní elektrody. Vedle bipolární elektrody lze využít i multipolární systémy, které kombinují tři a více elektrod (přístroj CelonPOWER Systems, firma Olympus). Vždy vznikne uzavřený elektrický obvod.

Vzhledem k tomu, že tkáně ledviny má ve srovnání s kovovým hrotem elektrody vysokou elektrickou rezistenci, vyvolává proud, který prochází tkání v okolí hrotu elektrody agitaci a třením tak vzniká teplo, které může být přesně kontrolované nastavením radiofrekvenční energie. Toto ohřívání buněk vyvolává jejich nevratné změny. Výsledkem je koagulační nekróza. Rozsah tkáně, zničené kolem hrotu jehlové elektrody záleží jednak na dosažené teplotě a jednak na průběhu zahřívání tkáně.

U větších nádorů (nad 3cm) je optimální kombinace obou postupů. Důvodem je, že tumory ledvin a ledvina jako taková jsou výrazně překrvené a při termoablaci dochází k trvalému ochlazování nádorové tkáně krví. Při chemoembolizaci zase dochází k tvorbě kolaterál, které zásobují tumor z okolí. Tkáňové buňky jsou k chemoterapii výrazně citlivější, pokud jejich teplota stoupne na 42°C (tzv. využití hypertermie). Se zvyšující se teplotou se zkracuje doba potřebná ke zničení tkáně. Embolizovaná tkáň není prokrvená a při RFA nedochází k ochlazování. Čím hůře ale tkáň vede teplo, tím delší je čas nutný k dosažení dostatečné teploty v celém ložisku. Pokud je ložisko ochlazované (např. blízkost velkých cév) nebo dojde k vaporizaci (dojde v vytvoření bublin plynu okolo hrotu aktivní elektrody) či karbonizaci (dojde k zuhelnatění tkáně v okolí hrotu aktivní elektrody a tím k její izolaci), je dosažení potřebné teploty nemožné. Pokud ale teplota přesáhne 100 ° až 110°C dochází k odpařování tkáně (vaporizace) či k jejímu zuhelnatění (karbonizace). Pokud má být tkáň zničená dostatečně, je třeba, aby celé ložisko dosáhlo teplotu více než 50°C na 4-7 minut. Zvyšování teploty elektrody nad 100°C nemá vzhledem k riziku vaporizace a karbonizace smysl.

V našem sdělení na našem souboru 43 nemocných ukážeme výhody a nevýhody chemomebolizace a termoamblace a možnosti kombinace obou metod. Naše výsledky porovnáme s literárními údaji.

191 Biologická léčba renálního karcinomu.

Kocák I., Kocáková I., Lakomý R., Špelda S., Horová R.
Klinika komplexní onkologické péče, MOÚ, Brno

Ze světových i našich statistik vyplývá, že renální karcinom se stává neustále větší hrozbou. Je patrný nárůst především křivky incidence, mortalita mírně klesá. Ve srovnání se statistikami ze Spojených států je v našem regionu nejhorší poměr mezi incidencí a mortalitou. Není zcela jasné, co je příčinou tohoto jevu, je ale zřejmé, že za mortalitu odpovídá vysoké procento pokročilých onemocnění.

Pokročilé onemocnění renálním karcinom je definováno jako T4 N0 M0 či jakékoliv T a N a M1. Většina těchto pacientů je považována za nevyléčitelné. Inoperabilní onemocnění je doménou systémové léčby. Chemoterapie neprokázala významnější terapeutické účinky. Za slibnější byla dosud považována imunotetrapie. V randomizovaných trialech SWOG 8949/EORTC 30947 byl za základ systémového působení zvolen interferon alfa 2b. Cílem bylo zhodnotit, zda cytoreduktivní nefrektomie dokáže zlepšit terapeutické výsledky. Byl stanoven předpoklad, že cytoreduktivní nefrektomie může zlepšit imunitní odpověď organismu a tím dosažené celkové odpovědi. Medián přežití u pacientů s nefrektomií byl 13,6 měsíců vedle 7,8 měsíců u pacientů bez nefrektomie. Na základě těchto výsledků je dnes obecně připouštěn fakt, že nefrektomie má předcházet imunoterapii. Další imunogenní látkou v léčbě metastatického renálního karcinomu je interleukin 2 (IL-2). Tento dosahuje přibližně stejný počet celkových odpovědí jako interferon alfa, tj. kolem 15%, 7% dosahuje kompletních remise (CR). Významné bylo zjištění, že existuje část pacientů, kteří významně profitují z dosažené CR. Asi u 60% z této skupiny nebyl v desetiletém sledování zachycen relaps onemocnění. Dosavadní léčebné zkušenosti metastatického renálního karcinomu tedy lze shrnout, že je dosahováno malého procenta navozených remisí onemocnění a u velmi malé skupinu pacientů lze dosáhnout téměř kurabilních výsledků.

Renální karcinom se stal v poslední době objektem zájmu při využití nových, biologických léků. Antiangiogenního účinku prostřednictvím inhibice proteinu VEGF je využito u bevacizumabu, inhibice intracelulární části tyrosinkinásových receptorů pro VEGF, PDGFR aj. se využívá u tzv. malých molekul jako jsou sunitinib, sorafenib, valatinib, axitinib. Blokáda intracelulární části receptorů pro PDGF a VEGF na pericytech a endoteliích vede k inhibici signálních cest vedoucích k nádorové angiogenezi.

Výsledky léčby sunitinibem dokumentovaly dva trialy fáze II. Oba trialy zařazovaly pacienty předléčené imunoterapií, v trialu II bylo v zařazovacích kritérií požadováno radiografické stanovení progrese onemocnění a nutnost předchozí nefrektomie.

Oba téměř shodně vykazovaly dosažené odpovědi (trial I: 36%, trial II: 35%), trvání odpovědi v trialu II bylo publikováno 27 týdnů, v trialu I pak 54 týdnů.

Výborné výsledky dosažané u předléčených pacientů iniciovaly vznik randomisovaného trialu fáze III, kde sunitinib byl randomisován s interferonem alfa (IFN alfa) u pokročilého renálního karcinomu dosud nepředléčeného. Výsledky byly demonstrována na ASCO 2006. Celkem bylo zařazeno do obou ramen 750 pacientů, k době hodnocení bylo 632 na živu. Doba do progrese v rameni se sunitinibem byla 47,3 měs. proti 27,9 měs. v rameni s IFN alfa. V celkové odpovědi u sunitinibu bylo dosaženo 35,7% proti 8,8% v rameni s IFN alfa. V době hodnocení zemřelo 49 pacientů mezi léčenými sunitinibem a 65 pacientů léčených IFN alfa.

Na základě těchto výsledků se stal sunitinib registrovaný pro II. linii léčby pro pokročilý renální karcinom v USA i v EU, pro I. linii léčby byl již zaregistrován v USA.

My jsme měli možnost podávat sunitinib u pacientů s generalizovaným renálním karcinomem předléčených imunoterapií v rámci specifického léčebného programu. Do léčby bylo zařazeno celkem 14 pacientů, hodnoceno pro efekt bylo 13 pacientů. Nábor pacientů probíhal v období 3.2006 do 10.2006. Jednalo se o pacienty předléčené imunoterapií nebo imunoterapií a chemoterapií. Sunitinib byl podáván standardně v dávce 50 mg/den, doba podávání byla 28 dnů, interval 6 týdnů. Průměrný počet podaných cyklů k 31.1.2007 byl 4,5 cyklu. Efekt léčby byl hodnocen po 2-3 cyklech.

Nejlepší dosažené odpovědi byly u sledované skupiny progrese onemocnění 2x, stabillisace onemocnění 7x, parciální remise 4x. Léčba byla ukončena dosud u 5 pacientů, u čtyřech byl důvod k ukončení stanovení progrese, u jednoho pacienta po 5 cyklech vzniklá intolerance. Maximálně počet podaných cyklů byl dosud v léčené skupině celkem šest a to u pěti pacientů, kteří dále pokračují v léčbě.

Stran nežádoucích účinků byla popsána únava, slabost, bolesti svalů, kloubů, hypertenze. Výrazné byly kožní a pigmentové projevy. U pacientů docházelo k vybělení vlasů, obočí, řas a žluté zbarvení kůže, nejvíce patrné v obličeji. Toto nebylo v souvislosti se zvýšenou hladinou bilirubinu, po vysazení léčby v mezidobí mezi jednotlivými cykly barevný kolorit kůže vymizel. Z kožních projevů byly dále popsány lehčí exantém a projevy hand foot syndromu – zarudnutí plosek a dlaní, lehčí puchýřnaté projevy na konečcích prstů s naznačeným nebolestivým olupováním kůže. Ze slizničních projevů byly většinou patrné pouze známky přecitlivělosti dutiny ústní, bez ulcerací či superinfekcí. Pouze u jedné pacientky bylo zaznamenáno závažnější krvácení ze sliznice ústní, vedoucí po prvním cyklu k přerušení léčby. Stav nebyl v přímé souvislosti s výrazným poklesem trombocytů ale s pokročilou paradentosou. Z laboratorních projevů byly zaznamenány lehčí leukopenie, u jedné pacientky byla vedle hypertenze, trombocytopenie G 3, hepatotoxicita s icterem důvodem k vyřazení ze studie po pěti cyklech studiové léčby. Nevolnost popisovaná pacienty byla vesměs lehčí, intenzita nevolnosti byla přímo úměrná rozsahu onemocnění. U pacientů v celkově dobrém stavu, nebyly nežádoucí účinky na překážku k dlouhodobému podávání medikace.

192 Efekt sorafenibu v druhé linii biologické léčby u metastazujícícho světlobuněčného karcinomu ledviny – kasuistika.

Matějů M.[1], Zemanová M.[1], Vondráčková M.[2]
1) Onkologická klinika 1. LF UK a VFN, Praha
2) Radiodiagnostická klinika 1. LF UK a VFN, Praha

Úvod

U nemocných s metastazujícím karcinomem ledviny (MRCC) je standardním léčebným postupem imunoterapie cytokiny, která podle posledních dat má příznivý vliv na prodloužení přežití jen u nemocných v dobré prognostické skupině dle MSKCC *(6)*. U pacientů střední a špatné prognostické skupiny nepřináší léčba cytokiny zřejmě žádný prospěch [1].

V posledních letech se klinický výzkum zaměřuje na cílenou biologickou léčbu MRCC na podkladě zjištění, že zejména proliferace nádorů se světlobuněčnou histologií, převažující v 75%, je spojena s patologickou vaskularizací na trase: mutovaný tumorsupresorový gen von Hippel-Lindau – hypoxií indukovaný faktor 1-alfa – vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) – z destiček odvozený růstový faktor (PDGF) [2].

Randomizovaná studie porovnávající nízkomolekulární perorální inhibitor tyrosinkináz pro VEGF/PDGF sunitinib s interferonem alfa u pacientů střední prognostické skupiny prokázala zdvojnásobení přežití bez progrese na 0,000001 hladině významnosti a vedla k doporučení zařadit sunitinib do standardní léčby 1. linie [3]. Podobně si vedl u nemocných ve skupině se špatnou prognózou inhibitor mTOR – temsirolimus [4]. Léčba rovněž tabletovým sorafenibem, u něhož je kromě tyrosinkináz VEGF a PDGF inhibována také serin/threonin kináza RAF-1, vedla k významně delšímu přežití bez progrese proti placebu v 2. linii ($p < 0,00001$) [5], a tento preparát již byl v této indikaci registrován v USA a EU. Dále jsou ve vývoji např. AG-013736 (četnost odpovědí 46%) nebo sunitinibu velmi podobný pazopanib. Na základě dostupných dat je těžké rozhodnout, která z těchto látek je lepší, jsou zde také rozdíly v profilu nežádoucích účinků, nevíme, zda bude dosaženo trvalých remisí.

Otázkou zůstává, zda tyto biologické látky mají zkříženou resistenci, či zda bude léčebný efekt dosažen také při jejich sekvenčním podání po selhání jednoho z nich. Zajímavou klinickou zkušenost podává tato kasuistika.

Anamnéza

33letá žena, nekuřačka, bezdětná, bez rodinné zátěže zhoubných nádorů, nikdy vážněji nestonala. Obtíže od 4/2006, kdy si všimla bulky v pravém nadklíčku, ve stejnou dobu se objevily bolesti v pravé kyčli. Na CT hrudníku a břicha byla nalezena mnohočetná plicní ložiska pravděpodobně metastatického původu, mediastinální lymfadenopatie a expanze na pravé ledvině s prorůstáním do jater. Další vyšetření později zjistila také metastázy ve skeletu s postižením pravé kyčelní oblasti, pravého sakroiliakálního skloubení a levého kolene. V oblasti pravé poloviny pánve a pravého stehna se rozsáhlá nádorová infiltrace šířila ze skeletu do okolních měkkých tkání. Pro patologickou frakturu krčku pravého femoru bylo indikováno chirurgické řešení a 27.6.06 byla provedena osteosyntéza bez odběru materiálu na histologii. S ohledem na celkový stav (kachexie, anemie, rozsah metastáz) nebyla doporučena nefrektomie. 19.7.2006 byla pro morfologickou verifikaci provedena excise podkožního ložiska vlevo v lumbální krajině, histologie potvrzuje diagnózu světlobuněčného karcinomu.

Léčba

Podle MSKCC prognostických kriterií [6] byla pacientka klasifikována do skupiny se špatnou prognózou, léčba cytokiny byla kontraindikována. Byla zahájena terapie bisfosfonáty, která pokračuje stále. Po podpisu informovaného souhlasu a splnění vstupních kriterií byla zařazena do klinické studie s duálním inhibitorem tyrosinkináz VEGF/PDGF. Byla v celkovém stavu dle WHO PS 2, anemická (hgb 97), s hypoproteinémií a počínajícími příznaky syndromu horní duté žíly s otékáním obličeje a rozšířením žilní pleteně na hrudníku. Analgeticky užívala transdermální fentanyl 25 μg/h, meloxicam 15 mg denně, nimesulid dle potřeby. V den zahájení terapie 16.8.06 měla pacientka tento nález na CT: paket infiltrovaných uzlin v mediastinu 53 mm, uzliny prorůstají do horní duté žíly a z větší části obturují lumen, uzliny v pravém plicní hilu 24 a 22mm, uzlina dorsálně od bronchus intermedius 18 mm. Uzliny v levém plicním hilu 19 mm a 23 mm. V pravém střední plicním laloku ložiska 13 a 18 mm, dále v pravém plicním křídle 4 ložiska do 10 mm, vlevo jedno ložisko do 10 mm. Pravostranný fluidothorax, dorsobasálně 33 mm. Objemný tumor pravé ledviny, prorůstající do pravého laloku jaterního, s centrální nekrosou, velikost 100 mm. Samostatný shluk metastas v dolním cípu pravého laloku jaterního 60 mm. Neměřitelné metastasy v křížové kosti vpravo a v horním konci pravého femoru s částečnou infiltrací svalů stehna.

Tolerance této tabletové terapie byla dobrá, zcela bez nežádoucích účinků. Po krátkém ústupu některých symptomů, zejména projevů syndromu horní duté žíly, a normalizaci hemoglobinu a celkové bílkoviny po 4 týdnech podávání, byla po 8 týdnech podávání preparátu zjištěna progrese, zejména v oblasti pravé dolní končetiny (PDK) a pánve (kontrolováno CT). Následně byla indikována paliativní radioterapie (24Gy/4frakce/2týdny, do 13.11.07) na oblast maxima postižení v oblasti PDK a pravé poloviny pánve, kde byla rozsáhlá nádorová infiltrace skeletu i měkkých tkání. Došlo k mírnému ústupu bolesti a rozsahu infiltrace, pacientka však byla PS 3, kachektická, anemická (hgb 88), se spotřebou opioidů: transdermální buprenorfin 140 μg/h + morphin p.o. 3-4x 20 mg denně, trvale upoutána na lůžko.

Od 24. 11. byla zahájena terapie sorafenibem 800 mg denně p.o. Již po 3 týdnech užívání došlo k významnému ústupu bolestí a infiltrace PDK. Nežádoucí účinky byly minimální – elevace transamináz do 1,5 násobku normy, vzestup TK normalizovaný po nasazení ramiprilu 2,5 mg denně. Na kontrolním CT po 10 týdnech užívání byla zjištěna parciální remise všech lokalizací: Infiltrované uzliny v nadklíčkové oblasti vpravo, v mediastinu a hilové uzliny změnily strukturu, jsou výrazně hypodensní s jemným hyperdensním lemem. Všechny uzliny se o poznání změnšily. Některá ložiska v plicním parenchymu zcela vymizela, jiná změnila charakter, nejsou ostře ohraničená, mají spíše charakter drobných infiltrátů. Tekutinu v pleurálních dutinách neprokazujeme. Objemný tumor pravé ledviny, prorůstající do pravého laloku jaterního, celý výrazně hypodensní struktury s jemným lemem a septy, v průměru 10 cm. Samostatný shluk metastas v dolním cípu pravého laloku jaterního opět hypodensní struktury. Kostní metastasy jsou též hypodensní struktury s jemným lemem, v oblasti křížové kosti se o poznání zmenšily, výrazně se zmenšily v úrovni horní poloviny stehna, proti předchozímu vyšetření je nové ložisko při mediodorsální straně femoru v měkkých tkáních na rozhraní střední a distální třetiny, dosahuje v průměru 40 mm, je hypodensní s lemem. Proti předchozímu vyšetření se podstatně zmenšila masa v oblasti acetabula, postavení hlavice stehení kosti se vrací k normě. Došlo k normalizaci KO a sérové hladiny albuminu, snížení dávky opioidů na cca 30% maximální užívané dávky a vzestupu celkové kondice na PS 1.

Závěr

Tato kasuistika prokazuje, že různé multikinázové inhibitory mohou mít účinek v sekvenčním podání, a že selhání jednoho neznamená resistenci na jiný cílený preparát. V tomto případě je zřejmě rozhodující rozdíl v rozsahu inhibice signálních tras, u sorafenibu je inhibována kromě tyrosinkináz VEGF a PDGF navíc ještě serin/threonin kináza RAF-1. Optimální způsob kombinace cílených léků u MRCC musí být ověřen v klinických studiích.

Literatura

1. Negrier S for the Groupe Francais d'Immunotherapie: Cytokines in metastatic renal cell carcinoma: conclusions from the French Percy program. Ann Oncology 2006, 17: suppl 9, ix32-33
2. Motzer RJ: Targeted therapy for matastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol 24:5601-5608.*
3. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al: Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med 2007;356:115-24.

4. Hudes G, Carducci M, Tomczak P et al. A phase 3, randomized, 3-arm study of temsirolimus (TEMSR) or interferon-alpha (IFN) or the combination of TEMSR + INF in the treatment of first-line, poor-ris patients with advanced renal cell carcinoma. J Clin Oncol 2006, 24: 18S, part II: 930 s
5. Escudier B, Eisen T, Stadlert W: Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. N Engl J Med 2007;356: 125 -34
6. Motzer RJ, Bacik J, Mazumdar M Prognostic factors for survival of patients with stage IV renal cell carcinoma: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. Clin Cancer Res 2004, 10:6302s-6303s.

193 Primitivní neuroektodermální tumor ledviny (PNET).

Ürge T.[1], Hora M.[1], Eret V.[1], Hes O.[2], Votavová M.[3], Bulka J.[4]
LFUK a FN Plzeň
1) Urologická klinika FN Plzeň
2) Šiklův patologickoanatomický ústav
3) Onkologické a radioterapeutické oddělení
4) Radiodiagnostické oddělení

Úvod

Primární PNET ledviny je velmi vzácný nádor, vyskytující se spíše u mladších nemocných průměrného věku 28 let (4 – 69 let). Vzniká dediferenciací neuroektodermálních buněk. Je zařazen do skupiny tzv. kulatobuněčných nádorů. Jedná se o prognosticky velmi pestrou skupinu nádorů lišících se terapií, proto je nutná exaktní histopatologická diferenciální diagnóza pomocí imunohistochemických metod. PNET býval dříve označován také jako Ewingův sarkom. Nejčastěji postihuje gastrointestinální trakt. Prezentujeme kasuistiku 42letého pacienta s PNET ledviny.

Kasuistika

Pacient byl prosinci 2004 vyšetřen pro makroskopickou hematurii s renálními kolikami vpravo. Na CT byl popsán 75mm tumor pars intermedia pravé ledviny denzity 80HU. Byla provedena transperitoneálním nefrektomie. Histologicky se jednalo o PNET stádia pT2N0M0, který byl pozitivní v reakci s vimentinem a MIC2, negativní pak s S100, EMA, LCA. Pooperační průběh byl komplikován poruchou pasáže. V únoru byl vyšetřován pro bolesti pravé poloviny břicha, febrilie. Pro flegmonózní apendicitidu byla provedena apendektomie. V období od března 2005 do ledna 2006 bylo podáno 7 sérií chemoterapie (VAC). Pacient je 23 měsíců od operace bez známek recidivy či metastatického postižení.

Závěr

Do současnosti bylo prezentováno ve světové literatuře pouze 51 nemocných s primárním PNET ledviny. Pomocí zobrazovacích metod nelze odlišit od dalších nádorů ledvin. Chirurgická léčba je stejná jako u jiných nádorů ledvin. Vzhledem k literárně udávanému agresivnímu chování nádoru se doporučuje adjuvantní chemoterapie. U několika případů stádia pT1NXM0 byla provedena pouze nefrektomie. Vzhledem ke krátké době dispenzarizace, je prognóza našeho nemocného stále nejistá.

Práce byla podpořena projektem MSM 0021620819

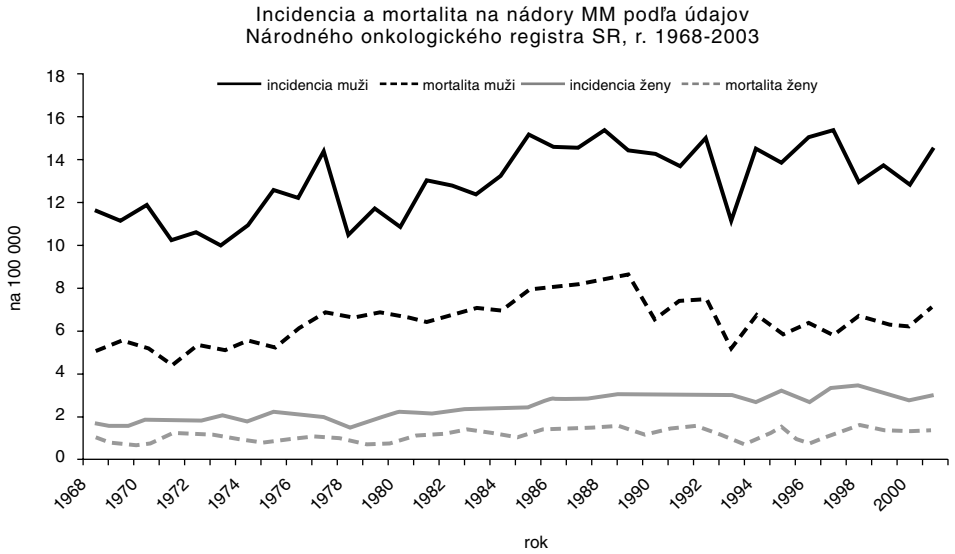
XXIII.
Nádory močového měchýře

194 Trendy výskytu mortality nádorov močového mechúra v SR a vývoj ich histologických klasifikačných systémov.

Ondruš D.[1], Ondrušová M.[2,3], Galbavý Š.[4], Horňák M.[5]
1) I. onkologická klinika LFUK a OÚSA
2) Národný onkologický register SR, NCZI
3) Oddelenie epidemiológie nádorov ÚEO SAV
4) Ústav laboratórnych vyšetrovacích metód LFUK a OÚSA
5) Urologická klinika LFUK
FNsP Bratislava-pracovisko Kramáre, Bratislava

Úvod

Zhubné nádory močového mechúra, ktoré tvorí spektrum ochorení charakterizovaných rozdielnym morfologickým obrazom s rozdielnym klinickým priebehom a prognózou, sú najčastejšími nádormi uropoetického systému. Ich podiel na všetkých zhubných nádoroch predstavoval v celosvetovom meradle okolo roku 2000 3,28%. Najvyššie hodnoty incidencie sú v západnej Európe a severnej Amerike, nanižšie v ázijských krajinách. Aj napriek tomu, že sa incidencia nádorov močového mechúra celosvetovo mierne zvyšuje u oboch pohlaví predovšetkým vo vyspelých krajinách, na Slovensku sa posledných 30 rokov zaznamenal stabilizovaný trend tak incidencie, ako aj mortality. Nádory močového mechúra sú asi 4-krát častejšie u mužov, ako u žien. Hodnotami incidencie 14,3/100 000 u mužov v SR (20,8/100 000 v ČR), resp. 3,7/100 000 u žien v SR (5,4/100 000 v ČR) v roku 2003 sa zaraďujeme medzi krajiny so stredným až nižším výskytom tohto ochorenia. Úmrtnosť na nádory močového mechúra dosiahla v r. 2003 5,8/100 000 mužov (6,5/100 000 v ČR) a 1,5/100 000 žien (1,5/100 000 v ČR) (graf 1). Krivky špecifickej incidencie a mortality so vzostupom po 5. dekáde a maximálnou kumuláciou v najvyšších vekových skupinách sú typické nielen na Slovensku, ale aj v celosvetovom meradle. Väčšina pacientov s novozisteným nádorom močového mechúra je vo veku 50-70 rokov, výskyt pred 40. rokom života je zriedkavý.



Väčšina nádorov močového mechúra je epitelového pôvodu, z nich vyše 90% predstavujú nádory z urotelu. Autori prekladajú historický vývoj histologických klasifikácií nádorov močového mechúra. Revolučný krok v snahách o roztriedenie nádorov močového mechúra priniesla práca Jewetta a Stronga (1946) o vzťahu medzi hĺbkou prerastania nádoru stenou močového mechúra a závažnosťou ochorenia. Táto štúdia sa stala základom klasifikácie Marshalla a Jewetta (Marshall, 1956), Inštitútu urológie v Londýne a iných, až po klasifikáciu UICC (1963). V čase, keď sa v spolupráci s Urologickou klinikou LFUK v Bratislave začala v roku 1964 u nás používať klasifikácia UICC, ešte neexistovala nijaká medzinárodne uznaná histologická klasifikácia. Veľká roztrieštenosť v názoroch na nádory močového mechúra viedla k tomu, že veľa autorov si vytvorilo vlastnú klasifikáciu. A tak sa stalo, že rôzni odborníci (urológovia aj patológovia) aj v tej istej krajine používali rozličné klasifikácie. Preto pri výbere histologickej klasifikácie bola myšlienka vybrať takú klasifikáciu, o ktorej bolo možné právnom predpokladať, že jej uplatnenie bude čo najširšie. Takouto klasifikáciou bola klasifikácia Inštitútu urológie v Londýne (Pugh, 1959). Patológ tohto inštitútu RCB Pugh bol vtedy členom komisie WHO, ktorá pripravovala definitívnu medzinárodnú histologickú klasifikáciu nádorov močového mechúra. Dukes (1959) rozlišoval trojstupňovú diferenciáciu (papilóm, dobre diferencovaný a slabo diferencovaný karcinóm). Pugh včlenil medzi 1. a 2. stupeň pojem „atypický papilóm“ a medzi 2. a 3. stupeň pojem „intermediárny karcinóm“. Túto klasifikáciu prevzal a zaviedol do praxe u nás Ondruš (1968). Bergkvist a spol. (1965) ohraničili nádory močového mechúra histologic-

kou 5- stupňovou diferenciáciou (stupeň 0-5, papilóm zodpovedal bodu 0), na základe bunkovej štruktúry. Kľúčovou bola prvá WHO-klasifikácia pre nádory močového mechúra (Mostofi a spol., 1973), ktorí prevzali Pughovo 5-stupňové členenie, len jednotlivé stupne označili pojmami – stupne malignity (tab. 1). Táto klasifikácia sa s minimálnymi obmenami používa dodnes.

1. papilóm	1. papilóm
2. atypický papilóm	2. karcinóm I. stupňa malignity
3. dobre diferencovaný karcinóm	3. karcinóm II. stupňa malignity
4. intermediárny karcinóm	4. karcinóm III. stupňa malignity
5. málodiferencovaný (anaplastický) karcinóm	5. nediferencovaný karcinóm

Tabuľka 1: Histologické klasifikácie nádorov močového mechúra (Pugh, 1959; Mostofi a spol., 1973)

Ten istý expert inicioval v 1997 a 1998 schôdzu expertov WHO/ISUP kvôli novej terminológii (Epstein a spol., 1998) s cieľom dosiahnutia všeobecne akceptovanej a zjednodušenej schémy, nakoľko klasifikačné systémy pre nádory močového mechúra používajú nielen patológovia, onkológovia, ale najmä urológovia (tab. 2).

Normálny epitel
- Normálny urotel (zahŕňa prípady predtým označované ako „ľahká dysplázia“)

Hyperplázia
- Plochá hyperplázia
- Papilárna hyperplázia

Atypické ploché lézie
- Reaktívna (zápalová) atypia
- Atypia neurčitého významu
- Dysplázia (intraurotelová neoplázia nízkeho stupňa malignity)
- Carcinoma in situ (intraurotelová neoplázia vysokého stupňa malignity)

Papilárne nádory
- Papilóm
- Invertovaný papilóm
- Papilárna neoplázia s nízkym malígnym potenciálom (papillary neoplasm of low malignant potential)
- Papilárny karcinóm nízkeho stupňa malignity (low grade papillary urothelial carcinoma)
- Papilárny karcinóm vysokého stupňa malignity (high grade papillary urothelial carcinoma)

Invazívne nádory
- Invázia lamina propria
- Invázia muscularis propria

Tabuľka 2: WHO/ISUP klasifikácia nádorov močového mechúra

Najnovšia WHO klasifikácia (tab. 3) sa výrazne neodlišuje od WHO-ISUP klasifikácie z 1998 a reflektuje dohodu pracovnej skupiny uropatológov z „Editorial and Consensus Conference“ v Lyone z decembra 2002 (Eble a spol., 2004).

Nová WHO klasifikácia (2004) umožňuje používať jednotnú terminológiu nádorov močového mechúra. Obsahuje aj zreteľne definované podskupiny, čo dovolí v budúcnosti porovnávať jednotlivé svetové štúdie navzájom a presne určiť rizikové profily.

V novej klasifikácii sa ruší delenie na povrchový a invazívny nádor, odporúča sa delenie na neinvazívny a invazívny. Doteraz používaný povrchový nádor štádia T1, podľa novej klasifikácie patrí medzi invazívne nádory. Nový pojem papilárna urotelová neoplázia s nízkym malígnym potenciálom (PUNLMP) zodpovedá predchádzajúcemu TaG1, pojem neinvazívny papilárny urotelový karcinóm nízkeho stupňa malignity (LGPUC) zodpovedá malej časti pTaG1 a veľkej časti pTaG2 nádorom a pojem neinvazívny papilárny urotelový karcinóm vysokého stupňa malignity (HGPUC) zodpovedá malej časti pTaG2 a všetkým pTaG3 nádorom (WHO, 1973). Prítomnosť epidermoidnej alebo žľazovej zložky sa podľa novej klasifikácie nepovažuje za metapláziu, ale ide o epidermoidnú alebo žľazovú diferenciáciu, ktorá predstavuje horšiu prognózu, ako čistý nádor.

Ciele

Cieľom práce je prezentácia novej klasifikácie s jej zmenami v porovnaní s predchádzajúcimi klasifikačnými systémami urotelových nádorov močového mechúra na vlastnom súbore pacientov z rokov 1968-2003 s dôrazom na histologický typ, stupeň,

nakoľko sa predpokladá, že až do doby definitívneho „zažitia“ novej klasifikácie bude sa súbežne používať aj naďalej WHO- klasifikácia z roku 1973.

Neinvazívne urotelové neoplázie
Papilárne
Papilóm
Invertovaný papilóm
Papilárna urotelová neoplázia s nízkym malígnym potenciálom (PUNLMP)
Neinvazívny papilárny karcinóm nízkeho stupňa malignity
Neinvazívny papilárny karcinóm vysokého stupňa malignity
Nepapilárne
Intraurotelová neoplázia vysokého stupňa malignity – carcinoma in situ
Invazívne (infiltrujúce) nádory
Invázia lamina propria mucosae
Invázia lamina muscularis propria
Invázia perivezikálneho tkaniva a okolitých orgánov

Tabuľka 3: 2004 WHO klasifikácia nádorov močového mechúra

Materiál a metódy

V skupine 1320 pacientov, u ktorých sa v rokoch 1968-2003 diagnostikoval a liečil nádor močového mechúra boli hodnotené a reklasifikované bioptické nálezy materiálu získaného pomocou transuretrálnej resekcie primárneho nádoru.

Výsledky

Súbor tvorilo 1004 mužov (76,1%) a 316 žien (23,9%). Priemerný vek mužov bol 62,6 rokov (rozpätie 18-90 rokov), priemerný vek žien 65,5 (rozpätie 24-96 rokov). Celkové 5-ročné prežívanie dosahovalo okolo 60% mužov u žien 55% žien. Papilárny vzhľad nádoru bol v 856 (64,8%), solídny v 304 (23%), zmiešaný v 157 (12%) a neurčený a iný typ v troch prípadoch (0,2%). Histologický typ: nádor z urotelu (čistý alebo so skvamocelulárnou alebo žľazovou diferenciáciou) – 1282 (97,1%), skvamocelulárny – 13 (1,0%), žľazový – 6 (0,5%), neurčený a iný typ -19 (1,4%). Grading: papilóm – 50 (3,8%), grade 1 (PUNLMP) – 361 (27,3%), grade 2 (LGPUC) – 729 (55,2%), grade 3 (HGPUC) – 158 (12%), grade 4 (nediferencovaný karcinóm) – 22 (1,7%). Neinvazívne (Ta) 587 (44,5%), invazívne: neprenikajúce za lamina propria (T1) 326 (24,7%), prenikajúce do svaloviny 139 (T2) (10,5%), s inváziou do perivezikálneho tkaniva (T3) 219 (16,6%), s inváziou do prostaty alebo uteru alebo vagíny (T4) 6 (0,5%). V 43 prípadoch (3,2%) nebolo možné hĺbku invázie posúdiť.

Záver

WHO klasifikácia nádorov močového mechúra z roku 2004 poskytuje spoločnú terminológiu a všeobecné definície pre široké spektrum patológov. Predstavuje klasifikačný konsensus medzi cytológiou a histopatológiou. Umožňuje objektivizovanie prognózy pacientov s neinvazívnym nádorom na základe metód molekulárnej genetiky: za geneticky stabilné neoplázie sa považuje PUNLMP (TaG1) a LGPUC (G1-2), za nestabilné, s horšou prognózou sa považuje CIS a HGPUC (G2-3).

Práca potvrdila, že rôzne črty nádorov močového mechúra, stanovenie ktorých je možné len bioptickým vyšetrením, majú rozdielny prognostický význam s vplyvom na prežívanie pacientov. Komplexnú liečbu nádorov močového mechúra možno vykonávať len na základe multidisciplinárnej spolupráce-urológa, patológa, onkológa (rádioterapeuta) a v súčasnosti aj onkológa (chemoterapeuta).

195 Faktory ovlivňující vznik karcinomu močového měchýře.

Katolická J., Rovný A., Filipenský P.
Fakultní nemocnice u svaté Anny, Brno

Epidemiologie karcinomu močového měchýře je v České republice velmi podobná situaci v USA. V roce 2002 bylo ve Spojených státech přibližně 56,500 nových případů onemocnění nádorem močového měchýře a 12,600 nemocných na tuto diagnosu zemřelo. Toto číslo představuje 4,4 procenta všech nádorových onemocnění a 2,3 procenta všech úmrtí na nádorová onemocnění. Karcinom močového měchýře častěji postihuje muže. Incidence mezi ženami je stoupající. Poměr postižení muži : ženy u invazivního karcinomu je 4:1, poměr postižení neinvazivním karcinomem je 2,7:1. U obou pohlaví je kouření velmi důležitým faktorem pro vznik tohoto nádorového onemocnění. Stran pracovní expozice – ve Spojených státech je to 11% žen a 21% mužů. U žen je ale častěji iniciálně diagnostikováno pokročilejší stadium nemoci.

Kouření cigaret je primární rizikový faktor pro vznik karcinomu močového měchýře, riziko jeho vzniku je u kuřáku 5- krát vyšší než u nekuřáků. Téměř polovina (47%)mužů a 37% žen zemřelých na karcinom močového měchýře ve Spojených státech byli kuřáci. Cigaretový kouř obsahuje široké spektrum chemických karcinogenů, zahrnujících polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy a N-nitroso sloučeniny, které po metabolické transformaci katalyzované specifickými enzymy mohou vytvářet reaktivní metabolity schopné navázat se na DNA uroteliálních buněk a tak vyvolat její mutagenní změny.

Vyšší riziko onemocněním karcinomem močového měchýře provází i některá *zaměstnání:* výrobci barev, zpracovatelé hliníku, pracovníci v kožedělném a gumárenském průmyslu, malíři, řidiči kamionů a nákladních vozů.

Závislost mezi *pitím kávy* a karcinomem močového měchýře není jednoznačná. Ty práce, které tento předpoklad potvrdily, poukazují na možnost vlivu kofeinu v souvislosti s dalšími chemickými látkami a pracovním prostředím, ve kterém se nemocný nachází.

Vztah mezi pitím kávy a karcinomem močového měchýře je přibližně dvakrát vyšší u žen (5,2) než u mužů (2,6).

Tak jednoduché opatření v prevenci, jako je pití většího *množství tekutin* (zejména vody), má skutečný dopad na snížení incidence karcinomu močového měchýře.

Konzumace alkoholu zřejmě riziko toho nádorového onemocnění nezvyšuje. Ojedinělé starší studie našly mírně zvýšené riziko u silných pijáků piva, eventuelně dělníků v pivovarech: za možné karcinogeny byly pokládány sloučeniny arzenu uvolňované ze speciálně konzervovaných dřevěných pivních sudů.

Jistý efekt na vznik karcinomu močového měchýře má i předchozí *ozařování pánve* – zejména u žen po radioterapii pro karcinom čípku děložního. Z cytostatik je to podávání *cyklofosfamidu* (jeho nežádoucím účinkem je hemoragická cystitída), z dalších léků především analgetika obsahující *fenacetin*. Byl prokázán vztah mezi častějšími *infekcemi urinárního traktu* a karcinomem. Role lidského papiloma viru, který se uplatňuje u karcinomu cervixu u žen, ale prokázaná nebyla.

Vitamíny jsou intenzivně studovány v řadě studií v prevenci karcinomu močového měchýře.

Je důkaz o chemoprevenci vitaminu A. Iniciálně jsou doporučovány dávky 32,000 IU/den *vitamínu A*, s menší dávkou (24,000IU) pro osoby s váhou méně než 50 kg. Vzhledem k možné hepatotoxicitě při dlouhém užívání mají být dávky po 3 letech redukovány na 16,000 IU. Také *vitamín B6* v monoterapii prokázal účinnost pro snížení rizika karcinomu močového měchýře. *Vitamíny C a E* jsou potenciální antioxidanty a mohou inhibovat karcinogenesi u močového měchýře neutralizací reaktivních oxygenních látek, které poškozují DNA, nebo inhibicí nitrosaminů. Vitamin C a E také stimulují imunitní systém. Poslední práce publikovaná v roce 2002 v American Journal of Epidemiology podpořila hypotézu, že dlouhodobé užívání vitamínu E (více než 10 let) redukuje riziko úmrtí na karcinom močového měchýře.

196 Význam stanovení hladiny survivinu v moči pro neinvazivní diagnostiku tumorů močového měchýře.

Pešl, M.[1], Babjuk, M.[1], Soukup, V.[1], Houšková, L.[2], Dušková, J.[3], Dvořáček, J.[1]
1) Urologická klinika 1. LF UK a VFN, Praha
2) Centrum nádorové cytogenetiky ÚKBLD, VFN a 1. LF UK, Praha
3) Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

Cíl

Cílem naší práce bylo posoudit význam stanovení hladiny survivinu v moči pro neinvazivní diagnostiku tumorů močového měchýře.

Materiál a metodika

Do prospektivní studie jsme zařadili 114 pacientů (89 mužů a 25 žen), průměrný věk ve skupině byl 66,2 let (21 až 87 let). Všech 67 pacientů ve zkoumané skupině mělo tumor potvrzený histologickým vyšetřením. U 45 pacientů se jednalo o nově zjištěný karcinom močového měchýře (primozáchyt), u zbylých 22 se jednalo o recidivu tohoto onemocění. U 47 pacientů byl nádor neinvazivní a u 20 invazivní, ve 39 případech se jednalo o nádor solitární a ve 28 případech o nádor mnohočený. Dále jsme hodnotili hladinu survivinu v močii u skupin pacientů rozdělených dle stupně nádorové diferenciace (20x G1, 20x G2 a 27x G3). Kontrolní skupinu tvořilo 47 pacientů s různými benigními urologickými onemocněními (striktura uretry, benigní hyperplazie rpostaty, hydronefróza). U všech zařazených pacientů byla vyloučena močová infekce pomocí kultivačního vyšetření moči.

Hladina survivinu byla stanovována ve vzorcích spontánně vymočené moči zhruba 24 hodin před transuretrální resekcí tumoru močového měchýře a byla uchována při teplotě –20 °C.

K detekci survivinu v moči byla použita metoda TiterZyme EIA human Total Survivin Enzyme Immunometric Assay, Assay designs, Inc. (USA).

Statistická analýza byla provedena pomocí programu S.A.S. software release 8.2 (SAS Inc., Cary, USA). Hladina významnosti byla stanovena na p=0,05.

Výsledky: Střední hladina survivinu ve skupině pacientů s prokázaným tumorem močového měchýře byla 32,4 pg/ml. V kontrolní skupině to bylo pouze 22,4 pg/ml, což byl statisticky významný rozdíl (p=0,001).

Z níže uvedené tabulky je patrná korelace mezi hladinou survivinu v moči a vzrůstající velikostí tumoru, stejně jako se stupněm nádorové invaze a diferenciace. Rozdíly jsou statisticky významné.

		Střední hladina survivinu
Nádorová invaze	Invazivní tumoury (n=20)	47,2 pg/ml
p=0,0002	Neinvazivní tumoury (n=47)	29,4 pg/ml
Nádorová diferenciace	G1 (n=20)	28,7 pg/ml
p=0,0028	G2 (n=20)	30,2 pg/ml
	G3 (n=25)	44,8 pg/ml
	G4 (n=2)	46,9 pg/ml
Velikost nádoru	0-19 mm (n=13)	29,4 pg/ml
	p=0,005720-49 mm (n=32)	30,9 pg/ml
	50 mm a větší (n=14)	46,3 pg/ml

Tabulka č. 1

Při stanovení cut off na 33,9 pg/ml a při 90% specificitě byla senzitivita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota pro diagnostiku tumoru močového měchýře 45%, 86% a 53%. Při cut off 33,9 pg/ml a 90% specificitě byla senzitivita tohoto vyšetření pro tumory větší než 50 mm dokonce 80%.

	S e n z i t i v i t a		
		Cut off 33,9 pg/ml	**Cut off 39,2 pg/ml**
		90% specificita	**95% specificita**
Skupina	Tumory (n=67)	45%	42%
Nádorová invaze	Invazivní tumory (n=20)	80%	75%
	Neinvazivní tumory (n=47)	30%	28%
Nádorová diferenciace	G1 (n=20)	20%	20%
	G2 (n=20)	35%	30%
	G3 (n=25)	68%	64%
	G4 (n=2)	100%	100%
Velikost tumoru	0-19 mm (n=13)	31%	31%
	20-49 mm (n=32)	34%	31%
	50 mm a větší (n=14)	79%	71%
Mnohočetnost	Mnoho četné tumoury (n=28)	43%	43%
	Solitární tumoury (n=39)	46%	41%
Prmozáchyt/recidiva	Primozáchyty (n=45)	38%	33%
	Recidivy (n=22)	59%	59%

Tabulka č. 2

Závěr

Naše výsledky demonstrují signifikantní rozdíl mezi střední hladinou survivinu v moči u pacientů s tumorem měchýře oproti pacientům bez tohoto onemocnění. Hladina survivinu v moči koreloval se stupněm nádorové invaze, diferenciace a s velikostí nádoru. Přestože celková senzitivita tohoto testu byla nízká, zdá se, že stanovení hladiny survivinu v moči je možno použít jako pomocný test k diagnostice uroteliálních tumorů močového měchýře.

197 Prognostický význam exprese fascinu A T1 subtypizace u T1 nádorů močového měchýře.

Soukup V.[1], Babjuk B.[1], Dušková J.[2], Pešl M.[1], Szakázcová M.[1], Dvořáček J.[1]
1) Urologická klinika VFN a 1. LFUK, Katedra urologie IPVZ, Praha
2) Patologicko-anatomický ústav VFN a 1. LFUK

Cíl

Posoudit prognostický význam subtypizace a exprese fascinu u T1 nádorů močového měchýře.

Metoda

V rámci prospektivní studie byla vyšetřena tkáň T1 nádorů močového měchýře u 105 pacientů. Jako hranice pro rozdělení tumorů do podskupin na T1a a T1b byla použita lamina muscularis mucosae, jde o tenkou svalovou vrstvu nacházející se v jedné třetině vzdálenosti mezi urotelem a svalovinou detrusoru.

Fascin je protein vážící aktin, který byl objeven v roce 1970. Exprese fascinu je signifikantně vyšší u transformovaných epiteliálních buněk, stejně i u některých běžných typů karcinomů, mezi něž patří karcinom plic, prsu, pankreatu, ovaria, žlučových cest, kůže a kolorektální karcinom. Zvýšená exprese u těchto karcinomů koreluje s vyšší mírou histologické dediferenciace (nádorovým grade), hloubkou nádorového růstu, vznikem vzdálených metastáz a horší prognózou. K imunohistochemickému vyšetření exprese fascinu byla použita myší monoklonální protilátka proti fascinu (DAKO, clone 55K-2, code No.M3567) v ředění 1:100, inkubace 70 min. Reakce byla visualisována pomocí procedury DAKO Cytomation LSAB – HRP – DAB. Jádra byla barvena pomocí Harrisova hematoxylinu.

Pozitivita endotelu a fibroblastů byla použita jako vnitřní kontrola pozitivity. Reakce urotelu byla hodnocena semikvantitativně jak pro intenzitu tak pro rozložení, podle následujícících pravidel:

znak	body		
intensita pozitivit	negativní 0	slabá 1	střední – silná 2
max. rozsah pozitivity vyš. vzorku	méně než polovina síly urotelu 1	více než polovina dispersně 2	více než polovina difúzně 3

Všichni pacienti byli následně sledováni dle obvyklých schémat zahrnujících pravidelné cystoskopické a cytologické kontroly. Intravezikální chemoterapie nebo imunoterapie byly indikovány dle obvyklých kritérií. Výsledky byly hodnoceny pomocí statistického systému SAS (Cary, USA).

Výsledky

Subtypizace T1 nádorů byla proveditelná u 99 nemocných (tj. v 94%). T1a tumor byl zjištěn u 77 nemocných (81,05%), T1b tumor u 18 (18,95%) nemocných. Doba sledování byla 27,3 ± 13,7 měsíce. U 5 (5%) nemocných byl při druhé době transuretrální resekce (TUR) zjištěn invazivní tumor (z toho u jednoho nemocného nebyla proveditelná iniciální subtypizace tumoru).

Nemocní, u kterých v druhé době TUR nebo, u kterých nebylo možno provést subtypizaci byli z dalšího hodnocení vyřazeni. K recidivě onemocnění došlo u 41 ze 77 nemocných (53,2%), ve skupině nemocných s T1a tumorem a u 7 z 18 (38,9%) nemocných s T1b tumorem. K progresi onemocnění došlo u nemocných s T1a tumorem v 9 případech (11,7%) a u nemocných s T1b tumorem v 6 případech (33,3%). Míra exprese fascinu nekorelovala s hloubkou nádorové invaze. Korelace nebyla přítomna pro intenzitu pozitivity (Wilcoxon test p-value = 0.3904 NS), ani pro rozsah pozitivity (Wilcoxon test p-value = 0.9209 NS), ani pro celkovou hodnotu míry exprese fascinu (Wilcoxon test p-value = 0.6721).

Při hodnocení doby do recidivy onemocnění nebyl mezi podskupinami nemocných s T1a a T1b tumory zaznamenán signifikantní rozdíl (log-rank test, p = 0.4769).

Naopak doba do progrese byla v podskupině T1b tumorů signifikantně kratší (log-rank test, p = 0,0034). Intensita pozitivity fascinu (Wilcoxon test p-value = 0.6122 NS), ani rozsah intenzity fascinu (Wilcoxon test p-value = 0.8796 NS), ani celková hodnota míry exprese fascinu (Wilcoxon test p-value = 0.8909) nekorelovala s dobou do recidivy onemocnění.

Stejně tak intenzita pozitivity fascinu (Wilcoxon test p-value = 0.9596 NS), rozsah pozitivity fascinu (Wilcoxon test p-value = 0.5556 NS), ani celková hodnota míry exprese fascinu (Wilcoxon test p-value = 0.9332) nekorelovala s dobou do progrese onemocnění.

Závěr

V riziku vzniku recidivy tumoru nebyl mezi podskupinami T1 tumorů zaznamenán signifikantní rozdíl. Nález T1b tumoru je spojen se signifikantně vyšším rizikem progrese onemocnění. Míra exprese fascinu v našem souboru nekorelovala s hloubkou nádorové invaze, ani s rizikem recidivy či progrese onemocnění.

*Práce byla podpořena grantem **IGA NR 8934-3.***

198 Povrchové nádory močového měchýře (PNMM). Současné názory na diagnostiku léčbu i sledování (overview).

Hanuš M.
Urocentrum Praha

PNMM charakterizuje exofytický (endokavitární) růst. Spodinou nepronikají za lamina propria mucosae. Proto je možné jejich radikální odstranění transuretrální resekcí (TUR) a tím jsou léčebné výsledky příznivější než u nádorů rostoucích invazivně. V diagnostice je u mužů standardně používán flexibilní cystoskop a pro diagnostiku carcinoma in situ /CIS) je doporučována fluorescence. Základním léčebným výkonem je transuretrální resekce všech lézí, nejlépe stratifikovaná. Tím je patologovi usnadněna orientace v zaslaném materiálu. Někteří autoři v krátkém pooperačním intervalu provádějí rebiopsii. Pro indikaci další léčby je rozhodující histopatologická klasifikace a pořet lézí. Nádory G1 a G2 mohou být dostatečně ošetřeny TUR, zatímco CIS a nádory G3 vyžadují další zajištění intravezikálními instilacemi nebo radikální chirurgickou léčbou. V intravezikální zajišťovací léčbě je nejčastěji používán Mitomycin C a mitigovaný BCG v různých instilačních schematech. Uroteliální nádory vyžadují dispenzární sledování.

Přednáška podrobněji rozebírá odlišné diagnostické a léčebné přístupy, tak jak jsou prezentovány předními odborníky v této oblasti v posledních letech.

Obecně lze však říci, že za posledních 15 let nebyl nalezen žádný významně nový diagnostický či léčebný postup, který by vedl k zásadně lepším výsledkům v léčbě uroteliálních nádorů.

199 Lokální chemoprofylaxe a imunoprofylaxe u nádorů povrchových nádorů močového měchýře.

Matoušková M., Hanuš M.
Urocentrum Praha

Úvod

Více než 75% všech nádorů urotelu představují povrchové nádory močového měchýře. Podle schopnosti progrese v kategorii T a G jsou členěny do skupin s nízkým, středním a vysokým rizikem. Rozdělení do skupin vychází z histopatologické klasifikace. Zatímco sledování postižených se zásadním způsobem nemění, je nemocným v závislosti na stupni rizika aplikována lokální léčba. Současné Guidleines EAU předkládají doporučení k adjuvantní terapii po transuretrální resekci. S platnými doporučenými postupy srovnáme naše zkušenosti.

Materiál a metodika

V letech 1992-2005 jsme sledovali v Urocentru Praha 164 pacientů s povrchovými nádory měchýře, u nich jsme provedli celkem 274 transuretrální resekce. Jeden výkon podstoupilo 88, dva a více 76 pacientů. Celá skupina prezentovaných nemocných podstoupila lokální imuno nebo chemoprofylaxi v dlouhodobém režimu. Léčbu obvykle zahajujeme do 14 dnů od provedené TUR.

Soubor nemocných	
nízké riziko	45
střední riziko	181
vysoké riziko	48
Σ	274

První linie léčby zahrnuje Mitomycin C nebo Immucyst. Volba vychází z výsledku histopatologického vyšetření. Ve druhé linii obvykle používáme Farmorubicin nebo Immucyst v závislosti na dříve podané léčbě. U nemocných ve skupině s nízkým rizikem byla léčbou volby vždy chemoprofylaxe.

Výsledky

TFI (doba beznádorového intervalu) se u nemocných s recidivou liší v závislosti na histopatologickém gradu. V celé skupině byla 19,8 měsíce, u nemocných s nízkým rizikem byla 34 měsíců <8;78> se středním a vysokým rizikem 16,5, resp. 17,2 měsíce <4;83>.

Tolerance léčby je uspokojivá. Výskyt vedlejších nežádoucích účinků je vyšší při podání imunoterapie, především spojených s výskytem systémových vedlejších účinků. Pro intoleranci nedokončilo chemoprofylaxi 14 nemocných ze 187 zahájených podávání, imunoprofylakci 18 ze 85 nemocných. Při podávání chemoprofylaxe jsme pozorovali jen nevelké zvýšení lokálních iritací při eskalaci dávky.

Závěr

Lokální léčba pomocí lokální imunomodulace nebo chemoterapie je bezpečnou modalitou v adjuvantní léčbě povrchových nádorů močového měchýře. Za cenu nejčastějších lokálních vedlejších účinků léčby vede k prodloužení doby beznádorového intervalu.

200 Epirubicin – druhá linie chemoprofylaxe u HR povrchových nádorů močového měchýře.

Matoušková M., Hanuš M.
Urocentrum Praha

Povrchové nádory močového měchýře tvoří různorodou skupinu onemocnění danou biologických chováním. Charakteristickým rysem povrchových nádorů měchýře je schopnost recidivovat. Do 3 let po primárním ošetření recidivuje až 88% tumorů. Přitom přibližně 25% nádorů při recidivě progreduje v kategorii T nebo zhoršuje histologický grade. Snaha o oddálení recidivy a prodloužení beznádorového intervalu vede k podávání různých schémat lokální chemoprofylaxe nebo imunoprofylaxe. Tato farmaka mohou oddálit recidivu, nezmění však schopnost progrese nádorového onemocnění.

Předkládáme skupinu 39 pacientů s recidivu povrchového nádoru močového měchýře po předchozím transuretrální ošetření a lokální chemoprofylaxi Mitomycimem C nebo Immucystem. Průměrná doba TFI (beznádorového intervalu) do histologicky ověřené recidivy recidivy byla 37 měsíců.

Intravesikální instilace Farmorubicínu v dávce 50 mg/d po transuretrálním ošetření tumoru s histologickou verifikací podáváme v ročním cyklu podle protokolu. Při průkazu karcinoma in situ je možné eskalovat dávku až na 80 mg/d. Aplikace Farmorubicínu je provázena zvýšeným množstvím iritačních příznaků, které v našem souboru nemocných se zvyšují s počtem podanách dávek. U 6 nemocných jsme museli modifikovat pro chemickou cystitidu léčebný režim.

Doba TFI v našem souboru je zatím 43 měsíců, u 12 pacientů zatím recidiva nebyla zjištěna. I když výsledky jsou uspokojivé, hlubší hodnocení vyžaduje dlouhodobé sledování.

201 Radikální cystektomie v léčbě nádorů močového měchýře.

Babjuk M., Hanuš T., Šafařík L., Pavlík I., Dvořáček J.
Urologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

Úvod

Radikální cystektomie je významnou součástí léčby nádorů močového měchýře. Cílem výkonu je pokud možno odstranit veškerou nádorovou tkáň v močovém měchýři, v malé pánvi a ve spádových lymfatických uzlinách. Nevyhnutelnou součástí výkonu je následná derivace moči.

Radikální cystektomie je zlatým standardem léčby nádorů močového měchýře prorůstajících do svaloviny detruzoru. Je však léčbou volby i u vybraných pacientů s tzv. povrchovými nádory (Ta, T1, Tis), které jsou rezistentní k lokální terapii.

Rutinní součástí výkonu je pánevní lymfadenektomie. Její pečlivé provedení umožňuje nejen přesné posouzení rozsahu onemocnění, ale zvyšuje i pravděpodobnost vyléčení. Ukazuje se totiž, že významným prognostickým faktorem je nejen počet pozitivních uzlin, ale i počet uzlin odstraněných. Jako prognostický faktor je v poslední době navrhována tzv. „hustota uzlinového postižení“ (LND = lymph node density), která bere v úvahu počet postižených i odstraněných uzlin.

Metodika

Hodnotíme výsledky 125 pacientů (33 žen a 92 mužů), u kterých byla od ledna 2000 do května 2006 provedena cystektomie pro karcinom močového měchýře. Průměrný věk operovaných činil 59,8 roku (29 – 77 let). Derivace byla zajištěna ortotopickou ileální neovezikou u 55, ureteroileostomií u 52 a sigma-rectum pouchem u 16 nemocných. Dva arenální pacienti byli ponecháni bez derivace. Kraniální hranici lymfadenektomie tvořilo křížení ureteru se společnými ilickými cévami. Lymfatické uzliny byly separovaně odstraněny z oblasti podél společných a zevních ilických cév, v obturatorní jámě a podél vnitřních ilických cév. V pří-

padě hmatných uzlin na kraniální hranicí disekce pokračovala lymfadenektomie i nad bifurkaci aorty. V individuálních případech zvláště před rokem 2002 byly odstraněny pouze uzliny v obturatorní jámě.

U pacientů s pozitivním uzlinovým nálezem následovala systémová chemoterapie. Teleradioterapie malé pánve byla indikována v případě pozitivních chirurgických okrajů.

Hodnotíme beznádorové přežití (DFS = disease free survival) a nádorově specifické přežití (DSS = disease specific survival) v závislosti na klasifikaci lokálního tumoru a v závislosti na uzlinovém nálezu, tedy na počtu pozitivních uzlin, počtu odstraněných uzlin, respektive na faktoru LND (počet potizivních / počet odstraněných uzlin x 100).

Výsledky

Pozitivní uzlinový nález byl zachycen u 36 pacientů (28,8%). U 22 z nich se jednalo o oboustranné postižení. Pravděpodobnost uzlinových metastáz signifikantně korelovala s kategorií T lokálního tumoru (P<0,0001). Počet pozitivních uzlin se pohyboval mezi jednou pozitivní uzlinou u 11 nemocných až k 27 pozitivním uzlinám u jednoho operovaného. Počet odstraněných uzlin kolísal od 1 do 38. Od roku 2002, kdy jsme zvýšili důraz na počet odstraněných uzlin, činil jejich průměrný počet 16,5.

Onkologické výsledky závisely na lokálním rozsahu onemocnění i na přítomnosti uzlinového postižení. Tříleté DFS a DSS bylo 76% a 87,1% u nádorů pT1, 69,2% a 82,9% u pT2, 32,9% a 62,4% u pT3, respektive 39,5% a 36,8% u pT4 (P= 0,0001, 0,0004, Log-rank test).

Tříleté DFS a DSS činilo 51,8% a 44,8% u pacientů s pozitivními uzlinami, respektive 69,4% a 87,6% u pacientů bez uzlinového postižení (P=0,0008, P<0,0001, log-rank test).

Při hodnocení počtu odstraněných uzlin, jsou parné pozitivní trendy u operovaných, kde bylo odstraněno 9 a více lymfatických uzlin, a to v případech s pozitivním i negativním nálezem. Rozdíl v našem souboru ale nedosáhl statistické významnosti, což je zřejmě dáno limitovanou velikostí souboru.

Při hodnocení faktoru LND bylo signifikantně lepší DFS i DSS u nemocných, kde byl faktor nižší než 30, tedy u těch, kteří měli menší počet pozitivních a větší počet odstraněných uzlin (P=0,006, P= 0,021, log-rank test).

Závěr

Pro osud pacienta s invazivním tumorem měchýře je významným faktorem včasná indikace výkonu a kvalita jeho provedení. Naše zkušenosti potvrzují lepší onkologické výsledky u nemocných s nádorem ohraničeným na stěnu měchýře a s negativními uzlinami. Významným faktorem je i počet odstraněných uzlin.

202 Jaká je nezbytnost a rozsah lymfadenektomie u cystektomie pro karcinom močového měchýře?

Čapák I., Doležel J., Miklánek D., Macík D.
Masarykův onkologický ústav, Brno

Jelikož 5-letý dissease free interval pacientů podstoupivších radikální cystektomii pro invazivní karcinom močového měchýře je dle literárních údajů 50-60% a celkové 5-ti leté přežití nemocných s uzlinovým postižením jen 4-31%, je zjevné, že na léčebných postupech je stále co zlepšovat. Přítomnost uzlinových metastáz je nezávislým a signifikantním prognostickým faktorem a riziko selhání léčby pro takto postižené pacienty je počítáno koeficientem 1,8. Vyvstává tudíž otázka opodstatněnosti, rozsahu a indikace lymfadenektomie. Nejčastějšími argumenty jejích odpůrců jsou její zbytečnost v případě onemocnění omezeného na orgán a to, že v případě postižení uzlin by onemocnění mělo být pokládáno za systémové. Navíc starší zprávy o 5-ti letém přežití radikálně cystektomovaných s uzlinovým postižením jsou neutěšené.

Výsledky prospektivních studií které by měly z onkologického hlediska potvrdit nadřazenost cystektomie s lymfadenektomií oproti simplexní cystektomii (v jejím rámci jsou též odstraněny některé uzliny přiléhající povrchu měchýře a ty, které souvisejí s viscerální skupinou větví a. iliaca interna), zatím nejsou pro relativně krátkou dobu jejich trvání zcela jednoznačné, i když některé literární prameny retrospektivního charakteru naznačují možnost prodloužení přežití pro právě takto léčenou skupinu nemocných s uzlinovým postižením. Nejsou jednoznačně vyjasněny otázky doporučeného rozsahu lymfadenektomie, počtu odstraněných uzlin a prognostických faktorů ve vztahu k přežívání po lymfadenektomii. Review se opírá zejména o práce M.A.Ghoneima a H. Abol-Enaima.

Incidence metastatického postižení regionálních lymfatických uzlin u pacientů podstoupivších radikální cystektomii pro karcinom močového měchýře osciluje mezi 14 až 28%. Tato incidence koreluje se stadiem primárního tumoru, čím vyšší stadium, tím větší výskyt uzlinových metastáz. Abdel -Latif (2004) potvrdil multivariační analýzou vliv primárního stadia jako nezávislý prognostický faktor. Dále byl potvrzen vliv nádorového grade a lymfovaskulární invaze. Herr (2003) referoval o zjištění, že čím více lymfatických uzlin bylo odstraněno, tím větší byl počet nemocných se záchytem uzlinové disseminace. V jiných pracech však byla korelace mezi počtem odstraněných a metastaticky postižených uzlin jen nevýznamná. Prognózu radikálně cystektomovaných nemocných s uzlinovým postižením ovlivňuje více faktorů za něž jsou považovány pT stadium, pN stadium, absolutní počet odstraněných uzlin a s tím více méně související rozsah lymfadenektomie. Více studií prokázalo snížení 5-ti leté doby

přežití u pacientů s extravezikálním šířením tumoru (18-30%) proti nemocným bez penetrace tumoru mimo hranice orgánu (46-57,5%). Rizikový koeficient byl Abdel- Latifem stanoven pro stadium pT3 2,1, pro pT4 6,7! Viewegh (1999) referoval o postupně se snižující době přežití u nemocných ve stadiu N1-N3, nezaznamenal však rozdíl u nemocných s karcinomem nepřekračujícím hranice orgánu, N0 a N1. S těmito výsledky koreluje pozorování Gnoneima (2004) bez rozdílu v dissease free intervalu mezi N0 a N1 u karcinomu orgánově lokalizovaného, dále pak s rizikovým koeficientem 2,1 pro N2 a 4,8 pro N3. Lerner (1992) pozoroval 5-ti letou dobu přežití u nemocných s 6 a více uzlinami v 35% proti 17% u nemocných s 5 a méně pozitivními uzlinami. Herr (2003) neprokázal užitím multivariační analýzy rozdíl v přežití ve skupině se 4 a méně proti skupině s 5 a více pozitivními uzlinami. Prognosticky významná hranice 8 pozitivních uzlin byla stanovena Steinem (2003).

Rozsah lymfadenektomie a vliv tohoto faktoru na přežití cystektomovaných s uzlinovou disseminací je další otázkou na kterou se pokusily odpovědět některé studie. Na jejich rezultátech je založen koncept stagingu lymfatických uzlin u karcinomu močového měchýře postavený na počtu pozitivních uzlin odstraněných při lymfadenektomii. Byl definován jako podíl pozitivních k celkově odstraněným uzlinám. Problémem je, že potencionální užitečnost tohoto parametru je podmíněna širokou variací počtu odstraněných uzlin udávaných různými autory, mnohdy chybějícím jejich přesným anatomickým mapováním a nejednotností určení kraniální hranice lymfadenektomie. Tato bývá provedena jako pelvická, u níž průměrný počet odstraněných uzlin kolísá dle různých autorů mezi 13-20, společná iliacká se 14,6 průměrně odstraněnými uzlinami, po aortální bifurkaci s 25-30 uzlinami a rozšířená distálně aortální s 50 uzlinami jejíž kraniální hranice je tvořena odstupem a. mesenterica inferior. Poulsen (1998) referoval v retrospektivní a nerandomizované studii o delším dissease free intervalu u nemocných stadia pT3 a nižšího léčených lymfadenektomií s kraniální hranicí při aortální bifurkaci proti lymfadenektomii pelvické. Leissner (2000) popsal korelaci specifického přežití s počtem uzlin odstraněných při lymfadenektomii vedené k aortální bifurkaci.

Pokrok byl pozorován při l6 a více odstraněných uzlinách. Mills (2001) zjistil při pelvické lymfadenektomii u 83 cystektomovaných ve 40% oboustranné uzlinové postižení. Jak Herr (2003) u 162 cystektomií s pelvickou lymfadenektomií, tak Stein (2003) u 224 cystektomií s lymfadenektomií po aortální bifurkaci, zaznamenali signifikantně lepší přežití u nemocných s podílem pozitivních k celkově odstraněným uzlinám 20% a menším. Dosažení konsenzu v rozsahu lymfadenektomie na základě výsledků výše uvedených studií je obtížné pro jejich retrospektivitu a nekonzistenci údajů jako je rozdílný počet odstraněných uzlin a mnohdy absence jednoznačného anatomického mapování lymfonodů při operačním výkonu. Prospektivní studie Abol-Enaina (2004) u 200 nemocných s invazivním karcinomem močového měchýře léčených radikální cystektomií stanovila jako proximální hranici rozšířené lymfadenektomie odstup a. mesenterica inferior a uzliny každé anatomické skupiny byl histologicky vyšetřeny separátně. Všechny výkony byly provedeny maximálně 2 různými operatéry za účelem dosažení maximální standardizace procedury. Počet odstraněných uzlin se pohyboval od 36 do 61, pozitivní uzliny byly nalezeny ve 24% případů a stejně jako v Millsově studii byl ve 40% shledán oboustranný výskyt metastatického uzlinového postižení. Stadium pN1, tzn. jediná pozitivní metastatická uzlina, bylo shledáno u 46 nemocných s uzlinovým postižením, uzliny byly lokalizovány vždy v pelvické oblasti. Stadium pN2 (2-5 pozitivních uzlin) bylo pozorováno v 27%, přičemž pouze u 3 z 13 pacientů byly patologické uzliny v extrapelvické oblasti. U 27% nemocných stadia pN3 (5 a více pozitivních uzlin) bylo pelvické postižení až na 1 případ vždy asociováno s postižením extrapelvickým.

Závěr

Pozitivní lymfonody se vyskytují u 25% cystektomovaných, přičemž na incidenci má jako nezávislý faktor vliv stadium pT, 30-40% nemocných s uzlinovými metastázami je ve stadiu pN1, a pozitivní uzliny u tohoto stadia jsou beze zbytku lokalizovány v pelvické oblasti, saltatorní uzlinové metastázování nebylo pozorováno.

Pečlivá bilaterální pelvická lymfadenektomie by měla odstranit všechny pozitivní uzliny kategorie pN1 a většinu pN2, prognóza pacientů stadia pN1 léčených radikální cystektomií s lymfadenektomií se blíží prognóze pacientů stadia N0. Pelvická lymfadenektomie je považována za dostatečnou, je-li kryocutové vyšetření uzlin z této etáže negativní. Prognóza nemocných s extrapelvickým uzlinovým postižením je špatná a přínos provedení rozšířené lymfadenektomie je diskutabilní. Lze spekulovat o pomocném efektu k adjuvantní léčbě redukcí nádorové masy. Tyto úvahy však nejsou ověřeny.

203 Derivace moči po cystektomii: soubor sledovaných pacientů.

Doležel J.[1], Miklánek D.[1], Čapák I.[1], Macík D.[1], Sutorý M.[2], Navrátil P.[3]
1) Onko-urologické odd, Masarykův onkologický ústav, Brno
2) Úrazová nemocnice v Brně
3) Centrum pro transplantace ledvin, Urologická klinika UK, FN Hradec Králové

Úvod

Střevní močová derivace po cystektomii patří klade vysoké nároky nejen na techniky provedení operace samotné, ale i na pooperační péči a sledování. Operace nepatří do kategorie „fit and forget“ (udělej a zapomeň). Toho si musí být vědom pacient i ošetřující tým. Její provádění by proto mělo být svěřeno specializovaným, zaškoleným centrům.

Cíl práce

Cílem práce je vyhodnocení výsledků různých technik derivace moči po cystektomii, provedené vesměs pro onkologická onemocnění, v retrospektivní studii souboru autory operovaných pacientů

Pacienti a metody

Soubor zahrnuje 60 operovaných v období 7/2001 až 12/2006. Střevní močová derivace po cystektomii byla vytvořena u 21 žen a 39 mužů, průměrného věku 60 roků (29-82). Průměrná délka sledování činila 24 měsíců (1-66). Po ukončení hospitalizace mohlo být sledováno 57 pacientů. Nejčastějším důvodem k cystektomii byl invazivní uroteliální (41) či spinocelulární (2) karcinom močového měchýře, lokálně pokročilý adenokarcinom prostaty (1), lokálně pokročilý karcinom ženské uretry (2), devastující trauma pánevních orgánů po aktinoterapii pro pokročilý karcinom cervixu (5) či tlustého střeva (1), komplikovaný neurogenní močový měchýř (4), retrahovaný močový měchýř z důvodu benigních onemocnění (3) a exstrofie močového měchýře (2). Krom tří pacientek, u kterých byl změněn stávající typ močové derivace po dříve provedené cystektomii byla močová derivace provedena v jedné době s cystektomií. Všichni pacienti byly před operací srozumitelně a detailně poučeni o problematice střevní derivace moči: zvolili si typ, který pro sebe považovali za nejvhodnější. Ve 32 případech byla jako močová derivace vytvořena kutánní uretero-ileo(resp.-transverso)stomie, tzv. konduit, ve 23 případech kontinentní ileální ortotopická náhrada měchýře, tzv. neovezika, u 6 sigma-rektum pouch typu Mainz II. U dvou pacientek ve stadiu konečného selhání ledvin byl následně (za 1 rok) do vytvořené ortotopické náhrady měchýře vyústěn močovod transplantované ledviny.

Výsledky

Závažné časné komplikace (do 30 dnů od operace) se vyskytly u 13 pacientů…: 1 úmrtí na hemoragickou kolitis, 1 úmrtí na septický šok, 2x dehiscence neoveziko-uretrální anastomózy dříve ozářených pacientů, 1x rektovaginální píštěl též v ozářeném terénu, 2x enterokutánní píštěl z dehiscentní anastomózy (spontánně se uzavřely), 1x sterkorální peritonitis při perforaci rekta, 2x déle trvající subileosní stav, 2x plicní embolie.

Pozdní komplikace

13 pacientů ze sledovaného souboru zemřelo: u 12 byla příčinou diseminace národu měchýře, u 1 protrahovaná sepse v důsledku sterkorální peritonitidy při postaktinické stenóze rekta. U dalších 4 pacientů byly diagnostikovány vzdálené metastázy. Z ostatních častějších komplikací byla zaznamenána hyperkontinence u 3 a inkontinence moči u 4 pacientů s neovezikou. U žádného z našich operovaných jsme dosud nezaznamenali obstrukci horních cest močových způsobenou stenotizací uretero-intestinální anastomózy, přestože se na včasný záchyt této komplikace soustřeďujeme.

U pacientů s dobrou funkcí ledvin před operací jsme po operaci nezaznamenali zhoršení rénálních funkcí ani jiné metabolické komplikace vyplývající z resorpce moče střevním traktem či z poruch trávení.

Závěry

Pacienti podstupující operaci musí být psychicky odolní a pozitivně motivovaní pro překonání enormní zátěže spojené s léčbou závažného (většinou onkologického) onemocnění dolních cest močových, musí si být vědomi nutnosti trvalé úzké spolupráce s ošetřujícím zdravotnickým týmem.

Pacienti s radiačními traumaty pánevních orgánů představují rizikovou skupinu vzniku časných i pozdních komplikací a vyžadují aplikaci speciálních operačních postupů při konstrukci močové derivace.

Časným i pozdním komplikacím lze předcházet pečlivou technikou provedení derivace, časnou pooperační péčí a systematickým celoživotním sledováním. Provádění operací by mělo být soustředěno ve specializovaných centrech.

Pacienti s trvalou močovou derivací mohou vést kvalitní, plnohodnotný život.

204 Vyhodnocení radikálních cystektomií na Urologické klinice LF UP a FN Olomouc.

Lamla A., Fiala R., Študent V., Hrabec M., Vidlář A.
Urologická klinika LF UP a FN Olomouc

Cíl

Práce srovnává radikální cystektomie provedené v letech 2003-2004 a 2005-2006 na Urologické klinice FN Olomouc z hlediska časných a pozdních pooperačních komplikací, délky přežití pacientů, srovnání klinického a patologického stagingu, rozdíly v patologických stadiích mezi pacienty primárně z Urol.kl. FNO a ze spádu, počet cystoskopií či endovýkonů před cystektomií, dále poukazuje na tendence v derivačních výkonech.

Metody

Uvedené faktory jsme hodnotili u 110 pacientů, kteří v uvedeném období podstoupili radikální cystektomii pro karcinom močového měchýře.

Výsledky

Při stanovení kategorie T jsme byli nejúspěšnější u T1 a T4, endosonografii jsme u pacientů po radikální cystektomii shledali přesnější než bimanuální palpaci, nejčastější derivací byla i přes tendenci k ortotopickým ureteroileostomie, sdruženým výkonem apendektomie, od které ustupujeme, nejčastější časné pooperační komplikace byly ranné a kardiovaskulární, pozdní pak střevní neprůchodnost, ureter. obstrukce a metabolické komplikace.

Závěr

Cílem je možnost informovat odbornou veřejnost o problematice časných indikací k radikální léčbě, dále kvalifikovaná informovanost pacientů, kteří u nás budou operováni, o výsledcích radikálních operací s možností blíže se seznámit s problematikou „měchýřové“ onkologie nejen v laickém rozsahu.

205 Radioterapie nádorů močového měchýře.

Čoupková I., Šlampa P., Čoupek P., Princ D., Gombošová J.
Oddělení radiační onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Standardní terapií invazivního karcinomu močového měchýře je radikální cystektomie. Kurativní radioterapie je indikována u pacientů se závažnějšími interkurentními chorobami, které jsou kontraindikací radikálního chirurgického výkonu, a u nemocných odmítajících operaci. U pacientů v dobrém klinickém stavu je možno během kurativní radioterapie podat konkomitantně chemoterapii. Pětileté přežívání u konkomitantní chemoradioterapie se udává až v 55-65%, není však dosaženo úrovně lokální kontroly po radikální cystektomii (lokální kontrola až v 90%). Nevýhodou radioterapie je relativně vysoká incidence akutních i chronických komplikací, výhodou je zachování funkce močového měchýře.

Pooperační radioterapie je indikována po parciální resekci tumoru, při rozsahu nádoru pT4 a při postižení regionálních lymfatických uzlin.

Paliativní radioterapie má za cíl zmírnění symptomů včetně ovlivnění hematurie.

Karcinomy močového měchýře

Protokol MOU-radioterapie

Anatomické sublokalizace: trigonum (C 67.0), klenba (C 67.1), boční stěna (C 67.2), přední stěna (C 67.2), zadní stěna (C 67.4), hrdlo (C 67.5), ústí močovodu (C 67.6), urachus (C 67.7), léze přesahující močový měchýř (C 67.8).

Základní rozdělení karcinomů močového měchýře

Nejčastějšími nádory močového měchýře jsou nádory z urotelu. Morfologicky mají většinou vzhled papilárních nádorů. Vzácnými typy maligních epitelových nádorů jsou adenokarcinomy, dlaždicobuněčné karcinomy a karcinomy nediferencované, z mezenchymálních nádorů to jsou rhabdomyosarkom, leiomyosarkom. Vzácné jsou i maligní lymfomy.

Klinická stadia onemocnění

Klinická stadia karcinomů močového měchýře jsou určována pravidly TNM klasifikace (TNM klasifikace zhoubných novotvarů. 6. vydání 2002, česká verze 2004, ÚZIS, Praha). TNM klasifikace se používá pouze pro karcinomy, vylučují se papilomy. Diagnóza musí být histologicky ověřena.

Diagnostika

Obligatorní stagingová vyšetření

Anamnéza, fyzikální vyšetření, UZ vyšetření ledvin, epigastria a moč. cest, cystoskopie, CT vyšetření retroperitonea a pánve, angiografie, vylučovací urografie, Rtg plic, scintigrafické vyš. skeletu, základní hematologické, biochemické vyšetření.

Fakultativní stagingová vyšetření

Izotopové vyšetření ledvin, MR pánve, celotělové PET vyšetření, vyšetření antigenu karcinomu močového měchýře NMP (Nuclear matrix protein), fibrin-degradační produktů (Quanticyt, Immunocyt).

Léčebná strategie

Terapie karcinomů močového měchýře se volí podle nejvyšší T a G kategorie, které jsou zjištěny v rámci stagingu. Nádory Ta-T1 jsou povrchové nádory, jejích léčba je zaměřená na prevenci recidiv a progrese; Tl, G3 nádory mají vysokou tendenci k progresi; T2 nebo vyšší kategorie jsou infiltrující nádory a cystektomie je standardním postupem ve většině případů zachování močového měchýře je možné u vybraných pacientů. V případě pozitivních uzlin a metastatického onemocnění je indikována chemoterapie, event. s radioterapií.

Nádory se středním rizikem (všechny ostatní, Ta-T1, G1-2, mnohočetné, větší než 3 cm v průměru)

Po transuretrální resekci je indikována adjuvantní instilační terapie. Nejčastěji používané látky k instalaci jsou BCG vakcína, interferon alfa (možné dávkovací schéma 54 MIU v F1/1 50 ml na dobu 1 hod., celkem 8 sérií, 1x týdně) nebo mitomycin C, epirubicin, doxorubicin.

Nádory s vysokým rizikem (T1, G3, mnohočetné nebo časně recidivující)

Lze indikovat časnou cystektomii, u 50% pacientů ale přináší léčebný efekt instalační terapie, zejména BCG vakcínou. Nádory T1; G3 nemají jasnou indikaci k cystektomii jsou ale faktory, které toto rozhodnutí podpoří – solidní nebo papilární typ nádoru, vysoká četnost recidiv, mnohočetnost tumorů, současný nález Tis.

Nádory s vysokým rizikem, CIS (carcinoma in situ)

Carcinoma in situ (CIS) je považován za vysoce maligní onemocnění s možností přechodu do invazivní formy uroteliálního karcinomu. Současná standardní léčba se sestává z instalace BCG vakcín. Instalace se provádí obvykle 1x týdně 6 po sobě následujících týdnů. V případě přetrvávající pozitivní cytologie nebo biopsie je indikovaná druhá série 6-ti týdenního podání. Při nedosažení remise je indikována cystektomie s uretrektomií.

V případě povrchových forem nádorů (Tis, Ta, T1) lze ve vybraných případech na specializovaných pracovištích použít koagulace či vaporizace tkáně laserem nebo aplikovat fotodynamickou terapii (metoda využívá cytotoxického účinku světla o určité vlnové délky na buňky, které jsou senzibilizovány systémovým podáním hematoporfyrinů).

Systémová léčba

Léčba je určena standardy České onkologické společnosti (ČOS ČLS JEP: Zásady cytostatické léčby maligních onkologických onemocnění).

Radioterapie

Radikální cystektomie je doplněna pooperačním ozářením při parciální resekci tumoru, při rozsahu nádoru pT4 nebo postižení regionálních uzlin.

Kurativní radioterapie přichází v úvahu u inoperabilních tumorů nebo u pacientů odmítajících operaci nebo s kontraindikací operace. U pacientů v únosném celkovém stavu lze indikovat k radioterapii s kurativním záměrem konkomitantní podání chemoterapie. Při radioterapii oblasti močového měchýře se ozařuje metodou postupného (i 2x) zmenšování cílového objemu (shrinking-field).

Cílové objemy

Při radioterapii celé pánve (PTV 1) jsou pacienti ozařováni s plným močovým měchýřem. Při aplikaci záření jen na oblast močového měchýře (PTV 2,3) je měchýř prázdný.

Kurativní radioterapie

Nádorový objem (GTV) tvoří objem tumoru a postižené regionální lymfatické uzliny.

Klinický cílový objem (CTV 1) je určen objemem GTV, dále zahrnuje pánevní regionální uzliny (zevní a vnitřní ilické), proximální část uretry, u mužů prostatu a objem močového měchýře.

Plánovací cílový objem PTV 1, tzv. „velký objem“ – pánev, zahrnuje objem CTV 1 a lem 1-2 cm.

Plánovací cílový objem (PTV 2), tzv. „malý objem“ – zahrnuje oblast tumoru (GTV), dále tumor a objem močového měchýře (CTV 2) a lem 1-2 cm (při prázdném močovém měchýři).

Plánovací cílový objem (PTV 3), cílené doplnění dávky (boost) je tvořen objemem tumoru (GTV), dále klinickým cílovým objemem CTV 3 (GTV + 1 cm lem) a s bezpečnostním lemem 1-2 cm.

Pooperační radioterapie

Nádorový objem GTV se neurčuje. Plánovací cílový objem (PTV 1) odpovídá PTV 1 při kurativní radioterapii.
Zmenšený cílový objem (PTV 2) odpovídá objemu PTV 2 při kurativní radioterapii.

Frakcionace a dávka záření

Standardní frakcionace	5x1,8-2,0 Gy/týden, dávky
PTV 1	40-44 Gy,
PTV 2	20-24 Gy (celková dávka 60-64 Gy),
PTV 3	event. při změně PTV 2 po aplikaci celkové dávky 54-56 Gy, do celkové dávky 60-64 Gy.
ICRU – referenční bod	– leží ve středu PTV v CT řezu odpovídajícím středu kraniokaudálního rozměru PTV.

Kritické orgány a toleranční dávky ($TD_{5/5}$)
Rektum (60 Gy), hlavice femuru (45 Gy).

Technika a plánování radioterapie

Poloha: Pacient se ozařuje v supinační poloze na zádech s podložením kolenních kloubů (vyrovnání lumbální lordózy).
Plánování: Rtg simulátor, CT plánovací vyšetření (vhodný p.o. a i.v. kontrast), 3D plánovací systém (event. i MR).
Technika: kombinace tří konvergentních polí (maximální šetření rekta), event. kombinace čtyř polí, BOX technika. Tvar polí je individuálně upraven vykrývacími bloky nebo vícelamelovým kolimátorem (MLC).
Pozn.: Při plánování radioterapie celé pánve (PTV 1) jsou pacienti s plným močovým měchýřem. Při plánování záření jen na oblast močového měchýře (PTV 2,3) jsou s prázdným močovým měchýřem – tzn. provedení min. dvou CT plánovacích vyšetření.
V průběhu radioterapie jsou provedeny kontroly nastavení portálovým snímkováním a ověření dávky in vivo dozimetrií.

Paliativní radioterapie

U lokálně pokročilého nádoru se k dosažení analgetického a hemokoagulačního efektu využívá akcelerovaná radioterapie (vyšší jednotlivé dávky) a jednoduché techniky. Celkovou dávku a schéma aplikace je nutné přizpůsobit celkovému stavu pacienta.
U diseminovaného onemocnění lze indikovat paliativní ozáření oblasti metastáz podle lokalizace postižení (plíce, skelet) a tolerančních dávek kritických orgánů (viz kap. Paliativní radioterapie).
Možná schémata paliativní radioterapie (cíleně na oblast tumoru)
5x3,0-3,5 Gy/týden, 10 frakcí; 5x4,0 Gy/týden nebo 4x5,0 Gy/týden; 6,0 Gy/1x týdně, 4-5 frakcí.

Sledování po léčbě zářením

Sledování pacientů po léčbě provádí urolog, radiační a klinický onkolog. První kontrola je 4-6 týdnů po ukončení radioterapie k zhodnocení odeznívajících akutních postradiačních změn. Další období – kontroly stavu po 6 měsících (klinický stav, biochemická vyš., KO, moč). Akutní a chronické vedlejší účinky léčby jsou vyhodnocovány podle EORTC-RTOG stupnice.

206 Adjuvantní nebo neoadjuvantní chemoterapie u invazivních nádorů močového měchýře?

Katolická J., Rovný A., Filipenský P.
Fakultní nemocnice u svaté Anny, Brno

Karcinom močového měchýře je pátým nejčastějším nádorovým onemocněním v Evropě a čtvrtou nejčastější malignitou v USA. Asi 80% pacientů je postiženo povrchovým onemocněním, postihujícím sliznici a 20% onemocněním infiltrujícím svalovinu močového měchýře. U pacientů s lokalizovaným svalovinu infiltrujícím onemocněním je standardním terapeutickým postupem radikální cystectomie s pelvickou lymfadenektomií.
U pacientů léčených pouze chirurgicky dochází ve 30% k rekurenci choroby, z toho 7% recidív je lokálních a 22% nemocných má vzdálené metastázy. Důvod k radikalitě chirurgického výkonu je tedy jasně daný, nutno ale snížit riziko vývoje vzdálených metastáz a prodloužit přežití nemocných s invazivním karcinomem močového měchýře.

Invazivní karcinom močového měchýře je považován za systémové onemocnění.

Literární prameny uvádějí pětileté přežívání u karcinomů močového měchýře stadia T0 v 75-100%, v stadiu T1 60-80%, v stadiu T2 30-70%, T3 7-30% a v stadiu T4 0-20%; desetileté u stadia T0 21%, T1 15-67%, u stadia T2 13-44%, u stadia T30-11% a deset let nepřežívá žádný z pacientů.

Současný pohled na adjuvantní (pooperační) a zejména neoadjuvantní (předoperační) chemoterapii poukazuje na obecně známý fakt, že infiltrující karcinom močového měchýře je spojen s vysokým rizikem relapsu. Potenciální užitek adjuvantní chemoterapie je podporován známou chemosensitivitou a jen malým, ale konsistentním počtem vyléčených nemocných s metastatickým onemocněním. Přes četné studie je role adjuvantní a také neoadjuvantní chemoterapie nejistá.

U lokálně pokročilého a metastazujícího karcinomu močového měchýře studie fáze III. srovnávající dvoukombinaci gemcitabin a cisplatina se čtyřkombinací M-VAC prokázala lepší toleranci s minimálně stejným efektem pro kombinaci gemcitabin a cisplatina.

GEMCITABIN i KARBOPLATINA jsou prokazatelně účinné v léčbě nádorů močového měchýře. Karboplatině byla dána přednost před cisplatinou, má řadu předností, není nefrotoxická, má lepší snášenlivost a možnost ambulantní aplikace. Ve stadiu II a III je zkoumána účinnost chemoterapie v neoadjuvantní aplikaci a ve stadiu IV v adjuvantním podání.

Naším cílem je zhodnotit toleranci této kombinace, procento dosažených remisí, délku trvání bezpříznakového období, délku celkového přežití a kvalitu života nemocných léčených na našem oddělení v adjuvantním a neoadjuvantním podání.

XXIV.
Nádory prostaty

207 Je PSA nad šedou zónou indikací k opakovaným biopsiím?

Hanuš M.[1], Matoušková M.[1], Dudková V.[2]
1) Urocentrum Praha
2) Oddělení nukleární medicíny a PET centrum, nemocnice na Homolce

Elevace hodnot PSA přes šedou zónu (4-10ng/ml) představuje asi ve 30-60% případů vzestupnou pravděpodobnost přítomnosti karcinomu. PSA nad 20ng/ml značí 80% možnost lokálně pokročilého onemocnění. Hodnoty však mohou být vyšší i u nezhoubného zvětšení prostaty při obstrukčních uropatiích, zánětech žlázy, mechanickém podráždění prostaty aj. Existují však též nezvykle vysoké hodnoty, pro které není dosud přesné vysvětlení. Uvažuje se o endogenních interferencích immunoesejí s cílovými markery (zkřížené reakce, odlišně reagující isoformy markerů, bakteriální kontaminace, revmatoidní faktor).

V naší skupině pacientů jsme všechny tyto pravděpodobnosti nevyšetřovali. Sledovali jsme změny v symptomatologii, laboratoři a fyzikálních nálezech. Vyjma elevace PSA v řadě případů spojené s BPH a symptomy LUTS jsme nenalezli závažné stavy svědčící pro karcinom prostaty. Ve skupině jsme ve sledovaném období zachytili pouze jeden karcinom při náhlém vzestupu PSA.

Z těchto důvodů jsme po vyhodnocení skupiny dospěli k rozhodnutí, pokud hodnoty PSA neprogredují (alespoň tři odběry po třech měsících) a není ani jiná změna (fyzikální nález aj), po třech biopsiích zůstáváme pouze u hodnocení subjektivního a objektivního nálezu, sonografického vyšetření a biochemického sledování PSA a isoforem, obvykle 3x ročně.

208 Existuje rozdíl v Gleasonově skóre získaným z jehlové biopsie a definitivním preparátu získaným z radikální prostatektomie?

Študent V.[1], Soukeníková D.[2], Král M.[1], Hrabec M.[1], Grepl M.[1], Vidlák A.[1], Pernička J.[1]
1) Urologická klinika, FN a LFUP Olomouc
2) Klinika patologické anatomie FN a LFUP Olomouc

Cíle

Autoři hodnotí korelaci Gleasonova skóre (GS) z jehlových biopsií prostaty a definitivních preparátů prostaty získaných po retropubické radikální prostatektomii (RRP) ve světle závěrů Mezinární společnosti urologických patologů (ISUP) 2005.

Materiál a metoda

Byla provedeno opětovné zhodnocení histologických preparátů z jehlové biopsie a definitivních preparátů po RRP z let 2003-2006. Evaluace byla provedena dle dosud běžně užívaného hodnotícího systému Gleasonova skóre (skupina I.) a současně dle nových doporučení konsensu ISUP 2005 (skupina 2).

riziko:	nízké	střední	vysoké
Skupina I. Jehlová biopsie	13,90%	61,80%	24,30%
Skupina I. Def. preparát	0%	48,48%	51,52%

Tab. č. 1. Histopatologická korelace Gleasonova skóre ve skupině I.

riziko:	nízké	střední	vysoké
Skupina II. Jehlová biopsie	0%	47,87%	52,12%
Skupina II. Definitivní preparát	0%	48,48%	51,52%

Tab. č. 2. Histopatologická korelace Gleasonova skóre ve skupině II.

Výsledky

Celkový počet hodnocených preparátů byl 165. Při srovnání výsledků histologických vyšetření v obou skupinách byl zjištěn posun ve 14% nízko rizikových pacientů (GS 2-4) do skupiny středně rizikových (GS 5-6). Ze skupiny středního rizika (GS 5-6) do skupiny s vysokým rizikem (GS 7-10) byl zjištěn posun v 28,8% (ze skupiny I. do skupiny II.).

Při srovnání GS definitivních preparátů výsledky byly identické (100% korelace). Při statistickém zhodnocení (párový test) byl zjištěn signifikantní rozdíl v hodnocení GS mezi výsledky jehlové biopsie a definitivního preparátu ve skupině I ($p<0,001$).

Ve skupině II. (hodnoceno dle ISUP 2005) nebyl již prokázán statisticky významný rozdíl mezi výsledky z jehlové biopsie a definitivního preparátu(p<0,62)

Závěr

Dosud užívaný hodnotící systém Gleasonova skóre z jehlových biopsií má velmi nízkou korelaci s definitivním preparátem získaným po RRP. Nabízí se otázka, zda Gleasonovo skóre získané z jehlové biopsie a hodnoceno dosud užívaným způsobem je možno použít pro predikci dalšího průběhu karcinomu prostaty. Dle jeho výsledku je zvažovány a navrhovány pacientům neoperační metody jako pozorné sledování (WW), radioterapie, brachyterapie, Hifu). Na podkladě námi získaných výsledků se domníváme, že dosud užívané hodnocení Gleasonova skóre z jehlových biopsií prostaty není vhodné. Doporučujeme užití nového histopatologického hodnocení dle konsensu ISUP 2005.

209 Časné odhalení rizika karcinomu prostaty na základě vyšetření polymorfismů a specifických haplotypů v genu pro steroidní 5-alfa-reduktázu (SRD5A2).

Minárik M.[1], Fantová L.[1], Heráček J.[2], Urban M.[2], Loukola A.[3], Sachová J.[2], Benešová L.[1]
1) Laboratoř molekulární genetiky a onkologie, Genomac International, s.r.o., Praha
2) Urologická klinika FNKV, 3. LF UK, Praha
3) Finnish Genome Center, University of Helsinki, Helsinki, Finland

Karcinom prostaty je nejčastější malignita u mužů ve vyspělých zemích. Odhaduje se, že v Evropě je každoročně diagnostikováno 2,6 milionů nových případů. Gen SRD5A2 kóduje enzym, který katalyzuje konverzi 3-oxo-5-alfa-steroidu + akceptoru na to 3-oxo-delta(4)-steroid + redukovaný akceptor. SRD5A2 enzym je tím přímo zodpovědný za syntézu dihydrotestosteronu, který je hlavním promotorem růstu prostatických buněk a současně významným tumor promotorem. Očekává se, že jednonukleotidové polymorfismy (SNP) mohou ovlivnit aktivitu tohoto genu a tím i vznik a proliferaci nádorových buněk prostaty.

Do studie bylo zařazeno celkem 339 pacientů s ověřeným karcinomem prostaty a 231 kontrolních osob s klinicky ověřenou diagnózou benigní hyperplázie. U každé osoby bylo provedeno vyšetření sady 18ti jednonukleotidových polymorfismů genu SRD5A2 z DNA získané z periferních lymfocytů.

Identifikovali jsme celkem 5 různých SRD5A2 polymorfismů, které vykazují statisticky významně odlišný výskyt u skupiny pacientů a kontrol. Dále jsme určili 12 nejčastějších SNP kombinací (haplotypů) a z nich nalezli 5 kombinací vykazující vysokou míru asociace s diagnostikovaným karcinomem i s jeho agresivitou. Odhalené polymorfismy a jejich haplotypy by tak mohly představovat potenciální genetické markery pro časnou identifikaci skupin mužů se zvýšeným rizikem karcinomu prostaty.

Podporováno grantem IGA MZ 8039-3

210 Účinek působení inhibitorů histonových deacetyláz, NaB a TSA u na androgenech závislých a nezávislých prostatických nádorových linií.

Trtková K., Bouchal J., Kolář Z.
Laboratoř molekulární patologie, Ústav patologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc

Úvod

Studium epigenetických příčin změněné exprese genů představuje nový přístup k řešení nádorové problematiky. Acetylace je jedna z postranslačních modifikací histonových proteinů a obecně platí, že transkripční aktivace genů obvykle souvisí s acetylací. Jak ale vyplývá z definice histonového kódu, efekt acetylační změny je ovlivněn i jinými současně probíhajícími modifikacemi (fosforylace, metylace) a konečný biologický dopad může pak mít jiný důsledek. Acetylační změna tedy nemusí vždy způsobit aktivaci transkripce příslušné genové oblasti. Acetylace a deacetylace působící prostřednictvím enzymů histonových acetyláz (HACs) a deacetyláz (HDACs) jsou důležitými regulačními mechanismy exprese genů. Účinek těchto enzymů se neomezuje pouze na histony, a zdá se, že právě nehistonové proteiny nebo jiné cytoplazmatické či jaderné proteiny jsou jejich původními substráty. Androgenový receptor (AR), který je členem velké skupiny jaderných receptorů, je obvykle aktivován navázáním ligandu a může tak stimulovat nebo potlačovat jím regulované geny. AR může být ovšem aktivován i v nepřítomnosti ligandu a to represory, které zprostředkovávají potlačení či represi transkripce buď vazbou represorů s jinými transkripčními faktory nebo s HDACs.

Inhibitory histonový deacetyláz (HDACIs) jsou potencionálními terapeutickými agens. Jsou schopny potlačovat růst nádorových buněk, obvykle při nižších dávkách, zatímco výšší koncentrace HDACIs mohou vést k apoptóze (Wang et al., 2004; Sadar and Gleave, 2000). Ani tady nelze jednoznačně říci, že inhibice HDACs inhibitory histonových deacetyláz vede k aktivaci transkripce. Deacetylace může být opět součastí jiných modifikací a efekt jejího zablokování může záviset na charakteru změn chromatinové struktury. Jakou úlohu hrají represory, jež jsou součastí komplexu s HDACs v mechanismu působení HDACIs, bylo

rovněž podnětem k vypracování našeho příspěvku. V procesu nádorové transformace stále nejsou pro jednotlivé HDACs přesně vymezeny jejich funkce. Vzhledem k biologickým důsledků působení HDACIs se ovšem zdají být inhibitory histonových deacetyláz velmi vhodné pro podrobnějším studium.

Materiál a metodika

Prostatické nádorové linie DU145 a PC3 nezávislé na androgenech, prostatická nádorová linie LNCaP závislá na androgenech a z ní odvozená linie C4-2, kterou lze charakterizovat jako androgen independentní, ale s expresí proteinu AR, jsme použili pro studium účinků dvou inhibitorů histonový deacetyláz: butyrátu sodného (NaB) a trichostatinu A (TSA). Buňky byly ovlivňovány po dobu 24 a 48 hodin 5 mM koncentrací NaB a 0,5 uM koncentrací TSA. Jedná se o vysoké koncentrace HDACIs, které vedou u buněk k apoptóze (Frønsdal and Saatcioglu, 2005; Sadar and Gleave, 2000). Expresi proteinů jsme detekovali z celkového extraktu buněk Western blotovou analyzou protilátkami proti AR (AR441) a p53 (DOI).

Výsledky a závěr

Překvapující bylo vymizení exprese AR u buněk linie LNCaP a z ní odvozené linie C4-2, a výrazné snížení exprese p53 u ovlivněných linií LNCaP, C4-2 a DU145 v porovnání s kontrolními vzorky. Výjimkou jsou buňky linie PC3, které neexprimují protein p53, a nevykazují zřetelný úhyn buněk mezi ovlivněnými a kontrolními buňkami. Pokud předpokládáme, že vyšší dávky HDACIs zprostředkovávají u prostatických nádorových buněk buněčnou smrt vyvolanou apoptózou, nevíme proč snížená exprese p53 u ovliněných buněk sledovaných linií nekoreluje s intenzitou jejich úhynu, která je zřejmá proti kontrolním neovlivněným buňkám u buněk linií LNCaP a C4-2, a velmi vysoká u buněk linie DU145.

Literatura

1. Frønsdal K., Saatcioglu F., Histone deacetylase inhibitors differentially mediate apoptosis in prostate cancer cells. *The Prostate* 2005, 62: 299 – 306.
2. Sadar M.D., Gleave M.E., Ligand-independent activation of the androgen receptor by the differentiation agent butyrate in human prostate cancer cells. *Cancer Research* 2000, 60: 5825 – 5831.
3. Wang L.G., Ossowski L., Ferrari A.C., Androgen receptor level controlled by a suppressor complex lost in an androgen-independent prostate cancer cell line. *Oncogene* 2004, 23: 5175 – 5184.

Financováno z MSM 6198959216

211 Výsledky a závěry vyhledávací studie karcinomu prostaty 1999-2004 u 5744 mužů. Výsledky spolupráce s praktickými lékaři.

Hanuš M., Matoušková M.
Urocentrum Praha

Prostatický specifický antigen (PSA) je stále považován za nejlepší onkologický marker vůbec. Jeho extenzivní využití při vyhledávání karcinomu prostaty (KP) vedlo k vysokému nárůstu záchytu KP s následným strmým vzestupem radikálních operací. V posledních deseti letech se ozývají kritické hlasy upozorňující na riziko overdiagnosis a overtreatment. Není zpochybňován význam PSA pro monitoring. Prezentace blíže diskutuje pro a proti v diagnostice a léčbě KP a předkládá soubor 5744 pacientů vyšetřených v Urocentru Praha v období 5 let.

Stadium	RAPE	ACTH	Hormony	WW
I/76	14	0	5	55
II/ 206	61 *	16	33	95
III/119	23 *	13 *	50	31
IV/85	4 *	3 *	42	26
celkem 486	**102**	**32**	**130**	**207**

*) v některých případech léčba kombinovaná

Na podkladě dlouhodobých zkušeností je uveden diagnostický postup, který autoři považují za zdůvodněný pro indikaci biopsie prostaty. Tímto algoritmem bylo indikováno 833 mužů k biopsii a prokázáno 486 KP. U všech záchytů byl rozsah onemocnění stanoven podle TNMG klasifikace a provedena příslušná léčba. Podle našich zkušeností je vhodné biopsie prostaty uvážlivěji indikovat.

212 Včasný záchyt karcinomu prostaty (KAPROS II.) v Olomouckém regionu – první výsledky.

Študent V., Grepl M., Král M., Hrabec M., Vidlář A., Pernička J.
Urologická klinika, LFUP a FN Olomouc

Cíle

Sekundární prevence karcinomu prostaty Olomouckého regionu ve věkovém rozmezí 40 až 70 let. Obdobná studie nebyla v české populaci dosud provedena.

Metody

Prospektivní studie u 362 respondentů v Olomouckém regionu v průběhu 6/ 2006 až 1/ 2007. Muži informováni mediální kampaní v místním tisku, měli možnost bez jakéhokoliv lékařského doporučení být vyšetřeni na ambulanci urologické kliniky. Nejprve jim byla vyšetřena PSA, provedeno klinické vyšetření a dle výsledku těchto vyšetření byla indikována biopsie prostaty.

Výsledky

Dosavadní získaná data průzkumu ukázala, že z 362 testovaných můžů byla hodnota PSA u 90% 2,5, u 9% v rozmezí 2,5 - 10, a pouze u 5% mužů >10.

U 164 mužů byla provedena biopsie prostaty, v 39 případech byl zachycen adenokarcinom prostaty(CaP).

V 6 případech CaP byla hladina PSA < 4,0ng/ml, ve 14 případech CaP bylo PSA v rozmezí 4-10ng/ml, ve 12 případech hodnota PSA byla v rozmezí 10,1-20ng/ml, pouze v 7 případech CaP byla zjištěna hodnota PSA >20ng/ml.

Gleasonovo skore bylo bylo určeno dle konsenzu ISUP 2005: Gleason 2+3 byl popsán 8x, Gleason 3+3 9x, Gleason 3+4 14x, Gleason 4+3 1x, Gleason 3+5 1x, Gleason 4+4 1x, Gleason 4+5 4x.

Závěr

Naše předběžné výsledky potvrzují vhodnost včasného záchytu CaP, jako sekundární prevence karcinomu prostaty. Přetrvává nízká informovanost mužské populace o možném riziku výskytu CaP i v mladších věkových kategoriích tj. od 50 let života. Rovněž záchyt 6 případů CaP u pacientů s hladinou PSA < 4,0ng/ml upozorňuje odbornou veřejnost, že tzv. normální hladina PSA neexistuje a je nutné při nižších hladinách PSA sledovat jeho velocitu (PSAV).

213 Korelují vlastní klinické zkušenosti s léčbou lokálně pokročilého karcinomu prostaty s výsledky studie Early Prostate Cancer?

Pacík D.[1], Vít V.[1], Šlampa P.[2]
1) Urologická klinika FN Brno
2) Oddělení radiační onkologie, MOU Brno

Úvod

Riziko biochemické recidivy karcinomu prostaty u pacientů léčených s kurativním záměrem závisí na řadě faktorů (stádium T, PSA, Gleason skóre) a zvolené modalitě léčby.

U značné části pacientů léčených s kurativním záměrem však bohužel časem dojde k progresi, popřípadě k úmrtí. Riziko biochemické recidivy karcinomu prostaty u pacientů léčených s kurativním záměrem i u velmi pečlivě indikované skupiny činí až 30% během 10 let.

Jednou z možností léčby s kurativním záměrem u pacientů s nemetastazujícím karcinomem prostaty ohraničeným na prostatickou žlázu nebo lokálně pokročilým je radioterapie, která je stále považována za alternativu kurativního řešení. Za tzv. „zlatý standard“ této léčby je možno považovat metodu zevního ozáření.

Nejvyšší riziko klinické progrese je u pacientů s onemocněním vyššího stádia (T), s vyšší hodnotou prostatického specifického antigenu (PSA) nebo vysokým Gleasonovým skóre (GS). Snížení rizika biochemické i klinické progrese může zlepšit výsledky přežívání a oddálit nástup symptomů spojených s pokročilým onemocněním (kostní metastázy, míšní komprese, patologické fraktury, obstrukce dolních močových cest), ale i vést ke snížení mortality.

Bicalutamid 150 je preparátem, u kterého bylo prokázáno, že snižuje riziko progrese onemocnění a u lokálně pokročilého onemocnění léčeného ozářením dokonce podle poslední analýzy Early Prostate Cancer (EPC) Programme zlepšuje celkové přežití.

Early Prostate Cancer (EPC) Programme je doposud světově největší a stále probíhající program studií pacientů s lokalizovaným nebo lokálně pokročilým karcinomem prostaty léčených základními terapeutickými modalitami s následnou adjuvantní terapií bicalutamidem 150 mg (Casodexem 150) nebo placebem. Tvoří jej tři prospektivní, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované studie zahrnující celkem 8 113 mužů. V nedávné době byla publikována data z poslední, třetí analýzy po průměrné době sledování 7,4 roku. Výsledky potvrzují významné zlepšení v objektivní době bez progrese onemocnění – 21%.

Nově byly provedeny analýzy rozdělující pacienty do skupiny s lokalizovaným KP (T1-2) a s nádory pokročilými (T3-4). Analýza jasně prokázala přínos bicalutamidu 150 ve smyslu zlepšení celkového přežití u pacientů s lokálně pokročilým KP. Nejjednoznačnější rozdíl je patrný u pacientů léčených radioterapií s kurativním záměrem (36%), benefit byl zaznamenán i u pacientů jen sledovaných (19%). Rozdíly ve skupině po radikální prostatektomii nejsou statisticky významné.

Pacienti a metodika

Jako jedno z výzkumných center programu EPC jsme po zveřejnění prvních výsledků tyto inkorporovali do běžné klinické praxe. U pacientů s lokálně pokročilým karcinomem prostaty (po vyloučení metastatického rozšíření) a s přítomností alespoň jednoho ze dvou rizikových faktorů (PSA >10 ng/ml nebo Gleasonovo skóre 7) byla po individuální diskuzi, poučení a pacientově volbě alternativy navrhované léčby, indikována neoadjuvantní hormonální terapie v délce čtyř měsíců (Buserelin + Flutamid), následovaná kurativní radioterapií a následnou adjuvantní terapií bicalutamidem v dávce 150 mg denně. V období 1997 – 2007 bylo takto doposud léčeno 103 pacientů (věk v době stanovení diagnózy 51 – 83 let, průměrný věk – 66,3 roku), kteří jsou sledováni celkově po průměrnou dobu 67,5 měsíce (15 – 114) = 5,6 roku. Pacienti jsou sledováni v intervalu tří měsíců, kdy je vždy provedeno stanovení koncentrace PSA v séru a digitální rektální vyšetření prostaty, jedenkrát ročně je provedena scintigrafie skeletu.

Charakteristika souboru pacientů je zachycena v tabulce 1.

Předpoklad stádia onemocnění podle Partinových nomogramů uvádí tabulka 2.

	radioterapie
Počet pacientů	103
Průměrná hodnota PSA před terapií	21,9 (3,4-116,0)
Průměrné Gleasonovo skóre	5,7 (2 – 9)
Průměrný věk době diagnózy	66,3 (51 – 83)
Průměrná expektace života	13,2 (5,05-23,47)
Průměrná doba sledování (měsíce)	67,5 (15 – 114)

Tabulka 1. Charakteristika souboru pacientů

	radioterapie
Předpoklad lokalizovaného onemocnění	40,1%
Předpoklad kapsulární penetrace	51,4%
Předpoklad postižení semenných váčků	19,6%
Předpoklad postižení lymfatických uzlin	15,2%

Tabulka 2. Předpoklad stádia KP podle Partinových nomogramů

Výsledky

Ze sledovaného souboru dosud zemřelo 7 pacientů (6,8%).

Z toho pouze 2 (1,9%) na progresi karcinomu prostaty (34, 44 měsíců od terapie),

3 pacienti (2,9%) zemřeli na interní komorbidity, 2 (1,9%) na nově vzniklé duplicitní karcinomy (ledvina, pankreas).

Progrese onemocnění byla detekována u celkem 16 pacientů (15,5%) v průměru za 44,1 měsíce (0 – 74).

2 pacienti na progresi karcinomu prostaty zemřeli, u 9 pacientů zatím trvá kompletní remise, u 2 pacientů v současné době progreduje PSA a je vysazen antiandrogen. U 3 pacientů došlo k další progresi a probíhá systémová chemoterapie docetaxelem.

Nežádoucí účinky léčby:

Nejčastějším nežádoucím projevem léčby bicalutamidem byla gynekomastie, která se manifestovala celkem u 54 pacientů (52,4%). Z toho u 24 pacientů (23,3%) byla gynekomastie asymptomatická, bez nutnosti terapie, symptomatická gynekomastie byla u 30 pacientů (29,1%).

U 10 pacientů byl podán Tamoxifen s dobrým efektem, u 6 pacientů byl Tamoxifen bez dostatečného účinku, u 3 pacientů byl dobrý efekt analgetické radioterapie. Ostatní pacienti se symptomatickou gynekomastií si navrhovanou léčbu nepřáli a většinou zvolili vysazení adjuvantní medikace.

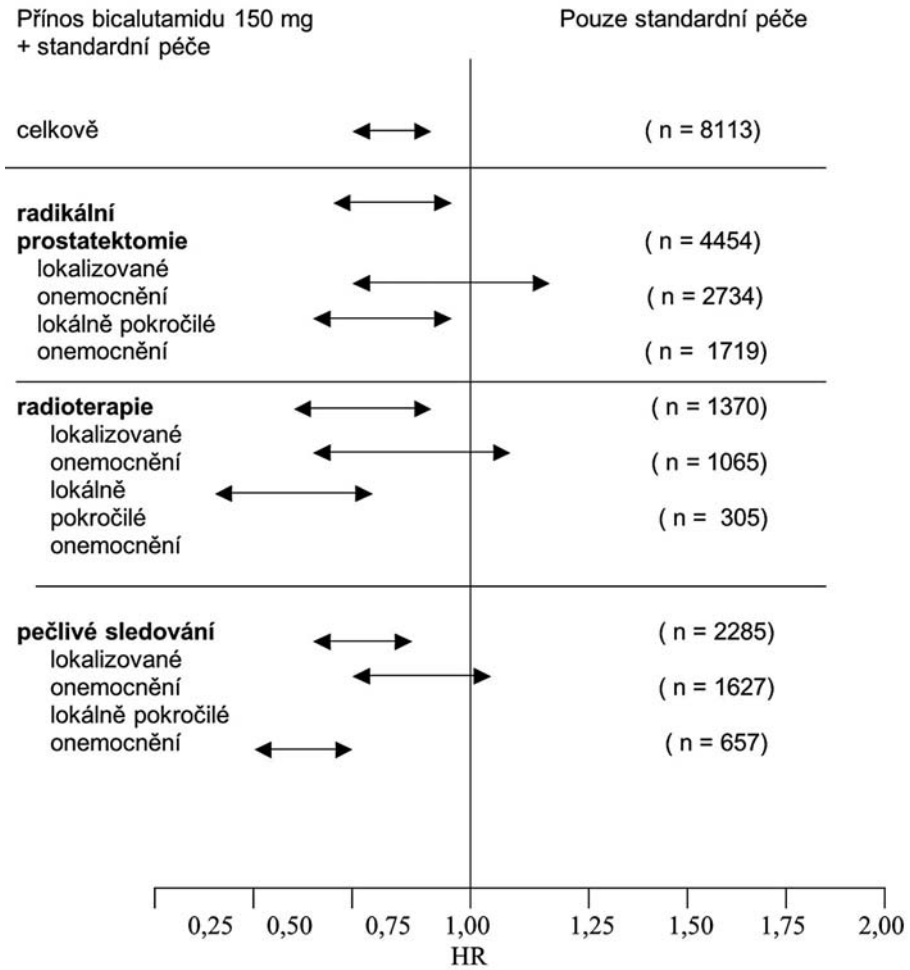
Ostatní nežádoucí vedlejší účinky byly ojedinělé – viz tabulka 3.

K přerušení léčby v důsledku projevů nežádoucích vedlejších účinků došlo u 12 pacientů (11,6%), většinou na přání pacienta.

	radioterapie
Gynekomastie celkem	54 (52,4%)
Asymptomatická gynekomastie	24 (23,3%)
Symptomatická gynekomastie	30 (29,1%)
Bolest v zádech	5 (4,9%)
Průjem	2 (1,9%)
Zvýšená únava	2 (1,9%)
Osteoporosa	1 (1,0%)
Dušnost	2 (1,9%)
Exantem	1 (1,0%)
Nechutenství	2 (1,9%)

Tabulka 3. Nežádoucí účinky léčby bicalutamidem

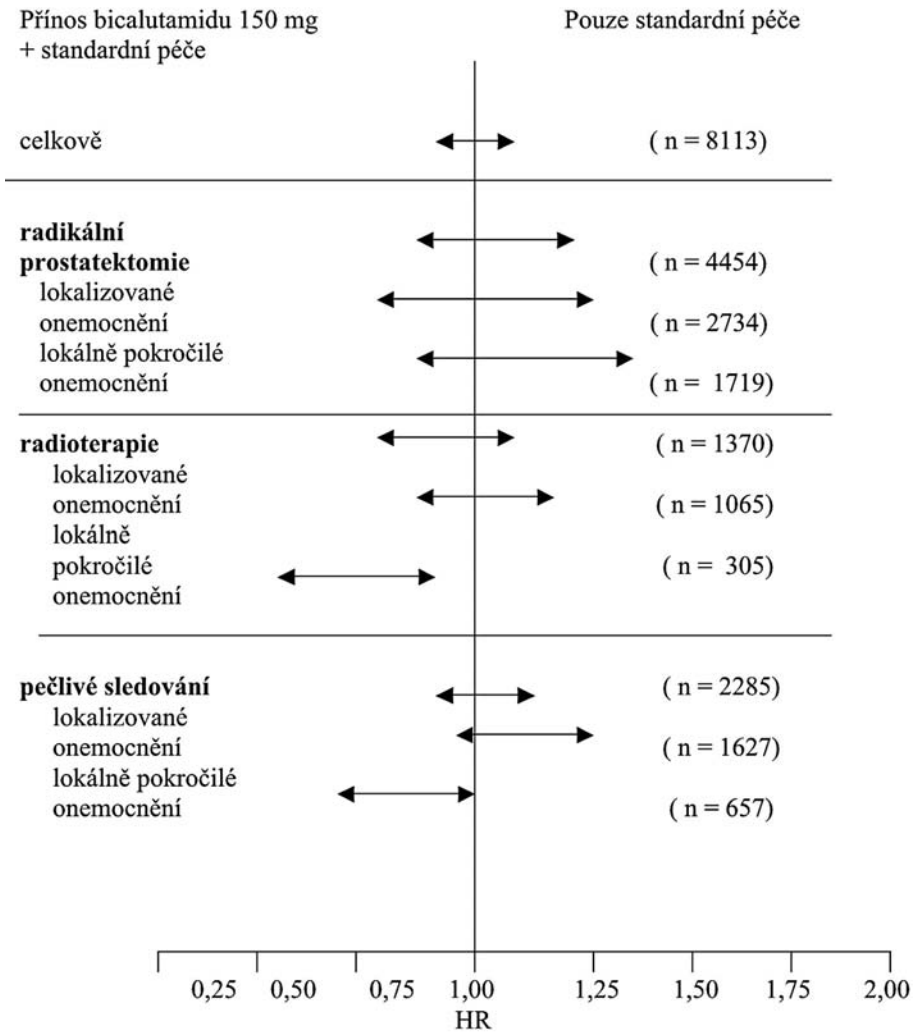
Přímé srovnání našich výsledků se závěry hodnocení EPC studie je obtížné, protože v žádné ze 3 jednotlivých studií není samostatně vyhodnocen soubor pacientů s lokálně pokročilým karcinomem prostaty léčených radioterapií s kurativním záměrem po předchozí neoadjuvantní androgenní blokádě.



Graf 1.

Při posledním hodnocení po 7,4 letech průměrného sledování jsou již provedeny analýzy jednotlivých podskupin podle typu provedené primární terapie. Bylo zjištěno, že u pacientů s lokálně pokročilým karcinomem prostaty léčených radioterapií a adjuvantně bicalutamidem 150 došlo k signifikantnímu snížení rizika úmrtí o 35%.

Hodnocení přínosu bicalutamidu 150 u pacientů po jednotlivých léčebných modalitách ukazuje graf 1 (přežití bez progrese) a graf 2 (celkové přežití).



Graf 2.

Závěr

Přes to, že u pacientů s lokálně pokročilým onemocněním s rizikovými faktory léčených radioterapií s následným adjuvantním podáváním bicalutamidu v dávce 150 mg je šance na snížení progrese nemocnění i zlepšení přežívání, při dlouhodobém sledování u určitého procenta i takto léčených pacientů progresi nevyhneme. Srovnání naší běžné klinické praxe s výsledky studie EPC přináší významné informace, kdy na základě evidence based medicine můžeme zpřesnit indikace a u jasně definované skupiny pacientů můžeme aplikovat léčbu s objektivně prokázaným efektem a naopak u jiných skupin pacientů, u kterých dosud nebyl objektivizován prospěch z takové léčby se můžeme vyhnout řadě nepříjemných vedlejších účinků neefektivní léčby.

XXV.
Pozitronová emisní tomografie v diagnostice nádorů

214 Nová radiofarmaka pro pozitronovou emisní tomografii a jejich zavedení do praxe.

Bolčák K., Staníček J.
Oddělení nukleární medicíny a pozitronové emisní tomografie, Masarykův onkologický ústav, Brno.

Klíčová slova: PET – radiofarmaka – FDG – non-FDG radiofarmaka – onkologie.

Úvod

Fluoro-deoxy-glukóza značená 18F je v současnosti nejvíce používaným radiofarmakem pro pozitronovou emisní tomografii ve světě. FDG – PET umožňuje zobrazit na molekulární úrovni stupeň metabolismu tkání (glykolýzu) a nepřímo buněčný transport glukózy, aktivitu hexokináz a GLU-6-fosfatázy. Přes svoje nesporné výhody z hlediska včasné diagnostiky nádorových onemocnění (vysoká senzitivita) má FDG – PET i řadu limitací, např. obtížnost oddiferencovat patologické ložisko od tkání s fyziologicky vysokou metabolickou aktivitou (tumory mozku), od odvodných cest močových, detekovat nádory diferencované a pomalu rostoucí, nádory s upregulací GLU-6-P (HCC) a odlišit nádor od nespecificky zvýšené akumulace FDG u zánětů a infekce. Z uvedených důvodů je perspektivně nutné zavést do klinické praxe PET vyšetření s použitím jiných, non – FDG radiofarmak.

Z radionuklidů se na značení RF pro PET používají:

^{18}F

- je ideální pro značení PET- RF zhledem k optimálnímu poločasu rozpadu (110 min.), který umožňuje distribuovat RF na vzdálenější pracoviště PET bez vlastní produkce RF,
- nízkou energii emitovaných pozitronů s krátký doletem ve tkáních umožňující vysokou rozlišovací schopnost kamer.

^{11}C, ^{13}N a ^{15}O

- jejich krátký fyzikální poločas limituje jejich využití i v PET centrech s cyklotronem,
- radiofarmaka jimi značená nejsou vhodná na sledování pomalejších biologických procesů a v případech, kdy je zpomalená clearence radiofarmak.

Platí proto všeobecný usus:

- na značení radiofarmak používat 18F, kdykoliv je to možné,
- ^{11}C, ^{13}N a ^{15}O používat na značení jenom u RF, které není možné značit ^{18}F.

Nádorový růst je z hlediska molekulárního zobrazení možné specifikovat z rozdílných hledisek. Tabulka poskytuje přehled možností zobrazení jednotlivých atributů nádorového růstu s přehledem perspektivně využitelných radiofarmak.

Cíl zobrazení	Perspektivní radiofarmakum
Metabolismus / utilizace energie	FDG , C -DG
Proteosyntéza	C – MET, analogy TYR, LEU, PHE
Proliferace / syntéza DNA	F – FLT, F – cholin, C - acetát
Dekarboxylace bílkovin	F – DOPA, C - hydroxytryptofan
Oxygenace / hypoxie	Cu –ATSM, F – MISO, F - FAZA
Buněčné receptory / TUmarkery	F – FES, EGFR - inhibitory
Apoptóza	F – anexin V
Exprese genů / onkogeneze	F – pancyklovir / HSV – 1 reporter gén systém, antisense oligonukleotidy
Angiogeneze	Protilátky,integriny,nemolekulární farmaka

Tabulka 1.

Z hlediska využití nových radiofarmak podle orgánového postižení je perspektivní:

1. u karcinomu prsu stanovit estrogenový a progesteronový receptor.
RF: [^{18}F]fluoro-ethyl-norprogesteron (FENP) a [^{18}F]fluoro–17β–estradiolem (FES),

2. u karcinomu prostaty stanovit vychytávání značených androgenních receptorů.
RF: [^{18}F] 11β–fluoro–19–nor–5α–dihydrotestosteron
[^{18}F] 11β–fluoro–1–5α–dihydrotestosteron [^{18}F]–DHT.

3. u kolorektálního karcinomu použít **5-fluorouracil([^{18}F]FU**), který je zde využíván pro přesnější diagnostiku jaterních metastáz a jejich kvantifikaci stanovením hodnoty intracelulární koncentrace ^{18}F]FU v oblasti metastáz,

4. u mozkových nádorů použít fluorem značených aminokyselin vykazujících vysokou permeabilitu barierou krev – mozková nádorová tkáň, ale nízký záchyt v normální mozkové tkáni.
RF: L–[2–^{18}F] fluorofenylalanin
L–[2–^{18}F] fluorotyrosin
O–2–[^{18}F]fluoroethyl–L–tyrosinu ([^{18}F]FET)
[^{18}F]l–amino–3fluorocyklobutankarbonová kyselina ([^{18}F]FACBC),

5. u maligního melanomu použít monoklonální protilátky, které se vážou s lidskými melanomovými antigeny.
RF: tridecopeptid α–MSH
[Nle^{4},D–Phe^{7}]–α–MSH

6. u genové terapie neinvazivně **zobrazit genový transfer**
RF: 8–^{18}F]–fluorogancyclovir [^{18}F]–FGCV
(9[(3–[^{18}F]–fluoro–1–hydroxy–2–propoxy)methyl]guanin [^{18}F]FHPG

7. zobrazit vazbu na σ receptory pro tomografickou detekci nádorů tlustého střeva, plic, mammy, jater a kožních melanomů.
RF: [^{18}F]α–(fluorofenyl)–4–(5–fluoro–2–pyrimidinyl)–1–piperazin–butan ol
[^{18}F]1–(3-fluoropropyl)–4–(4–kyanofenoxymetyl)piperidin.

8. odhad hypoxie buněk.
Buňky jsou v přítomnosti kyslíku mnohem sensitivnější k radiaci než bez přítomnosti kyslíku.
Množství hypoxických nádorových buněk limituje účinek radioterapie.
RF: [^{18}F]fluoromisonidazol ([^{18}F]FMISO)
[^{18}F]fluoroetanidazol ([^{18}F] FETA).

9. charakterizovat nádorový růst z hlediska proliferace
Pyrimidové analogy pro studium proliferace nádorové tkáně
RF: 3'–deoxy–3'–[^{18}F]fluorothymidin (3'–[^{18}F]FLT),
zabudovává se do nově replikované DNA. Intracelulární retence FLT je dostatečná k stanovení buněčné proliferace.

2'–deoxy–2'–[^{18}F] fluorouridin
zabudovává se do DNA a RNA, vykazuje však krátký biologický poločas, je rychle degradován.

2'–fluoro–5–methyldeoxyuracil–β–D–arabinofuranosyl–uracil([^{18}F] FMAU),
také podléhá degradaci.

Závěr

Využití nových non-FDG radiofarmak může mít důležitou úlohu pro zkvalitnění onkologické diagnostiky z hlediska objasnění molekulárních principů nádorového růstu a individualizaci léčby. Rozhodující je definovat vhodné cíle pro zobrazení za použití vhodných radiofarmak

Využití nových radiofarmak je a bude vázané na několik málo specializovaných center s technickým a personálním zázemím. Širší komerční využití je až na několik nejpopulárnějších radiofarmak značených 18F nepravděpodobné.

K dosažení úspěchu je nutná spolupráce PET Center, tvůrců legislativy, farmaceutického průmyslu a klinických pracovišť.

215 Přínos PET CT k algoritmu léčby karcinomu jícnu.

Vrba R., Neoral Č., Aujeský R., Cincibuch J.
I. chirurgická klinika FN Olomouc

Cíl práce
Posouzení významu PET/CT při stanovení přesného stagingu onemocnění při karcinomu jícnu.

Materiál a metodika
Na I. chirurgické klinice bylo od roku 2006 vyšetřeno PET/CT celkem 19 nemocných s karcinomem jícnu. Autoři analyzují přínos vyšetření ke stanovení stagingu onemocnění.

Výsledky
Ze sestavy nemocných nebyla u 17 pacientů pomocí PET/CT zjištěna generalizace onemocnění, pacienti prodělali neoadjuvantní radiochemoterapii a chirurgickou resekční léčbu. U 2 nemocných byla PET/CT vyšetřením prokázána generalizace onemocnění, která byla histologicky verifikována. Oba pacienti byli indikováni k paliativní onkologické léčbě.

Závěr
Ke zlepšení nelichotivých výsledků v terapii karcinomu jícnu vede správně stanovené stadium onemocnění před zahájením náročné terapie. Vhodná metoda volby je PET/CT vyšetření, které včas detekuje generalizaci onemocnění a umožní provádět náročnou terapii pouze u indikovaných pacientů.

216 Význam 18-FDG PET v diagnostice a sledování efektu terapie u pacientů s hepatocelulárním karcinomem.

Bencsiková B.[1], Nižňanská V.[2]
1*) Klinika komplexní onkologické péče*
2*) Oddělení nukleární medicíny a PET, Masarykův onkologický ústav, Brno*

Úvod
Hepatocelulární karcinom (HCC) je nejčastější primární maligní nádor jater. Může být diagnostikován s použitím zobrazovacích metod, jako ultrazvukové vyšetření (UZ), výpočetní tomografie (CT), magnetická rezonance (MRI), angiografie, i přesto vznikají diagnostické nejasnosti. Ze zobrazovacích metod můžeme dále využít metody nukleární medicíny scintigrafické a pozitronové emisní tomografie (PET), především PET/CT, které se v poslední době stává součástí diagnostických algoritmů onkologických onemocnění.

Zejména u pacientů s cirhózou se vypracovávají nové diagnostické non-invazivní kriteria. Alfa-fetoprotein (AFP) má v diagnostice HCC nízkou senzitivitu, přibližně 70% HCC vytváří AFP.

Ani bioptická verifikace není podle některých autorů optimálním řešením z důvodu rizika rozsevu (3,4-5,1%), především u kandidátů na transplantaci a u pacientů s často nevyhovujícími hemokoagulačními parametry. Biopsie může mít nízkou senzitivitu v důsledku nehomogenity nádorových areí (přítomnost nekróz u velikých tumorů), a u malých HCC. Platí, že negativní biopsie nevylučuje dg HCC.

HCC vychytává 18-FDG různou intenzitou, nehomogenně, v závislosti na viabilitě nádorové tkáně. Předpokládá se závislost na přítomnosti enzymu 6-phosfatázy, která je do různé míry přítomna v buňkách HCC.

Cílem práce je vyhodnotit význam 18-FDG-PET v diagnostice, léčebné strategii a sledování efektu terapie u pacientů s HCC, se zaměřením se na zjištění včasné recidivy po resekcích, radiofrekvenčních ablacích (RFA) a chemoembolizacích (TACE).

Metoda
Retrospektívní analýza souboru 30 pacientů léčených v MOÚ od ledna 2004, u kterých jsme analyzovali výsledky vyšetření 18-FDG-PET. Intenzitu akumulace 18-FDG v tumoru jsme měřili vizuálně a kvantitativně (hodnocení standard uptake value-SUV), v korelaci s histologickým typem, gradingem, hodnotou AFP a ve srovnání s provedenými zobrazovacími metodami, nejčastěji fúze s CT.

Výsledky
FDG- PET vykazoval pozitivitu u 87% pacientů, vyšší histopatologický grade koreluje s intenzitou vychytávání FDG. Diagnostickým problémem se jeví spíš dobře diferencované HCC, pro které má vyšetření s 18-FDG nižší senzitivitu pro primární diagnostiku.

U 30% pacientů zjišťujeme klinický význam PETu, ve smyslu změny terapeutického postupu- upřesnění místa biopsie, posouzení resekability, zobrazení nádorového trombu, detekci jaterních a vzdálených metastáz. Přínos po intervenčních výkonech (RFA, TACE) prezentujeme také formou několika kazuistik.

Závěr

18-FDG-PET lze považovat za součást vstupního stagingu k vyloučení extrahepatální diseminace, zejména u pacientů před zařazením do transplantačního programu. FDG-PET/CT je přesnější ve srovnání s CT v posuzovaní včasné recidivy po resekci, nebo rezidua nádoru po RFA a TACE.

217 Význam ^{18}F-FDG PET/CT v diferenciální diagnostice tumorózně zvětšených nadledvin u onkologických pacientů.

Nižňanská V., Řehák Z., Bolčák K., Staníček J., Stupalová J.
Oddělení nukleární medicíny a PET pracoviště, Masarykův onkologický ústav, Brno

Nadledviny jsou velmi **častým cílem metastáz** (MTS) různých nádorů. **Při solitárním postižení** nadledviny u onkologického pacienta je odlišení MTS a benigního ložiska, nejčastěji adenomu, zásadní z hlediska managementu léčby a rozhoduje o další prognóze pacienta. Protože **výskyt incidentalomů** (náhodně objevených ložisek v nadledvinách) v populaci s věkem výrazně stoupá a může dosahovat téměř 10%, často se s tímto problémem při stagingu a následné dispenzarizaci onkologických pacientů setkáváme. V souborech běžné populace tvoří benigní adenomy většinu z incidentalomů, v souborech onkologických pacientů je mírná převaha MTS, ale s nezanedbatelným podílem benigních adenomů.

Cílem naší práce bylo zhodnotit **přínos ^{18}F-FDG PET/CT** v diferenciální diagnostice tumorózně zvětšených nadledvin, protože je známo, že ^{18}F-FDG se metabolizuje v převážné většině maligních nádorů.

Největší význam má toto vyšetření při předoperačním stagingu, ale je vhodné též při hledání případné časné recidivy po adrenalektomii a při sledování efektu léčby.

Soubor a metody

V našem souboru bylo 76 onkologických pacientů, z toho 27 se solitárním postižením nadledviny. Nejvíce pacientů mělo primární tumor plic, ledviny, prsu, tlustého střeva nebo maligní melanom. Morfologicky jsou benigní a maligní ložiska na CT často k nerozeznání, proto jsme volili k hodnocení jejich biologické povahy **měření kvantitativních parametrů.** Při zpracování obrazů a následné fúzi jsme přeměřovali: **denzitu ložisek v** nadledvinách **na nativních CT scanech** vyjádřenou v HU a **intenzitu akumulace ^{18}F-FDG na PET scanech** jako semikvantitativní hodnotu SUV (standard uptake value). Následně jsme srovnávali kvantitativní i vizuální informace z obou těchto modalit. Vizuálně jsme pozitivitu PET hodnotili, už když ložisko intenzitou zobrazení lehce převyšovalo referenční játra. Histologická verifikace byla provedena u 7 pacientů, u ostatních jsme hodnotili další vývoj a určovali ložiska jako stacionární, anebo jako progresi, i s případnou diseminací. CT scany jsme získavali za pomoci PACS-u anebo v digitalizované podobě z CD. Pozitronovou emisní tomografii jsme prováděli PET kamerou ECAT ACCEL Siemens za standardních podmínek.

Výsledky

Z celkového počtu 76 pacientů byla ložiska hodnocena jako metastázy u 40, co činí 52%. **Metastázy** se jevily jako jednoznačně **PET pozitivní**, s vysokou akumulaci FDG, s průměrnou hodnotou SUV max. 12. (cut off 3,1)

a průměrnou denzitou na nativním CT 36 HU. **Adenomy** v počtu 26 (co činí 34%), byly **PET negativní**, s průměrnou hodnotou denzity + 5 HU a většina z nich patřila do skupiny **adenomů s** vysokým **obsahem tuku, čili s** nízkými **denzitami do 10 HU** (u těchto byla korelace kvantitativních i vizuálních parametrů při CT a PET vyšetření 100%.) U dvou pacientů bez aktivního onkologického onemocnění, se zobrazily kortikální adenomy s mírnou akumulací ^{18}F-FDG spíše jako náhodný, vedlejší nález s předpokládanou latentní hyperfunkcí. Hodnoty denzity na CT nedosahovaly průměrné velikosti jako u MTS (do 23 HU). U obou byla histologická verifikace a byly doporučeny endokrinologické testy. Ostatní ložiska v nadledvinách následně: **ganglioneurom** zralého typu, který může připomínat adenom s nízkým obsahem tuku, **primární lymfom** obou nadledvin s výrazně zvýšenou intenzitou metabolizmu ^{18}F-FDG, **PNET** a **myelolipom.** V obrazové formě prezentujeme některé typické obrazy metastáz, časné recidivy po adrenalektomii, benigních nefunkčních adenomů a dalších.

- zcela zásadní bylo určení **denzity na nativních CT scanech**, přičemž hodnoty do 16 HU velmi dobře korelovaly s negativním PET nálezem.
- **metastázy se vyznačovaly pozitivním PET nálezem**, se zvýšenou akumulací ^{18}F-FDG, která korelovala s vyššími hodnotami denzity na nativním CT.
- měření denzity časných postkontrastních scanů nebylo standardně určováno, protože **adenomy** mají **výrazný enhancement** a hodnoty denzit s MTS se překrývají!

- **technika měření washout** – pokles denzity v čase (v 15. min.) po podání k.l. nebyl při CT standardně určován, i když má v diagnostice dle literatury vysokou přesnost.

Z těchto výsledků vyplývá, že u onkologických pacientů s tumorózně zvětšenou nadledvinou, když je nález na CT nebo na MR nejednoznačný, je plně indikováno vyšetření pomocí PET anebo hybridní PET/CT kamery. Jedná se především o netypická ložiska vzhledem připomínající adenomy, u kterých denzita na nativním CT přesahuje hodnotu 10HU. Přesnost metody udávaná v literatuře dosahuje 97 – 100%.

Závěr

^{18}F-FDG PET/CT je velmi vhodnou metodou při odlišování benigních a maligních ložisek v nadledvinách, a to zvláště při syntéze kvantitativních informací z obou modalit.

Podpořeno Grantem IGA MZČR NR8342-3/2005

218 PET v diagnostice rakoviny děložního čípku.

Mojžíšová J., Havířová H., Bolčák K.
ONM, Masarykův onkologický ústav, Brno

Rakovina děložního čípku představuje celosvětově druhý nejčastější nádor žen s poměrně vysokou úmrtností. Nejnovější výzkumy ukazují, že původcem rakovinných změn děložního hrdla je infekce způsobená některými typy lidských papilomavirů (HPV), které jsou sexuálně přenosné a v současné populaci poměrně rozšířené.

Prognostické hodnocení a léčitelnost tohoto tumoru jsou přímo úměrné stupni pokročilosti, jeho velikosti, závisí na histologickém typu, gradingu, lymfatickém a cévním šíření v čase diagnosy.

Klasifikace rozsahu nemoci je dosud zatížená řadou nepřesností. Zavedení diagnostických metod CT, PET, MR doplňuje a zpřesňuje nález. S velkou spolehlivostí umožňuje zachytit hlavně zvětšené uzliny jak v oblasti pánve i v oblasti paraaortální. Avšak rozlišení zánětlivých procesů od tumorosních infiltrátů v pánvi je leckdy velmi obtížné.

Cíl: Seznámení odborné veřejnosti s problémem rakoviny děložního hrdla v současné populaci.

Metoda: Prezentace kazuistik vyšetřovaných žen.

Výsledky: Možnosti PET v záchytu nádorových ložisek.

Závěr: Výsledkem sledování skupiny žen s dg. C53 novými zobrazovacími metodami přináší kromě nových medicínských a etických hledisek i pohled na dokonaleji cílenou léčbu nádorů ženských pohlavních orgánů.

219 Reziduální retroperitoneální infiltrát u nemocných s germinativním tumorem varlat – lze určit jeho viabilitu pomocí ^{18}F-FDG PET?

Řehák Z.[1], Kocák I.[2], Fabián P.[3], Penka I.[4], Pacal M.[5], Čapák I.[6], Lakomý R.[2], Bolčák K.[1], Nižňanská V.[1], Staníček J.[1], Stupalová J.[1], Bartl J.[1], Tomášek. J.[7]
1) Oddělení nukleární medicíny, MOÚ Brno
2) Klinika komplexní onkologické léčby, MOÚ Brno
3) Oddělení patologie, MOÚ Brno
4) Oddělení chirurgické onkologie, MOÚ Brno
5) Oddělení radiologie, MOÚ Brno
6) Oddělení urologické onkologie, MOÚ Brno
7) Oddělení klinické onkologie FN Brno

Úvod

Retroperitoneální (RP) lymfatické uzliny jsou u germinativních nádorů varlat spádovou lymfatickou oblastí. Tyto uzliny zůstávají i po chemoterapii (CHT) často zvětšeny, jejich resekce předpokládá nalezení fibrózy (48%), teratomu (37%) nebo jiného viabilního tumoru (15%).

Cíl

Zhodnocení přínosu ^{18}F-FDG PET v predikci viability RP infiltrátu porovnáním PET pozitivních a negativních nálezů s histologickým vyšetřením u pacientů po léčbě kurativní CHT a po resekci RP rezidua.

Soubor a metody

Od září 2003 do června 2006 (33 měsíců) jsme provedli 501 PET vyšetření u 482 pacientů s germinativními tumory varlat. Vlastním souborem je 18 pacientů po CHT, u kterých byl RP infiltrát do 90 dní od vyšetření PET reskován. Věk nemocných byl v rozmezí 18-39 let (průměr 27,6 let), jednalo se o 3 seminomy a 15 nádorů neseminomového typu. (V souboru jsou zahrnuti i 2 pacienti s extragonadálním germinativním tumorem RP).

Výsledky

PET vyšetřením byly RP infiltráty rozděleny na 3 skupiny. 1. PET pozitivní (3x) – ložiskový nález se SUVmax nad 3, 2. PET hraniční (2x) – ložiskový nález se SUVmax v rozmezí 2-3 a 3. PET negativní (13x). U 3 PET pozitivních nálezů byla 1x správně detekována perzistující nádorová tkáň a 2x byla falešná pozitivita u zánětlivých změn ve fibróze (u seminomu i neseminomu). U 2 seminomů PET správně detekovala fibrózu. Oba 2 nálezy s hraničním zvýšením akumulace ^{18}FDG odpovídaly zralým teratomům. Problematické byly PET negativní nálezy u neseminomů (11 pacientů) vzhledem k nálezu mikrometastáz teratokarcinomu (1x), zralého teratomu (4x) i fibrózy (6x).

Závěr

Doporučenou indikací u germinativních nádorů varlat je PET k predikci viability reziduálních infiltrátů u seminomů. Rovněž v případech našich seminomů byla správně určena fibrotická rezidua. Je třeba počítat s možností falešné PET pozitivity i při zánětlivých změnách ve fibroticko nekrotickém reziduu, a to u všech histologických typů. Potvrzujeme, že v případě neseminomů není PET schopna odlišit fibrotické reziduum od zralého teratomu (oba nálezy mohou být PET negativní). ^{18}F-FDG PET při predikci viability reziduálních tumorů u neseminomů, ale také při stagingu a při podezření na relaps u nádorů varlat, je stále předmětem mnoha studií a její role není definitivně stanovena.

Podpořeno: Grantem IGA MZČR NR 8342-3/2005.

XXVI.
Onkopatologie

220 Úloha banky biologického materiálu v onkologii. Změna archivace vzorků v Masarykově onkologickém ústavu.

Knoflíčková D., Šimíčková M., Šmerdová T., Nenutil R., Žaloudík J.
Masarykův onkologický ústav, Brno

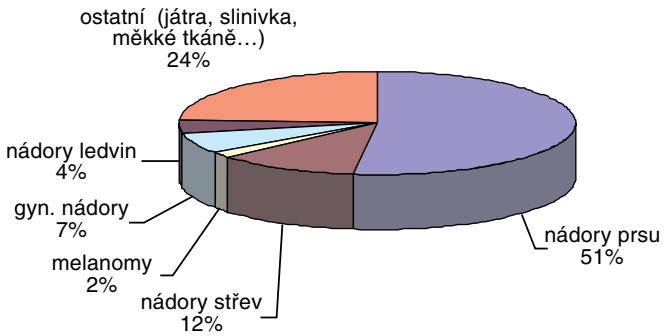
S rozvojem molekulární biologie v posledních dvou desetiletích nabývá na významu dostupnost nádorové tkáně odebrané při operaci a uchované v nativním stavu v bance biologického materiálu za přesně definovaných podmínek. Způsob uložení nefixované tkáně je velice důležitý pro rozvoj a uplatnění aktuálních či budoucích výzkumných projektů, analyzujících nové prognostické či prediktivní faktory jak na úrovni genomu, tak i proteomu. Další využití je spatřováno také v možnosti ovlivnění terapeutických procesů individuálního pacienta.

Banka biologického materiálu Masarykova onkologického ústavu byla založena koncem roku 2000 a v současnosti je v ní uloženo přes 3000 vzorků maligních tkání, obvykle ve 2-4 alikvotech. Je zaměřena především na vybrané nádorové lokality, a to mammární a kolorektální karcinomy, melanomy, karcinomy ledvin a nádory gynekologické. Nezbytná je také dostupnost relevantních klinických dat k uloženým vzorkům, která jsou pro význam nádorové banky klíčová.

Archivovány jsou nejen primární nádorové tkáně, ale také metastázy nebo, je-li dostupná, i tkáň nenádorová. Do banky biologického materiálu jsou ukládána rovněž séra všech nemocných před operací, event. séra vybraných pacientů v průběhu onemocnění. V loňském roce bylo započato s uchováváním nádorové tkáně v RNA Lateru, zajišťujícím okamžitou stabilizaci RNA ihned po odběru tkáně.

Až do roku 2006 byly všechny vzorky uloženy v hlubokomrazícím boxu při teplotě -80C. Začátkem roku 2007 došlo k vybudování nových prostor, určených pro banku biologického materiálu, přímo na oddělení klinické a experimentální patologie, kde je nyní umožněna archivace vzorků v parách tekutého dusíku (kolem –150°C). Z hlediska dlouhodobého uchovávání materiálu je tento typ archivace velmi vhodný, jelikož při těchto teplotách dochází k zástavě chemických reakcí, což vede k vynikající výtěžnosti makromolekul i po víceletém uložení tkáně.

Podíl maligních tkání v bance biologického materiálu k 31.1.2007



Současné využití banky biologického materiálu spočívá především v poskytnutí nádorové tkáně jako modelového materiálu pro řešení výzkumných či grantových projektů MOÚ. Pro budoucí využití je uvedený materiál velice cenný z hlediska dalších projektů na různých úrovních výzkumu a také pro individuální predikci odpovědi nemocného na navrhovanou terapii.

Organizace podobných projektů na evropské úrovni předpokládá v blízké budoucnosti i existenci virtuálních bank biologického materiálu, jejichž cílem bude vytvořit síť nádorových bank pro obecné využití vědeckou veřejností.

Projekt podpořen výzkumným záměrem MZO 00209805

221 Využití laserové mikrodisekce pro přípravu komplexních vzorků z nádorové tkáně pro účely mikrogenomických analýz.

Dziechciarková M.[1], Berkovcová J.[1], Trojanec R.[1], Srovnal P.[1], Bouchalová K.[1] Hajdúch M.[1,2]
1) Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci
2) Onkologická klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci

Laserová záchytná mikrodisekce (Laser capture microdissection, LCM) je rychlá a spolehlivá metoda, která umožňuje izolaci cílových buněk ze specifického komplexu tkáně pro jejich následnou molekulární nebo proteinovou analýzu. Základem LCM je inverzní mikroskop se zabudovaným nízko výkonnostním infračerveným laserem. Nařezané tkáně jsou upevněny na standardní podložní sklo a termoplastická membrána (TM) je umístěna nad dehydratovaný preparát. V ohnisku laserového mikroskopu je umístněna TM, kterou laser roztaví v požadovaném místě a naváže tak cílovou buňku či strukturu k membráně. Laserovou mikrodisekci lze použít pro izolaci buněk u řady typů buněčných i tkáňových preparátů, včetně zamražených vzorků, formalínem fixovaných parafinizovaných tkání či cytologických preparátů. V závislosti na použitém materiálu je možno z mikrodisekovaných buněk extrahovat DNA, RNA či proteiny v dobré kvalitě. Kombinací s dalšími technikami, jako je například cDNA microarray, LCM pomáhá identifikovat nové diagnostické a prognostické znaky vedoucí ke zlepšení diagnosticko terapeutických metod v léčbě onkologických onemocnění.

Na našem pracovišti jsme laserovou mikrodisekcí izolovali buňky z cytologických preparátů adenokarcinomu plic získaných punkční cytologií zmražených či parafinizovaných nádorů a také buněčné linie, např. myeloidní leukemii K562. V této práci popisujeme naše zkušenosti se zavedením LCM s následnou mikroizolací DNA/RNA a lineární amplifikací DNA/RNA pro účely dalších genetických analýz jako je např. komparativní genomická hybridizace, expresní studie, či přímé sekvenování vyšetřovaných genů z biologického materiálu s minimálním obsahem nádorových buněk, či pro studium nádorové heterogenity na jednobuněčné úrovni.

Práce na tomto projektu byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT 6198959216, grantem LC07017, IGA MZČR NR/9076 a MPO 1H-PK/45.

222 Chromogranin A pro tumory měkkých tkání?

Kapustová M., Vočková J., Schneiderka P., Beneš P., Cwiertka K.
OKB a Onkologická klinika, FN Olomouc

Úvod

Chromogranin A (CgA) je kyselý lidský protein, který se skládá z 439 aminokyselin.

Genetický kód se nachází na chromozomu 14.

Chromogranin A byl identifikován v mnoha normálních i neoplastických endokrinních tkáních.

Zvýšené koncentrace CgA byly prokázány u pacientů s tumory endokrinního původu.

CgA může být prekurzorem biologicky aktivních peptidů.

Je pravděpodobné, že štěpení nebo proteolytické zpracování chromograninu A v chromafinních granulách, začíná jak na C-konci, tak i na N-konci štěpení.

Měření chromograninu A může sloužit jako cenný diagnostický postup u jedinců s tumory např. feochromocytom, karcinoidní tumor, neuroblastom a malobuněčný karcinom plic.

Princip testu

Chromogranin A ELISA Kit je zjednodušený sendvičový test s dvojitou protilátkou, vzorky a protilátky proti chromograninuA konjugované s peroxidázou inkubují současně v mikrojamkách potažených anti-chromograninem A.

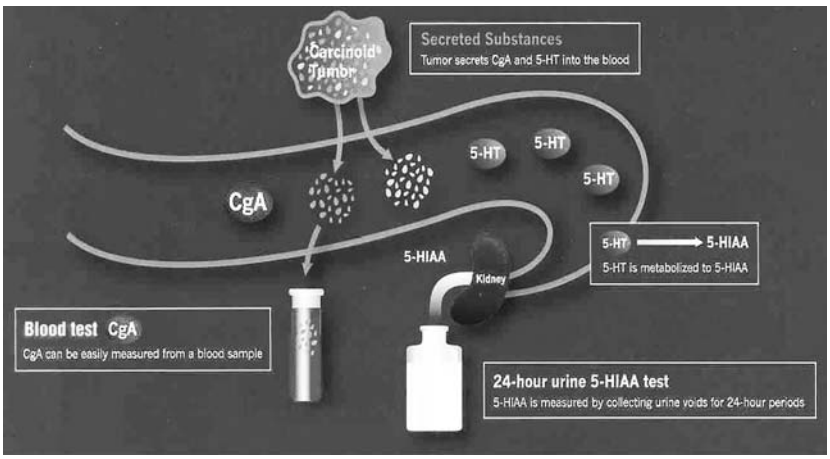
Při testu se používají králičí protilátky s fragmentem lidského chromograninu A s C-koncem

Standardy kitu jsou kalibrovány podle fragmentu s C-koncem

Předředěné vzorky se smísí s konjugátem a během dvou hodinové inkubace se vytvoří sendvič z protilátky v pevné fázi, chromograninuA a protilátky konjugované s peroxidázou.

Po přidání chromogenního substrátu dochází k barevné reakci vývoj reakce se zastaví přidáním kyseliny sírové. Absorbance se měří při 450 nm.

Koncentrace chromograninu se vydávají v U/l.



Závěr – význam stanovení CgA

CgA byl prokázán imunochemickými metodami (ELISA) v séru, plasmě i moči nemocných s neuroendokrinními malignitami. Ve srovnání s dosud užívanými metodami stanovení sérové NSE nebo močové 5-hydroxyindoloctové kyseliny vykazuje stanovení CgA v moči nejvyšší senzitivitu**.**

Senzitivita průkazu návratu choroby pro karcinoidy se pohybovala kolem 70 až 90%. Je to významný parametr pro monitorování především těch neuroendokrinních tumorů, které neprodukují jiné markery. Byla prokázána přímá korelace mezi sérovou hladinou CgA a nádorovou masou.

Histologický typ neuroendokrinních tumorů určuje míru exprese tohoto glykoproteinu, vysoké hladiny vykazují nemocní s karcinoidními tumory.

Neuroendokrinní diferenciace spojená s produkcí CgA může hrát významnou roli také u karcinomů prostaty nereagujících na hormonální léčbu.

Předpokládá se, že neuroendokrinní buňky neprodukující androgenní receptory nejsou ovlivněny hormonální terapií. Rezistence k hormonální terapii je možno predikovat stanovením CgA nejenom imunohistochemicky, ale i v cirkulaci. Bylo prokázáno, že CgA je u těchto nádorů zvýšen, i když je hladina PSA v séru normální. Zvýšená předterapeutická hladina CgA byla pozorována u 36% nemocných s metastázami před hormonální léčbou a u 45% nemocných s hormon-refrakterní chorobou. Zvýšená hladina CgA u tohoto typu nádoru koreluje se špatnou prognózou.

XXVII.
Nádorová imunologie

223 NK-T cells are expanded in cancer patients.

Dubska L., Frgala T., Valík D.
Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic, dubska@mou.cz

NK-T cells are unusual lymphocytes coexpressing some NK markers and possessing the self-reactivity and capacity to secrete quantities of cytokines implicating their importance in anti-tumour immunity. However, it is not clear whether NK-T cells enhance anti-tumor response via T_H1 pro-inflammatory cytokines production or rather suppress the anti-tumor response by secretion of T_H2 cytokines.

We aimed to investigate whether the correlation between cancer-state and number of NK-T cells exists and to specify the expression pattern of some antigens which could be associated with division into functional subsets. For this purpose, peripheral lymphocytes from more than 200 solid cancer patients in different state of disease and a control group of non-cancer adults were immunophenotyped by flow cytometry and the relative and absolute numbers of NK-T cells were assessed. Cancer patients were divided to one of three groups determined by /i/ new diagnosis /ii/ disseminated disease and /iii/ diseases-free remission, and statistical analysis of NK-T cell numbers with respect to these groups was performed.

Our data show the significant ($p<0.01$) increase of NK-T cells in patients with active malignancy (newly diagnosed and more profound in disseminated disease) compare to NK-T cells levels in non-cancer patients and patients in remission. We show case reports demonstrating gradual decrease of NK-T cells after initiation of anti-tumour therapy and increase of these lymphocytes during progression of disease. Concerning the immunophenotype, majority of NK-T cells was CD3+CD16-CD56+ and CD8 predominated CD4 expression. This work demonstrates that NK-T cells are expanded in solid cancer patients.

This work was supported by the Czech Ministry of Health (Grant No. MZ000209805)

224 Souběžná kvantifikace 10 Th1/Th2 cytokinů pomocí průtokové cytometrie: onkologický náhled a technická zpráva.

Dubská L., Bačíková, L., Valík D.
Oddělení laboratorní medicíny, MOÚ Brno, dubska@mou.cz

Vyzrálé T-lymfocyty diferencují pod vlivem určitých faktorů veš funkčně odlišné subsety, které se liší produkcí rozdílných spekter cytokinů. Výchozí populace naivních T-lymfocytů se označuje Th0, které mohou diferencovat, zpravidla pod dlouhodobějším vlivem mikrobiálních antigenů, do Th1 subsetu; po stimulaci nebakteriálních a nevirových antigenů (často enviromentálního původu např. alergenů) do buněk Th2 subsetu a konečně mohou diferencovat do Th3 subsetu. Mimo specifickou antigenní stimulaci je pro vyzrávání Th0 buněk určující cytokinové prostředí. Lymfocyty Th1 subsetu hrají úlohu především v buněčné cytotoxicitě, pro jejich vyzrávání je nezbytná přítomnost IL-12, IL-18, IL-1, a IFNγ, a výsledkem je pak produkce cytotoxických mediátorů jako je IFNγ, IL-2 a TNF. Th2 lymfocyty hrají úlohu při regulaci tvorby protilátek, pro vyzrávání do tohoto subsetu je nezbytná přítomnost IL-13 a IL-4. Th2 buňky pak produkují IL-4 (produkce protilátek), IL-5 (diferenciace eozinofilů), G-CSF(diferenciace granulocytů), IL-6 (hepatocytární produkce bílkovin akutní fáze) a také IL-2. Th3 buňky mají regulační úlohu protizánětlivého až imunosupresivního charakteru tlumící aktivitu Th1 buněk produkcí IL-10 a TGFβ.

Práce týkající se Th1/Th2 imunitní odpovědi v onkologické problematice poskytují více otázek než odpovědí; Th1/Th2 poměr se často hodnotí jako poměr mezi CD4+ lymfocyty exprimujícími IFNγ a IL-4. Takto zjištěný zvýšený Th1/Th2 poměr byl demonstrován jako negativní prognostický faktor u pacientů s rakovinou plic. Naopak posun k proti-zánětlivé/imunosupresivní složce imunitní odpovědi podle jiné studie přispívá k progresi metastáz hepatocelulárního karcinomu a snížení počtu Th1 lymfocytů a Th1 cytokinů bylo také zachyceno u pacientů s kolorektálním karcinomem, přičemž s progresí nemoci se redukce Th1 složky imunitní reakce prohlubovala. Proti-zánětlivá až imunosupresivní složka v podobě zvýšené exprese IL-10 je spojována s různými maligními onemocněními jako je maligní melanom, karcinom ledvin a kolorektální karcinom, a je popisována jako negativní prognostický faktor odpovědi na léčbu, i když existují práce označující IL-10 za supresor nádorového růstu a metastáz.

Jeden z přístupů jak vyšetřovat rovnováhu mezi Th1 a Th2 složkami imunitní odpovědi je multiplexové stanovení cytokinů ve vzorcích tělních tekutin imunoanalýzou pomocí průtokové cytometrie. Pro naše účely jsme použili systém FlowCytomix Multiplex human Th1/Th2 Kit II (Bender MedSystems), který umožňuje souběžnou (v jedné zkumavce) detekci 10 cytokinů (IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα, IL-12p70). Principem testu je interakce cytokinu s protilátkou navázanou na mikrosféru (kuličku) o určité fluorescenci. Hladina cytokinu je pak stanovena jeho interakcí s biotinylovanou protilátkou, která je dále značena streptavidinem-PE. V systému je tedy 10 různých typů kuliček tj. 2 velikostí 5 různých fluorescencí, které neinterferují s fluorescencí PE. Hladina jednotlivých cytokinů se odečítá z kalibrační křivky pro příslušný analyt.

Z technického hlediska jsme v první fázi zjišťovali vhodnost různých biologických materiálů pro stanovení, detekční rozmezí a variabilitu mezi jednotlivými měřeními. Porovnání periferní krve, séra a plazmy (Li-Heparin) ukázalo 1/ jednoznačně nejnižší výtěžek v případě séra, 2/ variabilní výtěžek pro jednotlivé analyty při srovnání plazma s periferní krev. Dále jsme se zaměřili na porovnání plazmy Li-Heparin a citrátové plazmy z hlediska reprodukovatelnosti signálu s mírně lepším výsledkem pro cit-

rátovou plazmu. Detekční rozmezí stanovené na souboru pacientek s karcinomem prsu v době před zahájením chemoterapie bylo napříč paletou cytokinů 0.0 pg/ml – 38.0 ng/ml, přičemž pouze IL-8 byl detekován u všech pacientů a ostatní analyty vykazovaly v tomto souboru pacientů značnou variabilitu od nulových hodnot po desítky ng/ml. Souběžná kvantifikace cytokinů pomocí průtokové cytometrie je možná v různých biologických materiálech, kdy je ovšem variabilní a patrně výrazně ovlivněná degradačními procesy. Reprodukovatelnost výsledků je poměrně dobrá na úrovni míry fluorescence, ale stanovení koncentrace některých cytokinů má horší reprodukovatelnost v závislosti na typu kalibrační křivky.

Z hlediska studia protinádorové imunity si od multiplexový způsobu detekce slibujeme vytipování a sledování určitých cytokiů v kontextu průběhu onemocnění (např. IL-10) a zhodnocení poměru mezi Th1 a Th2 imunitní odpovědí a zastoupením imunoregulačních buněčných subtypů hrajících patrně úlohu v průběhu onklogických onemocnění, např. NK-T buňky a regulační T-lymfocyty.

Tato práce byla podpořena Výzkumným záměrem grantem č. MZ000209805.

Literatura

1. Yamazaki, K., et al., Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma. Surgery, 2002. 131(1 Suppl): p. S236-41.
2. Ito, N., et al., Prognostic significance of T helper 1 and 2 and T cytotoxic 1 and 2 cells in patients with non-small cell lung cancer. Anticancer Res, 2005. 25(3B): p. 2027-31.
3. Budhu, A., et al., Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. Cancer Cell, 2006. 10(2): p. 99-111.
4. Nakayama, H., et al., Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer. Jpn J Clin Oncol, 2000. 30(7): p. 301-5.
5. O'Hara, R.J., et al., Advanced colorectal cancer is associated with impaired interleukin 12 and enhanced interleukin 10 production. Clin Cancer Res, 1998. 4(8): p. 1943-8.
6. Nemunaitis, J., et al., Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. Cancer Invest, 2001. 19(3): p. 239-47.
7. Wittke, F., et al., Interleukin 10 (IL-10): an immunosuppressive factor and independent predictor in patients with metastatic renal cell carcinoma. Br J Cancer, 1999. 79(7-8): p. 1182-4.
8. Galizia, G., et al., Circulating levels of interleukin-10 and interleukin-6 in gastric and colon cancer patients before and after surgery: relationship with radicality and outcome. J Interferon Cytokine Res, 2002. 22(4): p. 473-82.
9. Asadullah, K., W. Sterry, and H.D. Volk, Interleukin-10 therapy—review of a new approach. Pharmacol Rev, 2003. 55(2): p. 241-69.
10. De Vita, F., et al., Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. Cancer, 1999. 86(10): p. 1936-43.
11. Erdman, S.E., et al., CD4(+)CD25(+) regulatory lymphocytes require interleukin 10 to interrupt colon carcinogenesis in mice. Cancer Res, 2003. 63(18): p. 6042-50.

225 Regulační T-lymfocyty u pacientů s kolorektálním karcinomem a maligním melanomem: nová strategie detekce.

Dubská L., Pospíšilová E., Valík D.
Oddělení laboratorní medicíny, MOÚ Brno, dubska@mou.cz

Regulační T-lymfocyty (T-reg) významně ovlivňují imunitní odpověd organizmu a to především ve smyslu suprese imunitní reakce přímou interakcí s regulovanými imunitními buňkami nebo prostřednictvím produkce cytokinů. (Regulační lymfocyty se do značné míry překrývá se Th3 subsetem produkujícím IL-10 a TGF-β.) T-regulační lymfocyty tak brání hypersenzitivní a autoimunitní reakce a hrají významnou úlohu v ukončení imunitní odpovědi po antigenní stimulaci. Negativním působením T-reg lymfocytů je suprese imunitní reakce na infekci (infekční tolerance) a protinádorové imunity. Zvýšený počet T-reg lymfocytů byl v poslední době popsán u pacientů s různými onkologickými diagnózami. Nicméně zůstává nejasné, zda zvýšené zastoupení těchto buněk může sloužit jako prediktivní faktor protinádorové imunitní reakce či dokonce progrese onemocnění. Otázkou také charakteristika těchto buněk, která by umožňovala jejich rutinní detekci jak v periferní krvi tak v nádorové tkáni. T-reg lymfocyty jsou tradičně definovány jako CD4+ CD25+ (IL-2R) lymfocyty s expresí transkripčního faktoru FoxP3, což přináší nevýhodu kombinace povrchové a intracelulárního značení při detekci těchto buněk. Pro rutinní detekci a funkční studie vyžadující purifikaci těchto buněk se v poslední době vyskytla možnost využití markeru CD127, což je receptor pro IL-7, jehož exprese je potlačena na T-reg lymfocytech.

S použitím tohoto přístupu jsme stanovovali zastoupení T-reg lymfocytů u pacientů s maligním melanomem, karcinomem rekta a karcinomem tlustého střeva. T-reg lymfocyty jsme detekovali jako CD4+ CD25+ CD127(- až dim) a hodnotili jejich míru jako zastoupení v celkových Th-lymfocytech, kdy se průměrné hodnoty v jednotlivých skupinách pohybovali v rozmezí 5-10%. V periferní krvi pacientů s karcinomem rekta a karcinomem tlustého střeva jsme detekovali zvýšení počtu T-reg lymfocytů oproti skupině neonkologických dárců. V případě pacientů s maligním melanomem nebyl zaznamenán významný rozdíl v zastoupení těchto buněk oproti kontrolní skupině. Tento příspěvek ukazuje novou strategii rutinní detekce T-reg buněk v kontextu onkologických onemocnění. Zastoupení těchto buněk budeme u vybraných diagnóz dále sledovat a hodnotit z hlediska průběhu onemocnění.

Tato práce byla podpořena Výzkumným záměrem grantem č. MZ000209805.

Literatura

1. Lau, K.M., et al., Increase in circulating Foxp3+CD4+CD25(high) regulatory T cells in nasopharyngeal carcinoma patients. Br J Cancer, 2007.
2. Wolf, A.M., et al., Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. Clin Cancer Res, 2003. 9(2): p. 606-12.
3. Clarke, S.L., et al., CD4CD25FOXP3 Regulatory T Cells Suppress Anti-Tumor Immune Responses in Patients with Colorectal Cancer. PLoS ONE, 2006. 1: p. e129.
4. Loddenkemper, C., et al., In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. J Transl Med, 2006. 4: p. 52.
5. Petersen, R.P., et al., Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. Cancer, 2006. 107(12): p. 2866-72.
6. Banham, A.H., Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. Trends Immunol, 2006. 27(12): p. 541-4.
7. Liu, W., et al., CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. J Exp Med, 2006. 203(7): p. 1701-11.

XXVIII.
Genomika a proteomika

226 Cytogenetické aberace u primárních nádorů centrálního nervového systému a jejich význam pro další diagnosticko-léčebnou rozvahu.

Trojanec R.[1], Kalita O.[2], Ehrmann J.[3], Braunerová B.[1], Kolář Z.[3], Mlčochová S.[1], Hajdúch M.[1]
1) Laboratoř experimentální medicíny (LEM), Dětská klinika FN a LF UP v Olomouci
2) Neurochirurgická klinika, FNO, Olomouc
3) Laboratoř molekulární patologie, Ústav patologie, LF UP, Olomouc

Nejčastější primárními mozkové nádory jsou gliálního původu, mezi méně časté patří například meningeomy a neuroblastomy. Gliomy jsou známé svým potenciálem k agresivní proliferaci a difůzní invazi. Míra přežití u pacientů s gliálními nádory je pod 50%, avšak prognóza jednotlivých případů je velmi variabilní a je asociována s mnoha biologickými i klinickými znaky. Pro prognózu a správnou léčbu je zásadní určit grading nádoru (high grade x low grade), které však často nelze běžnou histopatologickou typizací provést a je zatížené individuální zkušeností patologa. Pro odlišení vysokého a nízkého gradingu gliomu bylo v naší laboratoři zavedeno vyšetření genů p53, RB1, EGFR1, stanovení delecí/amplifikací v chromozomálních oblastech 1p36.3, 9p21.3, 19q13 a stanovení počtu kopií chromozomů 7, 10 a 13 metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Cytogenetická data jsou doplňována a korelována se standardním histologickým vyšetřením. Jednotlivé vyšetřované aberace jsou spojeny s prognózou onemocnění či predikcí léčby. Například kombinovaná delece v 1p a 19q je asociována s dobrou prognózou, délkou přežití i dobrou odpovědí na léčbu, naopak delece tumor supresorových genů p53 či RB1 s prognózou špatnou.

V souboru 39 zatím vyšetřených pacientů nebylo možno odečíst FISH u 6,1% (3/39). U 58,3% (21/36) výsledky svědčily spíše pro gliom nižšího gradingu, u 41,7% (15/36) spíše pro vyšší grading. Nejčastější aberací byla delece v oblasti 9p21.3 (15/36; 41,7%) a zvýšený počet kopií EGFR1 (12/36; 33,3%).

U pacientů s nízkým věkem rovněž provádíme stanovení počtu kopií genů N-myc, C-myc a chromozomu 8, CCND1 a chromozomu 11 a delece v oblasti 22q11.23 (BCR) z důvodu diferenciální diagnostiky neuroblastomu a meduloblastomu. Například u 24-letého pacienta vykazovala nádorová populace deleci 9p21.3 (p16 a p15), monozomii chromozomu 10, polysomii chromozomu 7 a amplifikacií genu EGFR1. Nádorové buňky vykazovaly i zmnožení chromozomálního úseku 1p36.3, 22q11.23 (gen BCR) a 9q34.1 (gen ABL). Zvýšený byl rovněž počet kopií genu CCND1 důsledkem polysomie chromozomu 11. Dominantním nálezem však byla vysoká amplifikace genu N-MYC, kterou vídáme u neuroblastomů se špatnou prognózou. Na základě cytogenetického vyšetření bylo doporučeno vyšetření specifických tumor markerů, a provedení celotělového PET/CT k odlišení primárního neuroblastomu CNS od periferní metastázy, které potvrdily primární neuroblastom CNS.

Závěr

Smyslem zavedení vyšetření gliomů pomocí FISH je zpřesnění diagnózy pacienta, vedoucí k nejvhodnější léčbě tak, jak tomu je u prezentovaného případu. Význam cytogenetického vyšetření dále poroste s rozvojem nové, specificky cílené léčby.

Tato práce je podporována granty MSM6198959216 a MPO 1H-PK/45.

227 Rozsáhlé intragenové přestavby v genech BRCA1 a CHEK2 způsobující genetickou predispozici ke vzniku nádoru prsu v České republice.

Macháčková E., Vašíčková P., Lukešová M., Navrátilová M., Pavlů H., Kosinová V., Kuklová J., Foretová L.
Oddělení epidemiologie a genetiky nádorů, Masarykův onkologický ústav, Brno

Úvod

Nádor prsu představuje komplexní multifaktoriální onemocnění, jehož vznik je podmíněn interakcí genetických faktorů a vlivu prostředí. V naší populaci přibližně každá desátá žena onemocní během svého života nádorem prsu. Výskyt nádoru prsu v rodinné anamnéze ženy je bezesporu významným rizikovým faktorem.

Diagnózu hereditární formy nádoru prsu lze stanovit v případě rodiny, kde je evidováno několik postižených příbuzných, jejichž věk v době diagnózy je výrazně nižší než v případě sporadických nádorů prsu, je zde zvýšené riziko bilaterálního nádoru a často přidružený nádor vaječníků. U převážné části rodin s mnohočetným výskytem nádoru prsu v několika generacích lze segregační analýzou prokázat autozomálně dominantní dědičnost. Takovéto případy mohou být způsobeny monogenní genetickou predispozicí a tvoří jen asi 5-7% z celkového počtu diagnostikovaných nádorů prsu.

Vysoce penetrantní genetická predispozice je nejčastěji způsobena poškozením genu BRCA1 nebo BRCA2. Zdědění jedné poškozené alely genu BRCA1 nebo BRCA2 je dostatečné k vyvolání nádorové predispozice. Kumulativní riziko pro vznik nádoru prsu je u nosiček BRCA1 nebo BRCA2 mutace odhadováno na 65-85% do 70 let věku pacientky, přičemž pacientka která již nádorem prsu onemocněla má až 50% riziko vzniku bilaterálního nádoru do věku 70 let (Easton et al., 1995, Ford et al., 1998, Antoniou 2003). Kumulativní riziko pro vznik nádoru ovaria u nosiček BRCA1 mutace je odhadováno až na 63% do 70 let věku pacientky (Easton et al., 1995), u nosiček BRCA2 mutace je toto riziko odhadováno na maximálně 27% (Thompson et al.,2001).

Nádorové onemocnění je vysoce komplexní onemocnění, kdy interakcí různých genetických faktorů může docházet k výraznému navýšení individuálního rizika pro vznik nádorového onemocnění. Různé mutace v CHEK2 genu mohou mít rozdílnou expresivitu a penetranci. Celosvětově rozšířená mutace 1100delC v genu CHEK2 v heterozygotním stavu je popisována jako nízko penetrantní alela zvyšující 2-4 násobně riziko vzniku nádoru prsu (Offit et al., 2003). Některé studie popisují také zvýšenou predispozici ke vzniku nádoru prostaty, štítné žlázy, plic, ovaria, mozkových nádorů a osteosarkomů (Cybulski et al., 2004). V současné době byla popsána genomická delece exonů 9 a 10 u vysoce rizikových pacientek s nádorem prsu v USA u rodin československého původu (Welsch et al., 2006).

V laboratoři epidemiologie a genetiky nádorů Masarykova onkologického ústavu v Brně je na základě výběrových kriterií prováděn mutační screening BRCA1 a BRCA2 genů u rizikových pacientek s nádorem prsu a/nebo ovaria s pozitivní rodinnou anamnézou nebo diagnostikované v mladém věku. Procento záchytu mutace závisí na přísnosti výběrových kriterií. V průměru u cca 60% vysoce rizikových rodin s výskytem nádoru prsu a ovaria bývá standardním screeningem zachycena patogenní mutace. U rizikových rodin s výskytem nádoru prsu (bez asociace s ovarialními nádory) se záchyt patogenní mutace pohybuje mezi 25-30%.

Záchyt patogenních mutací v genech BRCA1 a BRCA2 u vysoce rizikových probandů však závisí také na zvolených postupech molekulárně genetického vyšetření. Částečná či úplná delece nebo amplifikace velkých oblastí přesahujících jednotlivé exony nemusí být detekována vlivem přítomnosti wild type alely způsobující pozitivní PCR signál a tím pádem falešně negativní výsledek.

O spektru a frekvenci intragenových přeskupení v genech BRCA1 nebo BRCA2 u pacientů s dědičnou formou karcinomu prsu a/nebo ovaria v české populaci nebylo doposud nic známo.

Vyšetřovaná skupina a postupy

Vyšetření na přítomnost velkých intragenových přestaveb v genech BRCA1, BRCA2 a CHEK2 genu bylo provedeno u probandů z nejrizikovějších rodin s předpokládaným dědičným syndromem nádoru prsu a/nebo ovaria, u kterých nebyla nalezena patogenní mutace v genech BRCA1 a BRCA2 v rámci standardního mutačního screeningu. Celkem bylo do konce roku 2006 analyzováno 350 vysoce rizikových pacientů na přítomnost intragenového přeskupení v BRCA1 genu a 180 na přítomnost intragenového přeskupení v BRCA2 genu.

Pro detekci intragenových přestaveb genu BRCA1 a BRCA2 byla použita metoda MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (Schouten et al., 2002). Pozitivní záchyt je ověřován jinou, nezávislou metodou (nejčastěji Long-range PCR) a sekvenováním jsou charakterizovány body zlomu na úrovni genomové DNA.

Přítomnost delece exonu 9 a 10 v CHEK2 genu byla do konce roku 2006 vyšetřena u 392 rizikových jedinců PCR testem a 180 jedinců metodou MLPA.

Výsledky

Intragenová přeskupení v BRCA1 genu

Celkem u 16 rizikových rodin byla zachycena velká delece v BRCA1 genu. MLPA analýza BRCA1 genu odhalila 8 různých delecí pokrývajících 1,9-39 kb BRCA1 genomové DNA. Průměrný věk nástupu nemoci u probandů s detekovanou delecí v genu BRCA1 se pohyboval kolem 40 let a v některých rodinách bylo možné pozorovat efekt snižujícího se věku v době diagnózy onemocnění u mladších generací. Body zlomu byly charakterizovány na úrovni genomové DNA u 5 různých delecí: delece exonů 5-14; exonů 11-12; exonů 18-19, exonu 20 a exonů 21-22. Všechny body zlomu byly nově charakterizovány a nebyly zatím popsány v jiné populaci.

Rozsáhlá BRCA1 delece 39 kb zahrnující oblasti pseudogenu, promotorovou oblast BRCA1 genu a exony 1A/1B-2 byla prokázána pomocí primerů publikovaných pro již dříve charakterizovanou deleci ve francouzské populaci (Puget et al.; 2002). Tato delece vzniká rekombinací mezi pseudogenem ψBRCA1 a odpovídajícími homologními oblastmi intronu 2 genu BRCA1.

Koncem roku 2006 byla nově zachycena delece exonu 8 a delece exonů 1-17 v BRCA1 genu, kde v současné době probíhá potvrzení a charakterizace bodů zlomu.

Zvýšená náchylnost k rozsáhlým intragenovým rekombinacím je v případě genu BRCA1 způsobena zejména vysokou četností *Alu*-repetitivních sekvencí v jeho intronických oblastech (Smith et al., 1996) a také přítomností duplikace oblasti na 5 konci BRCA1 genu obsahující ψBRCA1 pseudogen (Puget et al., 2002).

Intragenová přeskupení v genu BRCA2

V genu BRCA2 zatím nebylo u českých pacientů detekováno žádné intragenového přeskupení.

Delece exonu 9 a 10 v genu CHEK2

Do konce roku 2006 byly zachyceny 4 vysoce rizikové rodiny s delecí exonu 9 a 10 v genu CHEK2. Delece byly prokázány oběma metodami: MLPA a specifickou PCR.

Závěr

Podíl intragenových delecí v BRCA1 genu nalezených u nejrizikovější skupiny pacientů není rozhodně zanedbatelný. Proto bylo zahájeno testování všech pacientů splňujících kriteria pro testování BRCA genů. V případě všech charakterizovaných dele-

cí v BRCA1 genu byl zaveden jednoduchý screeningový PCR test pro detekci místa zlomu umožňující rychlé, specifické a finančně nenákladné testování příbuzných postižených pacientů.

Delece exonu 9 a 10 v genu CHEK2 se v České populaci jeví jako frekvenčně četnější (4-násobně v naší analyzované skupině) než dříve popsaná mutace 1100delC. Stanovení výše odhadu rizika pro vznik nádoru prsu u nosičů delece exonu 9,10 genu CHEK2 je předmětem dlouhodobější studie.

Práce byla podporována granty MZČR MZO 00209805 a IGA MZČR NR/8213-3.

Literatura

1. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. J. Hum. Genet. 2003; 72:1117-1130.
2. Breast Cancer Linkage Consortium. J. Natl. Cancer Inst. 1999; 91:1310-1316.
3. Cybulski C, Gorski B, Huzarski B, et al. Am J Hum Genet 2004; 75:1131-1135.
4. Easton DF, Bishop DT, Breast Cancer Linkage Consortium. Am. J. Hum. Genet. 1995; 56:265-271.
5. Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Am. J. Hum. Genet. 1998 62:676-689.
6. Offit K, Pierce H, Kirchhoff T, et al. BMC Med Genet. 2003; 4: 1.
7. Puget N, Gad S, Perrin-Vidoz L, et al. Am J Hum Genet 2002, 70: 858 – 865.
8. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Nucleic Acids Res 2002, 30: e57.
9. Smith TM, Lee MK, Szabo CI, et al. Genome Res 1996, 6: 1029 – 1049.
10. Thompson D, Easton D; Breast Cancer Linkage Consortium. Am. J. Hum. Genet. 2001; 68:410-419.
11. Walsh T, Casadei S, Coats KH, et al. JAMA. 2006; 295:p.1379-88.

228 „CELL ARRAYS“ – Velkoobjemový screening proteinů v buněčných liniích karcinomu prsu.

Hublarová P., Knoflíčková D., Fabian P., Babčanová S., Baturko Y., Nenutil R., Vojtěšek B.
Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, Brno, 65653

Sdružené buněčné bločky (SBB) – „cell arrays“ – představují další pokrok v imunocytochemických/proteomických metodách a jsou ideálním nástrojem pro rozsáhlé studie na buněčných liniích. Tento přístup se v dnešní době využívá při skríninku účinků nových léčiv a testování protilátek a jejich ředění, kdy je nezbytným krokem otestování reakcí u buněčných kultur. Na velmi malém prostoru s minimální spotřebou vybraných protilátek je možné analyzovat 23 vzorků buněčných linií. Metoda je velmi flexibilní, navržení SBB závisí na požadovaných vlastnostech výsledné „array“ – vzorky lze řadit dle buněčného původu, exprese proteinů, použitého ošetření terapeutiky a potřeb projektů.

Očekáváme zisk velkého množství validních dat v porovnání s ostatními přístupy v hodnocení proteinových hladin (Western blotting, metoda ELISA), jenž jsou materiálně a časově náročné. Výhodami SBB jsou malá spotřeba materiálu, velký objem výsledků hodnocených počítačovou analýzou s definovanými hladinami intenzity barvení a možnost porovnávat vysoký počet vzorků v jedné analýze. Zásadním přínosem je rovněž reprodukovatelnost dosažených výsledků. Nevýhodami jsou pěstování velkého množství buněk jako vstupního materiálu a problémy s falešně pozitivními výsledky při imunocytochemickém barvení.

Základním materiálem pro tvorbu SBB jsou fixované buňky zalité v agaróze, které se převedou do parafinového bloku. Z bloku se následně vypíchnou válečky o průměru 1 mm, které se umístí do vymezené pozice v „arrayi“. Jeden blok lze průměrně rozpíchat na 15 válečků. Hotová „array“ je nařezána na mikrotomu a přitavena na skla, z jednoho SBB je možné připravit přibližně 20 skel pro imunocytochemické barvení.

V naší práci jsme se zaměřili nejprve na optimalizaci výroby bloků a imunocytochemického barvení a následně na analýzu proteinů typických pro linie odvozené z karcinomu prsu. Barvení provádíme s protilátkami proti proteinu p53 (DO-1), MDM2, steroidním receptorům a různým typům keratinů. Počítačová analýza pozitivní reakce jednotlivých protilátek se provádí hodnotícím programem COLOR GRAPHICS ANALYSIS.

Tato práce je podporována granty IGA MZ ČR NR / 8338-3/2005 *a Centrum MŠMT LC06035.*

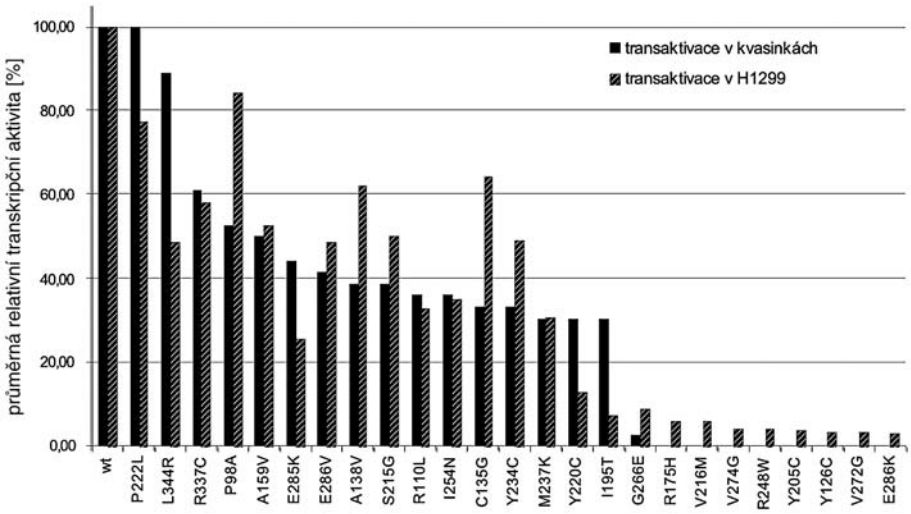
229 Analýza teplotně závislých mutantů p53 v kvasinkových a lidských buňkách.

Vaňková J.[1,2], Grochová D.[1,2], Šmardová J.[1]
1) Laboratoř molekulární patologie ÚPA FN Brno
2) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Úvod

Nádorový supresor p53 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který je aktivován ve stresovaných buňkách. Tím, že ovlivňuje expresi svých cílových genů se p53 podílí na regulaci takových buněčných procesů jako jsou buněčný cyklus, apoptóza, senescence a genomová stabilita. Gen p53 je často mutován v buňkách lidských nádorů. Nejčastější jsou bodové mutace, které ovlivňují strukturu centrální DNA vazebné domény proteinu p53. Dosud je popsáno více než 1300 různých bodových mutací p53 (*http://www.iarc.fr/p53*; Olivier et al. 2002). Tyto mutace se liší nejenom frekvencí, s níž se objevují u různých typů nádorů, ale také svými funkčními vlastnostmi. Většina mutací je zcela inaktivujících – způsobují tvorbu zcela nefunkčního proteinu p53. Jiné mutace umožňují vznik takových variant p53, které si některé své funkce ponechávají. Například tzv. diskriminující mutanti p53 mají schopnost indukovat transkripci alespoň některých svých cílových genů. Podmínečné mutace vedou ke vzniku proteinů p53, které jsou funkční jen za přesně vymezených podmínek, například jen v určité teplotě nebo při určitém pH.

K detekci mutací p53 se využívá řada různých metodických strategií. Nejběžnější jsou imunohistochemické detekce vysokých hladin proteinu p53, které často souvisejí s přítomností mutace v genu p53. Jinou možností je přímá analýza DNA, například sekvenování genomové nebo komplementární DNA. Další možností je detekce ztráty p53 specifického lokusu na chromozomu 17 metodou fluorescenční hybridizace *in situ*. Ztráta lokusu 17p13 je nejčastějším mechanismem ztráty heterozygotnosti genu p53. Další možností jsou funkční analýzy, většinou založené na měření transaktivačních schopností p53. K nim patří i funkční analýza separovaných alel v kvasinkách (FASAY; Ishioka et al. 1993, Flaman et al. 1995). Tato metoda využívá reparačního mechanismu na principu homologní rekombinace a toho, že lidský protein p53 funguje v kvasinkových buňkách jako transkripční faktor. Transkripčně aktivační schopnost p53 odvozeného metodou RT-PCR z vyšetřované tkáně je v kvasinkových buňkách testována s využitím reportérského genu ADE2. Míra transaktivační schopnosti p53 je hodnocena podle zbarvení kvasinkových kolonií, které rostou na plotnách s nízkým obsahem adeninu. Buňky exprimující funkční p53 tvoří bílé kolonie, buňky exprimující nefunkční p53, kolonie červené. K výhodám metody FASAY patří její schopnost rozlišit částečně inaktivující mutace p53 od zcela inaktivujících na základě fenotypu kvasinkových kolonií.



Obr. 1

Výsledky

V naší laboratoři již několik let rutinně využíváme metodu FASAY k detekci mutací p53 v různých typech nádorů. Postupně jsme vytvořili soubor 23 teplotně závislých (*td*) mutací p53 (tab. 1) a podrobně jsme je v kvasinkových buňkách charakterizovali. Sestavili jsme sedmistupňovou barevnou škálu kvasinkových kolonií od bílé (plná funkce) po červenou (úplná ztráta funkce) a semikvantitativně jsme hodnotili transaktivační aktivitu jednotlivých variant proteinů p53 v závislosti na teplotě (25, 30 a 35°C) a na typu responzivního elementu (odvozené z regulačních oblastí cílových genů proteinu p53: *p21*, *bax* a RGC). Ukázali jsme, že jednotliví mutanti p53 se liší stupněm teplotní závislosti. Někteří se svou aktivitou téměř blížili standardnímu proteinu p53 (P222L), jiní měli naopak jen minimální aktivitu i v 25°C (například Y126C, Y205C, V216M). Čtyři mutanti (P98A, P222L, L344R, R377C) byli zcela nebo částečně chladově senzitivní (*cs*), ostatní byli teplotně senzitivní (*ts*). Většina teplotně závislých mutantů (19/23 – 80%) byla diskriminujících, jejich transaktivační schopnost se lišila v závisloti na typu responzivního elementu.

V lidských buňkách je aktivita proteinu vedle samotné primární struktury dále významně ovlivňována například posttranslačními modifikacemi (Bode a Dong, 2004) a také kooperací s dalšími proteiny a faktory (Samuels-Lev et al. 2001, Qian et al. 2002). Tyto okolnosti nejsou v kvasinkové buňce zohledněny a přesto jsou kvasinky rutinně využívány k detekci mutací p53. Proto jsme se rozhodli využít náš jedinečný soubor teplotně závislých mutací p53 k porovnání měření transaktivačních schopností v kvasinkových a lidských buňkách. Všechny studované varianty p53 jsme klonovali do expresního vektoru pT-Rex-DEST30, který zajišťuje efektivní expresi genu p53 v lidských buňkách. Tento plazmid, spolu s reportérským plazmidem pro ß-galaktozidázu a plazmidem, který obsahuje reportérský gen pro luciferázu s předřazeným responzivním elementem odvozeným z regulačních oblastí genů *p21*, *bax* a RGC, jsme následně použili k přechodné transfekci buněk H1299. Buňky H1299 jsou odvozeny z lidského karcinomu plic a postrádají gen p53. Transfekované buňky jsme 42 hodin kultivovali ve 32 a 37°C a po jejich sklizení jsme provedli transaktivační testy. Stanovili jsme tak relativní transaktivační schopnosti jednotlivých variant p53 v buňkách H1299 v závislosti na teplotě a typu responzivního elementu. Výsledky analýzy transkripčně aktivačních schopností jednotlivých variant p53 v kvasinkových a lidských buňkách jsme pak mohli porovnat (obr. 1).

- Lidský expresní systém neumožnil rozpoznat mutanty (například V216M), u kterých došlo k reaktivaci v kvasinkách až při teplotách nižších, než při kterých lze úspěšně kultivovat lidské buňky H1299 (tj. 32°C).
- Lidský expresní systém neumožnil rozpoznat chladově senzitivní povahu transaktivačních schopností těch mutantů, kteří v kvasinkovém systému projevili *cs* fenotyp. V lidských buňkách se chovali výrazně (P222L) nebo méně výrazně jako teplotně senzitivní. Je to způsobeno teplotními podmínkami, při kterých byli mutanti exprimováni. U kvasinkového systému se chladově senzitivní fenotyp projevil až při teplotách nižších, než při kterých lze úspěšně kultivovat lidské buňky H1299. Jedinou výjimkou byl mutant P98A, který projevil *cs* trend na RE odvozeném z genu *p21*. V kvasinkových buňkách jsme cs fenotyp detekovali na RE RGC.
- Kvasinkový systém, na rozdíl od H1299, neumožnil rozpoznat to, že transkripčně aktivační schopnosti některých mutantů (například P98A, C135G, A138V, A159V a dalších) byly na některých RE vyšší než u standardní formy (wt) p53.
- Většina mutantů p53, kteří byli teplotně závislí v kvasinkových buňkách, se chovala teplotně závisle také v buňkách lidských. Podobně se potvrdil diskriminační charakter mutantů p53 rozpoznaný v kvasinkových buňkách také v buňkách lidských.
- Dokonce při kvantitativním srovnání průměrné relativní transkripčně aktivační schopnosti *td* mutantů p53 exprimovaných v kvasinkách (při teplotách 30 a 35°C) a v buňkách H1299 (při teplotách 32 a 37°C) jsme získali poměrně dobrou korelaci, a to především u mutantů s nízkou aktivitou.

č.	mutace p53	sekvence DNA	zdroj
1	P98A	cct>gct	buněčná linie – MM
2	R110L	cgt>ctt	HNSCC
3	Y126C	tac>tgc	AML M2
4	C135G	tgc>ggc	CLL; DLBCL
5	A138V	gcc>gtc	AML M4
6	A159V	gcc>gtc	nediferencovaný ca ovaria
7	I195T	atc>acc	ca prsu; CLL
8	Y205C	tat>tgt	HNSCC
9	S215G	agt>ggt	MDS
10	V216M	gtg>atg	CLL
11	Y220C	tat>tgt	buněčná linie – MM; CLL
12	P222L	ccg>ctg	DLBCL
13	Y234C	tac>tgc	CLL
14	M237K	atg>aag	buněčná linie - leiomyosarkom
15	I254N	atc>aac	ca ovaria
16	G266E	gga>gaa	HNSCC; ca prsu
17	V272G	gtg>ggg	nediferencovaný ca HN; HNSCC
18	V274G	gtt>ggt	MCL
19	E285K	gag>aag	AML M4; AML M6; buněčná linie – ca prsu
20	E286K	gaa>aaa	AML M4, HNSCC
21	E286V	gaa>gta	HNSCC
22	R337C	cgc>tgc	ca prsu
23	L344R	ctg>cgg	DLBCL
K-	R248W		
K-	R175H		
K+	wt		

Tab. 1: Seznam teplotně závislých mutací p53 a kontrol.
AML – akutní myeloidní leukémie
MDS – myelodysplastický syndrom
HNSCC – dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku (*head and neck squamous cell carcinoma*)
CLL – chronická lymfoidní leukémie
MM – maligní melanom
DLBCL – difúzní velkobuněčný B-lymfom (*diffuse large B-cell lymphoma*)
MCL – lymfom z buněk plášťové zóny (*mantle cell lymphoma*)
ca – karcinom

Závěry

- Potvrdili jsme, že výsledky analýzy transaktivačně aktivačních schopností proteinů p53 v kvasinkových buňkách platí i v buňkách lidských.
- To jednoznačně dokládá spolehlivost metody FASAY nejenom pro detekci mutací p53 jako takových, ale také při rozpoznání jejich různých funkčních variant, především jejich částečně inaktivující povahu.
- Pro svou pracovní, finanční a časovou nenáročnost je tak FASAY jednoznačně vhodnou metodou k rutinní analýze stavu genu p53 v klinickém materiálu.

Literatura

1. Bode AM and Dong Z. *Nat.Rev.Cancer.* 4: 793-805, 2004
2. Ishioka C, Frebourg T, Yan YX, et al. *Nat.Genet*. 5: 124-129, 1993
3. Flaman JM., Frebourg T, Moreau V, et al. P*roc.Natl.Acad.Sci.USA* 92: 3963-3967, 1995

4. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, et al. *Hum.Mutat.* 19: 607-614, 2002
5. Qian H, Wang T, Naumovski L, et al. *Oncogene* 21: 7901-7911, 2002
6. Samuels-Lev Y, O'Connor D, Bergamaschi D, et al. *Mol.Cell* 8: 781-794, 2001

***Poděkování**: Tato práce je podporována grantem MSM 0021622415.*

230 DNA analýza buněk uroteliálního nádoru.

Louda M.[1], Vokurková D.[2], Loudová M.[2], Pacovský J.[1], Holub L.[1], Broďák M.[1], Baker K.[1]
1) Urologická klinika FN a LF UK v Hradci Králové, FN a LF UK v Hradci Králové
2) Ústav klinické imunologie a alergologie FN a LF UK v Hradci Králové

Úvod
DNA analýza buněk uroteliálního nádoru průtokovou cytometrií a vyšetření ztráty apoptotické aktivity u nádorových buněk.

Soubor a metoda
Na DNA ploiditu a apoptotickou subpopulaci buněk bylo vyšetřeno 55 pacientů s uroteliálním karcinomem. Nádorové buňky byly získány selekcí z močového sedimentu.

Výsledky
DNA analýzou byl potvrzen vztah mezi ploiditou nádoru a nádorem. V souboru byla pozorováno vymizení apoptotické aktivity v 32 (88.9%) z 36 vyšetřených vzorků nádoru. U zbylých 19 odběrů nebylo získáno více jak 10 tisíc buněk ve vzorku a proto byly ze zpracování vyřazeni z důvodu udržení validity získaných dat.

Závěr
DNA analýza průtokovou cytometrií je použitelnou metodou k získání dat o charakteru nádorových buněk uroteliálního karcinomu. Byla pozorována patologická aneuploidita buněk uroteliálního karcinomu.

231 Jednoduché posouzení hladiny transkriptomu za využití elektrochemické detekce.

Húska D.[1], Křížková S.[1,2], Adam V.[2], Trnková L.[3], Masařík M.[4], Kizek R.[1]
1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno
2) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
3) Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
4) Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Klíčová slova
nukleové kyseliny – mRNA – transkriptom – elektrochemická detekce

Úvod
Výzkum v oblasti genetiky směřuje od poznání sekvence genomů různých organismů včetně člověka a jejich srovnávání (genomika) přes odhalování funkce jednotlivých genů a role proteinů jimi kódovaných v různých procesech, jako například počátky nádorového bujení. Tyto děje můžeme zkoumat jak na úrovni proteinů (proteomika) tak na úrovni mRNA (transkriptomika). Nedávné výzkumy naznačují, že hladina celkové mRNA v buňce má vysokou vypovídací hodnotu o úrovni stresu různého původu, kterému je organismus vystaven. Vychází z logické úvahy, že kromě mRNA pro „běžné" proteiny budou v souboru veškeré přepisované mRNA – transkriptomu navíc přítomny i mRNA pro syntézu proteinů, jejichž exprese nastává při buněčné obraně proti stresu, množství celkové mRNA bude také změněno v důsledku zvýšené metabolické aktivity buněk v reakci na stres. V případě nádorových buněk lze očekávat, že celková hladina transkriptomu bude výrazně zvýšena v důsledku jejich větší metabolické aktivity. Kromě tradičních molekulárně-biologických přístupů jako je například RT-PCR, Northern blot, SAGE, atd., se v analýze transkriptomu uplatňuje celá řada metod a postupů, mezi něž patří i elektrochemická analýza. Jako první publikoval elektrochemické chování nukleových kyselin na rtuťové pracovní elektrodě v roce 1960 Paleček. Od té doby je této problematice věnována značná pozornost. Pro tento účel byly zcela nedávno vyvinuty postupy, využívající povrchu paramagnetických kuliček. Paramagnetické kuličky jsou monodisperzní polymerní částice, zajišťující stálý a definovatelný povrch pro adsorpci nebo spojování různých bioreaktivních molekul. Tím zajišťují maximální stupeň účinnosti a reprodukovatelnosti v kvantitativním rozboru. Pro výrazné zvýšení senzitivity pozorovaných signálů je využíváno rozdílných způsobů modifikace DNA redoxními znač-

kami, jako jsou komplexy osmia, ruthenia. Cílem naší práce bylo a) navržení postupu pro izolaci mRNA z biologického materiálu, b) stanovení celkového množství mRNA v buněčné kultuře.

Materiál a metody

Chemikálie. Všechny chemikálie použité v experimentu byly od firmy Sigma Aldrich Chemical Corp. USA (čistota ACS). Pufry: a) fosfátový na úpravu paramagnetických – kuliček: 0,1 M NaCl + 50 mM Na2HPO4 + NaH_2PO4 a 0,2 M NaCl + 100 mM Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4; b) acetátový na měření vzorků: 0,2 M CH_3COOH + 0,2 M CH_3COONa. Roztoky pro měření byly připraveny rozpuštěním chemikálií v ACS vodě. Dále byly použity paramagnetické mikročástice Dynabeads Oligo $(dT)_{25}$ (DBT) a magnetický stojan Dynal MPC-S (Magnetic Particle Concentrator) od firmy Dynal, Oslo, Norsko.

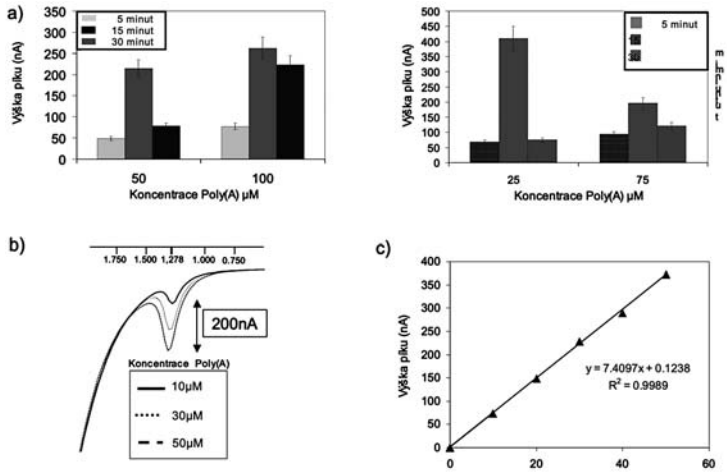
Elektrochemická analýza. Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Holandsko) ve spojení s VA Stantand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita visící rtuťová kapková elektroda – HMDE (plocha Hg kapky = 0,4 mm^2), referentní elektroda (Ag/AgCl, 3M KCl) a uhlíková tyčinka jako pomocná elektroda. Všechna elektrochemická měření byla provedena v acetátovém pufru pH = 4 za využití techniky adsorptivního přenosu. Analyzované vzorky byly deoxygenovány pro měření pomocí probublávání argonem (99.999%) nasyceného vodou po dobu 120 s. Všechny experimenty byly prováděny při pokojové teplotě.

Příprava vzorků. Pro izolaci mRNA byly buňky zcentrifugovány a přeneseny do sterilních mikrozkumavek a následně homogenizovány v 0,5 ml 50 mM fosfátovém pufru po dobu 2 minut pomocí přístroje Ultra turax T8 IKA WERKE (maximální otáčky) za stálého chlazení na ledu. Vzniklý homogenát byl ředěn 100krát vychlazeným sterilním fosfátovým pufrem. Takto připravený vzorek byl využit pro analýzu obsahu mRNA.

Výsledky a diskuze

Elektrochemická detekce studované DNA

Je známo, že DNA poskytuje na rtuťové elektrodě redukční signál adeninu a cytosinu kolem potenciálu -1,4 V a oxidační signál redukčního produktu guaninu se signálem kolem potenciálu -0,2 V. Pro naše účely jsme se nejdříve zaměřili na hledání co nejvhodnějších podmínek vazby nukleové kyseliny (mRNA) na povrch paramagnetických částic. Pro tento účel jsme si zvolili poly(A) jako velmi vhodnou molekulu simulující reálnou mRNA. Nukleová kyselina (poly(A)) byla měřena pomocí cyklické voltametrie na rtuťové kapkové visící elektrodě ve spojení s přenosovou technikou. Byly sledovány závislosti rychlosti polarizace elektrody (od 20 do 320 mV/s) v acetátovém pufru (pH 4,0). Na voltamogramech jsme získali charakteristický velmi dobře vyvinutý redukční signál adeninu při potenciálu –1,33 V. Na získaná experimentální data byla využita eliminační voltametrie. Eliminační voltametrie potvrdila, že poly(A) je na povrch pracovní elektrody adsorbována. Proto, aby bylo možné analyzovat mRNA v reálném vzorku, je potřebné zajistit její rychlé a velmi selektivní zachycení. Velmi vhodné jsou paramagnetické částice (DBT), které mají na svém povrchu ukotvený řetězec T(25). Molekuly mRNA (obsahují vždy sekvenci A25) interagují s řetězce $T_{(25)}$ navázaným na DBT.



Obrázek 1:
Závislost výšky píku na době hybridizace pro různé koncentrace poly(A), parametry měření: cyklická voltametrie, polarizační doba 100 mV/s, acetátový pufr pH 4, visící rtuťová kapková elektroda. (a), reálná elektrochemická odezva různých koncentrací poly (A) (b), zývislost výšky elektrochemického signálu na koncentraci poly(A) (c).

Proces hybridizace mRNA na DBT

Hybridizace mRNA spočívá ve vazbě poly(A) konce na poly(T) sekvenci, kterou nesou DBT. V našem experimentu jsme zvolili počáteční dobu hybridizace 30 min (podle našich dřívějších prací). Pro naše modelové účely byla zvolena koncentrace poly(A) o koncentraci 100 µg/ml, jelikož poskytovala dobře definované signály v acetátovém pufru. Abychom mohli změřit množství navázané poly(A) na DBT, museli jsme ji eluovat z DBT do roztoku. Jako eluční roztok jsme zvolili 20 µl eluční roztok jsme zvolili 20 µl 0,1 M NaCl + 50 mM Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4 (pH = 7). Denaturace probíhala při 85°C po dobu 5 min. Po ukončení

denaturace se vzorek krátce centrifugoval a vzniklý supernatant se přenesl do nové mikrozkumavky. Odebralo se 5 µl a následovala elektrochemická detekce.

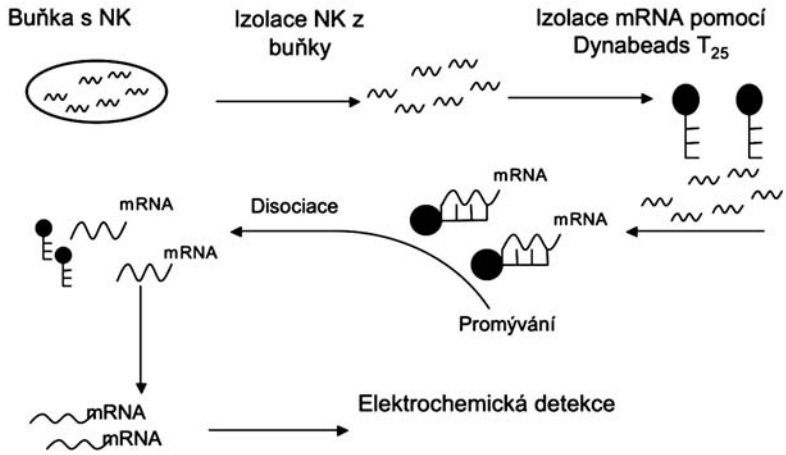
Závislost množství poly(A) ve vzorku na době hybridizace

Zajímalo nás, jaké množství poly(A) získáme při známé vstupní koncentraci 50 $\mu g_{(Poly\ A)}$/ml jestliže změníme dobu hybridizace na 5, 15 a 30 min. Zjistili jsme, že po patnáctiminutové hybridizaci získáme maximální výtěžek poly(A) na DBT (Obr. 1).

Dále byly studovány rozdílné koncentrace poly(A) (10, 20, 30, 40 a 50 $\mu g_{(Poly\ A)}$/ml). Z těchto dat jsme získali lineární závislost s rovnicí regrese y = 0.7,41x + 0,13 s koeficientem spolehlivosti R^2=0,9989 (Obr. 1).

Analýza obsahu mRNA v buněčné kultuře

Námi připravené homogenáty buněk různých nádorových linií byly přidány k připraveným DBT. Hybridizace mRNA k povrchu DBT probíhala po dobu 30 min. Poté byly DBT třikrát promyty 20 µl 0,1 M NaCl + 50 mM Na2HPO4 + NaH_2PO_4 (pH=7). K takto připraveným DBT bylo přidáno 20 µl 50 mM Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4 (pH = 7). Denaturace probíhala při 85°C po dobu 5 min. Po ukončení denaturace se vzorek krátce centrifugoval a vzniklý supernatant se přenesl do nové mikrozkumavky. Odebralo se 5 µl a následovala elektrochemická detekce (Obr.1). Experimentálně se nám podařilo pomocí DBT zachytit a elektrochemicky analyzovat hladiny mRNA. U jednotlivých nádorových linií byly transkriptomové hladiny různé.



Obrázek 2:
Schéma postupu izolace mRNA pomocí DBT.: dezintegrace buňky, hybridizace mRNA s paramagnetickými kuličkami, odstranění nečistot, disociace, elektrochemická detekce.

Závěr

Předpokládáme, že izolace celkové mRNA (transkriptomu) z daného vzorku tkáně a její následná detekce nám umožní rozpoznat vliv různých vnějších faktorů na organismus. Lze předpokládat, že právě paramagnetické kuličky (DBT) jsou pro tuto izolaci jednoduchým, vysoce selektivním a rychlým nástrojem. Navíc bude možné zvýšit selektivitu a senzitivitu stanovení využitím eliminační voltametrie.

Poděkování: *Příspěvek vznikl za podpory grantů Liga proti rakovině Praha a Běh Terryho Foxe 2007.*

Literatura

1. Palecek E. Oszillographiche Polarographie der Nucleinsauren und ihrer Bestandteile. Naturwiss. 1958;45:186-7.
2. Palecek E. Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid. Nature. 1960;188:656-7.
3. Drummond TG, Hill MG, Barton JK. Electrochemical DNA sensors. Nature Biotech. 2003;21(10):1192-9.
4. Palecek E. New trends in electrochemical analysis of nucleic acids. Bioelectrochem Bioenerg. 1988;20(1-3):179-94.
5. Palecek E. Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. Talanta. 2002;56(5):809-19.
6. Palecek E, Fojta M, Jelen F. New approaches in the development of DNA sensors: hybridization and electrochemical detection of DNA and RNA at two different surfaces. Bioelectrochemistry. 2002;56(1-2):85-90.
7. Wang J, Polsky R, Merkoci A, Turner KL. „Electroactive beads“ for ultrasensitive DNA detection. Langmuir. 2003;19(4):989-91.
8. Wang J. Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. Anal Chim Acta. 2003;500(1-2):247-57.
9. Palecek E, Fojta M. Detecting DNA hybridization and damage. AnalChem. 2001;73(3):74A-83A.
10. Fojta M, Havran L, Kizek R, Billova S, Palecek E. Multiply osmium-labeled reporter probes for electrochemical DNA hybridization assays: detection of trinucleotide repeats. Biosensors & Bioelectronics. 2004 Nov;20(5):985-94.
11. Kizek R, Havran L, Fojta M, Palecek E. Determination of nanogram quantities of osmium-labeled single stranded DNA by differential pulse stripping voltammetry. Bioelectrochemistry. 2002 Jan;55(1-2):119-21.

12. Palecek E, Kizek R, Havran L, Billova S, Fojta M. Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor. Analytica Chimica Acta. 2002 Sep 26;469(1):73-83.
13. Palecek E, Billova S, Havran L, Kizek R, Miculkova A, Jelen F. DNA hybridization at microbeads with cathodic stripping voltammetric detection. Talanta. 2002 Apr 1;56(5):919-30.
14. Trnkova L, Friml J, Dracka O. Elimination voltammetry of adenine and cytosine mixtures. Bioelectrochemistry. 2001;54(2):131-6.
15. Trnkova L, Jelen F, Petrlova J, Adam V, Potesil D, Kizek R. Elimination voltammetry with linear scan as a new detection method for DNA sensors. Sensors. 2005;5.
16. Trnkova L, Jelen F, Postbieglova I. Application of elimination voltammetry to the resolution of adenine and cytosine signals in oligonucleotides. I. Homooligodeoxynucleotides dA(9) and dC(9). Electroanalysis. 2003;15(19):1529-35.
17. Trnkova L, Kizek R, Vacek J. Square wave and elimination voltammetric analysis of azidothymidine in the presence of oligonucleotides and chromosomal DNA. Bioelectrochemistry. 2004;63(1-2):31-6.
18. Trnkova L, Postbieglova I, Holik M. Electroanalytical determination of d(GCGAAGC) hairpin. Bioelectrochemistry. 2004; 63(1-2):25-30.

232 Zapojení vybraných mikroRNA do patogeneze kolorektálního karcinomu a jejich korelace s klinicko-patologickými charakteristikami.

Slabý O.[1], Svoboda M.[1], Garajová I.[2], Svoboda M.[2], Šachlová M.[2], Šmerdová T.[1], Trtílková A.[2], Jurasová I.[2], Vyzula R.[2]
1) Oddělení onkologické a experimentální patologie, Masarykův onkologický ústav, Brno,
2) Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

MikroRNA (miRNA) jsou nekódující jednořetězcové RNA o délce 18-25 nukleotidů tvořící novou skupinu regulátorů genové exprese vyskytující se v rostlinných i živočišných buňkách. Kódující mRNA negativně regulují jedním ze dvou mechanizmů v závislosti na míře komplementarity miRNA s cílovou sekvencí. Při úplné či téměř úplné komplementaritě miRNA s cílovou sekvencí dochází k jevu RNA interference. Kódující mRNA jsou štěpeny ribonukleázami v multiproteinovém komplexu asociovaném s miRNA, RISC (RNA-induced silencing complex), dokud nejsou zcela degradovány. Tento mechanizmus byl opakovaně pozorován v rostlinných buňkách, ale doposud nebyl prokázán u buněk živočišných. Živočišné miRNA využívají rozdílného mechanizmu, který není spojený s degradací cílové mRNA. Regulační účinek uskutečňují vazbou na nedokonale komplementární sekvence v rámci 3' netranslatovaných oblastí (UTR) cílových mRNA, a expresi genů regulují post-transkripčně tím, že znemožňují jejich translaci. Druhý mechanizmus je proto doprovázen souvisejícím poklesem hladiny kódovaného proteinu, zatímco hladina cílové mRNA není ovlivněna [1].

Biogeneze miRNA z prekurzorových molekul je dvoustupňový proces. Primární transkripty, pri-miRNA, jsou často dlouhé i několik kilobází a jsou dále v jádře zpracovávány RNázou III zvanou Drosha a dvouřetězcovou-RNA-vázajícím proteinem Pasha na přibližně 70 nukleotidů dlouhé pre-miRNA vytvářející nedokonalé vlásenkové struktury, které jsou exportovány do cytoplazmy transportérem exportin 5. Pre-miRNA jsou dále štěpeny RNázou III zvanou Dicer na finální miRNA duplexy dlouhé přibližně 22 bazí. Jedno z vláken miRNA duplexu se asociuje ke komplexu RISC a druhé vlákno je ihned degradováno. Komplex miRNA-RISC je připraven na translační represi případně degradaci cílových mRNA. Schopnost miRNA vázat se k cílovým sekvencím i v případě nedokonalé komplementarity je důvodem velkého množství cílových mRNA pro každou jednotlivou miRNA. Podle odhadů bioinformatických analýz tvoří miRNA přibližně 3% genů a mají potenciál regulovat přibližně 30% lidských genů [1,2,3].

Stále více důkazů svědčí pro zásadní roli miRNA v kontrole buněčné proliferace a přežívání tedy procesů bezprostředně souvisejících s onkogenním procesem. Přibližně 50% miRNA genů se nachází na fragilních částech chromozómů, což vede k častým abnormalitám v počtu jejich kopií, zahrnující jak jejich ztrátu tak amplifikaci, právě v případě onkologických onemocnění [4]. MiRNA mohou mít funkci onkogenu nebo nádorového supresoru v závislosti na charakteru cílových kódujících mRNA [2,3]. Významným příkladem miRNA s funkcí nádorového supresoru je rodina miRNA označovaná *let-7* negativně regulující onkogen RAS. Snížená exprese *let-7* v nádorech vede ke zvýšeným hladinám onkogenu RAS a související ztrátě kontroly proliferace [5, 6]. Do regulace dalšího významného onkogenu MYC je zapojen například klastr miR-17-92, miR-142 nebo miR-155 [2,3]. Klasickým případem onkogenní miRNA je miR-21, jejíž antiapoptotický efekt byl pozorován u glioblastomů, ve kterých se miR-21 vyskytovala až ve stonásobně zvýšených hladinách oproti kontrolní zdravé tkáni [7]. Zvýšené hladiny miR-21 byly pozorovány také u mamárního a kolorektálního karcinomu [8, 9]. Díky rychlému vývoji metod jako jsou miRNA mikročipy či varianta kvantitativní RT-PCR sloužící k detekci miRNA se podařilo identifikovat a vyizolovat specifické expresní miRNA profily u všech dosud zkoumaných typů nádorových onemocnění: chronické lymfocytární leukémie [10, 11], mamárního karcinomu [8], glioblastomu [12], karcinomu štítné žlázy [13], hepatocelulárního karcinomu [14], plicního karcinomu [15, 16] a také kolorektálního karcinomu [9,17,18].

Na buněčných liniích karcinomu tlustého střeva byl pozorován nádorově supresorový efekt *let-7a-1*. Transfekce prekurzoru *let-7a-1* do nádorových buněk vedla k signifikatnímu potlačení jejich růstu a byla spojeno se snížením hladin proteinů RAS

a MYC, zatímco hladiny jejich mRNA zůstaly neovlivněny [6]. Ve studii srovnávající hladiny 283 miRNA v nádorové tkáni kolorektálního karcinomu a její korespondující zdravé sliznici u šestnácti pacientů bylo pozorováno globální snížení exprese miRNA v nádorové tkáni, nejvíce signifikantní redukci exprese v karcinomech ovšem vykazovaly miR-143 a miR-145 [17]. Cummins a kol. (2005) a kol. použila varianty metodiky sériové analýzy genové exprese (SAGE) pro miRNA (miRAGE) a identifikovala 50 rozdílně exprimovaných miRNA v kolorektální nádorové tkáni, z těchto miRNA bylo 32 down-regulovaných, součástí této skupiny byly rovněž miR-143 a miR-145. Expresi 156 miRNA srovnával mezi nádorovou tkání a zdravou sliznicí u 12 pacientů a na 16 buněčných liniích kolorektálního karcinomu Bandres a kol. (2006). Studie založená na detekci miRNA přesnou metodou kvantitativní RT-PCR mimo jiné potvrdila předchozí pozorování popisující snížení exprese miR-143 a miR-145 a zvýšení exprese miR-21 v kolorektální nádorové tkáni. Autorům se rovněž podařilo asociovat hladiny miR-31 ke stagingu nádorového onemocnění, klinické stádium IV bylo spojeno s nejvyššími hladinami miR-31 [18]. Z výše uvedeného vyplývá, že **v** patogenezi **kolorektálního karcinomu lze na základě opakovaných pozorování předpokládat onkogenní vlastnosti u miR-21 a miR-31, naopak za nádorové supresory lze považovat *let-7-a*, miR-143 a miR-145.**

Zatímco v případě hematologických malignit, ale i mamárního karcinomu nebo karcinomu plic, již proběhly či právě probíhají klinické především prognostické studie založené na stovkách pacientů s velice slibnými výsledky [8, 11, 16], výzkum miRNA u kolorektálního karcinomu doposud probíhal především na buněčných liniích nebo na úrovni pilotních studií na souborech čítajících okolo 20 pacientů.

Cílem naší studie je analyzovat metodou kvantitativní RT-PCR expresi vybraných, na základě současných poznatků relevantních mikroRNA (miR-21, miR-31, *let-7-a*, miR-143 a miR-145) v nádorové tkáni a zdravé sliznici u souboru přibližně 50 pacientů s kolorektálním karcinomem, a korelovat ji s vybranými klinicko-patologickými charakteristikami. Značná část pracovního souboru pacientů byla již dříve molekulárně charakterizována pomocí komerčních oligonukleotidových makročipů a pro některé miRNA jsou tedy známé hladiny jejich cílových mRNA. Plánujeme proto také stanovení hladin vybraných korespondujících proteinů (RAS, MYC,…), abychom mohli potvrdit případně vyvrátit předpokládaný post-transkripční regulační účinek konkrétní miRNA na konkrétní kódující mRNA.

Literatura

1. Gregory RI, Shiekhattar R: MicroRNA biogenesis and cancer. Cancer Res 65:3509-12, 2005
2. Chen CZ: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. N Engl J Med 353:1768-71, 2005
3. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer 6:259-69, 2006
4. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A 101:2999-3004, 2004
5. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell 120:635-47, 2005
6. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T: let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. Biol Pharm Bull 29:903-6, 2006
7. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS: MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res 65:6029-33, 2005
8. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. Cancer Res 65:7065-70, 2005
9. Bandres E, Cubedo E, Agirre X, et al: Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. Mol Cancer 5:29, 2006
10. Borkhardt A, Fuchs U, Tuschl T: MicroRNA in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 354:524-5; author reply 524-5, 2006
11. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al: A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 353:1793-801, 2005
12. Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, et al: Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. Biochem Biophys Res Commun 334:1351-8, 2005
13. He H, Jazdzewski K, Li W, et al: The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 102:19075-80, 2005
14. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, et al: Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene 25:2537-45, 2006
15. Eder M, Scherr M: MicroRNA and lung cancer. N Engl J Med 352:2446-8, 2005
16. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al: Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. Cancer Cell 9:189-98, 2006
17. Michael MZ, SM OC, van Holst Pellekaan NG, et al: Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. Mol Cancer Res 1:882-91, 2003
18. Cummins JM, He Y, Leary RJ, et al: The colorectal microRNAome. Proc Natl Acad Sci U S A 103:3687-92, 2006

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NR/9076-4

233 Příprava biologického materiálu pro metodu SELDI TOF MS.

Pilný R.[1], Michalová E.[2], Brožková K.[2], Greplová K.[1], Vojtěšek B.[2], Valík D.[1]
1) Masarykův onkologický ústav, Oddělení laboratorní medicíny, Brno
2) Masarykův onkologický ústav, Oddělení klinické a experimentální patologie, Brno

Proteomika se zabývá studiem souboru proteinů, snaží se o jejich identifikaci v kontextu jejich funkce v organizmu za fyziologických a patologických stavů. Technikami tohoto výzkumu jsou především metody založené na separaci molekul v elektrickém poli (jednorozměrná elektroforéza – ELFO, dvojrozměrná elektroforéza – 2D ELFO, isoelektrická fokusace – IEF) a metody založené na stanovování molekulové hmotnosti analytu (hmotnostní spektrometrie – MS a to především MALDI TOF MS* a ESI TOF MS**). Každá z uvedených metod má svou nevýhodu, která brání jejímu použití pro rutinní analýzu proteinů a peptidů. Hlavní nevýhodou 2D elektroforézy je časová náročnost, u IEF je to nedostatečná citlivost, u metod MALDI TOF MS a ESI TOF MS je to náročná přípravu samotného vzorku nebo nemožnost v krátkém časovém úseku zpracovat větší množství vzorků. Tyto nevýhody částečně řeší metoda SELDI TOF MS (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization – Time of Flight – Mass Spectrometry), která spojuje hmotnostní spektrometrií se separaci proteinů na základě jejich chemických a biochemických vlastností. Stanovované proteiny se na základě svých chemických (náboj, vazba na kov atd.) a fyzikálních vlastností (hydrofilita a hydrofobnost) vážou ze vzorku na „aktivní“ povrch čipu, který je pokryt chemickým (chromatografický povrch: katex, anex, hydrofilní, hydrofobní, navázaný kov – Cu, Ni atd.) nebo biochemickým (navázanou např. protilátkou, receptorem atd.) povrchem. Metoda SELDI TOF MS patří mezi kvalitativní metody. Proteiny specificky navázané na povrch se laserem desorbují z čipu a po ionizaci se dělí na základě poměru své molekulové hmotnosti a náboje (m/z) v hmotnostním spektrometru. Výhodou je zakoncentrování analytu na aktivním povrchu, kdy se stanovované proteiny o nižší koncentraci navážou se na povrch zatímco matrice a nenavázané proteiny jsou vymyty a tím dojde k zakoncentrování. Příprava většího počtu vzorku je relativně snadná a rychlá stejně jako samotná hmotnostní analýza. Mezi hlavní nevýhody patří nutnost odstranit vysocekoncentrované proteiny ze vzorku (např. albumin ze séra) pro zachování dostatečného počtu vazebných míst pro látky s nižší koncentrací; různá afinita proteinů k povrchům čipů a ne příliš dobrá reprodukovatelnost metody.

Na našem pracovišti zabýváme především hledáním nových nádorových markerů v biologickém materiálu např. sérum, plazma, tkáňové lyzáty atd u onkologicky nemocných pacientů. V těchto komplexních systémech jsou biomarkery přítomny v relativně malém množství a k jejich identifikaci je nutno metodu SELDI TOF MS zoptimalizovat. Lepší citlivost metody jsme dosáhli:

1) zlepšením „recovery“ (výtěžnosti) signálu při detekci analytů z čipů s povrchem normální fáze (fáze je analogická s chromatografii), kdy protokol doporučený firmou pro přípravu vzorku na tomto čipu obsahoval některé nepřesnosti nebo přímo protiklady. Po naší úpravě přípravy čipů oproti původnímu protokolu se nám podařilo zvýšit „recovery“ v podobě celkového iontového proudu (TIC) na 2,5 násobek a i plochy pod píky jsou významně zvýšené. Tohoto se dá využít především při stanovování proteinů o nižší koncentraci;
2) v dalším kroku jsme se zaměřili na optimalizací rozlišení proteinů, které mají stejnou afinitu k čipu a podobnou molekulovou hmotnost. K tomuto rozlišení jsme použili isoelektrickou fokusaci, která dává této metodě další rozměr v podobě dělení proteinů na základě jejich isoelektrických bodů, které jsou specifické pro každý protein (isoelektrický bod – pH při kterém má protein nulový náboj).

Vyvinuli jsme postup celkového zpracování vzorku, kdy jsme schopní biologický vzorek rozdělit do frakcí a tyto potom zpracovat na chromatografických čipech a tento výsledek reprodukovat. Vzhledem k vysoké separační účinnosti isoelektrické fokusace, relativně nízké pracnosti přípravy vzorku a rychlosti separace je tato metoda vhodná k použití i pro větší počet vzorků.

Tento projekt je podporovaný grantem MZ 000209805.

* MALDI TOF MS – Laserová desorpce/ionizace za přítomnosti matrice s detekcí hmotnosti průletovým analyzátorem (Matrix assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass spectrometry)

** ESI TOF MS – Elektrospray s detekcí hmotnosti průletovým analyzátorem (Elektrospray Time of Flight Mass spectrometry)

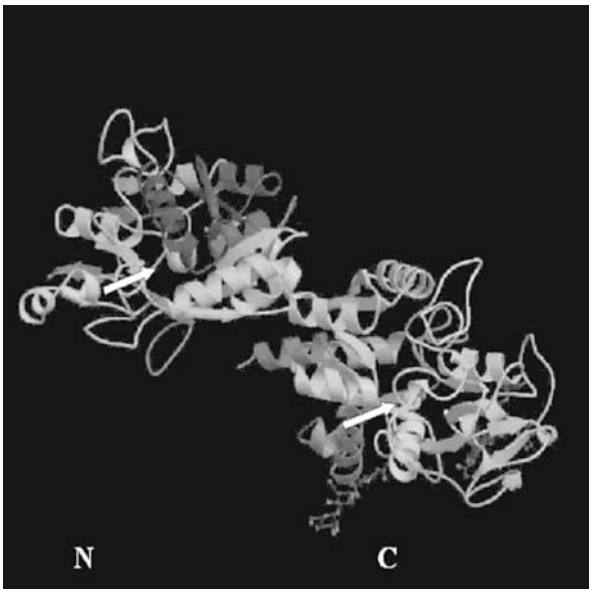
234 Sledování strukturní změny proteinů pomocí jednoduché elektrochemické detekce.

Zítka O.[1,2,*], Horna A.[3], Adam V.[1], Kizek R.[1,*]
1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
2) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
3) Radanal s.r.o., Pardubice
**) Korespondenční autor: zitka@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz*

Klíčová slova: *Laktoferin – strukturní změny – elektrochemie*

Úvod

Studiu změn struktur proteinů je v poslední době věnována velká pozornost. Pokud dojde vlivem některých faktorů (jakými mohou být například teplota, pH nebo iontová síla) ke změně struktury proteinu na úrovni terciární a kvartérní, pak je velice pravděpodobné, že protein částečně nebo zcela ztratí svoji funkčnost. To sebou nese mnoho negativních důsledků, které se podle druhu metabolického působení proteinu, mohou v organismu projevit jak v krátkodobém, tak dlouhodobém časovém intervalu. Proto je nutné vytvářet postupy a kombinace postupů pro separaci proteinů z biologické matrice a metody, které jsou schopné tyto změny na vyšších strukturních úrovních postihnout. Alternativními metodami pro detekci mohou být elektrochemické metody, které se nabízí nejen pro svoji citlivost ale také pro nízkou cenu.



Obr. 1
Strukturní model laktoferinu. Šipkou je vyznačeno vázané železo (podle)

Modelovým proteinem použitým v naší studii byl laktoferin, který je obsažen v mléce. Laktoferin, který je také nazýván laktotransferin, byl objeven v roce 1939 v kravském mléku. Jeho jméno je odvozeno podle dřívější klasifikace jako nejvýznamnější železo vázající bílkovina v mléce. V roce 1960 byl poprvé izolován z lidského mateřského mléka. V minulosti byl považován pouze za bakteriostatický železo-transportní protein v mléku. Následně se také ukázal velmi významným železo vázajícím proteinem dalších exokrinních sekretů jako jsou žluč, pankreatická šťáva a střevní sekrety. Velikost a struktura laktoferinu úzce souvisí s podobností s ostatními železo vázajícími proteiny, transferiny. Díky těmto vlastnostem je laktoferin považován za právoplatného člena transferinové rodiny. Plazmatický laktoferin je pravděpodobně syntetizován leukocyty. Nejvyšší hladina je pozorována v kolostru (až 7 g/l) a mléce (v průběhu laktace se sníží koncentrace oproti kolostru přibližně 7x), nižší hodnoty jsou v slzách, nosních tekutinách, slinách atd.. Strukturně a chemicky je laktoferin glykoprotein skládající se z 703 aminokyselinových zbytků. Hololaktoferin je tvořen z jednoho lineárního polypeptidového řetězce včleněného do dvou kulovitých domén (C- a N-terminální), každá doména má jedno vazebné místo pro navázání železa (Obr. 1). Jeho molekulová hmotnost se pohybuje kolem 77000 Da.

Laktoferin je schopný do stejného místa vázat i další kovy, ale s nižší afinitou. Je známo, že váže např.: Ga^{3+}, Al^{3+}, VO^{2+}, Mn^{3+}, Co^{3+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, trivalentní lanthanoidy. Mezi doposud známé biologické funkce laktoferinu patří regulace homeostázy železa. Regulace homeostázy železa se odehrává převážně v tenkém střevě, kde je přijímáno z potravy. Zajímavý je vztah k regulaci buněčného růstu, diferenciaci buněk a protizánětlivé aktivitě. Z toho také vyplývá možný vztah ke zhoubným nádorům a procesu metastazování.

Cílem naší práce bylo základní elektrochemické studium laktoferrinu pomocí stacionárních a průtokových elektrochemických technik s aplikací na rozlišení strukturních změn.

Materiál a metody

Chemikálie

Methanol (HPLC-čistota) byl získán od firmy Merck (Darmstadt, Německo). DMW lactoferin byl získán z NUTRA ingrediens (Holandsko). Všechny další chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA) pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 1 $mg.ml^{-1}$) byly připraveny v ACS vodě (Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při 4°C.

Elektrochemická analýza v průtočném systému

Průtočný systém byl složen z chromatografické pumpy (Model 583 ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), Guard cely (Model 5020 ESA, USA), reakční smyčky (1 m) pro průtokovou injekční analýzu (FIA) a elektrochemického detektoru. Detektor je složen z průtočné amperometrické analytické cely (Model 5040, ESA, USA) obsahující referentní (hydrogen-paládiová), pomocnou uhlíkovou a pracovní elektrodu ze skelného uhlíku a kontrolního modulu Coulochem III, který slouží k ovládání detektoru. Vzorek (5 μl) byl injektován manuálně. Data z detektoru byla zpracována pomocí software CSW 32.

Denaturační experimenty

Teplotní působení: 1 $mg.ml^{-1}$ laktoferinu v Britton-Robinson pufru byl umístěn na thermomixer Eppendorf za konstatní teploty 65°C a míchání 400 rpm. Po 30 minutách byl odebírán vzorek pro FIA analýzu.

Působení methanolu: 1 $mg.ml^{-1}$ laktoferinu byl navážen (váhy Sartorius) přímo do mikrozkumavky a přidán 1 ml methanolu (99.8%, Sigma Aldrich, HPLC čistota) a umístěn na Vortex (Genie, USA) za konstantního míchání 400 rpm. Po 30 minutách byl odebírán vzorek FIA analýzu.

Působení močoviny: 1 $mg.ml^{-1}$ laktoferinu byl přidán do 6 M močoviny a umístěna na thermomixer Eppendor za konstatní teploty 65°C a míchání 400 rpm. Po 30 minutách byl odebírán vzorek FIA analýzu.

Výsledky a diskuse

Elektrochemické chování laktoferinu na uhlíkové pastové elektrodě

Proto, abychom mohli posoudit vhodnost elektrochemické detekce pro analýzu laktoferinu a případně jeho konformačních změn, byla provedena jednoduchá studie ve stacionárním elektrochemickém uspořádání. Pro tento náš účel jsme využili tříelektrodového zapojení (uhlíková pastová elektroda (CPE) jako pracovní, uhlíková tyčinka jako pomocná a Ag/AgCl 3M KCl jako referentní). Základní elektrochemické chování laktoferinu (1 $\mu g.ml^{-1}$) na CPE v acetátovém pufru (pH 5.0) bylo provedeno pomocí tří rozdílných voltametrických elektrochemických technik (cyklické, diferenční pulzní a square wave voltametrie). Na elektrochemických záznamech byly pozorovány oxidační signály laktoferinu kolem potenciálu 0.8 až 0.85 V v závislosti na použité voltametrické technice. Všechny signály laktoferinu byly dobře rozlišitelné a detekovatelné.

Elektrochemické chování laktoferinu na elektrodě ze skelného uhlíku v průtokovém *uspořádání*

Na základě získaných experimentálních výsledků bylo provedeno studium chování laktoferinu v průtokové systému. Pomocí Coulochem III bylo studováno chování laktoferinu na elektrodě ze skelného uhlíku (GC) jako pracovní elektrodě. Při prvních experimentech byly testovány rozdílné elektrolyty (acetátový, fosfátový a Britton Robinson) při aplikovaném potenciálu 700 mV a průtoku mobilní fáze 0.5 $ml.min^{-1}$. Z experimentálních výsledků jsme zjistili, že asi o 20-30% vyšší odezva byla pozorována v acetátovém pufru v porovnání s pufrem fosfátovým. Nejvyšší elektrochemickou odezvu laktoferinu bylo možné pozorovat, pokud byl použit Britton-Robinson pufr. Z tohoto důvodu byly další experimenty provedeny v základním elektrolytu (mobilní fázi) složeném z Britton-Robinson pufru. Z našich předešlých prací je známo, že kromě složení základního elektrolytu ovlivňuje výšku pozorovaného signálu také pH. Testovali jsme vliv pH Britton-Robinson pufru na výšku signálu laktoferinu v rozsahu 3.5 až 6.5. Maximální výška signálu laktoferinu byla pozorována v rozmezí pH 4-5 u univerzálního Britton Robinson pufru. Dále vzrůstající hodnota pH vedla k poměrně rychlému poklesu signálu laktoferinu. Aby bylo možné analyzovat laktoferin aperometrickým způsobem detekce bylo potřebné ověřit nejvhodnější detekční potenciál. Z výsledků získaných pomocí voltametrie bylo očekáváno maximum kolem potenciálu 800 mV. V experimentech byly sledovány změny signálu laktoferinu při aplikovaném potenciálu 400 až 900 mV. Pozorovaný elektrochemických signál laktoferinu s narůstajícím aplikovaným potenciálem postupně vzrůstal. Pro maximální odezvu byl nejvhodnější aplikovaný potenciál okolo 900 mV. Proto byl pro další analýzu vybrán jako vhodný potenciál 900 mV, kdy se variabilita stanovení pohybovala kolem 3-5%. Při takto nastavených experimentálních podmínkách byla sledována odpověď laktoferinu na jeho koncentraci. Byla sestrojena kalibrační křivka, která byla v rozsahu 0–60 $\mu g.ml^{-1}$ lineární ($y = 0.4689x + 1.0096$; $R^2 = 0.9939$).

Rozlišení nativní a denaturované formy laktoferinu

V dalších experimentech byla sledována změna signálu laktoferinu (1 $mg.ml^{-1}$) v přítomnosti různých fyzikálních nebo chemických činitelů vedoucích ke změně struktury za využití průtokové injekční analýzy. Byla sledována dynamika změny po dobu 3 hodin. Změna signálu nativního laktoferinu během sledovaného období nabyla pozorovatelná (změny výšky píků byly v rám-

ci chyby analýzy a kolísaly kolem 5-6%). V případě, že byl laktoferin vystaven působení tepla (65°C) byl nejdříve pozorovatelný pozvolný nárůst signálu asi do 2 h působení, poté signál laktoferinu začal velmi strmě narůstat. Lze tedy předpokládat, že po 2 h dochází k výrazné změně struktury laktoferinu. V případě běžně používaného denaturačního činidla (6 M močoviny při 37°C) byl pozorován prakticky lineární nárůst signálu laktoferinu. To ukazuje na postupné rozvolnění poměrně složité struktury tohoto proteinu. V přítomnosti methanolu docházelo nejdříve k nárůstu signálu asi do 1 h působení, poté se již signál laktoferinu měnil velmi zvolna.

Závěr

Rozlišení nativní a denaturované formy proteinů je stále velmi obtížené. Jak bylo ukázáno, elektrochemická analýza umožňuje poměrně velmi jednoduché a rychlé rozlišení změny terciární a kvartérní struktury proteinu. Tato změna má přímý vliv na zpřístupnění elektrochemicky aktivních aminokyselinových zbytků, které mohou interagovat s povrchem detekční elektrody. Spojení elektrochemické detekce a injekční analýzy je velmi vhodné pro běžnou analýzu jednak z hlediska rychlosti a také díky relativně nízkým pořizovacím a provozním nákladům.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory grantů Radanal 2007.

Literatura

1. Sanchez L, Calvo M, Brock JH. Biological Role of Lactoferrin. Archives of Disease in Childhood. 1992 May;67(5):657-61.
2. Bezkorovainy A. Human milk and colostrum proteins – review. Journal of Dairy Science. 1977;60(1023):1977.
3. Levay PF, Viljoen M. Lactoferrin – a General-Review. Haematologica. 1995 May-Jun;80(3):252-67.
4. Suzuki YA, Lopez V, Lonnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. Cellular and Molecular Life Sciences. 2005 Nov;62(22):2560-75.
5. Vorland LH. Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein. Apmis. 1999 Nov;107(11):971-81.
6. Steijns JM, van Hooijdonk ACM. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. British Journal of Nutrition. 2000 Nov;84:S11-S7.
7. Bernal V, Jelen P. Thermal-Stability of Whey Proteins – a Calorimetric Study. Journal of Dairy Science. 1985;68(11):2847-52.
8. van der Strate BWA, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DKF. Antiviral activities of lactoferrin. Antiviral Research. 2001 Dec;52(3):225-39.
9. Legrand D, Elass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. Cellular and Molecular Life Sciences. 2005 Nov;62(22):2549-59.
10. Pan Y, Wan J, Roginski H, Lee A, Shiell B, Michalski WP, et al. Effect of chemical modification on anti-microbial and antiviral properties of milk proteins. Australian Journal of Dairy Technology. 2005 Jul;60(2):149-51.
11. Ward PP, Paz E, Conneely OM. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. Cellular and Molecular Life Sciences. 2005 Nov;62(22):2540-8.

235 Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE), technika pro studium proteomu mnohočetného myelomu.

Zelená J.[1,2], Konečná H.[3], Zdráhal Z.[3], Šedo O.[3], Moravcová J.[1], Rycová M.[1], Kyjovská D.[1], Hájek R.[1,2,4]
1) Laboratoř experimentální hematologie a buněčné imunoterapie, Oddělení klinické hematologie FN, Brno
2) Integrované laboratoře biomedicínckých technologií, Univerzitní kampus MU, Brno
3) Laboratoř funkční genomiky a proteomiky, Ústav experimentální biologie, PřF MU, Brno
4) Interní hematoonkologická klinika FN, Brno

Mnohočetný myelom (MM) je heterogenní onemocnění, které je charakterizováno zhoubnou proliferací B-buněčného lymfocytárního klonu a akumulací terminálních vývojových stádií – plazmocytů (1). Incidence MM činí v ČR 4/100 000 obyvatel. Medián věku při stanovení diagnózy je 60-65 let. Méně než 2% všech pacientů je ve věku do 40 let. Menšina případů MM vzniká transformací z monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammapathy of undeterminated significance – MGUS), v ostatních případech jde o nově rozpoznané (vzniklé) onemocnění.

MM je ve většině případů nevyléčitelnou nemocí s individuálně odlišným průběhem, léčebnou odezvou a prognózou. V současné době se léčebné výsledky u MM zásadním způsobem zlepšily tak, že více než 20% nemocných přežívá 10 let a nové léky jako thalidomid, revlimid, bortezomib (Velcade) ještě tyto výsledky pravděpodobně zlepší (2).

Proteomika (proteomics) je v současné době rychle se rozvíjející vědní obor, který se zabývá systematickou analýzou veškerých proteinů (proteomů) dané buňky organismu, orgánu, tkáně nebo tělesné tekutiny. Protože je proteom studován v určitém

okamžiku za přesně definovaných podmínek, odráží tak aktuální metabolický stav dané buňky. U onkologických onemocnění se proteomika snaží nalézt a stanovit biomarkery, jejichž měření by vedlo k efektivnímu rozlišení definovaných fází různých typů onemocnění či sledování odpovědi pacienta na použitou terapii.

Základní separační technikou proteomiky je dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE) (3), která k identifikaci jednotlivých proteinů využívá hmotnostní spektrometrii (MS). V zahraničním písemnictví v posledních letech vyšla řada přehledových publikací věnovaných proteomickému výzkumu hematoonkologických onemocnění (4, 5, 6, 7). Studie zabývající se analýzou proteomu MM však doposud chybí. V naší práci jsme se zaměřili na optimalizaci solubilizace proteinů buněk myelomové linie ARH-77 a buněk získaných od nemocných MM a provedli jsme prvotní analýzy proteomu MM technikou 2D-PAGE. Optimalizovaná a standardizovaná metodika bude v budoucnu využita pro studium markerů rezistence myelomových buněk k podanému léčivu (bortezomib, thalidomid). Rozdílně exprimované proteiny v buňkách pacientů citlivých a rezistentních na podané léčivo pak budou identifikovány pomocí MS spektrometrie. Na základě vstupního proteomického profilu nemocného bude pak možné předem vyloučit léky nevhodné pro daného nemocného.

Literatura

1. Barlogie B., Shaughnessy J., Trikot G. et al: Treatment of multiple myeloma. Blood, 2004, 1, 20-32.
2. Hájek R., Maisnar V., Gregora E., Pour L.: Využití nových léků thalidomidu a bortezomibu v léčbě primárně refrakterních nebo relabujících nemocných s mnohočetným myelomem (přijato do tisku ČLČ).
3. Görg A., Weiss W. and Dunn M. J.: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics, 2004, 4, 3665-3685.
4. Cristea I. M., Gaskell S. J. and Whetton A. D.: Proteomics techniques and their application to hematology. Blood, 2004, 103, 3624-3634.
5. Ress-Unwin K. S., Morgan G. J. and Davies F. E.: Proteomics and the haematologist. Clin. Lab. Haem., 2004, 26, 77-86.
6. Caron M. and Joubert-Caron R.: Proteomics in hematological malignancies. Expert. Rev. Proteomics, 2005, 2, 567-576.
7. Joubert-Caron R. and Caron M.: Proteome analysis in the study of lymphoma cells. Mass Spectrom. Rev., 2004, 24, 455-468.

Podporováno grantem MŠMT LC06027 a výzkumným záměrem MSM 0021622434.

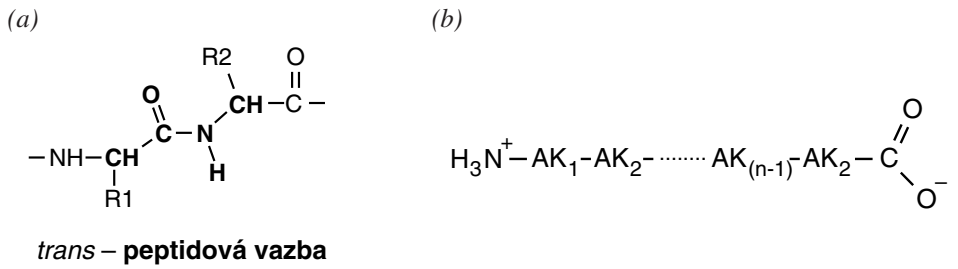
236 Vybrané analytické metody pro studium peptidů a proteinů.

Adam V.[1], Křížková S.[1], Fabrik I.[1,2], Šobrová P.[1], Stejskal K.[1,2], Trnková L.[2], Kizek R.*
1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
2) Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno
**) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz*

***Klíčová slova**: Thiolové sloučeniny – analytické metody – elektrochemické metody – katalytické a oxidační signály*

Úvod

Proteiny jsou nezbytnou součástí všech živých organismů. Je známo, že jsou složeny převážně z 21 druhů -aminokyselin vycházejících z genetického kódu. Jednotlivé aminokyseliny jsou spolu spojeny peptidovou vazbou (Obr. 1a) a propojením několika aminokyselin vzniká polypeptidický řetězec (Obr. 1b).



Obr. 1 (a) Peptidová vazba mezi jednotlivými aminokyselinami (b) struktura polypeptidového řetězce

Biologická rozmanitost proteinů

Biologická funkce je spojena s jejich strukturou, určenou pořadím jednotlivých aminokyselin a dále prostorovým uspořádáním jednotlivých molekul. V organismech se vyskytují jako enzymy, regulační proteiny, receptory, transportéry, hrají roli ve smyslovém vnímání, imunitním a oporném systému. Samotná složitost proteinového složení organismů je dána již tvorbou protei-

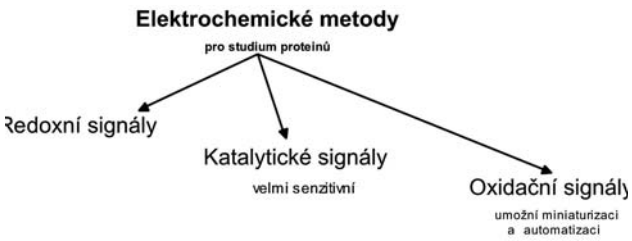
nových polymerů, které mohou tak být i) monodisperzní (mají stejnou molekulovou hmotnost) ii) disperzní (mají molekulovou hmotnost výrazně rozdílnou a molekuly tak mohou mít desítky až stovky aminokyselin). Tvar proteinu může být také rozdílný, od molekuly jednoduché vláknité, přes kulovité.

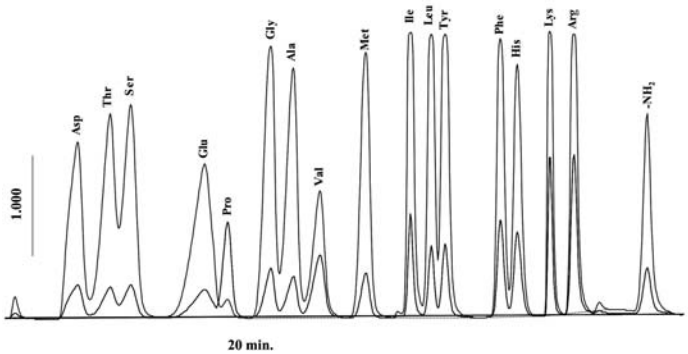
Strukturní uspořádání proteinů

Primární struktury vytváří vyšší uspořádání, dvou základních typů i) helixu nebo ii) skládaného listu. Takto vzniklé sekundární struktury vedou ke vzniku prostorového terciárního uspořádání proteinu. Navíc obecně platí, že u globulárních proteinů míří polární nabité skupiny ven z povrchu proteinu a jsou hydratovány. Dovnitř struktury míří jen v případech, když zde mají nějakou specifickou funkci (vazbu kovových iontů). V případě dlouhého polypeptidového řetězce vznikají domény, které mohou mít svou specifickou funkci. Na vzniku terciárních struktur se podílí celá řada interakcí jako: elektrostatické přitažlivé síly mezi atomy a dipóly, vodíkové vazby, interakce mezi polárními skupinami a vodou, disulfidické vazby, disperzní síly mezi hydrofobními skupinami. Mnohé proteiny se skládají z více samostatných polypeptidových jednotek vytvářející kvartérní strukturu, přičemž i zde se uplatňují všechny typy interakcí. Velmi významnou je schopnost dalších biologicky aktivních látek vázat se na proteiny.

Co se musí udělat se vzorkem pro stanovení proteinů?

Primárním úkolem je správné odebrání a převedení získaného biologického vzorku do odběrové zkumavky. Podle charakteru sledovaného proteinu je vhodné jeho okamžité zamražení kapalným dusíkem a dále uchování v hlubokomrazícím boxu při -80°C. Vzorek je před vlastní analýzou homogenizován pomocí různých způsobů a technik závislých na hledaném proteinu. Obecně je však vždy potřebné biologický vzorek mechanicky upravit (mechanické a ultrazvukové homogenizátory). Cílem je rozbití buněk a uvolnění intracelulárního obsahu do roztoku. Získaný homogenát je centrifugován, aby došlo k oddělení zbytků buněk a supernatantu (obsahující proteiny). Takový vzorek je možné již použít k vlastní analýze. Většinou je však potřebné provést jeho vhodné naředění či další úpravu vzorku podle analyzovaného proteinu.





Obr. 2 Chromatogram hydrolyzátu aminokyselin. Ionexová kolona, průtok mobilní fáze 0,5 ml/min, derivatizace ninhydrinem, snímaná vlnová délka 440 a 560 nm.

Obr. 3 Schéma elektroanalytického stanovení proteinů a peptidů

Analýza proteinů – stanovení obsahu aminokyselin

Abychom zjistili, které aminokyseliny obsahuje polypeptidový řetězec a v jakém jsou zastoupení, musíme provést úplnou hydrolýzu na aminokyseliny. Kyselá hydrolýza probíhá zahříváním vzorku při 100-120°C po dobu 24 h v prostředí 6 M HCl. Vzniklá směs aminokyselin (kromě tryptofanu, který se rozkládá) se analyzuje pomocí chromatografie. Alkalická hydrolýza probíhá působením 2M NaOH po dobu 8 hodin při 120°C a umožní stanovení tryptofanu. Pro analýzu takové směsi je velmi vhodná iontová chromatografie, kde na ionexu dochází k rozdělení jednotlivých aminokyselin. Pro jednoduchou analýzu hydrolyzovaných aminokyselin pomocí jednoduché a levné UV detekce je nezbytné aminokyseliny tzv. „zviditelnit“. Z tohoto důvodu jsou deprivatizovány vhodnými barevnými činidly např. ninhydrin. Vzniklý barevný produkt je snímán pomocí jednoduchého spektrofotometrického detektoru (Obr. 2).

Elektrochemické stanovení proteinů

V případě, že je nutné analyzovat „celé“ proteiny, jsou nejběžněji používané metody elektroforéza na polyarylamidovém gelu. Kromě běžných metod využitelných pro studium proteinů je možné použít i metody elektrochemické. Elektrochemické metody detekují změny (proudu/potenciálu/náboje) na povrchu pracovních elektrod. Elektrochemické zařízení je složeno z části elektrodové a části převodníkové. Elektrodová část je pro přesná měření tvořena více elektrodami: i) pracovní (indikační), na takové elektrodě probíhá vlastní stanovení studované látky; ii) pomocné, která snižuje vliv rušivých proudů; iii) referentní, která určuje hodnotu potenciálu, ke které je vztaženo vlastní měření. Převodníková část je pak tvořena především zařízením umožňujícím udržení konstantního potenciálu nebo proudu.

Elektrochemické signály proteinů

Pomocí elektrochemických metod je možné sledovat několik rozdílných signálů závislých na použité pracovní elektrodě. Na rtuťové elektrodě je možné pozorovat signály redoxní povahy (redukční/oxidační). Za tento signál je odpovědná redukce vzniklého komplexu proteinu s povrchem pracovní elektrody. Za vlastní signály pak odpovídají elektroaktivní skupiny proteinu nebo peptidu, zejména však SH a NH2 skupiny. Dalším typem elektrochemických signálů proteinů jsou oxidační signály na pevných elektrodách. Za vzniklé elektrochemické signály jsou odpovědné především aminokyseliny tyrosin a tryptofan. Tyto metody přináší možnosti pro jejich miniaturizaci a využití nejen ve specializovaných laboratořích.

Na druhou stranu z pohledu senzitivity jsou tyto redoxní signály poměrně málo významné. Mnohem významnější jsou signály katalytické povahy. Tyto signály odpovídají jevům probíhajícím na rtuťových elektrodách, především toho, že přítomný protein vyvolá urychlení uvolnění vodíku ze základního elektrolytu. V přítomnosti proteinů tak vznikají signály, které jsou závislé na koncentraci proteinu. Byly popsány dva takové signály a to i) Brdičkova reakce a ii) pík H. Pro vznik katalytických signálů Brdečkovy reakce je potřebné k roztoku proteinu přidat ionty kobaltu(III) a zvýšit pH základního elektrolytu. Po splnění těchto podmínek vznikají typické signály, které odpovídají koncentraci proteinu přítomného v roztoku. Druhým a velmi senzitivním katalytickým signálem je pík H. Tento signál vzniká v negativnějším potenciálu a pro jeho analýzu je velmi vhodná chronopotenciometrická rozpouštěcí analýza s konstantním proudem. Metoda pak umožňuje v roztoku analyzovat ultrastopová množství proteinů.

Využití elektrochemie pro studium nádorových onemocnění

Přesně před sto jedna lety (25. února 1906) se narodil jeden z významných žáků Jaroslava Heyrovského Rudolf Brdička, který objevil signál vznikající v přítomnosti proteinů obsahující ve své molekule atomy síry. Na počest objevitele byl tento jev pojmenován jako Brdičkova reakce, viz výše. Rudolf Brdička se však nezastavil a pokusil se metodu využít pro diagnostiku rakoviny a výsledky své práce publikoval v roce 1937 v časopise Nature. Zjistil, že průběh analýzy krevního séra zdravého člověka a pacienta s nádorovým onemocněním je výrazně odlišný a mohl být využit pro rozlišení zdravého a nemocného člověka. Nebylo však zcela zřejmé, které proteiny byly podle vypracované metodiky stanovovány. Později se podařilo objevit skupinu mukoproteinů (MP-1, MP-2 a MP-3), ale proteinům o nižší molekulové hmotnosti nebyla věnována žádná pozornost. Jak se v poslední době ukazuje, nízkomolekulární proteiny (jako je metalothionein) a peptidy (jako je glutathion) hrají významnou roli v řadě biologických procesů včetně regulace buněčného dělení.

Závěr

Elektrochemické metody patří mezi méně používané postupy v analýze peptidů a proteinů. Je však nezbytné připomenout, že vykazují velmi dobrou senzitivitu, reprodukovatelnost a navíc jsou poměrně snadno miniaturizovatelné.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory grantů Liga proti rakovině Praha a Běh Terryho Foxe 2007.

Literatura

1. Vodickova H, Pacakova V, Sestakova I, Mader P. Analytical methods for determination of metallothioneins. Chemicke Listy. 2001;95(8):477-83.
2. Kizek R, Vacek J, Trnková L, Klejdus B, Havel L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for metallothionein electrochemical detection. Chem Listy. 2004;98(4):160-7.
3. Kizek R, Trnkova L, Palecek E. Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry. Anal Chem. 2001 Oct; 1573(20):4801-7.
4. Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Klejdus B, Kuban V. Electrochemical biosensors in agricultural and environmental analysis. Chem Listy. 2003;97(10):1003-6.
5. Petrlova J, Blastik O, Prusa R, Kukacka J, Mikelova R, Stiborova M, et al. Analýza obsahu metatothioneinu u pacientů se zhoubným nádorem prsu, tlustého střeva a nebo melanomem. Klin Onkol. 2006;19(2):58-62.
6. Petrlova J, Blastik O, Prusa R, Kukacka J, Potesil D, Mikelova R, et al. Using of electrochemical methods for studying of metallothionein content in the human blood serum of a patient poisoned by lead and treated by platinum. Biomedical Papers. 2005;149(2):485-8.
7. Petrlova J, Potesil D, Mikelova R, Blastik O, Adam V, Trnkova L, et al. Attomole voltammetric determination of metallothionein. Electrochim Acta. 2006;51(24):5112-9.
8. Brdicka R. Polarographic studies with the dropping mercury kathode. – Part XXXII. - Activation of hydrogen in sulphydryl group of some thio-acids in cobalt salts solutions. Coll Czech Chem Commun. 1933;5:148-64.
9. Brdicka R. Polarographic studies with the dropping mercury kathode. – Part XXXI. – A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride. Coll Czech Chem Commun. 1933;5:112-28.
10. Brdicka R. Polarographic investigation in serological cancer diagnosis. Nature. 1937;139:1020-1.
11. Brdicka R. Application of the polarographic effect of proteins in cancer diagnosis. Nature. 1937;139:330-.
12. Brdicka R. Zur frage nach der natur der polarographisch feststellbaren serumverandrungen bei Krebs. Klinische Wochenschrift. 1938;18:305-8.

XXIX.
Signální mechanismy v patofyziologii nádorů

237 Indukce buněčné smrti a změn adhezívních vlastností u neadherentně kultivovaných epiteliálních buněčných linií.

Kočí L.[1,2], Hýžďalová M.[1], Hofmanová J.[1], Kozubík A.[1]
1) Laboratoř cytokinetiky, Biofyzikální ústav Akademie věd ČR, Brno
2) Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita Brno

Zachování rovnováhy mezi procesy proliferace, diferenciace a apoptózy buněk je typické pro zdravé epiteliální buňky tlustého střeva, tato rovnováha může být narušena během karcinogeneze. Epiteliální buňky tlustého střeva jsou uvolňovány do lumen na vrcholu krypty a umírají „detachment-induces apoptosis“ (anoikis). Cytokinetické i adhezívní vlastnosti buněk tlustého střeva mohou být ovlivněny složkami potravy (např. mastné kyseliny) nebo běžně přítomnými endogenními regulátory (např. cytokiny TNF rodiny). Tyto látky mohou na jedné straně přispívat ke vzniku infekčních, zánětlivých nebo nádorových onemocnění střeva, na straně druhé mohou napomáhat při regeneraci postižené tkáně a při léčbě zmíněných chorob.

V rámci prezentovaných výsledků jsme studovali účinky butyrátu (mastné kyseliny s krátkým řetězcem, která vzniká v tlustém střevě bakteriální fermentací nestravitelné vlákniny; NaBt) a apoptotických induktorů z rodiny TNF (TNF-α, Fas ligand a TRAIL) na cytokinetické parametry a adhezívní vlastnosti normálních (lidské fetální kolonové buněčné linie – FHC) a nádorových (lidská buněčná linie odvozená z adenokarcinomu tlustého střeva – HT-29) buněk v souvislosti s navozením anoikis.

Pro navození podmínek vedoucích k indukci anoikis, jsme zavedli experimentální model neadherentní kultivace buněk. Výsledky cytokinetických experimentů ukazují větší citlivost k podmínkám neadherentní kultivace u normálních buněk FHC ve srovnání s nádorovými buňkami HT-29. Dále jsme pomocí western blottové anyalýzy porovnávali exprese adhezívních molekul během adherentní a neadherentní kultivace buněk. Zjistili jsme, že změny v expresi těchto molekul, které ztráta kontaktu s povrchem způsobuje, jsou u normálních FHC i nádorových HT-29 buněk podobné. Během neadherentní kultivace došlo k nárůstu exprese obou studovaných integrinů α1 a α2, které jsou ve střevním epitelu nejvíce zastoupeny. Toto zvýšení exprese receptorů zprostředkujících kontakt buňky s ECM může být dáno snahou buněk zvýšit schopnost vytvoření adherentních spojů a následné adheze. Při tom celková exprese kinázy FAK, která se účastní vytvoření adherentních spojů a která je při tom aktivována, se neměnila, a exprese fosforylované formy FAK byla zvýšena pouze u adherentně kultivovaných buněk. Na druhou stranu exprese další kinázy, která se účastní adheze buněk, ILK kinázy, se během neadherentního typu kulivace mírně zvyšovala, ale pouze u HT-29 buněk. Pokud jde o expresi molekul účastnících se vazby mezi buňkami, byla při neadherentní kultivaci zvýšena exprese E-kadherinu. Zároveň byla zvýšena exprese i fosforylace (aktivace) α-cateninu. Toto navýšení pravděpodobně souvisí s tendencí buněk vytvářet mezibuné kontakty při shlukování (tvorba tzv. sféroidů) během neadherentní kultivace.

V dalších experimentech jsme se zaměřili na sledování účinků členů rodiny TNF a NaBt na cytokinetické parametry a expresi adhezívních molekul během adherentní a neadherentní kultivace buněk FHC a HT-29. Pokud jsme neadherentně rostoucí buňky ovlivnili cytokiny z rodiny TNF nedošlo ke změně jejich počtu, ale k mírnému zvýšení procenta buněk v S-fázi buněčného cyklu. Významné bylo zvýšení počtu buněk v subG0 populaci a množství apoptotických buněk, a to zejména po působení anti-Fas. Citlivější byly k těmto změnám nádorové (HT-29) než nenádorové (FHC) buňky. Byly detekovány také rozdíly v účincích členů rodiny TNF na expresi adhezívních molekul u adherentně a neadherentně kultivovaných buněk. Za nejvýznamnější považujeme změny v expresi integrinů. V buňkách HT-29 byla exprese integrinu α2 během adherentní kultivace zvyšována TNF-α, anti-Fas i TRAIL, zatímco během neadherentní kultivace došlo naopak ke snížení exprese po působení anti-Fas a TRAIL. Na druhé straně u FHC buněk byla exprese integrinu α2 zvýšena pouze po účinku TNF-α a to u obou typů kultivací. Exprese integrinu 1 se během neadherentní kultivace po působení členů rodiny TNF spíše snižovala. Avšak u neadherentně kultivovaných buněk byla exprese tohoto integrinu zvýšena u linie HT-29 i FHC vlivem TNF-α. Exprese E-kadherinu a kinázy FAK nebyla působením TNF rodiny ovlivněna.

NaBt způsoboval u standardně kultivovaných buněk HT-29 i FHC zastavení růstu a blok v G0/G1-fázi buněčného cyklu. U neadherentní kultivace byla zpomalena proliferace pouze u nenádorových buněk FHC, zatímco zvýšení počtu buněk v G_0/G_1-fázi buněčného cyklu jsme pozorovali u obou použitých linií (u FHC buněk byl tento blok větší). Také snížení viability a indukce buněčné smrti NaBt byla podobná v obou typech kultivačních podmínek. Neadherující buňky však podléhaly apoptóze již po kratší době působení NaBt (24 hod). Citlivější byly k navození buněčné smrti v obou případech nádorové buňky HT-29. S využitím stejného experimentálního uspořádání byl sledován i účinek NaBt na expresi a aktivaci molekul účastnících se mezibuněčné interakce a interakce buňka-ECM. NaBt patří mezi významné induktory diferenciace epiteliálních buněk tlustého střeva. Sledovali jsme proto, jak ztráta kontaktu s povrchem během neadherentního typu kultivace ovlivňuje u buněk HT-29 a FHC schopnost diferenciace. Z výsledků měření vnitrobuněčné aktivity alkalické fosfatázy (jako ukazatele diferenciace) vyplývá, že zatímco u nádorových buněk není tato schopnost ovlivněna, u normálních buněk je během neadherentní kultivace významně snižena diferenciaci navozená NaBt.

Cílem naší práce bylo ustanovit *in vitro* experimentální model neadherentní kultivace buněk u vybraných nádorových i nenádorových buněčných linií tlustého střeva. Dále analyzovat efekty působení vybraných cytokinů TNF rodiny a butyrátu sodného na expresi adhezívních proteinů a na cytokinetiku normálních i nádorových střevních epiteliálních buněk při srovnání adherentního a neadherentního typu kultivace. Výsledky potvrzují hypotézu, že endogenní regulátory jako je TNF rodina, a stejně tak slož-

ky obsažené v potravě jako je NaBt, mohou modulovat signální transdukci spojenou s buněčnou adhezí a anoikis ve střevních epiteliálních buňkách.

Tato práce vznikla za podpory grantů IGA AV ČR KJB500040508 a GAČR 524/07/1178.

238 Úloha transkripčního faktoru NF-κB v mechanismu interakce TNF-α a butyrátu u epiteliálních buněk tlustého střeva.

Hýžďalová M., Hofmanová J., Kozubík A.
Laboratoř cytokinetiky, Biofyzikální ústav AV ČR, Brno

Epiteliální buňky tlustého střeva jsou ovlivňovány řadou látek různého původu – například trávícími enzymy a žlučovými kyselinami, dále některými látkami přecházejícími z krve (hormony apod.), nebo růstovými faktory produkovanými buňkami imunitního systému. Velké množství rozličných látek se do střeva dostává z potravy. Z hlediska ovlivnění střevních epiteliálních buněk je významné zastoupení tuků a také množství nestravitelné vlákniny v přijímané potravě.

Všechny tyto látky mohou v tlustém střevě spolupůsobit a vzájemně se ovlivňovat, přičemž mohou mít na střevní epitel různý vliv. Mohou na jedné straně přispívat ke vzniku infekčních, zánětlivých nebo nádorových onemocnění střeva, na straně druhé mohou napomáhat při regeneraci postižené tkáně a při léčbě zmíněných chorob.[1,2]

Jednou z látek ovlivňujících střevní epitel je **kyselina máselná (butyrát)**, který vzniká v tlustém střevě bakteriální fermentací nestravitelné vlákniny přijímané potravou.[3,4] Bylo prokázáno, že tato mastná kyselina s krátkým řetězcem má schopnost potlačovat proliferaci a naopak posilovat diferenciaci a indukovat apoptózu buněk střeva v koncentracích okolo 5 mM, a to jak *in vitro* tak *in vivo*.[5] Tím přispívá k rovnováze cytokinetických procesů u epiteliálních buněk v kryptách tlustého střeva.

Nádory nekrotizující faktor alfa (TNF-α) je endogenně produkovaný cytokin, který patří mezi intenzivně studované biologicky aktivní látky. Hraje významnou úlohu v imunitních a zánětlivých reakcích, endotoxickém šoku, kachexii a v regulaci buněčného růstu a smrti. Ve střevě je produkován buňkami imunitního systému, zejména makrofágy, a ve tkáních postižených zánětem je jeho množství významně zvýšeno.[7] V tkáních získaných z kolorektálních nádorů pacientů bylo nalezeno zvýšené množství endogenního TNF-α ve srovnání s odpovídajícími normálními kolorektálními tkáněmi.[8]

Naše předchozí výsledky ukazují na modelu lidských buněk HT-29 a CaCo-2 odvozených od adenokarcinomu tlustého střeva a normálních fetálních buněk tlustého střeva FHC, že **mezi působením butyrátu (NaBt) a TNF-α existuje interakce**.[9] TNF-α potlačoval v našich experimentech vyvolané znaky diferenciace – konkrétně aktivitu alkalické fosfatázy a polymerizaci F-aktinu v buňkách. Na druhé straně jsme potvrdili i jeho schopnost zvyšovat při společném působení s NaBt množství buněk umírajících apoptózou. [10] Tyto výsledky ukazují na možnou úlohu TNF-α při poškození epiteliálních buněk a vzniku či potenciaci neoplastických změn během dlouhotrvajících chronických zánětů tlustého střeva, vzhledem k jeho schopnosti ovlivňovat účinky NaBt na střevní epitel.

Rodina **transkripčních faktorů NF-κB**, která zahrnuje RelA (p65), c-Rel, RelB, NFKB1 (p50/p105) and NFKB2 (p52/p100), reguluje exprese stovek genů účastnících se fyziologických i patologických procesů.[11,12] Zánětlivá a autoimunitní onemocnění jako je astma, revmatická artritida nebo zánětlivé onemocnění střev, stejně jako ateroskleróza, nádorová onemocnění nebo diabetes, jsou spojena s konstitutivní aktivací NF-κB dráhy.[13,14] Ve většině buněk je NF-κB přítomen v latentní inaktivní formě, vázán v komplexu s ihibitorem (IκB) v cytoplazmě. Existují dvě dráhy, které vedou k aktivaci NF-κB – kanonická (klasická) a nekanonická (alternativní) dráha. Prvním krokem vedoucím ke spuštění obou ?těchto drah je aktivace IB kináz (IKK), což vede k fosforylaci a následné degradaci IκB. Tím se uvolňuje dimer NF-κB z inhibičního komplexu a dochází k jeho translokaci do jádra, kde spouští transkripci příslušných genů. Během kanonické aktivační dráhy dochází k uvolnění a translokaci heterodimerů RelA (p65) s p50 nebo p52, případně homodimeru p50. Zatímco u alternativní dráhy aktivace NF-κB je translokován heterodimer p52/RelB.[16,17]

Prozánětlivé cytokiny, jako je TNF-α, patří mezi typické aktivátory kanonické signální dráhy NF-κB.[16] Navíc se předpokládá, že aktivace NF-κB je jedním z mechanismů TNF-α vyvolané cytotoxicity.[17] Na druhou stranu NaBt je schopen potlačovat aktivitu transkripčního faktoru NF-κB, a pro tuto vlastnost by mohl být využíván během terapií chronických zánětů střeva (např. Crohnovy choroby).[18] V diferencovaných částech střevních krypt, kde dochází k odumírání buněk apoptózou, byla nalezena zvýšená exprese proteinů rodiny IκB.[19]

Vzhledem k souvislosti aktivity NF-κB se stavem střevní epiteliální tkáně a schopnosti TNF-α aktivovat NF-κB jsme předpokládali, že aktivita tohoto transkripčního faktoru by mohla hrát úlohu v mechanismu interakce NaBt a TNF-α. Proto jsme v této práci sledovali aktivaci kanonické dráhy NF-κB u normálních (FHC) i nádorových (HT-29) buněk tlustého střeva běhme interakce působení NaBt a TNF-α.

Pro detekci aktivace NF-κB jsme použili čtyři různé přístupy. Nejrpve jsme vytvořili klony HT-29 buněk s reportérovým konstruktem pBIIX-LUC. TNF-α u těchto HT-29 klonů zvyšoval ve srovnání s neovlivněnou kontrolou významně vazebnou aktivitu NF-κB, a tento účinek byl časově závislý (41-násobné zvýšení po 4 hodinách, 47-násobné po 8 hodinách a 75-násobné po 24 hodinách). Zvýšení vazebné aktivity NF-κB po působení TNF-α jsme pozorovali u buněk HT-29 i FHC i pomocí EMSA.

TNF–α také indukoval translokaci p65 do jádra, což jsme u obou buněčných linií prokázali pomocí Western blotů z jaderných extraktů. Posledním použitým přístupem byla analýza exprese inhibičního proteinu IκB, jehož exprese po působení TNF-α významně klesala. Samotný NaBt aktivitu NF-κB po krátké době působení (4 a 8 hodin) neovlivňoval, pouze po 24 hodinách působení docházelo ve srovnání s kontrolou k nárůstu aktivity u obou buněčných linií.

Při kombinovaném působení TNF-α a NaBt jsme ve srovnání s působením samotného TNF-α pozorovali ve změnách aktivity NF-κB významné rozdíly mezi normálními a nádorovými buňkami. U HT-29 buněk došlo ve srovnání s působením samotného TNF-α po kombinovaném účinku TNF-α a NaBt nejprve k počátečnímu (4 hodiny) navýšení aktivity. Avšak u FHC buněk byl po 4 hodinách působení zjištěn stejný nárůst aktivit NF-κB u samotného TNF-α i jeho kombinace s NaBt. Po 8 hodinovém účinku byla úroveň aktivit NF-κB stejná u samotného TNF-α i kombinace u obou typů buněk, ale po 24 hodinách se u obou linií po kombinovaném působení ve srovnání s účinkem samotného TNF-α snížila.

Abychom detailněji prozkoumali úlohu NF-B během studované interakce, ovlivnili jsme buňky nejprve inhibitorem aktivace NF-κB parthenolidem a následně TNF-α, NaBt nebo jejich kombinací. Tato inhibice NF-κB dráhy měla u obou typů buněk za následek snížení citlivosti k NaBt indukovanému zpomalení růstu, kterou už TNF-α, stejně jako u předchozích experimentů bez parthenolidu, dále neměnil. Naopak indukce apoptózy NaBt byla po inhibici aktivace NF-κB významně vyšší, ale pouze u nádorových buněk. Navíc jsme nalezli mezi normálními a nádorovými buňkami také ?rozdíl v úloze NF-κB během regulace apoptózy indukované ?kombinovaným působením TNF-α a NaBt. Zatímco u HT-29 buněk došlo po použití parthenolidu k rapidnímu nárůstu apoptózy po ?kombinaci účinků TNF-α a NaBt (3.6-násobně oproti samotnému NaBt), u FHC buněk to bylo pouze 1.6-násobně, což je významně nižší nárůst než bez použití parthenolidu. Pokud jde o schopnost diferencovat po působení NaBt byla tato u nádorovým buněk HT-29 po inhibici NF-κB dráhy silně snížena. U FHC buněk došlo po ?použití parthenolidu ke snížení schopnosti TNF-α potlačovat NaBt navozenou diferenciaci (z 5.8-násobného snížení na 2.7-násobné). Rozdílná odpověď normálních a nádorových buněk na inhibici aktivace NF-κB dráhy odpovídá zjištěnému rozdílu v aktivaci této ?dráhy během interakce TNF-α s NaBt.

Naše výsledky ukazují, že mechanismus již dříve zjištěné interakce TNF-α a NaBt, která naznačuje možnou úlohu TNF-α při poškození epiteliálních buněk a vzniku či potenciaci neoplastických změn během dlouhotrvajících chronických zánětů tlustého střeva, je rozdílný u normálních a nádorových epiteliálních buněk tlustého střeva. Je pravděpodobné, že jednu z významných úloh hraje v mechanizmu této interakce aktivace kanonické dráhy NF-κB.

Tato práce vznikla za podpory grantů IGA AV ČR KJB500040508 a GAČR 524/07/1178.

Literatura

1. Lipkin M, Reddy B, Newmark H and Lamprecht SA. Annual Rev Nutr 19, 545-586 (1999).
2. Petronis A and Petriniene R. Gut 47, 302-306 (2000).
3. Clausen MR and Mortensen PB. Gut 37, 684-689 (1995).
4. Scheppach W, Bartram HP and Richter F. Eur J Cancer 31A, 1077-1080 (July-August 1995).
5. Pouillart PR. Life Sci 63, 1739-1760 (1998).
6. Larric JW and Wright SC. FASEB J 4, 3215-3223 (1990).
7. Plevy SE, Targan SR, Andus T and Toyoda H. J Immunol 150, 10A (1993).
8. Numata A, Minagawa T, Asano M, Nakane A, Katoh H and Tanabe T. Cancer 68, 1937-1943 (1991).
9. Kovaříková M, Pacherník J, Hofmanová J, Zadák Z and Kozubík A. Eur J Cancer 36, 1844-1852 (2000).
10. Giardina C, Boulares H and Inan MS. Biochim Biophys Acta 1448, 425-438 (1999).
11. Pahl HL. Oncogene 18, 6853-6866 (1999).
12. Martone R, Euskirchen G, Bertone P, Hartman S, Royce TE, Luscombe NM, Rinn JL, Nelson FK, Miller P, Gerstein M, Weissman S and Snyder M. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 12247-12252 (2003).
13. Schmid RM, Adler G and Liptay S. Gut 43, 587-588 (1998).
14. Lu T and Stark GR. Cell Cycle 3, 1114-1117 (2004).
15. Gilmore TD. Oncogene 25, 6680-6684 (2006).
16. Scheidereit C. Oncogene 25, 6685-6705 (2006).
17. Claudio E, Segade F, Wrobel K, Ramos S, Bravo R and Lazo PS. Exp Cell Res 224, 63-71 (1996).
18. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM and Galmiche JP. Gut 47, 397-403 (2000).
19. Wu GD, Huang N, Wen X, Keilbaugh SA and Yang H. J Leukocyte Biol 66, 1049-1056 (1999).

239 Lidský nádorový supresor p53 zastavuje růst a indukuje diferenciaci ptačích monoblastů.

Navrátilová J.[1], Horváth V.[1,2], Kozubík A.[1,2], Šmarda J.[1]
1) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
2) Biofyzikální ústav AV ČR, Brno

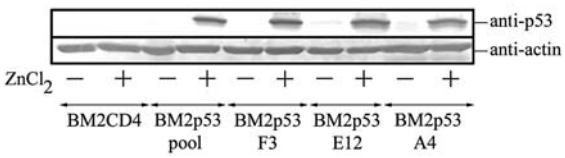
Úvod

Nádorový supresor p53 dokáže ovlivit osud potenciálně maligních buněk tím, že buď navodí jejich smrt apoptózou, aktivuje jejich diferenciační potenciál nebo zastaví jejich proliferaci [1]. Během tvorby nádoru proto často dochází k ztrátě nebo mutaci p53. I když k inaktivaci p53 dochází u hematopoietických malignancí méně často než u solidních nádorů [2], cílená exprese p53 stimuluje diferenciaci řady leukemických buněk – např. L12-pre-B buněk, erytroleukemických buněk K562, promyelocytiků HL-60, monoblastů U937 i myeloblastů M1/2 [3-8]. V této práci jsme navodili ektopickou expresi cDNA kódující lidský protein p53 v ptačích monoblastech transformovaných onkogenem v-*myb* (BM2) a vyhodnotili jeho účinek na proliferaci, diferenciaci a programovanou buněčnou smrt.

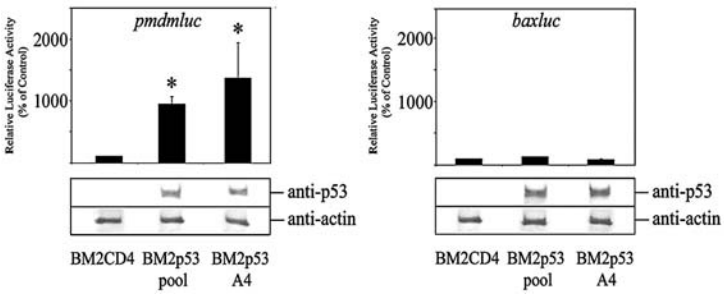
Výsledky

Inducibilní exprese cDNA kódující lidský p53 v ptačích buňkách

Kuřecí monoblasty transformované onkogenem v-*myb* (BM2) jsme transfekovali plazmidem pMT-p53-CD4. Tento plazmid obsahuje cDNA lidského genu p53 začleněnou pod kontrolou metalothioneinového promotoru. V transfekovaných buňkách lze proto navodit expresi p53 přidáním těžkých kovů, např. $ZnCl_2$. Izolovali jsme 16 nezávislých klonů buněk BM2p53, které cizorodou cDNA stabilně začlenily do svého genomu. Inducibilní expresi p53 jsme v těchto buňkách stimulovaných ionty zinku ověřili SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou následovanou westernovým přenosem (obr. 1). Jako negativní kontrolu jsme použili derivát buněk BM2, které byly stabilně transfekovány vektorem pMT-IRES-CD4 postrádajícím sekvenci p53 (BM2CD4) [9].



Obr. 1:
Analýza exprese p53 v buňkách BM2p53 SDS-polyakrylamidovou gelovou elektroforézou a westernovým přenosem



Obr. 2: Lidský p53 transaktivuje expresi reportérského genu z promotoru genu *mdm-2*, ale ne genu *bax* v buňkách BM2p53. Buňky byly přechodně transfekovány luciferázovými reportérskými plazmidy elektroporací. Relativní luciferázová aktivita nalezená v buněčných extraktech byla normalizována podle účinnosti transfekce. Hladina proteinu p53 v transekovaných buňkách byla kontrolována SDS-polyakrylamidovou elektroforézou a westernovým přenosem.

Lidský protein p53 aktivuje transkripci z promotoru genu *mdm*-2 v ptačích buňkách

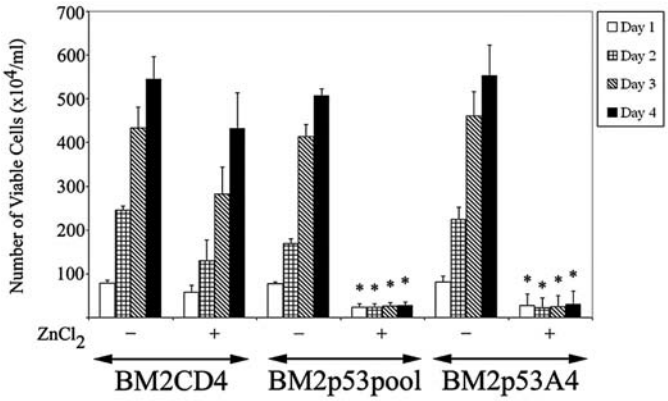
Abychom ověřili, že lidský p53 funguje v ptačích buňkách, otestovali jsme jeho transkripčně aktivační schopnost v přechodně transfekovaných buňkách BM2p53 s využitím reportérských systémů *pmdmluc* a *baxluc* [10,11]. Míra aktivity luciferázy v extraktech buněk BM2p53 transfekovaných plazmidem *pmdmluc* byla významně vyšší než v extraktech kontrolních buněk BM2CD4 a buněk BM2p53 transfekovaných plazmidem *baxluc* (obr. 2). Tyto výsledky naznačují, že lidský p53 transaktivuje expresi genu *mdm*-2, ale ne *bax* v ptačích buňkách BM2p53.

Lidský p53 zastavuje růst ptačích buněk ve fázi G2 buněčného cyklu

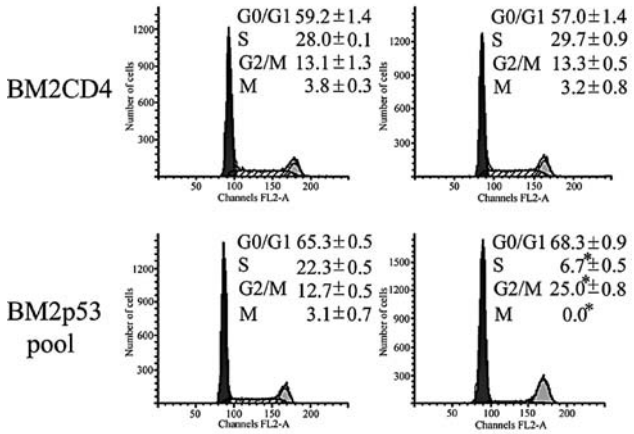
Průběh růstových křivek zřetelně ukázal, že proliferace buněk BM2p53 je zpomalena ve srovnání s buňkami BM2CD4 (obr. 3). Tento protirůstový účinek p53 jsme ověřili analýzou buněčného cyklu. Buňky BM2CD4 a BM2p53 jsme vystavili 48-hodinovému působení iontů zinku. Následně byly buňky fixovány, obarveny propidium jodidem a stanoven obsah jejich DNA průtokovou cytometrií. Frekvence buněk v S-fázi se snížila z 22.3% u neovlivněných buněk BM2p53 a 29.7% u buněk BM2CD4 ovlivněných $ZnCl_2$ na 6.7% u zinkem ovlivněných buněk BM2p53 cells. Deficit buněk BM2p53 v S-fázi byl kompenzován nárůstem počtu buněk ve fázi G2/M (obr. 4). Analýzou frekvence mitóz v jednotlivých vzorcích jsme neprokázali vliv p53 na M-fázi. Z těchto výsledků vyvozujeme, že lidský p53 zastavuje růst buněk BM2p53 ve fázi G2 buněčného cyklu.

Lidský protein p53 neovlivňuje programovanou buněčnou smrt ptačích buněk BM2p53

Abychom zjistili, zda exogenní p53 dokáže vyvolat apoptózu buněk BM2p53, vystavili jsme je působení iontů zinku po dobu 6 hodin. Následně jsme měřili míru přítomnosti fosfatidylserinu (PS) na buněčném povrchu průtokovou cytometrií s využitím anexinu V. Frekvence anexin-pozitivních buněk BM2p53 ovlivněných zinkem byla stejná jako frekvence anexin-pozitivních buněk BM2CD4 cells ovlivněných zinkem (1.3%) a žádnou významnou odlišnost jsme nezaznamenali rovněž u kontrolních buněk BM2CD4 (2.3%) a BM2p53 (0.9%) kultivovaných za nepřítomnosti zinku. Pouze u pozitivní kontroly, tj. buněk BM2CD4 ovlivněných induktorem apoptózy se frekvence anexin-pozitivních buněk významně zvýšila (10.6%). Ani dalšími testy se nám v nich nepodařilo prokázat znaky apoptózy, jako tvorbu apoptotických tělísek nebo fragmentaci DNA v buňkách BM2p53. Tyto výsledky ukazují, že exprese p53 nepostačuje pro iniciaci apoptózy buněk BM2p53, což koreluje s nedostatečnou schopností lidského p53 aktivovat transkripci z promotoru pro-apoptotického genu *bax* v buňkách BM2p53 (obr. 2).



Obr. 3: p53 zastavuje proliferaci buněk BM2. Buňky byly kultivovány za přítomnosti (+) nebo nepřítomnosti $ZnCl_2$ (-) 4 dny. Počet živých buněk byl stanoven denně pomocí hemocytometru a barvení eosinem.



Obr. 4: p53 zastavuje proliferaci buněk BM2 ve fázi G2 buněčného cyklu. Po dvoudenní kultivaci byly buňky fixovány, obarveny propidium jodidem a analyzovány průtokovou cytometrií. Frekvence buněk v M fázi byla vyhodnocena mikroskopickou analýzou alespoň 400 cytocentrifugovaných a obarvených buněk.

Lidský p53 indukuje diferenciaci ptačích monoblastů BM2

Vliv lidského p53 na řízení diferenciace monoblastů BM2 jsme zloumali několika přístupy: analýzou morfologie buněk světelnou mikroskopií, měřením aktivity nespecifických esteráz a myeloperoxidáz, sledováním fagocytické aktivity, stanovením relativní exprese diferenciačního markeru CD11b a měřením nitrobuněčného pH. Všechny tyto parametry prokázaly, že exogenní p53 indukuje monocytickou diferenciaci ptačích monoblastů.

Závěr

Nádorový supresor p53 dokáže ovlivňovat buněčný cyklus, programovanou buněčnou smrt a diferenciační stav mnoha bhuněčných typů. Ektopická exprese p53 úspěšně obnovila schopnost buněk zpomalit buněčný cyklus, diferencovat se nebo odumřít apoptózou u mnoha leukemických buněčných linií. V této práci jsme exprimovali lidský protein p53 v kuřecích monoblastech transformovaných onkogenem v-*myb*. Zjistili jsme, že i tento protein, jehož sekvence aminokyselin je pouze z 53% homologní se svým ptačím protějškem, může podstatně změnit morfologii a fyziologii těchto buněk. Lidský p53 zastavil proliferaci ptačích monoblastů ve fázi G2 buněčného cyklu a indukoval jejich monocytickou diferenciaci. Naše výsledky proto dokazují, že mezidruhové rozdíly ve struktuře molekul p53, promotorů/enhancerů a kofaktorů v ptačích a lidských buňkách jsou kompatibilní s funkcemi p53, které řídí buněčný cyklus a diferenciační procesy. Nádorový supresor p53 úspěšně zajistil tyto své funkce i za přítomnosti aktivního onkoproteinu v-Myb. Další z funkcí p53, tj. schopnost navodit apoptózu, jsme však v monoblastech BM2 neprokázali. Z toho vyplývá, že signální dráhy řízené p53, které ovlivňují programovanou buněčnou smrt a procesy diferenciace/proliferace jsou vzájemně nezávislé.

Tato práce byla podporována grantem 301/06/0036 GAČR a výzkumným záměrem MSM 0021622415 MŠMT.

Citace

1. Levine, A.J. (1997) Cell 88: 323-331.
2. Shiohara. M. et al (1994) Blood 84: 3781-3784.

3. Banerjee, D. et al. (1995) Cell Growth Differ 6: 1405-1413.
4. Chylicky, K., et al. (2000) Cell Growth Differ 11: 561-571.
5. Feinstein, E. et al. (1992) Oncogene 7: 1853-1857.
6. Johnson, P. et al. (1993) Mol Cell Biol 13: 1456-1463.
7. Matas, D. et al. (2004) Cell Growth Differ 11: 458-467.
8. Shaulsky, G. et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88: 8982-8986.
9. Smarda, J. et al. (1993) Gene 137: 145-149.
10. Friedlander, P. et al. (1996) Mol Cell Biol 16: 4961-4971.
11. Zauberman, A. et al (1993) EMBO J 12: 2799-2808.

240 Úloha MAPK v regulaci exprese Mcl-1 a indukované monocytární diferenciace u lidských leukemických buněk HL-60.

Stixová L.[1,2], Procházková J.[2,1], Souček K.[2,1], Hofmanová J.[2,1], Kozubík A.[2,1]
1) Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, (Lenka@ibp.cz)
2) Laboratoř cytokinetiky, Biofyzikální ústav AVČR, Brno

Mitogeny aktivované proteinkinázy (MAPK) představují uspořádaný systém signálních drah, které zprostředkovávají buněčnou odpověď na široké spektrum podnětů. MAPK se podílejí na regulaci mnoha důležitých biologických procesů, jako jsou regulace buněčného růstu, diferenciace, apoptózy či zánětlivé odpovědi a jejich modulace může přispět k inhibici karcinogeneze.

Experimentálním modelem použitým v této práci byly lidské leukemické buňky HL-60, které mají charakter promyelocytů. aMonocytární diferenciace byla indukována 1,25-dihydroxyvitaminem D3 (VD3) a metabolismus kyseliny arachidonové byl modulován prostřednictvím specifických inhibitorů 5-lipoxygenázy (5-LPO) MK-886 a AA-861.

Hlavním cílem práce bylo zjistit, jakou úlohu představují MAPK v procesu monocytární diferenciace indukované VD3 a posílené inhibicí 5-LPO.

Účinky VD3 na monocytární diferenciaci lidských leukemických buněk HL-60 mohou být posíleny působením inhibitorů 5-LPO (MK-886, AA-861). Stupeň diferenciace odpovídá zvýšené expresi antiapoptotického proteinu Mcl-1. Je známo, že při monocytární diferenciaci indukované VD3 dochází k aktivaci JNK a p44/p42 MAPK drah a k inhibici p38 MAPK dráhy. Zajímalo nás tedy, jak mohou inhibitory 5-LPO dále modulovat účast MAPK drah v procesu indukované monocytární diferenciace. Zapojení jednotlivých MAPK signálních drah bylo studováno nepřímo za použití specifických inhibitorů: p38 – SB202180, JNK – SP600125 a p44/p42 – U0126. Zjistili jsme, že nejen na účincích VD3 ale i inhibitorů MK-886 a AA-861 na monocytární diferenciaci se podílí upregulace JNK a p44/p42 a inhibice p38 MAPK, což se projevilo změnami v expresi antiapototického proteinu Mcl-1 i expresi monocytárních povrchových antigenů CD14 a CD11b.

Výsledky tedy ukazují, že posílení diferenciace indukované vlivem kombinace VD3 s inhibitorem 5-LPO je důsledkem spolupůsobení všech tří sledovaných MAPK drah.

241 Poruchy v intracelulární transdukci interferonových signálů u stabilizovaných linií maligního melanomu a karcinomu mléčné žlázy.

Součková K., Boudný V., Adámková L., Lauerová L., Hošková A., Poláková H., Sekaninová R., Kovařík J.
Laboratoř buněčných regulací, Masarykův onkologický ústav, Brno; e-mail: ksouckova@mou.cz

Úvod do problematiky

Abnormality na různých úrovních intracelulární signalizace mohou být u onkologických pacientů jednou z příčin jejich patologického imunitního stavu a snížené citlivosti na imunoterapeutickou léčbu. Významný podíl na normálním průběhu buněčné proliferace a diferenciace je v dnešní době připisován aktivitě proteinů multigenové rodiny STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription). Tyto proteiny zprostředkovávají přenos signálu vyvolaného celou řadou extracelulárních ligandů (interferony, růstové faktory) z buněčného povrchu do jádra, kde po interakci s příslušnými promotorovými sekvencemi modulují expresi responzivních genů. Proteiny STAT se nachází v cytoplazmě v inaktivním stavu jako monomery. Po fosforylaci jejich konzervovaného tyrozinového zbytku prostřednictvím Janusových tyrozinkináz (sdružených s povrchovými receptory) tvoří aktivní homo- nebo heterodimerní formy interakcí SH2 domény jednoho STAT proteinu s fosfotyrozinem svého partnera. Pro úspěšný přenos signálu a následnou aktivaci genů prostřednictvím STATů je v některých případech nezbytná nejen fosforylace na příslušných tyrozinových, ale i na konzervovaných serinových zbytcích.

Funkce proteinu STAT1, který je významným mediátorem interferonových signálů, zahrnuje antiproliferační a proapoptotickou aktivitu. Jeho potenciální úloha v procesech do různé míry souvisejících s maligní transformací byla podpořena řadou prací, které referují o nesprávné funkci STAT1 nebo pozměněné míře exprese tohoto proteinu u malignit různého histopatologického původu, jako je maligní melanom, karcinom mléčné žlázy, nádory hlavy a krku, lymfom a leukémie.

Cíl studie

Prezentované sdělení je zaměřeno na detekci a srovnání funkčních změn proteinu STAT1 v souvislosti s jeho aktivací interferony (IFN-α a IFN-γ) u lidských stabilizovaných buněčných linií maligního melanomu, karcinomu mléčné žlázy a normálních nemaligních buněk.

Materiál a metody

Buněčný model: sbírka 18 dobře definovaných stabilizovaných buněčných linií maligního melanomu, sbírka 10 stabilizovaných buněčných linií karcinomu mléčné žlázy, 2 primokultury normálních epiteliálních buněk mléčné žlázy a primokultura kožních melanocytů.

Kultivační podmínky, inkubace buněk s interferony: buněčné linie kultivované v médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) do 80%-ní konfluence byly inkubovány s lidským rekombinantním IFN-α (5000 U/ml) respektive IFN-γ (10 ng/ml) po dobu 30 min při kultivační teplotě 37°C.

Imunoprecipitace a Western blot analýza: analyzovali jsme expresní profil a úroveň fosforylace proteinu STAT1 na konzervovaném tyrozinovém (Y701) a serinovém (S727) zbytku, neboť je známo, že transkripční aktivita STAT1 je dána stupněm fosforylace obou jmenovaných aminokyselin. Protein STAT1 byl imunoprecipitován z celobuněčných lyzátů protilátkou S1C, následně podroben elektroforéze na 10% SDS-PAGE a přenosu na nitrocelulózovou membránu. Jako primární byly použity následující protilátky: polyklonální antisérum proti C-terminální doméně STAT1 (S1C), monoklonální anti-pS727 STAT1 (obě protilátky vyvinuty v naší laboratoři), polyklonální anti-pY701 STAT1. Dále byly membrány inkubovány se sekundárními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou. K vizualizaci signálu byl použit ECL detekční systém.

Výsledky a diskuse

Western blot analýza exprese celkové hladiny proteinu STAT1 u stabilizovaných linií maligního melanomu a karcinomu mléčné žlázy ukázala, že krátkodobá inkubace buněk s IFN-α i IFN-γ nevedla ke kvantitativním změnám tohoto proteinu.

U skupiny stabilizovaných linií karcinomu mléčné žlázy jsme v kontrolních buňkách detekovali velmi nízkou nebo nulovou bazální hladinu proteinu STAT1 fosforylovaného na Y701 a relativně vysokou hladinu jeho pS727 formy. Většina stabilizovaných linií maligního melanomu obsahovala měřitelnou bazální hladinu pY701 a pS727 STAT1.

Po použití obou interferonů došlo u mamárních linií k indukci fosforylace na tyrozinu, zatímco fosforylace serinového zbytku zůstala konstantní i po přídavku interferonu. Většina linií (8/10) odpovídala silně na přídavek IFN-γ a slabě na IFN-α, dvě linie reagovaly na inkubaci s oběma interferony stejnou intenzitou fosforylace Y701. Zvýšení fosforylace na Y701 bylo pozorováno u 14/18 (IFN-α), resp. u 16/18 (IFN-γ) melanomových linií. Narozdíl od mamárních buněk došlo u melanomu v několika případech také k indukci fosforylace na S727 (2/18 linií po indukci IFN- a 8/18 po IFN-). U jedné melanomové linie jsme nezaznamenali zvýšení fosforylace ani na jednom aminokyselinovém zbytku. Pro oba maligní modely platilo, že IFN-γ je silnějším aktivátorem proteinu STAT1 než IFN-α.

U dvou primokultur normálního epitelu mléčné žlázy jsme zachytili obdobné fosforylační změny jako u maligních buněk. Je zajímavé, že normální melanocyty reagovaly zvýšením fosforylace obou konzervovaných aminokyselinových zbytků po přídavku IFN-, zatímco po inkubaci s IFN- došlo ke zvýšení úrovně fosforylace pouze na tyrozinu.

Analýza fosforylačních změn proteinu STAT1 u melanomových, nikoli však u mamárních buněk, odhalila určité rozdíly v odpovědi na interferonové signály mezi normálními a maligními buňkami i mezi stabilizovanými nádorovými liniemi navzájem. U maligních buněk se může jednat o patologické změny související s poruchami ve STAT1 dependentní signální dráze, takže vyšetření fosforylačního stavu STAT1 by mohlo posloužit jako jedno z diagnostických kritérií nebo jako pomocný nástroj na selekci pacientů vhodných k imunoterapii.

Práce byla podporována projekty IGA MZ ČR NR/8341-3/2005, GA ČR 301/06/0912, KJB502070601 AV ČR a MZO 00209805.

Literatura

1. Boudny V, Kocak I, Lauerova L, Kovarik J (2003) Interferon inducibility of STAT 1 activation and its prognostic significance in melanoma patients. Fol Biol (Praha) 49: 142-46
2. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000) STATs in oncogenesis. Oncogene 19: 2474-88
3. Buettner R, Mora LB, Jove R (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. Clin Cancer Res 8: 945-54
4. Calo V, Migliavacca M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A (2003) STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. J Cell Physiol 197: 157-68
5. Decker T, Kovarik P (2000) Serine phosphorylation of STATs. Oncogene 19: 2628-37
6. Janjua S, Stephanou A, Latchman DS (2002) The C-terminal activation domain of the STAT-1 transcription factor is necessary and sufficient for stress-induced apoptosis. Cell Death Differ 9: 1140-6

7. Ramana CV, Chatterjee-Kishore M, Nguyen H, Stark GR (2000) Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. Oncogene 19: 2619-27
8. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA (2004) The JAK/STAT signaling pathway. J Cell Sci 117: 1281-3
9. Weihua X, Hu J, Roy SK, Mannino SB, Kalvakolanu DV (2000) Interleukin-6 modulates interferon-regulated gene expression by inducing the ISGF3 gamma gene using CCAAT/enhancer binding protein-beta(C/EBP-beta). Biochim Biophys Acta 1492: 163-71

242 Sledování exprese STAT 1 a STAT 3 u kožních maligních melanomů.

Brychtová S.[1], Fiurášková M.[1], Hlobilková A.[1], Tichý M. jr.[2], Beneš P.[3], Zapletalová J.[4]
1) Laboratoř molekulární patologie, Ústav patologie LF UP a FN Olomouc,
2) Klinika chorob kožních a pohlavních LF UP a FN Olomouc,
3) Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc,
4) Ústav lékařské biofyziky LF UP Olomouc

Úvod

Signální transduktory a aktivátory transkripce rodiny STAT jsou aktivovány fosforylací tyrosinu. Za normálního stavu mají poměrně krátkou životnost. U nádorů dochází ke konstitutivní aktivaci zejména STAT 3, což přímo přispívá ke stimulaci buněčné proliferace a inhibici apoptózy. STAT aktivují geny kódující inhibitory apoptózy jako jsou BCL-X_L, cykliny D1/D2 a c-Myc. U některých transfekovaných buněčných linií maligních melanonů (MM), které byly STAT negativní, bylo popsáno zvýšení apoptózy nebo zástava buněčného cyklu ve fázi G1. Prokázalo se rovněž, že defektní exprese komponent nebo aktivace dráhy JAK/STAT 1 koreluje s rezistencí na adjuvantní terapii interferonem.

Cíl práce

Cílem naší studie bylo sledovat expresi proteinů STAT 1 a STAT 3 v bioptických vzorcích kožních maligních melanomů různého stádia dle TNM klasifikace a srovnat ji s expresí v benigních pigmentových névech.

Materiál a metody

Vyšetřili jsme celkem 76 případů primárních kožních lézí, 9 uzlinových metastáz a 35 névů. Fosforylovaná, funkčně aktivní forma proteinů byla detekována na parafínových řezech šíře 5-8 μm pomocí nepřímé imunohistochemie specifickými myšími protilátkami anti STAT 1 (klon PSM1, ředění 1:3, fy Abcam) a STAT 3 (klon 6E4, ředění 1:30, fy Cell Signaling Technology). Hodnocení jsme prováděli semikvantitativně pomocí stanovení histoskóre (H-skóre), které získáme násobkem % pozitivních buněk a intenzity zbarvení. Výsledky byly statisticky analyzovány chí-kvadrát testem ($p<0,05$).

Výsledky

Pozitivitu STAT 1 jsme nacházeli v různé intenzitě v cytoplasmě melanoblastů. I když 47% případů primárních MM bylo zcela negativních, hladiny proteinu byly ve srovnání s pigmentovými névy vyšší ($p=0,025$). Zřetelný nárůst exprese STAT 1 byl zaznamenán zvláště u metastatických lézí ($p=0,0006$). Rozdíly mezi časnými a pokročilými stádii významné nebyly. STAT 3 často vykazoval kolokalizaci v jádře i cytoplasmě, přičemž u MM lehce převyšovalo jaderné zbarvení. MM vykazovaly také zvýšení exprese proteinu ve srovnání s névy ($p=0,0001$). Metastázy exprimovaly STAT 3 více než primární tumory ($p=0,037$). Ve studii nebyla prokázána korelace mezi expresí STAT a pozitivitou sentinelových uzlin, stejně jako mezi expresí STAT a klinickým stavem pacientů.

Závěr

Zjistili jsme významné zvýšení exprese zejména STAT 3 u maligních lézí, což je v souladu s předpokladem, že se podílí na stimulaci růstu nádorových buněk.

Práce byla podpořena granty IGA MZ ČR 1A/8245-3 a MSM 6198959216.

243 Hladiny proteinů STAT 1 a SOCS 3 po indukci interferony v buňkách maligního melanomu.

Adámková L., Boudný V., Součková K., Lauerová L., Sekaninová R., Hošková A., Poláková H., Kovařík J.
Laboratoř buněčných regulací, Masarykův onkologický ústav, Brno

Signální dráha JAK/STAT (Janusovy tyrozinproteinkinázy/ přenašeče signálu a aktivátory transkripce – signal transducers and activators of transcription) je jednou z klíčových signálních kaskád, které zprostředkovávají přenos signálů indukovaných extracelulárními ligandy (např. cytokiny a růstové faktory) z buněčného povrchu do jádra. Odpovědí na externí stimulaci je modulace na ligandech závislých genetických programů, které hrají důležitou roli v základních fyziologických procesech jako jsou například diferenciace, proliferace, apoptóza a angiogeneze. Analýza signální dráhy JAK/STAT provedená u širokého spektra primárních nádorů a stabilizovaných buněčných linií odvozených z těchto nádorů naznačuje, že tato dráha může být u maligních buněk často narušena a to na mnoha úrovních. Také již bylo zjištěno, že abnormální signalizace zprostředkovaná JAK/STAT dráhou může ovlivnit vnímavost nádorové buňky na imunoterapeutickou léčbu. Velká pozornost je rovněž věnována negativním regulátorům signální dráhy JAK/STAT. Asi největší a nejdůležitější skupinou inhibitorů jsou supresory cytokinové signalizace (Suppressors of cytokine signalig, SOCS), dalšími negativními regulátory jsou fosfatázy (Protein Tyrosine Phosphatases, PTP) a proteinové inhibitory aktivovaných STATů (Protein Inhibitors of Activated STATs, PIAS).

Intenzivní výzkum na poli signalizace zprostředkované proteiny STAT/SOCS vede stále častěji k závěru, že nesprávná funkce těchto proteinů může mít dramatický dopad na základní procesy probíhající v buňce. Přibývají rovněž důkazy, že patologický přenos signálu nebo pozměněná míra exprese genů STAT/SOCS hraje významnou roli v biologii maligní buňky a v její vnímavosti na imunoterapii. Zvýšení či snížení konstitutivní exprese proteinů STAT, jejich aberantní aktivace (poruchy ve fosforylaci), změny ve struktuře (mutace), ale i alterace ve STAT/SOCS interakcích jsou příčinou patologie těchto signálních procesů v nádorové buňce. Kontinuální signalizace u nádorových buněk může být také způsobena zvýšenou degradací SOCS proteinů nebo umlčením SOCS genů pomocí metylace.

Námi prezentovaná studie byla zaměřena na analýzu funkčních a expresních změn STAT/SOCS proteinů v souvislosti s aktivací této signální kaskády pomocí interferonů u buněk lidského maligního melanomu. Dosud je k dispozici jen málo studií, které podávají informaci o roli signalizace STAT/SOCS v souvislosti s exogenní interferonovou (IFN) léčbou. Některé výsledky však naznačují, že například abnormální hladina proteinu STAT 1 nebo jeho aberantní aktivace pozitivně koreluje se sníženou odpovídavostí nádorových buněk na inhibiční účinek IFN-α.

Ke srovnání indukce SOCS 3 interferony alfa a gama na úrovni proteinu jsme využili 7 primárních buněčných kultur odvozených z metastatických lymfatických uzlin pacientů nemocných melanomem a 2 lidské nenádorové kultury (kožní melanocyty). Exprese proteinu SOCS 3 byla stanovena přímým imunoblotem za použití komerční polyklonální protilátky proti SOCS 3. V primokulturách derivovaných z melanomových pacientů byl SOCS 3 indukován IFN gama u většího počtu vzorků (86%) než po IFN alfa (14%). Nemaligní melanocytové buňky vykazovaly prakticky obdobné výsledky jako jejich nádorové protějšky. Dále jsme použili sbírku 18 stabilizovaných maligních melanomových buněčných linií. SOCS 3 byl indukován IFN gama v 83% případů, indukce po IFN alfa byla zaznamenána na úrovni proteinu v 11%. Závěrem lze říci, že IFN gama indukuje SOCS 3 v mnohem větší míře než IFN alfa, a že jsme dosáhli obdobných výsledků jak na souboru 7 primokultur melanomových pacientů tak i na sbírce 18 stabilizovaných melanomových linií.

Exprese proteinu STAT 1 byla vyhodnocena pomocí nepřímého Western blotu s využitím imunoprecipitace a specifických protilátek proti STAT 1. Analýza celkové hladiny STAT 1 u stabilizovaných buněčných linií maligního melanomu i primokultur odvozených z pacientů nemocných melanomem ukázala, že krátkodobá inkubace buněk s oběma interferony nevede ke kvantitativním změnám tohoto proteinu. Nebyl tedy pozorován nijak výrazný rozdíl v intenzitě signálu STAT 1 mezi neovlivněnými a IFN ovlivněnými buňkami.

U všech 7 melanomových pacientů byla pozorována nulová konstitutivní hladina PY701 a vždy poměrně vysoká hladina PS727 STAT 1. U skupiny stabilizovaných melanomových linií jsme detekovali velmi nízkou nebo dokonce nulovou bazální hladinu odpovídající PY701 a relativně vysokou hladinu PS727 STAT 1.

Po použití IFN gama došlo u primokultur ustavených z melanomových pacientů k indukci PY701 STAT 1 u 86% případů, zatímco k fosforylaci S727 docházelo pouze u 29% pacientů. Tyto kultury rovněž odpovídaly silněji na přídavek IFN gama v porovnání s IFN alfa i v případě fosforylace S727. Zvýšení fosforylace na Y701 STAT 1 bylo pozorováno u 78% (IFN alfa), resp. u 89% (IFN gama) stabilizovaných melanomových linií. U jedné melanomové linie jsme nezaznamenali zvýšení fosforylace dokonce ani na jednom z aminokyselinových zbytků. Pro oba nádorové modely platilo, že IFN gama je rozhodně silnějším aktivátorem proteinu STAT 1 než IFN alfa. U dvou primokultur normálních nemaligních buněk (kožních melanocytů) jsme zjistili obdobné fosforylační změny jako u buněk nádorových. Je zajímavé, že kontrolní melanocyty reagovaly zvýšením fosforylace obou konzervovaných aminokyselinových zbytků STAT 1 po přídavku IFN alfa, zatímco po inkubaci s IFN gama došlo ke zvýšení úrovně fosforylace pouze na Y701.

Analýza fosforylačních změn proteinu STAT 1 u stabilizovaných melanomových linií, nikoliv však u metastatických primokultur ustavených z melanomových pacientů, odhalila určité rozdíly v odpovědi na interferonové signály mezi normálními a maligními buňkami i mezi stabilizovanými nádorovými liniemi navzájem. U nádorových buněk se může jednat o patologické změny

související s poruchami ve STAT 1 dependentní signální dráze, takže vyšetření fosforylačního stavu STAT 1 by mohlo posloužit jako jedno z diagnostických kritérií nebo jako pomocný nástroj na výběr pacientů vhodných k imunoterapii.

Literatura

1. Calo, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., Russo, A. (2003). STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. J Cell Physiol 197 (2), 157-168.
2. Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C.W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. Gene 285 (1-2), 1-24.
3. Kovarik, J., Boudny, V., Kocak, I., Lauerova, L., Fait, V. and Vagundova, M. (2003). Malignant melanoma associates with deficient IFN-induced STAT 1 phosphorylation. Int J Mol Med 12, 335-340.
4. Pansky, A., Hildebrand, P., Fasler-Kan, E., Baselgia, L., Ketterer, S., Beglinger, C. and Heim, M.H. (2000). Defective Jak-STAT signal transduction pathway in melanoma cells resistant to growth inhibition by interferon-alpha. Int J Cancer 85, 720-725.
5. Wong, L.H., Krauer, K.G., Hatzinisiriou, I., Estcourt, M.J., Hersey, P., Tam, N.D., Edmondson, S., Devenish, R.J. and Ralph, S.J. (1997). Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. J Biol Chem 272, 28779-28785.

Práce byla podporována projekty IGA MZ ČR NR/8341-3/2005, GA ČR 301/06/0912 a MZO 00209805.

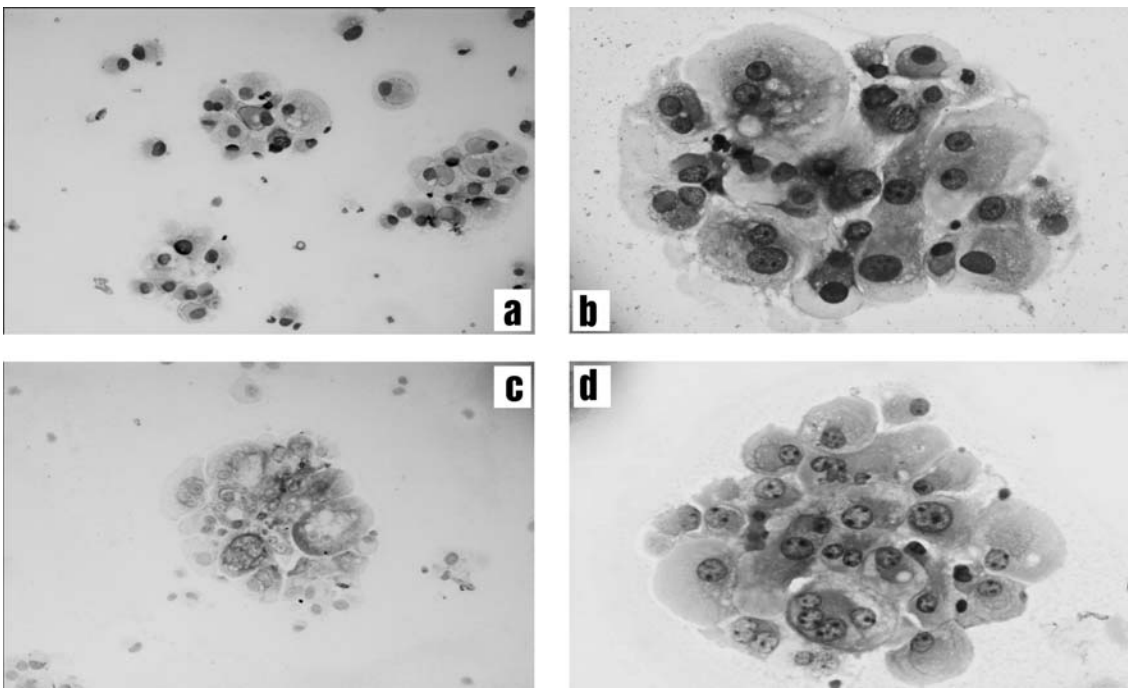
XXX. Experimentální onkoterapie

244 Využití buněk vybraných typů nádorů při vývoji protinádorových imunoterapeutických přípravků v autologních a alogenních podmínkách.

Hanák L.[1,2], Lauerová L.[2], Matějková E.[1], Smejkalová J.[1,2], Vidláková P.[1], Kyjovská D.[1], Stejskalová A.[1], Němečková I.[2], Hošková A.[2], Sekaninová R.[2], Nenutil R.[2], Křen L.[4], Kocák I.[2], Fait V.[2], Oltová A.[5], Žaloudík J.[2], Hájek R.[1], Michálek J.[1,3]
1) Centrum buněčné imunoterapie (CBI) LF MU Brno
2) Masarykův onkologický ústav (MOÚ) Brno
3) I. dětská interní klinika FN Brno
4) Ústav patologie FN Brno
5) Oddělení lékařské genetiky FN Brno

Kultivace buněk primárního karcinomu ledvin

Hlavním účelem projektu „Národní program výzkumu II“ je vývoj biotechnologie vedoucí k bezpečné alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk (SCT) tak, aby na jedné straně byla zcela potlačena nežádoucí a často smrtelná reakce štěpu proti hostiteli (GVHD) vyvolaná alogenními lymfocyty dárce, a na druhé straně, aby byl maximálně využit protinádorový potenciál (GVL/GVT; graft-versus-leukemia/tumor) alogenních lymfocytů. Jeden ze způsobů jak eliminovat GVH-reaktivní klony dárcovských T lymfocytů spočívá v jejich aktivaci nenádorovými buňkami příjemce v tzv. smíšené lymfocytární reakci a poté v jejich eliminaci specifickým imunotoxinem. Následně jsou ostatní lymfocyty aktivovány kultivovanými nádorovými buňkami (po jejich ozáření, aby byl zpřístupněn nádorový antigen) za účelem dosažení maximálního efektu GVL/GVH. Všechny kroky jsou prováděny v in vitro podmínkách. Kompletní remise po aplikaci infuze dárcovských lymfocytů byla pozorována především u chronické myeloidní leukémie, ale také u pacientů s dalšími nádorovými onemocněními, především u akutní myeloidní leukémie, mnohočetného myelomu a renálního karcinomu. Zatímco část projektu týkající se krevních malignit je již ve fázi povolené studie testování účinku na vybraných pacientech, s renálními karcinomy probíhá v současné době základní laboratorní výzkum.



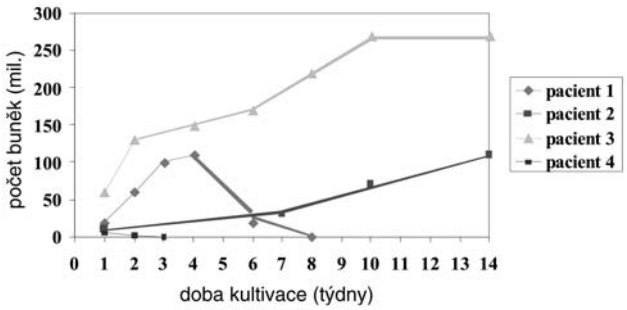
Obr. 1: Hodnocení zastoupení nádorových buněk (cytospin, pacient 3, zvětšeno 200x)
a) Pasáž 1 (hematoxilin **b)** Před aktivací lymfocytů (Giemsa)
c) Pasáž 1 (pancytokeratin) **d)** Před aktivací lymfocytů (PAP)

Pro stimulaci protinádorové aktivity T–lymfocytů je nutné zajistit prezentovatelný nádorový antigen, jehož zdrojem může být kultura příslušných nádorových buněk pacienta. Ty jsou získávány izolací z resekátu nádorové tkáně (ohledané patologem) získané od pacientů MOÚ Brno s primárním karcinomem ledvin, převážně po nefrektomii. Kultivace v laboratoři pak umožňuje jejich namnožení a selekci od nenádorových buněk za účelem vypěstování primokultury, jednak jako zdroje zmiňovaného nádorového antigenu a jednak pro její zamražení pro pozdější stimulaci lymfocytů mrtvými nádorovými buňkami. Vzhledem k tomu, že renální buňky patří k velmi obtížně kultivovatelným typům nádorů, bylo stěžejním úkolem na základě zkušeností nečetných

prací vybrat vhodné médium, jehož základ tvořilo DMEM suplementované 15% fetálním sérem, antibiotiky penicilinem a streptomycinem, inzulinem, pyruvátem, glutaminem stabilizovaným proti rozkladu a glukózou. Buňky uvolněné z nastříhaných kousíčků tkáně jsou kultivovány na Petriho miskách do 1. pasáže (1-4 týdny), poté je část pěstována v R. lahvích pro realizaci výše zmíněných testů v laboratořích CBI LF Brno. Zbývající část se dále kultivuje v laboratoři MOÚ Brno pro navýšení počtu buněk, které jsou při dostatečném počtu zamraženy na sucho (mrtvé buňky). Reprezentativní zastoupení vitálních nádorových buněk v kultuře je kontrolováno cytospinovým barvením patologem před 1. pasáží (MOÚ Brno) a před aktivací lymfocytů (FN Brno). Výsledky barvení vybraného pacienta ukazující na v podstatě výhradní zastoupení živých buněk tumoru jsou znázorněny na **Obr.1**.

V úvodní části projektu (září – prosinec 2006) byly zpracovány a pěstovány buňky pocházející z karcinomu ledvin 4 pacientů. Z **Obr. 2** je patrné, že u tří z nich se podařilo vypěstovat primokulturu a namnožit dostatečný počet buněk alespoň pro 1. fázi pokusů s živými buňkami, u dvou z nich (pacienti 2 a 3) pak i do další části s buňkami mrtvými. Pacienti 1 a 2 byli pasážováni 2x, pacient 3 3x. Z nastříhané tkáně posledního pacienta se uvolnilo jen velmi málo vitálních buněk, které by adherovaly na dně kultivačních misek a po 3 týdnech kultura odumřela.

Jak již bylo zmíněno, ze zkušeností ve světě vyplývá, že nádorové buňky ledvin nevykazují přílišnou schopnost žít a rozrůstat se, ať již byla pro kultivace použita různá média. Práce na toto téma jsou spíše kusé, obšírnější výsledky publikuje Ueda a spol., kde z 52 primárních karcinomů ledvin se polovinu podařilo udržet alespoň do 1. pasáže a 17% do šesté. Za těchto podmínek je možné dosavadní zde uváděné výsledky hodnotit jako úspěšné s tím, že projekt je teprve na začátku a zpracován je zatím jen malý soubor pacientů.



Přípravek	Počet buněk počátek kultivace	Počet buněk konec kultivace	Závěr
TIL-1	$15{,}8 \times 10^6$	$27{,}0 \times 10^9$	vyhověl
TIL-2	$2{,}9 \times 10^6$	$56{,}0 \times 10^9$	vyhověl
TIL-3	$15{,}8 \times 10^6$	$34{,}0 \times 10^9$	vyhověl
TIL-4	$2{,}2 \times 10^6$	$12{,}1 \times 10^6$	nevyhověl
TIL-5	120×10^6	45×10^9	vyhověl
TIL-6	120×10^6	28×10^9	vyhověl
TIL-7	50×10^6	22×10^9	vyhověl

Obr.2: Výsledky kultivace buněk renálního karcinomu

Využití buněk metastatického melanomu při vývoji protinádorových imunoterapeutických přípravků

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

V tomto projektu byly nádorové buňky využívány ke stimulaci cytotoxické aktivity lymfocytů jiným způsobem než vlastní separovanou kultivací. Nádorová tkáň pacientů MOÚ Brno byla v laboratoři po posouzení patologem na kousky nastříhána a v médiu X-VIVO 15 (zohledňující potřeby růstu lymfocytů) tentýž den posílána do LEHABI OKH FN Brno k 1-2 měsíční expanzi TIL pomocí vysokých dávek IL-2 (1000 IU/ml) a jednorázově phytohemaglutininem (10g/ml) in vitro za přítomnosti tzv. „feeder cells“, což jsou ozářené alogenní mononukleáry jiného zdravého dárce. Jejich specifická cytotoxická aktivita je zajištěna přítomností nádorových buněk jak napřed přirozeně v nádorové tkáni tak posléze v kultuře.

Přípravek	Počet buněk počátek kultivace	Počet buněk konec kultivace	Závěr
TIL-1	$15{,}8 \times 10^6$	$27{,}0 \times 10^9$	vyhověl
TIL-2	$2{,}9 \times 10^6$	$56{,}0 \times 10^9$	vyhověl
TIL-3	$15{,}8 \times 10^6$	$34{,}0 \times 10^9$	vyhověl
TIL-4	$2{,}2 \times 10^6$	$12{,}1 \times 10^6$	nevyhověl
TIL-5	120×10^6	45×10^9	vyhověl
TIL-6	120×10^6	28×10^9	vyhověl
TIL-7	50×10^6	22×10^9	vyhověl

Tab. 1

Prospektivně byly validovány mononukleáry periferní krve 5 zdravých dárců (stimulovány in vitro buněčnou linií ARH 77 mnohočetného myelomu – jednalo se o průkaz expanze nádorově specifických T lymfocytů nádorovým antigenem s cílem simulovat expanzi TIL in vitro) a poté 7 pacientů s metastazujícím melanomem. V rámci schvalovacího procesu přípravku jako léčiva musela být vedle jeho jakosti provedena i validace bezpečnosti sestávající z endotoxinového testu a vyšetření sterility bez-

prostředně před hlubokým zmrazením přípravku TIL, dále vyšetření na přítomnost Mycoplasma sp., HBV, HCV, Parvoviru B19, HIV, mykobakterie. Pro sledování případných cytogenetických změn v průběhu kultivace bylo provedeno cytogenetické vyšetření periferní krve pacientů před začátkem kultivace a onkocytogenetické vyšetření expandovaných TIL.

V šesti případech ze 7 pacientů se jednalo o lymfatickou uzlinu, postiženou nádorovým procesem a v jednom případě se jednalo o primární ložisko kožního melanomu. V případě všech nádorových uzlin byla expanze TIL zahajována s počtem buněk splňující spodní limit $2x10^6$ a po 5-7 týdenní kultivaci podle postupů navržených v této studii došlo k nárůstu převyšujícímu minimální požadavek $5x10^9$ TIL buněk (**Tab. 1**). V případě kultivace TIL z primárního ložiska (TIL-4) nádoru došlo pouze k minimálnímu nárůstu z $2,2x10^6$ na $12,1x10^6$ TIL po 8-týdenní kultivaci. Z tohoto důvodu je rovněž v protokolu klinické studie navrhováno využívat pouze lymfatických uzlin postižených nádorovým procesem a nikoliv primárních ložisek nádoru, která jsou zpravidla fibrózní a neumožňují požadovanou expanzi TIL.

Kultivace TIL in vitro je možná za sterilních podmínek v CBI LF Brno, jež má schválené prostory pro výrobu léčiva bez vzniku kontaminace. Expanze TIL je reálná z lymfatických uzlin postižených metastázami maligního melanomu na hodnoty použitelné v klinické praxi.

Podporováno grantem MŠMT NPVII – 2B06058

Literatura

1. Ueda R., Shiku H., Pfreundschuh M. et al. Cell surface antigens of human renal cancer defined by autologous typing, J Exp Med. 1979,150: 564-679.
2. Childs R., Chernoff A., Contentin N. et al. Regression of metastatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. The New England Journal of Medicine 2000, 343 (11): 750-758.
3. Greenberg PD. Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells. Adv Immunol 1991, 49: 281-9.
4. Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. Nature 2001, 411: 380-6.
5. Dudley ME, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. Science 2002, 298: 850-4.
6. Michálek J., Svoboda M.: Buněčná imunoterapie nádorů. Klinická onkologie 2003, 16: 145-148.

245 První klinické zkušenosti s polymerními cytostatiky s imunoprotektivním a imunomodulačním efektem.

Kubáčková K.[1], Strohalm J.[2], Prausová J.[1], Jelínková M.[2,4], Rozprimová L.[4], Šírová M.[2], Mrkvan T.[2], Plocová D.[3], Etrych T.[3], Šubr V.[3], Ulbrich K.[3], Říhová B.[2]
1) Radioterapeuticko- onkologické odd. FN v Motole, Praha
2) Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha
3) Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha
4) AGILAB biochemická a imunologická laboratoř, Praha

Z experimentálních a časných klinických zkušeností je známo, že polymery vázající cytostatika, jako např. doxorubicin dosahují vyšší efektivity a nižší toxicity ve srovnání s volnými léčivy. Makromolekulární transportní systémy mají další výhody týkající se možnosti podání vyšších maximálně tolerovatelných dávek, schopnosti obejít MDR (multidrug resistence), vyšší rozpustnosti léčiva a dosažení vyšší koncentrace v nádorové tkáni, s indukcí nekrózy a apoptózy. Mimořádnou vlastností je jejich imunoprotekční a imunostimulační efekt.

Makromolekulární systém s účinnou látkou kovalentně vázanou na nosič může být směrovaný či nesměrovaný. Aktivní směrování znamená, že konjugát s léčivem obsahuje ligand pro receptor, který je exprimován na nádorové tkáni. Pasivní směrování je založeno na zvýšené propustnosti nádorových kapilár, které dovolí pronikání molekul s vysokou molekulární hmotností a v důsledku špatného lymfatického zásobení delší eliminační čas léčiva. Tento fenomén je v literatuře označován jako efekt zvýšené permeability a retence, t.zv. EPR effect (Enhaced Permeability and Retention effect). Nový poznatek o schopnosti indukce protinádorové imunity tohoto transportního systému je zvláště důležitý, jelikož imunitní systém u nemocných s nádorovým onemocněním bývá výrazně alterován v důsledku rychlého růstu nádoru či klasické onkologické léčby.

Na našem pracovišti jsem měli možnost aplikovat pěti nemocným s generalizovaným karcinomem prsu po vyčerpání onkologické terapie doxorubicin navázaný na *N*-(2-hydroxypropyl) methacryalmid (HPMA) směrovaný lidským i.v. imunoglobulinem (Intraglobin, Endobulin). Léčba směrovaným doxorubicinem byla dobře tolerovatelná, bez projevů kardiotoxicity, nejčastěji pozorovaným nežádoucím účinkem byla myelosuprese stupně 3 a 4.

Experimentální modely prokázaly, že během léčby polymerním cytostatikem dochází k navození aktivní imunitní odpovědi vůči nádorovému modelu. U našich nemocných jsme prokázali zvýšený počet $CD16^+56^+$ a $CD4^+$ v periferní krvi a aktivaci NK

a LAK buněk 72 hodin po podání směrovaného léčiva. Na *in vitro* modelech bylo prokázáno, že intravenosní aplikace Ig stimuluje syntézu IL-12, cytokinu zodpovědného za protinádorový efekt NK buněk a cytotoxických T lymfocytů a za indukci protinádorových protilátek. Předpokládá se, že aplikace směsného i.v.Ig od většího počtu dárců může vézt ke zvýšené imunostimulační a protilátkové odpovědi na rozdíl od Ig získaného od jediného dárce. Na této protinádorové odpovědi se mohou podílet jak přímá cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC), tak lýza nádorových buněk zprostředkovaná komplementem, zvýšení obranných mechanismů příjemce stimulací IL-12, zvýšení aktivity NK buněk a zvýšení molekulární hmotnosti konjugátů a využití efektu EPR.

Klinický průkaz těchto pozorování vyžaduje validní data, které by měla vzejít z dobře postavených klinických studií.

246 Inhibice aktivity receptorů rodiny c-erbB trastuzumabem a cetuximabem.

Überall I., Lukáš V., Bláha O., Bouchal J., Kolář Z.
Laboratoř molekulární patologie a Ústav patologie, LF UP v Olomouci, Olomouc

Úvod

Receptory rodiny c-erbB jsou proteiny s tyrozinkinázovou aktivitou lokalizované v buněčné membráně. Změny jejich exprese a funkce mají významnou úlohu v biologii nádorové buňky. Ovlivňování aktivity receptorů c-erbB může mít významný inhibiční efekt na nádorové buňky, například použitím monoklonálních protilátek vůči extracelulárním doménám c-erbB. Pochopení mechanizmů působení těchto inhibičních protilátek může přispět k jejich racionálnímu terapeutickému využití, a tím ovlivnit délku a kvalitu života pacientů s nádorovým onemocněními.

Metodika

V naší práci jsme aplikovali trastuzumab a cetuximab (popř. jejich kombinace) na prostatické a mammární buněčné linie lišící se expresním profilem receptorů c-erbB. Prostatická linie DU145 vykazuje zvýšenou expresi receptorů c-erbB1, zatímco mammární linie BT474 je charakteristická zvýšenou expresí c-erbB2. Obě buněčné linie byly kultivovány ve stripovaném DMEM médiu a byly aktivovány EGF (10 $ng.ml^{-1}$, 15 min). Monoklonální protilátky byly přidány v různých koncentracích a změny proliferačního potenciálu buněk po 72 hodinách stanoveny MTT testem. Ke zjištění změn exprese jednotlivých receptorů c-erbB po ovlivnění trastuzumabem (20 $\mu g.ml^{-1}$) nebo cetuximabem (20 $\mu g\text{-}ml^{-1}$), popř. jejich kombinací byla použita Western analýza.

Výsledky

Na základě zjištěných experimentálních dat vyplývá, že prostatická buněčná linie DU145 nevykazovala změnu proliferační aktivity po aplikaci terapeutik, zatímco linie BT474 reagovala na podání terapeutik snížením proliferace, přičemž nebyl zaznamenán dávkový efekt. Kombinace obou látek nevykazovaly vliv na proliferační aktivitu ani u jedné z testovaných linií. Na základě western blot analýzy za použití specifických protilátek nebyla zjištěna změna fosforylace c-erbB1. Bylo zjištěno snížení exprese c-erbB2 linie BT474, a to po aplikaci obou typů protilátek. U téže linie docházelo po aplikaci trastuzumabu ke snížení exprese receptoru c-erbB4.

Závěr

Z uvedených výsledků vyplývá, že stupeň exprese jednotlivých receptorů c-erbB je významným faktem ovlivňující účinnost terapeutik s cíleným účinkem. Byla vyslovena hypotéza, že účinek trastuzumabu není dán pouze přímou inhibicí receptoru c-erbB-2, ale i blokádou tvorby heterodimerů c-erbB-2/c-erbB4.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MSM 61989559216

247 4-Arylazo-3,5-diamino-1H pyrazolové CDK Inhibitory: analýza in vitro a in vivo protinádorové aktivity.

Džubák P.[1], Kryštof V.[2], Cankař P.[3], Fryšová I.[3], Slouka J.[3], Kontopidis G.[4], Vydra D.[1], Srovnal J.[1], Azevedo W. F.[5], Orság M.[2], Paprskářová M.[2], Rolčík J.[2], Látr A.[2], Fischer P.[4], Strnad M.[2], Hajdúch M.[1]
1) Laboratoř experimentální medicíny, Dětská klinika, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého
2) Laboratoř růstových regulátorů, Univerzita Palackého a Ústav Experimentální Botaniky AV ČR.
3) Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého
4) Structure Based Design Group, Cyclacel Pharmaceuticals, Inc., Dundee, UK.
5) Faculdade de Biociencias, Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Rutinním testováním sbírky malých molekul byly identifikovány 4-arylazo-3,5-diamino-1H-pyrazoly jako nová skupina ATP antagonistů s mírnou účinností vůči komplexu CDK2-cyklin E. Předběžná studie vztahu struktury a účinku, založená na porov-

nání aktivity 35 různých derivátů, navrhuje cestu, kterou bude farmakologická část molekuly dále optimalizována. Studie enzymatické kinetiky společně s rentgenovou krystalografií komplexu inhibitor-CDK2, ukázaly, že způsob inhibice je kompetetivní, což bylo podpořeno molekulárním modelováním i v případě komplexu ligand-CDK9. Funkční kinázové testy dále potvrdily selektivitu vůči CDK s překvapivou preferencí pro CDK9-cyklin T1. Nejúčinnější inhibitor – 4-[(3,5-diamino-1H-pyrazol-4-yl)diazenyl]phenol (kódové označení 31b), inhiboval CDK9/T1 již v submikromolárních koncentracích a dosahoval selektivity v poměrech 40-200 vůči dalším CDK. V in vitro analýze buněčného cyklu prováděné pomocí BrdU značení na buněčné nádorové linii HT-29 tento derivát snižoval pozitivitu značení u buněk nacházejících se v S-fázi cyklu. Další pozorovaný účinek zahrnuje sníženou fosforylaci Rb proteinu a C-terminální domény RNA polymerázy II, inhibici RNA syntézy, která byla hodnocena jak pomocí průtokové cytometrie, tak i pomocí RT-PCR a indukci exprese p53, přičemž tyto nálezy souvisí s inhibicí CDK9.

Vzhledem ke slibným výsledkům v testech in vitro byly následně provedeny testy in vivo na myším nádorovém modelu, přičemž testovaná sloučenina je výhodně per orálně dostupná. Díky dobré toleranci v testech toxicity bylo provedeno orientační testování in vivo protinádorového účinku v modelu využívajícím intraperitonálně transplantovanou nádorovou linii myšího lymfomu P388/D1. V tomto případu bylo pozorováno pouze nesignifikantní prodloužení přežití. Uvažujeme o rozšíření testování na dalších nádorových modelech. Závěr: Jedná se o perspektivní skupinu léčiv, otevírající možnost využití CDK9 jako terapeutického cíle u onkologických onemocnění.

Práce byla realizovaná díky finanční podpoře výzkumným záměrem MŠMT 6198959216, grantem LC07017 a GAČR 301/05/0418.

248 Efekt brassinosteroidů na buněčné línie odvozené od karcinomu mléčné žlázy a prostaty.

Malíková J.[1], Swaczynová J.[2], Kolář Z.[1], Strnad M.[2]
1) Laboratoř molekulární patologie, Ústav patologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
2) Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Ústav experimentální botaniky AVČR, Olomouc

Úvod

Brassinosteroidy (BRs) představují skupinu polyhydroxylových steroidních látek s povahou rostlinných hormonů, fytohormonů, které mohou nést vlastnosti regulátorů růstu a vývoje se stimulačními nebo inhibičními účinky (1). BRs byly zjištěny ve všech druzích rostlin (jednoděložných i dvouděložných), u kterých byl proveden podrobnější výzkum. Jsou hojně zastoupeny ve všech rostlinných orgánech včetně rostoucích vegetativních orgánů, ale také v pylu (2). V rostlinách jsou přítomny v extrémně nízkých koncentracích. Vnitrobuněčný obsah brassinosteroidů kolísá v závislosti na typu orgánu, stáří tkáně a druhu rostliny. BRs představují nové typy rostlinných regulátorů vyskytující se v přírodě se sedmičlenným laktonovým B kruhem. Základní strukturou jsou BRs podobné živočišným hormonům odvozených od cholesterolu (jako jsou androgeny, estrogeny a kortikoidy u obratlovců, ekdyson u hmyzu a korýšů). Současný výzkum BRs je zaměřen zejména na studium vzájemného vztahu mezi strukturou a aktivitou BRs, dále je studován vztah mezi BRs a dalšími rostlinnými hormony (3, 4, 5). O mechanismu brassinosteroidů je známo jen velmi málo, některé deriváty byly testovány in vitro na nádorových buněčných liniích a u některých se podařilo prokázat velmi výraznou cytotoxickou aktivitu.

Cíl práce

Cílem této studie bylo zjistit vliv přírodních brassinosteroidů na buněčný růst, indukci apoptózy a lokalizaci jaderných receptorů pro steroidní hormony u buněčných linií odvozených od karcinomu mléčné žlázy a prostaty a zjistit případné rozdíly mezi expresí klíčových proteinů u hormonálně citlivých a hormonálně necitlivých buněk, které by napomohly lépe pochopit mechanismy nádorové progrese a perspektivně vést k vývoji účinnější terapie.

Materiál a metody

Na základě MTT-testu byl u mammárních (MCF-7 a MDA-MB-468) a prostatických (LNCaP a DU-145) nádorových buněčných linií sledován účinek 28-homocastasteronu a 24-epibrassinolidu na buněčnou viabilitu a proliferaci po dobu 6, 12 a 24 h a byla určena koncentrace IC_{50}. Pomocí průtokové cytometrie byl pozorován vliv studovaných látek na buněčný cyklus a na základě Western blot analýzy byla sledována genová exprese proteinů uplatňujících se v regulaci buněčného cyklu a apoptózy. Výsledky byly dále doplněny detekcí bromodeoxyuridinu inkorporovaného do DNA buněk a detekcí apoptotických buněk pomocí metody TUNEL. Lokalizace receptorů pro steroidní hormony (ER, AR, PR) byla sledována pomocí imunofluorescenční detekce.

Výsledky

Zjistili jsme, že oba typy BRs inhibují buněčnou viabilitu vybraných buněčných linií. Na základě analýzy pomocí průtokové cytometrie byla zjištěna blokáda buněk v G1 fázi buněčného cyklu u buněk MCF-7, MDA-MB-468 a LNCaP. Tyto změny v distri-

buci buněčného cyklu byly provázeny poklesem BrdU pozitivních buněk, poklesem exprese cyklinu D_1, sníženou fosforylací pRb a zvýšenou expresí $p21^{Waf1/Cip1}$ a $p27^{Kip1}$.

Oba typy brassinosteroidů podporují apoptózu u buněčné linie LNCaP, u které byly apoptotické změny doprovázené poklesem exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-2, zvýšením exprese pro-apoptotického proteinu Bax, poklesem exprese celkového Bid nasvědčující jeho štěpení a zvýšeným počtem TUNEL pozitivních buněk. Dále byly detekovány aktivní fragmenty caspázy-3 po ovlivnění buněk LNCaP testovanými látkami, které vznikly štěpením neaktivní formy pro-caspázy-3. U ostatních buněčných linií nebyly zaznamenány signifikantní změny nasvědčující indukci apoptózy.

U buněčné linie MCF-7 citlivé na estrogeny byly pomocí imunofluorescenční detekce a Western blot analýzy zjištěny změny lokalizace androgenového receptoru (AR) a estrogenového receptoru (ER-α, -β) doprovázené poklesem exprese proteinu ER–α po 12 a 24 h působení testovaných látek. U buněčné linie LNCaP citlivé na androgeny byla prokázána snížená exprese AR v jádrech buněk ovlivněných brassinosteroidy a zároveň byl zaznamenán pokles hladiny AR po 12 h působení látek. Při sledování exprese ER-α a -β u buněk LNCaP byla zjištěna u kontrolních buněk cytoplazmatická exprese. Po ovlivnění buněk brassinosteroidy nebyla zjištěna žádna změna exprese ani jednoho typu estrogenových receptorů vzhledem ke kontrolním buňkám.

Závěr

Na základě této práce jsme charakterizovali účinek brassinosteroidů na buněčné linie odvozené od karcinomu mléčné žlázy a prostaty. Zjistili jsme, že tyto látky mají schopnost u všech linií inhibovat buněčnou proliferaci a vyvolat změny buněčného cyklu a hladin některých proteinů regulujících buněčný cyklus. U buněčné linie závislé na androgenech tyto látky indukovaly apoptózu pravděpodobně prostřednictvím mitochondriální cesty aktivace. U hormonálně závislých linií způsobovaly změny v lokalizaci a expresi některých jaderných receptorů pro steroidní hormony. Na základě našich výsledků lze efekt testovaných brassinosteroidů přirovnat k antagonistům receptorů pro steroidní hormony. Výsledky by mohly přispět k potenciálnímu terapeutickému užití studovaných látek.

Literatura

1. Szekeres M, Nemeth K, Koncz Kalman Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Redei GP, Nagy F, Schell J and Koncz C. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis, Cell 1996;85:171-82.
2. Kim SK, Chang SC, Lee EJ, Chung WS, Kim YS, Hwang S, Lee JS. Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize. Plant Physiol 2000;123:997-1004.
3. Brosa C, Zamora I, Terricabras E, Soca L, Peracaula R, Rodriguez-Santamarta C. Synthesis and molecular modeling: related approaches to progress in brassinosteroid research. Lipids 1997;32:1341-7.
4. Back TG, Baron DL, Luo W, Nakajima SK. A concise, improved procedure for the synthesis of brassinolide and some novel side chain analogues. J Org Chem 1997;62:1179-82.
5. Back TG, Janzen L, Nakajima SK, Pharis RP. Effect of chain length and ring size of alkyl and cycloalkyl side-chain substituens upon the biological activity of brassinosteroids. Preparation of novel analogues with activity exceeding that of brassinolide. J Org Chem 2000;65:3047-52.

Poděkování: *Práce byla podpořena grantem MSM 6198959216.*

249 Reovírus ako protinádorový liek?

Figová K.[1], Hraběta J.[1], Sobotková E.[2], Dušková M.[2], Vonka V.[2], Eckschlager T.[1]
1) Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol, Praha,
2) ÚHKT, Praha

Jednou z foriem génovej liečby nádorov sú onkolytické vírusy – vírusy, ktoré sa selektívne replikujú v nádorových bunkách a tým ich likvidujú. Za ostatných 20 rokov výskumu bolo identifikovaných viacero vírusov s onkolytickou aktivitou. Niektoré prirodzene sa vyskytujúce vírusy, napr. vírus vezikulárnej somatitídy, herpes simplex vírus, Newcastle desease virus a reovírus prednostne infikujú a usmrcujú transformované bunky (Norman and Lee, 2000; Stojdl et al., 2000; Sinkovics and Horvath, 2000; Farassati et al., 2001). Atenuovaný kmeň vírusu osýpiek Edmonston-B pôvodne pripravený pre použitie ako živá vírusová vakcína, má potenciálne onkolytické využitie (Grote et al., 2001). Špecifické génové modifikácie na adenovírusoch, influenza vírusoch a herpes vírusoch pomohli do týchto vírusov vniesť selektívnu onkolytickú aktivitu a znížiť alebo úplne eliminovať ich patogenitu (Martuza, 2000; Bergmann et al., 2001; Dobbelstein, 2004). Výsledky narastajúceho počtu štúdií s takto pripravenými vírusmi dokazujú, že môžu nielen efektívne a selektívne ničiť transformované bunkové línie, ale taktiež nesú protitumorové vlastnosti *in vivo*.

Reovírus serotypu 3, Dearing, bol prvýkrát izolovaný z intestinálneho traktu zdravých osôb. V nádorovej bunke pre svoju replikáciu využíva aktivovanú Ras signálnu dráhu (alebo jej časti). V nenádorových bunkách sa nereplikuje, a preto nevyvoláva žiad-

ne manifestné ochorenie. V skutočnosti sa väčšina ľudí dostane do kontaktu s reovírusom už do svojich piatich rokov s malými či žiadnymi prejavmi infekcie. Aktivácia Ras onkogénu vedie k inaktivácii bunkových antivírusových mechanizmov tak, že špecificky odstraňuje translačný blok pre vznik reovirálnych transkriptov.

Základný mechanizmus zabránenia iniciácie translácie ako odpoveď bunky na infekciu vírusom alebo environmentálny stres v hostiteľskej bunke zahŕňa fosforyláciu alfa podjednotky eukaryotického iniciačného faktora-2 (eIF-2) proteínkinázou PKR (na dvojvláknovej RNA závislá proteínkináza) (Wek, 1994; de Haro et al., 1996; Brostrom and Brostrom, 1998). PKR je prítomná v nízkej koncentrácii v každej bunke. Odpoveďou na IFN vylučovaný bunkami napadnutými vírusom je jej zvýšená expresia. Naviazanie virálnej dvojvláknovej RNA na PKR spôsobí jej dimerizáciu a následnú aktiváciu autofosforyláciou. Fosforylácia eIF-2 aktivovanou PKR znemožní vznik väzby GTP na eIF-2, čím sa zabráni začleneniu Met-t-RNA a vzniku 43S iniciačného komplexu. V bunkách s aktivovaným Ras onkogénom k zastaveniu replikácie nedochádza, pretože v týchto bunkách nenastane aktivácia PKR.

V našej štúdi sme i*n vitro* sledovali účinok reovírusu na myšaciu bunkovú líniu (TC-1) transformovanú ľudským papiloma vírusom typu 16 (HPV 16) a aktivovaným H-ras onkogénom – model vírusom indukovaného nádoru s aktiváciou onkogénom H-ras. Ako kontrolu sme použili normálne ľudské fibroblasty. Efekt vírusu na bunky sme hodnotili MTT testom a mikrokinematografiou. S touto bunkovou líniou transplantovanou syngenným myšiam sme robili i prvé testy *in vivo*.

In vitro sme preukázali vysokú účinnosť reovírusu na bunky TC-1, avšak nie na normálne ľudské fibroblasty.

Narastené nádory sme liečili reovírusom a porovnávali účinnosť rôznych protokolov podávania vírusu. Podanie reovírusu spomalilo rast nádoru, ale neviedlo k jeho úplnému vyliečeniu. Najúčinnejšia bola jednorázová aplikácia do nádoru, jednorázová i opakovaná intraperitoneálna aplikácia a opakované podanie do nádoru boli menej účinné.

Po štyroch týždňoch liečby, keď ešte nedošlo k úplnému odhojeniu liečených nádorov, sme tieto i kontrolné vyoperovali a previedli na tkanivovú kultúru. Novovytvorené bunkové línie sme podrobili rovnakým testom ako pôvodnú líniu TC-1 a všetky sme porovnali. Bunky z reovírusom liečeného nádoru boli v prvej pasáži odolnejšie k účinkom reovírusu, v ďalších pasážach však túto rezistenciu stratili.

Naše pokusy *in vitro* potvrdili selektivitu reovírusu. Pokusy *in vitro* a vyšetrenia buniek ovplyvnených *in vivo* reovírusom naznačujú, že terapeutický efekt reovírusu môže byť negatívne ovplyvnený protivírusovou imunitou (menší účinok opakovanej než jednorázovej aplikácie) i rezistenciou časti buniek k vírusovej infekcii.

V súčasnej dobe sa zaoberáme experimentami vedúcimi k objasneniu súčinnosti reovírusu s imunosupresívnou liečbou cyklofosfamidom.

Práca je podporovaná grantami GACR 301/05/2240 a dMSMT0021620813.

Literatura

1. Norman KL and Lee PW. (2000). J. Clin. Invest., 105, 1035-1038.
2. Sinkovics JG and Horvath JC. (2000). J. Clin. Virol., 16, 1-15.
3. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N and Bell JC. (2000). Nat. Med., 6, 821-825.
4. Farassati F, Yang AD and Lee PW. (2001). Nat. Cell Biol., 3, 745-750.
5. Martuza RL. (2000). J. Clin. Invest., 105, 841-846
6. Bergmann M, Romirer I, Sachet M, Fleischhacker R, Garcia-Sastre A, Palese P, Wolff K, Pehamberger H, Jakesz R and Muster T. (2001). Cancer Res., 61, 8188-8193.
7. Dobbelstein M. (2004). Curr. Top. Microbiol. Immunol., 273, 291-334.
8. Wek RC. (1994). Trends Biochem. Sci., 19, 491-496.
9. de Haro C, Mendez R and Santoyo J. (1996). FASEB J., 10, 1378-1387.
10. Brostrom CO and Brostrom MA. (1998). Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 58, 79-125.

XXXI.
Varia

250

Biosenzory v nádorové diagnostice.

Kizek R.[1,*], Adam V.[1,2], Křížková S.[1], Fabrik I.[1,3], Šobrová P.[1], Stejskal K.[1,3], Masařík M.[4], Stiborová M.[5]
1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
2) Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
3) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
4) Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno
5) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha
**) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz*

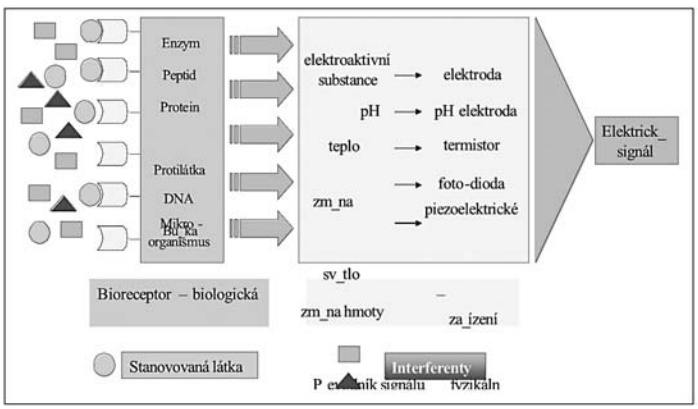
Klíčová slova:
Thiolové sloučeniny – biosenzor – analytické metody – elektrochemické metody – katalytické a oxidační signály

Úvod

Biosenzor je analytický přístroj obsahující citlivý prvek biologického původu, který je buď součástí nebo v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Poskytuje průběžný elektronický signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupin) chemických látek přítomných ve vzorku. Aplikace biosenzorů zasahuje do oblastí biochemie a biotechnologie, medicíny, analytické a fyzikální chemie, elektroniky, informatiky a nauky o materiálech. Základní schéma biosenzoru je zobrazeno na Obr. 1. Z obrázku vyplývá, že se biosenzor obecně skládá z biologické části (tzv. bioreceptoru či biorekogničního prvku) a fyzikálně chemického převodníku.

Fyzikálně-chemické převodníky

Pro konstrukci biosenzorů se obecně používají čtyři různé druhy fyzikálně-chemických převodníků a to elektrochemické, optické, piezoelektrické, akustické a kalorimetrické. Elektrochemické systémy reprezentují nejrozšířenější typ převodníku používaného pro konstrukci biosenzorů, zejména katalytických. Hlavními výhodami jsou jednoduchá konstrukce měřícího systému, nízké pořizovací náklady a výborná citlivost. Pro sestavení elektrochemického měřícího systému jsou zapotřebí nejméně dvě elektrody – pracovní (měřící) a referentní. Podle aplikace a konstrukce biosenzoru může být tento dvouelektrodový systém doplněn o elektrodu pomocnou.



Obr. 1. *Princip funkce biosenzoru. Bioreceptor (např. enzym, peptid protilátka) je vhodně navázán na fyzikálně-chemický převodník (elektrody, termistor, piezoelektrické zařízení), který je schopen při navázání stanovované látky na biologickou část biosenzoru detekovat změnu vyjádřenou teplem, světlem, změnou hmoty a dalších.*

Bioreceptory

Bioreceptor je velmi kritickou složkou biosenzoru. Na jeho „správné“ funkci záleží úspěch celé analýzy. Podle druhu dělíme bioreceptory na biokatalytické (enzym, organela, buňka, tkáň, orgán, organismus; analyt přeměňují v průběhu chemické reakce) a bioafinitní (lektin, protilátka, nukleová kyselina, receptor; analyt váží v afinitním komplexu) [1,3]. Nedávno bylo publikováno využití kovy vázajícího thiolu jako biologické složky biosenzoru pro detekci těžkých kovů [4-6].

Elektrochemických biosenzorů je možné využít nejen pro stanovení toxických látek jako jsou těžké kovy, ale také pesticidní přípravky a některé organické polutanty, např. polychlorované bifenyly, akridinové deriváty a látky fenolické povahy. Nejnovější trendy v navrhování biosenzorů vedou k technikám schopným stanovit specifické sekvence RNA nebo DNA. V těchto případech je využívána DNA-hybridizace případně enzymatické modifikace pevných uhlíkových elektrod [7]. Navíc, DNA imobilizovaná na povrchu indikační elektrody je využitelná pro sledování poškození DNA, což má značný význam pro studium genotoxických vlivů škodlivin na organismy za použití kompaktních a přenosných diagnostických zařízení. Všechny tyto poznatky jsou důležité pro konstrukci selektivních a citlivých elektrochemických zařízení a jejich aplikaci v ochraně životního prostředí a lidského zdraví.

Biosenzory představují budoucnost v rozvoji terénních analýz a plně automatizovaných zařízení pro monitorování nejrůznějších analytů. Nejefektivnější a ekonomicky nejvýhodnější technologií se jeví použití převodníku složeného z galvanostatu či potenciostatu zapojeného s pevnou elektrodou, jako jsou uhlíkové pastové elektrody a nebo elektrody vyrobené z uhlíkového vlákna či pyrolytického grafitu [8]. Na druhou stranu jako biologický prvek biosenzoru je výhodné používat enzymy a některé další proteiny se schopností specifické vazby, nebo v DNA-hybridizační technologii používané, syntetické oligonukleotidy a PNA. Využití biosenzorů je možné i v on-line zapojení s elektroforetickými nebo chromatografickými separačními technikami [9]. Všechny tyto možnosti jsou dnes intenzivně studovány, nicméně použití velmi nadějné technologie DNA-hybridizace pro stanovení chromosomové DNA se prozatím bez složité přípravy vzorku příliš nedaří. V budoucnu by mohl být problém vyřešen použitím automatických mikro-PCR systémů (PCR: polymerázová řetězová reakce). Jednou z nejnovějších technik je např. provedení DNA-hybridizace na velkém pracovním povrchu (povrch H) komerčně vyráběných paramagnetických kuliček a stanovení redoxní a nebo enzymatické značky indikující hybridizaci na malém povrchu indikační elektrody [2,10-13].

Biosenzory a tumor supresorové geny

Kromě mutací v proto-onkogenech mohou vznikat mutační změny v anti-onkogenech (tumor-supresorové geny). Na rozdíl od onkogenů jimi kódované proteiny *mají antiproliferační účinek, podporují diferenciaci a apoptózu.* V každé somatické buňce je asi 40 tumor-supresorových genů. Aby se staly tumorogenními, musí být mutovány obě jejich alely – proto název *recesivní onkogeny.* S tím souvisí tzv. *dvouzásahová teorie,* kterou poprvé formuloval Knudson, když vysvětloval vznik vzácného *hereditárního retinoblastomu.* Na rozdíl od mnohem častějšího *sporadického retinoblastomu,* kde se jedná o náhodné mutace jedné a posléze druhé alely v buňce sítnice, je u hereditární formy jedna mutovaná alela zděděna. Příslušný jedinec je heterozygot, u něhož se zděděná nádorová predispozice zatím neprojevuje. Dojde-li však k mutaci/eliminaci druhé alely, iniciuje se rozvoj nádorového klonu buněk sítnice. Tomuto procesu se říká *ztráta heterozygozity (LOH=loss of heterozygozity).* Prvně objevený tumor-supresorový gen byl nazván *retinoblastomový gen = Rb-gen* a jeho produkt RB-protein. Vyskytuje se v každé buňce, kde reguluje buněčný cyklus dělení. *Rb-1* negativně reguluje důležitý transkripční faktor E2F. ***Tumor-supresorový gen p53*** je klíčovým regulačním faktorem, který monitoruje poškození DNA. Inaktivace *p53* bývá jedním z prvních kroků, který vede k maligní transformaci při vývoji řady nádorových onemocnění. Pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* mají obvykle jednu mutantní alelu v zárodečných buňkách a tím i riziko vzniku sarkomů, leukémie a karcinomu mléčné žlázy. Vzácně pacienti s *Li-Fraumeniho syndromem* nemají v zárodečných buňkách tuto mutaci, ale mutaci genu *CHK 2,* kódující proteinkinasu, která fosforyluje protein p53, čímž dochází k jeho aktivaci.

Právě pro studium změny funkce těchto velmi významných proteinů jsou velmi vhodné elektrochemické biosenzory. Umožňují sledování vazby proteinů na cílové molekuly, usnadní rychlé rozpoznání fyziologické či patologické struktury. Navíc umožní výraznou miniaturizaci a komercionalizaci takových zařízení. Každé takové zařízení může velmi intenzivně pomoci ve včasné diagnostice zhoubných onemocnění a tím umožní vyléčení tohoto závažného onemocnění.

Závěr

Jak je ukázáno, elektrochemické biosenzory jsou nástrojem s perspektivou k budoucím nanotechnologiím v medicíně, farmacii, molekulární biologii a dalších.

Poděkování: Příspěvek vznikl za podpory grantů Liga proti rakovině Praha a Běh Terryho Foxe 2007.

Literatura

1. Skládal P. Biosensory. Brno: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity; 1999.
2. Paleček E. Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. Talanta. 2002;56:809-19.
3. Paleček E. Preface. Talanta. 2002;56:807.
4. Wang J, Rivas G, Cai X, Paleček E, Nielsen P, Shiraishi H, et al. DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. Anal Chim Acta. 1997;347:1-8.
5. Adam V, Petrlova J, Potesil D, Zehnalek J, Sures B, Trnkova L, et al. Study of metallothionein modified electrode surface behavior in the presence of heavy metal ions-biosensor. Electroanalysis. 2005 Sep;17(18):1649-57.
6. Adam V, Zehnalek J, Petrlova J, Potesil D, Sures B, Trnkova L, et al. Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy-metal ion biosensor. Sensors. 2005 Jan-Feb;5(1-2):70-84.
7. Masarik M, Kizek R, Kramer KJ, Billova S, Brazdova M, Vacek J, et al. Application of avidin-biotin technology and adsorptive transfer stripping square-wave voltammetry for detection of DNA hybridization and avidin in transgenic avidin maize. Analytical Chemistry. 2003 Jun;75(11):2663-9.
8. Gilmartin MAT, Hart JP. Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes. A review. Analyst. 1995;120:1029-45.
9. Bossi A, Piletsky SA, Righetti PG, Turner APF. Capillary electrophoresis coupled to biosensor. J Chromatogr A. 2000;892:143-53.

10. Paleček E, Billová S, Havran L, Kizek R, Miculkova A, Jelen F. DNA hybridization at microbeads with cathodic stripping voltammetric detection. Talanta. 2002;56:919-30.
11. Paleček E, Fojta M, Jelen F, Vetterl V. Electrochemical analysis of nucleic acids. New York: Wiley-VCH; 2002.
12. Paleček E, Fojta M, Tomschik M, Wang J. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. Biosens Bioelectron. 1998;13:621-8.
13. Paleček E, Kizek R, Havran L, Billová S, Fojta M. Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor. Anal Chim Acta. 2002;469:73-83.

251 Význam sledování indukce cytochromu p450 flavonoidními sloučeninami.

Hanuštiak P.[1], Kratochvílová P.[2], Mareš P.[2], Adam V.[2,3], Šupálková V.[2], Beklová M.[1], Zehnálek J.[3], Zeman L.[2], Hodek P.[4], Stiborová M.[4], Kizek R.[3,*]

1) Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně
2) Ústav výživy zvířat a pícninářství
3) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
4) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha
**) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz*

Úvod

V dnešní době se ve výživě člověka stále častěji objevují potravinové doplňky, které obsahují látky přijímané i v „běžné“ stravě. Proto není překvapením, že celková koncentrace takových látek vysoce převyšuje normální hodnoty denního příjmu. Tento efekt se nevyhnul ani velmi zajímavé skupině látek nazývaných flavonoidy. Jsou to nízkomolekulární heterocyklické látky založené na flavanovém jádře [1]. Biochemická aktivita flavonoidů či jejich metabolitů závisí na chemické struktuře a relativní orientaci kruhů v molekule [2]. Klasifikace flavonoidů je založena na jejich struktuře. Hlavní třídy zahrnují flavonoly, flavony, flavanony, katechiny (též flavanony), anthokyany, isoflavony, dihydroxyflavonoly a chalkony [3-6].

Flavonoidy jsou klasifikovány jako sekundární rostlinné metabolity všudypřítomné v rostlinné říši. Jsou produkovány rostlinami například k ochraně před býložravci a k oxidativní ochraně buněk [5,7], dále také působí jako stimuly pro opylení, vábí hmyz ke své potravě [4] nebo se v prašnících a pestících a účastní se vývinu pylu a pučení [8].

Ve vztahu k člověku jsou všeobecně považovány za prospěšné látky. Z některých studií prováděných *in vitro* vyplývá, že mají výrazné antioxidační, protisrážlivé, spasmolytické, antimikrobní, protizánětlivé a antikarcinogenní vlastnosti [9-16]. Bylo identifikováno několik mechanismů, kterými flavonoidy působí cytotoxicky. Protinádorová aktivita několika flavonoidů (pinostrobin, quercetin, myricetin, morin) je připisována jejich schopnosti inhibovat topoisomerasu I a II [17,18]. A dále jsou schopny zpomalit buněčnou proliferaci jako následek jejich vazby na estrogenní receptor [19]. Oproti tomu některé flavonoidy, stejně jako jiná xenobiotiky, jsou schopny indukovat cytochrom P450 [20].

V naší práci jsme se zabývali problematikou vlivu různých flavonoidů na cytochrom P450, především na jeho indukci v játrech a tlustém střevě. Pro tyto účely jsme využili western blotting. A dále jsme se zaměřili na elektrochemické pozorování interakcí DNA s flavonoidy.

Materiál a metody

Chemikálie

NaH_2PO_4, metanol, CH_3COOH, CH_3COONa, diosmin, chrysin, uhlíkový prášek a minerální olej byly dodány firmou Sigma Aldrich Corp. (USA). Rutin trihydrát a quercitrin dihydrát byly dodány firmou Roth GmbH, Karlsruhe (Německo). Na_2HPO_4 byla dodaná firmou Merck, Darmstadt (Německo). Quercetin dihydrát byl dodán firmou Fluka chemie AG (USA). Všechny ostatní použité chemikálie byly ACS čistoty dodané firmou Sigma Aldrich.

Indukce cytochromu P450 flavonoidy

Pro experiment jsme použili β-naftoflavon, chrysin, quercetin, flavon, naringin, naringenin, diosmin, hesperetin, hesperidin, baicalin, rutin (Sigma Chemical Co.) nebo slunečnicovým olejem (vehikulum). Dospělí krysí samci (skupina třech zvířat) byli vystaveni studovaným flavonoidům v koncentraci 60 mg/kg po tři dny a následně byli usmrceni. Mikrosomální frakce z jater a tlustého střeva byly připraveny diferenciální centrifugací [21]. V těchto frakcích byl stanoven obsah CYP1A1 pomocí Western blottingu [22] na mebráně Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) za využití specifických kuřecích anti-CYP1A1 protilátek [23].

Stacionární elektrochemický systém

Square wave voltametrie byla prováděna pomocí elektrochemického analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, Nizozemí) v zapojení s tříelektrodovou celou VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byla použita pracovní uhlíková pastová elektroda, referenční (Ag/AgCl, 3 M KCl) elektroda, a jako pomocná elektroda byla použita uhlíková tyčka. Získaná data byla upravena matematickou korekcí podle algoritmů navržených Savitzkym a Golayem implementovaných do GPES softwaru (EcoChemie). Experi-

menty byly prováděny při laboratorní teplotě. Měření bylo prováděno v potenciálovém rozsahu od –0,1 V do 1,2 V s těmito parametry: potenciálový krok 1,95 mV, pulzní amplituda 49,85 mV. Jako základní elektrolyt jsme použili fosfátový pufr o pH = 7,0. Uhlíková pasta (asi 0.5 g) byla vyrobena z uhlíkového prášku a minerálního oleje (bez DNáz, RNáz, a proteáz). Poměr uhlíkového prášku a minerálního oleje byl 70/30 (w/w). Pasta byla vložena do teflonového těla elektrody s průměrem plochy elektrody 2,5 mm. Před každým měřením byl povrch elektrody vždy mechanicky obnoven.

Výsledky a diskuze

Vliv různých flavonoidů na indukci CYP1A1

O biologickém působení flavonoidů na živočišné organismy je málo známo, a tak jsme vybrali flavonoidy, flavanony a flavony, a jejich glykosidy, které jsme testovali jako potencionální induktory cytochromu P450. Vybrané flavonoidy byly podávány gaváží pokusným samcům potkanů. Tato studie je zaměřena na indukci CYP1A1, hlavního cytochromu P450 vyvolávajícím karcinogenní aktivaci. Zvýšená exprese tohoto enzymu v tkáni tlustého střeva může vést k narůstající incidenci kolorektálního karcinomu u lidí. V literatuře lze nalézt množství experimentálních dat, které se zabývají studiem indukčního efektu flavonoidů v různých umělých systémech (např. buněčných kulturách), nicméně výsledky jsou často protichůdné.

Cílem našeho experimentu bylo prokázat přímou indukci CYP1A1 flavonoidy v tlustém střevě, po jejich konzumaci experimentálními zvířaty v koncentracích identických k průměrným hodnotám v lidské stravě. Byl proveden Western blotting mikrosomálních vzorků tlustého střeva a jater pokusných potkanů, kteří byli vystaveni β-naftoflavonu, který je znám jako látka efektivně indukující CYP1A1 jako ve střevech, tak v játrech. Tyto vzorky byly použity jako pozitivní kontrola. Z našich výsledků vyplývá, že aglykony chrysin a quercetin a rutinosid – diosmin způsobily v obou pozorovaných tkání CYP1A1indukci. V případě studia indukce CYP1A1 dalšími flavonoidy a to hesperetinem, hesperidinem a baicalinem jsme zjistili, že tyto flavonoidy neovlivnily CYP1A1 expresi. Z flavonoidů typicky obsažených v citrusových plodech jsme pozorovali indukci CYP1A1 v tlustém střevě pouze v případě naringeninu, zatímco naringin nezpůsobil žádné změny ani v jednom druhu studované tkáně. Bylo pro nás překvapením, že flavon (flavonoid, který nemá hydroxylovou nebo methoxylovou skupinu) nebyl schopen indukovat CYP1A1 v tlustém střevě, zatímco v játrech indukce probíhá. Tento výsledek je ve shodě s předpokladem, že méně polární flavonoidy snadno prochází membránovou bariérou, a proto jsou absorbovány ze střeva do krevního oběhu. Získané výsledky demonstrují důležitost nejen zvažovat schopnost flavonoidů vázat se na Ah receptor (indukční faktor), ale také se zaměřit na jejich distribuci a metabolizaci v organismu.

Studium interakce flavonoidů s DNA

Pro stanovení základního elektrochemického chování DNA na uhlíkové pastové elektrodě byly analyzovány jednotlivé nukleové kyseliny (A, G, C a T). Získali jsme dobře vyvinuté signály jednotlivých bazí při různých potenciálech (G–0.68 V, A–0.91 V, T–1.11 V, C–1.27 V. V případě analýzy celé molekuly DNA (ssDNA) byly elektrochemické signály posunuty přibližně o 50 mV do negativního potenciálu. A navíc, vybrané flavonoidy (quercetin a rutin) poskytovaly na povrchu uhlíkové pastové elektrody dobře separované signály. Následně byla provedena simultánní analýza ssDNA a flavonoidů. Přítomnost flavonoidů způsobila pokles signálů bazí, přičemž největší pokles byl pozorovatelný u guaninu, který byl v přítomnosti obou flavonoidů pouze 5% v porovnání s původním. Signály tyminu a cytosinu byly ovlivněny flavonoidy nejméně. Výsledky naznačují, že rozdíly v interakci flavonoidů s nukleovými bazemi souvisejí s purinovou nebo pyrimidinovou strukturou.

Závěr

Ačkoliv jsou flavonoidy považovány za bezpečné látky obsažené v naší potravě z důvodu jejich rostlinného původu, naše data naznačují, že příjem flavonoidů by měl být kontrolován s ohledem na jejich schopnost nejen ovlivnit cytochrom P450, ale také interagovat s DNA.

Poděkování: *Příspěvek vznikl za podpory grantů LPR 2006, RASO 2007, GAAV IAA401990701, MSM 6215712402 a VUP.*

Literatura

1. Coultate TP. 2nd edition ed: The Royal Society of Chemistry; 1990.
2. Cody V. Crystal and molecular structure of flavonoids. New York, NY USA; 1988.
3. Hodnick WF, Milosajevic EB, Nelson JH, Pardini RS. Electrochemistry of flavonoids: Reltaonships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration and production of oxygen radicals by flavonoids. Biochem Pharmacol. 1988;37:2607-11.
4. Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. New York, NY USA; 1986.
5. Harborne JB. Flavonoids in the enviroment: Structure-activity relationships. New York, NY USA; 1988.
6. Kühnau J. The flavonoids: A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. Wld Rev Nutr Diet. 1976;24:117-91.
7. Pierpoint WS. Flavonoids in the human diet. New York, NY USA; 1986.

8. Mo Y, Nagel C, Taylor LP. Biochemical complemetation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. Proc Nat Acad Sci. 1992;89:7213-7.
9. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev. 2000;52:673-751.
10. Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. Life Sci. 2001;68:921-31.
11. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM. Review: Isoflavones, lignans a stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. J Sci Food Agric. 2000;80:1044-62.
12. Chow K, Kramer I. San Francisco, USA: China Books and Period, Inc.; 1990.
13. Ratty AK, Das NP. Effect of flavonoids on monoenzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship. Biochem Med Metabol Biol. 1988;39:69-79.
14. Salvayre R, Negre A, Affany A, Lenoble M, Douste-Blazy L. Protective effect of plant flavonoids, analogs and vitamin E against lipid peroxidation of membranes. New York, NY USA; 1988.
15. Gryglewski RJ, Korbut R, Robak J, Swies J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. Biochem Pharmacol. 1987;36:317-22.
16. Beretz A, Cazevane J. The effect of flavonoids on blood-vessel wall interactions. New york, NY, USA; 1988.
17. Sukardiman, Darwanto A, Tanjung M, Darmadi MO. Cytotoxic mechanism of flavonoid from Temu Kunci (Kaempferia pandurata) in cell culture of human mammary carcinoma. Clin Hemorheol Microcirc. 2000;23(2-4):185-90.
18. Constantinou A, Mehta R, Runyan C, Rao K, Vaughan A, Moon R. Flavonoids as DNA Topoisomerase Antagonists and Poisons - Structure-Activity-Relationships. J Nat Prod. 1995 Feb;58(2):217-25.
19. Primiano T, Yu R, Kong ANT. Signal transduction events elicited by natural products that function as cancer chemopreventive agents. Pharm Biol. 2001;39(2):83-107.
20. Kohn MC, Walker NJ, Kim AH, Portier CJ. Physiological modeling of a proposed mechanism of enzyme induction by TCDD. Toxicology. 2001 May 21;162(3):193-208.
21. Stiborova M, Asfaw B, Frei E, Schmeiser HH, Wiessler M. Benzenediazonium Ion Derived from Sudan-I Forms an 8-(Phenylazo) Guanine Adduct in DNA. Chem Res Toxicol. 1995 Jun;8(4):489-98.
22. Guengerich FP, Wang P, Davidson NK. Estimation of Isozymes of Microsomal Cytochrome-P-450 in Rats, Rabbits, and Humans Using Immunochemical Staining Coupled with Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis. Biochemistry. 1982;21(7):1698-706.
23. Polson A, Vonwechmar MB, Vanregenmortel MHV. Isolation of Viral Igy Antibodies from Yolks of Immunized Hens. Immunol Commun. 1980;9(5):475-93.

252 Thioly a nádorová onemocnění, vidíme veškeré souvislosti?

Adam V.[1], Křížková S.[1], Fabrik I.[1,2], Šobrová P.[1], Stejskal K.[1,2], Zítka O.[1,2], Hraběta J.[3], Eckschlager T.[3], Kukačka J.[4], Průša R.[4], Horáková Z.[5], Binková H.[5], Horna A.[6], Kizek R.[1,*]
1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
2) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
3) Klinika dětské hematologie a onkologie, II. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha
4) Ústav klinické biochemie a patobiochemie, II. Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha
5) Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně
6) Radanal s.r.o., Pardubice
**) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz*

Klíčová slova
Thiolové sloučeniny – nádorová onemocnění – analytické metody – elektrochemické metody – glutathion – metallothionein

Úvod

Síra existuje v mnoha oxidačních stavech, což z ní dělá velmi univerzální prvek nezbytný v mnoha biologických sloučeninách a systémech [1]. Nejvíce aktivní a zároveň redukovanou formou síry v biomolekulách je thiolová skupina (-SH). Můžeme ji nalézt ve velkém množství biologicky aktivních látek jako je aminokyselina cystein, neproteinová aminokyselina homocystein a mnoho dalších. Thiolové sloučeniny mají velké množství biologických funkcí jako jsou například kontrola genové exprese [1], signalizace a detoxikace těžkých kovů [2,3]. Kromě toho mohou také sloužit jako markery mnoha různých onemocnění [4]. A navíc jejich vztah k nádorovým onemocněním je v poslední době stále častěji diskutovanou otázkou.

Glutathion

Jedním ze nejjednodušších thiolů obsažených v živých organismech je esenciální aminokyselina cystein. Podílí se významně na struktuře bílkovin (tvoří disulfidové můstky) a na udržení přiměřeného oxidačně-redukčního prostředí v buňce jakou sou-

část všudypřítomného tripetidu nazvaného glutathion (GSH). Tento peptid objevil M. J. de Rey Pailhade na konci devatenáctého století a nazval jej jako „hydrogénant le soufre“. Své dnes používané jméno získal prostřednictvím F. G. Hopkinse v roce 1921, který se nejvíce zasloužil o studium této velmi zajímavé molekuly. Bohužel se tento držitel Nobelovy ceny nejvíce zapsal do historie nejen jako velikán biochemie, ale také pro svůj omyl při určování primární sekvence GSH. Nejdříve navrhnul, že GSH je dipeptid skládající se z glutamové kyseliny a cysteinu. Až o pár let později a především pod tlakem jiných autorů přijal, že kromě výše zmíněných aminokyselin obsahuje také glycin [5]. GSH jako všudypřítomný thiol je životně důležitý intra- a extra-celulární antioxidant, který hraje klíčovou roli v kontrole signalizačních procesů, detoxikaci některých xenobiotik, těžkých kovů a mnoha dalších. GSH se vyskytuje především v redukované formě, pokud je enzym zvaný glutathion reduktáza, který jej z jeho oxidované formy redukuje, aktivní a schopný být navozen v podmínkách oxidativního stresu. A proto je poměr mezi redukovanou a oxidovanou formou gutathionu často používán jako marker buněčné toxicity [3,6-8]. Ve spojitosti s tímto tvrzením není tedy překvapením, že mnoho základních dějů v buněčné regulaci jako fosforylace proteinů a jejich vazba na transkripční faktory na DNA jsou silně ovlivňovány redoxní rovnováhou, zejména pak rovnováhou mezi -SH a S-S. Proto endogenní glutathionový a thioredoxinový systém mohou být považovány za efektivní regulátory redox-sensitivní genové exprese [4,9-11]. Sulfyhydrylová skupina GSH je vysoce reaktivní a je obvykle konjugována k dalším molekulám jako oxid dusnatý [12,13]. A právě nitrosylace glutathionu může sloužit jako signální událost anebo jako depozice oxidu dusnatého v podobě S-nitrosoglutathionu.

Na základě zmíněných faktů není překvapením, že GSH může ovlivnit léčbu různých onemocnění včetně nádorových [14,16]. U maligních nádorů v porovnání se zdravou tkání bylo prokázáno, že mnohočetná rezistence na léky („multidrug resistance“) v mnoha případech koreluje s vysokou hladinou GSH [17]. Zvýšená hladina GSH byla zjištěna u řady nádorových onemocnění v různých typech tkání např. kostní dřeně, prsu, střeva, hrtanu a plic [12]. Tyto výsledky vedly k navržená experimentů s buněčnými nádorovými liniemi. Bylo ukázáno, že hladiny GSH stoupla desetinásobně po vývoji rezistence u buněk získaných z nádorů vaječníků v porovnání s hladinou ve vzorcích, které nebyly vystaveny působení alkylujících činidel.

Jeden z hlavních důvodů takového nárůstu může být interakce GSH s protirakovinovými léčivy na bázi platiny [18]. Mezi dnes nejpoužívanější, na platině založené cystostatika patří cisplatina, karboplatina a oxaliplatina [19-23]. Právě karboplatina a oxaliplatina byly vyvinuty jako léčiva druhé popř. třetí generace, které mají překonávat rezistenci na cisplatinu. Studium interakcí těchto léčiv s glutathionem získává na významu nejen z pohledu pochopení vlastního fungování léčiva, ale také z pohledu překonání rezistence, která je u těchto léčiv jednou z hlavních komplikací jejich použití. A navíc by mohly tyto výsledky využity i při návrhu postupů pro léčbu rakoviny založeny na modulaci či kontrole změn obsahu a syntéze GSH [24-27].

Metalothionein

Jedním z dalších a neméně zajímavých thiolů z pohledu studia vztahu k nádorovým onemocněním jsou metalothioneiny (MT). Tyto proteiny patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein bohatých proteinů o molekulové hmotnosti od 6–10 kDa [28]). Ze strukturních modelů lze předpokládat, že molekula MT se skládá ze dvou vazebných domén a, které jsou složeny z cysteinových klastrů. Lidské MT patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódovány rodinou genů vytvářejících 10 isoforem. Vzniklé proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. MT-1 protein existuje ve více isoformách, respektive MT-1 protein vytváří více subtypů kódovaných sadou MT-1 genů (MT-1A, MT-1B, MT-1E, MT-1F, MT-1G, MT-1X). V organismu dospělých jedinců jsou nejvíce zastoupeny dvě isoformy MT (MT-1A, MT-2A), které se exprimují ve většině lidských tkání, v mozkové tkáni je přítomna pouze isoforma MT-3 (někdy označována jako růstový inhibiční faktor – GIF). V dlaždicovém epitelu je hojně zastoupena isoforma MT-4. MT-1 a MT-2 isoformy jsou obvykle exprimovány v lidském organismu ve velmi nízkých koncentracích.

Ačkoliv je MT připisována řada biologických funkcí, je většina z nich úzce spjata s jejich schopností vázat kovy[29]. A proto mohou organismu nejen chránit před toxicitou, kterou těžké kovy způsobují, ale také mohou sloužit jako donátor zinečnatých nebo mědnatých iontů do metalo-enzymů nebo transkripčních faktorů [28]. Mohou také sloužit jako ochrana proti oxidativnímu poškození pro svůj vysoký obsah cysteinu. Kromě těchto funkcí zůstává stále otázkou jejich vztah k buněčné proliferaci a diferenciaci [30].

A právě ochranná role MT proti oxidativnímu stresu a toxicitě těžkých kovů naznačuje možnou funkční roli těchto proteinů v růstu a přežití nádorových buněk. Je známo, že je řada faktorů zahrnuta ve vzniku a vývoji rezistence na protinádorovou léčbu a exprese MT v nádorech by mohla být jedním z nich. MT mohou „ulehčit“ růst nádoru dvěma potenciálními mechanismy. Může sloužit jako donor zinku k různým transkripčním faktorům včetně tumor supresorových genů, které produkují např. protein p53. *In vitro* studie ukázali, že MT jsou schopny modulovat transkripční aktivaci Sp1, neboli transkripčního faktoru zinkových prstů [31]. Což potvrzuje možnou výměnu zinku mezi MT a dalšími proteiny zapojených do buněčného růstu. Translokace MT do buněčného jádra během proliferativní fáze (G1-S) buněčného cyklu u lidských nádorů také podporuje myšlenku role MT jako donora zinku během rakovinového bujení. Kromě toho, MT jsou známy jako zhášeče volných kyslíkových radikálů. A proto druhý mechanismus spojení MT a rakoviny může ležet v tom, že MT jsou schopny chránit buňky před radiací a chemoterapeutickými léčivy prostřednictvím svých volných SH skupin schopných reagovat s radikály. Vztah MT a tumor supresorového genu p53 byla studována u řady lidských nádorů. Statisticky významná asociace mezi expresí MTs a p53 byla objevena v buňkách karcinomu plic [32]. V další práci nebyla objevena korelace mezi expresí MT a p53 ve zhoubném epitelu hrtanu a karcinomu močo-

vého měchýře [29,33]. In vitro studie ukázaly, že MT jsou schopny modulovat konformaci a transkripční aktivitu genu a proteinu p53 prostřednictvím chelatace zinku.

Dalším a neméně zajímavým směrem je studium vztahu koncentrace či exprese MTs a vznikem a průběhem jednotlivých nádorových onemocnění. Nejnovější výzkumy naznačují, že existuje vztah mezi množstvím metalothioneinu a rychlostí rozvoje zhoubného nádoru [35-37]. Dále se v poslední době objevují pokusy charakterizovat množství MTs v různých typech nádorů a získané výsledky jsou velkým příslibem do budoucna [38,39].

Závěr

Vztah thiolových látek a nádorových onemocněních lze studovat ve dvou rovinách a to z pohledu léčby anebo diagnostiky. Jak je v příspěvku ukázáno thioly jako redukovaný glutathion a metallothionein mohou a s největší pravděpodobností také hrají klíčovou roli při tvorbě rezistence na léčbu rakoviny. Jejich řízená exprese v organismu by tedy mohla výrazným způsobem zlepšit nejen průběh léčby, ale také její celkový příznivý výsledek. Co se týče druhé roviny studia, je stále otázkou, jestli mohou být thioly použity jako markery různých malignit. Výsledky získané v této oblasti jsou rozporuplné, ale potenciál jejich využití pro praxi v případě úspěšné korelace i s jedním typem nádorů je velmi slibný.

Poděkování: *Příspěvek vznikl za podpory grantů Běh Terryho Foxe 2007, Liga proti rakovině Praha 2006, GAAV IAA401990701 a VUP 2007.*

Literatura

1. Moriarty-Craige SE, Jones DP. Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. Annu Rev Nutr. 2004;24:481-509.
2. Meister A. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. J Biol Chem. 1988 Nov;263(33):17205-8.
3. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. Title: The importance of glutathione in human disease. 2003;57(3-4):145-55.
4. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. Faseb J. 1996 May;10(7):709-20.
5. Hopkins FG. On an autoxidisable constituent of the cell. Title: On an autoxidisable constituent of the cell. 1921;15(2):286-305.
6. Carelli S, Ceriotti A, Cabibbo A, Fassina G, Ruvo M, Sitia R. Cysteine and glutathione secretion in response to protein disulfide bond formation in the ER. Title: Cysteine and glutathione secretion in response to protein disulfide bond formation in the ER. 1997;277(5332):1681-4.
7. Locigno R, Castronovo V. Reduced glutathione system: Role in cancer development, prevention and treatment (Review). Title: Reduced glutathione system: Role in cancer development, prevention and treatment (Review). 2001;19(2):221-36.
8. Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. Title: Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. 1998;49:249-79.
9. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002 Jan;82(1):47-95.
10. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-Transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1995;30(6):445-600.
11. Yegorova S, Yegorov O, Lou MF. Thioredoxin induced antioxidant gene expressions in human lens epithelial cells. Exp Eye Res. 2006 Oct;83(4):783-92.
12. Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. Title: The role of glutathione in cancer. 2004;22(6):343-52.
13. Clancy RM, Levartovsky D, Leszczynskapiziak J, Yegudin J, Abramson SB. Nitric-oxide reacts with intracellular glutathione and activates the hexose-monophosphate shunt in human neutrophils - Evidence for S-nitrosoglutathione as a bioactive intermediary. P Natl Acad Sci USA. 1994;91(9):3680-4.
14. Brabec V, Kasparkova J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. Drug Resist Update. 2002 Jun-Aug;5(3-4):147-61.
15. Kasparkova J, Novakova O, Vrana O, Intini F, Natile G, Brabec V. Molecular aspects of antitumor effects of a new platinum(IV) drug. Mol Pharmacol. 2006 Nov;70(5):1708-19.
16. Ramos-Lima FJ, Vrana O, Quiroga AG, Navarro-Ranninger CN, Halamikova A, Rybnickova H, et al. Structural characterization, DNA interactions, and cytotoxicity of new transplatin analogues containing one aliphatic and one planar heterocyclic amine ligand. J Med Chem. 2006 Apr;49(8):2640-51.
17. Loe DW, Almquist KC, Deeley RG, Cole SPC. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C-4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles - Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. J Biol Chem. 1996 Apr;271(16):9675-82.
18. Riddick DS, Lee C, Ramji S, Chinje EC, Cowen RL, Williams KJ, et al. Cancer chemotherapy and drug metabolism. Drug Metab Dispos. 2005 Aug;33(8):1083-96.
19. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. Mol Cancer Ther. 2002 Jan;1(3):227-35.

20. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies. Ann Oncol. 1998 Oct;9(10):1053-71.
21. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Perez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. Curr Med Chem. 2003 Feb;10(3):257-66.
22. Ong ST, Vogelzang NJ. Chemotherapy in malignant pleural mesothelioma: A review. J Clin Oncol. 1996 Mar;14(3):1007-17.
23. Weiss RB, Christian MC. New Cisplatin Analogs in Development - a Review. Drugs. 1993 Sep;46(3):360-77.
24. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. Crit Rev Clin Lab Sci. 2006;43(2):143-81.
25. Kauvar LM, Morgan AS, Sanderson PE, Henner WD. Glutathione based approaches to improving cancer treatment. Chem-Biol Interact. 1998 Apr 24;112:225-38.
26. Clynes M, Heenan M, Hall K. Human Cell-Lines as Models for Multidrug-Resistance in Solid Tumors. Cytotechnology. 1993;12(1-3):231-56.
27. Mitchell JB, Glatstein E. Radiation Oncology - Past Achievements and Ongoing Controversies. Cancer Res. 1991 Sep 15;51(18):S5065-S73.
28. Kagi JHR, Schaffer A. Biochemistry of Metallothionein. Biochemistry. 1988 Nov;27(23):8509-15.
29. Cherian MG, Jayasurya A, Boon-Huat B. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. Mut Res. 2003;533(1-2):201-9.
30. Cherian MG, Apostolova MD. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. Cell Mol Biol. 2000 Mar;46(2):347-56.
31. Zeng J, Vallee BL, Kagi JHR. Zinc Transfer from Transcription Factor-Iiia Fingers to Thionein Clusters. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Nov;88(22):9984-8.
32. Joseph MG, Banerjee D, Kocha W, Feld R, Stitt LW, Cherian MG. Metallothionein expression in patients with small cell carcinoma of the lung - Correlation with other molecular markers and clinical outcome. Cancer. 2001 Aug;92(4):836-42.
33. Ioachim EE, Charchanti AV, Stavropoulos NE, Athanassiou ED, Michael MC, Agnantis NJ. Localization of metallothionein in urothelial carcinoma of the human urinary bladder: An immunohistochemical study including correlation with HLA-DR antigen, p53, and proliferation indices. Anticancer Res. 2001 May-Jun;21(3B):1757-61.
34. Meplan C, Richard MJ, Hainaut P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. Oncogene. 2000 Nov;19(46):5227-36.
35. Nakayama A, Fukuda H, Ebara M, Hamasaki H, Nakajima K, Sakurai H. A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2002;25(4):426-31.
36. Theocharis S, Karkantaris C, Philipides T, Agapitos E, Gika A, Margeli A, et al. Expression of metallothionein in lung carcinoma: correlation with histological type and grade. Histopathology. 2002;40:143-51.
37. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. Histopathology. 2004;45(2):103-18.
38. Petrlova J, Blastik O, Prusa R, Kukacka J, Mikelova R, Stiborova M, et al. Determination of metallothionein content in patients with breast and colon cancer, and malignant melanoma. Klinicka Onkologie. 2006;19(2):138-42.
39. Prusa R, Svoboda M, Blastik O, Adam V, Zitka O, Beklova M, et al. Increase in content of metallothionein as marker of resistance to cisplatin treatment. Clin Chem. 2006 July 23-27;52(Suppl. 6):A174-A5.

253 Sledování interakce protinádorových léčiv s látkami obsahujícími thiolovou skupinu.

Adam V.[1], Zítka O.[1,2], Húska D.[1], Křížková S.[1], Horna A.[3], Beklová M.[4], Trnková L.[5], Kizek R.[1,*]
1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
2) Katedra biochemie a 5Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
3) Radanal s.r.o., Pardubice
4) Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně
**) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz*

Klíčová slova: *Thioly – glutathion – cisplatina – interakce – elektrochemické techniky – protinádorová léčba*

Úvod

Lékařská anorganická chemie existuje jako vědní disciplína více než 40 let, přičemž základním kamenem bylo objevení protinádorových vlastností cisplatiny (komplex *cis*-diaminodichloroplatnatý – *cis*-[$Pt(NH_3)2Cl_2$]) [1,2]. Jeho biologická aktivita byla objevena v roce 1965 Rosenborgem během jeho studií vlivu elektrického proudu na růst bakterií. I přesto, že od jeho objevu uplynulo více než čtyřicet let, je cisplatina stále nejčastěji používaným cytotoxickým prostředkem při léčbě různých druhů nádorových onemocnění. Ovšem vývoj pokračoval dál a během těch čtyřiceti let byly objeveny stovky platnatých a platičitých kom-

plexů, které byly s většími či menšími úspěchy testovány při léčbě nádorových onemocnění [4,5]. V osmdesátých letech minulého století byla vyvinuta platinová léčiva „druhé generace“, jejichž zástupcem je karboplatina [*cis*-diamino(1,1-cyklobutan-dikarboxyláto)platnatý komplex)], jako méně toxická alternativa k cisplatině vykazující méně vedlejších efektů [6,7]. Zatímco oxaliplatina [oxaláto-1,2-diaminocyklohexan platnatý komplex] byla navržena v letech devadesátých jako další, již „třetí generace“ platinových léčiv [1,8,9]. Její hlavní předností je schopnost překonání resistence nádorových buněk vůči cisplatině a karboplatině. Kromě těchto obecně používaných léčiv je stále vyvíjena řada dalších jako například LA-12 [(OC-6-43)-bis-(acetáto)(1-adamantylamin)amminodichloro platičitý komplex] [10,11].

Ačkoliv jsou platinová cytostatika úspěšně aplikována při chemoterapii různých typů zhoubných onemocnění po více než třicet let, jejich biochemický účinek není ještě dosud zcela jasný. Dnes obecně akceptovaným názorem je, že toto léčivo indukuje své cytotoxické vlastnosti prostřednictvím vazby na buněčnou DNA a následně tak narušuje transkripci a DNA replikační mechanismy [2]. Chaney et al. [12,13,14] objevili, že cisplatina, karboplatina a oxaliplatina tvoří stejné typy aduktů na stejných místech v molekule DNA. Konkrétně, platinová cytostatika se dokáží vázat na N7 dvou sousedících guaninů anebo adeninů, přičemž daný dusík už není schopen vytvářet vazbu pomocí vodíkových můstků s dalšími bázemi, které leží ve stejném nebo protějším vláknu DNA.

Samotný účinek platinových cytostatik je velmi negativně ovlivňován mnoha různými reparačními a obrannými buněčnými mechanismy, mezi které patří exprese různých thiolových látek včetně všudypřítomného peptidu glutathionu. Velmi reaktivní -SH skupina toho tripeptidu je schopna vázat mnoho různých látek, a proto není překvapením, že ovlivňuje léčbu různých onemocnění včetně zmíněných nádorových [15,17], avšak přesný mechanismus je neznámý. Proto jsme se rozhodli studovat interakce glutathionu s cisplatinou. Nejprve jsme charakterizovali základní elektrochemické chování třech různých glutathionů (redukovaného, oxidovaného a S-nitroso). Za optimálních podmínek jsme provedli *in vitro* interakční studii.

Materiál a metody

Chemikálie

Redukovaný glutathion (GSH), oxidovaný glutathion (GSSG) a S-nitrosoglutathion (GSNO) byly získán od firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP) byl zakoupen od laboratoře Molecular Probes (Evgen, Oregon, USA). Chlorid sodný, dusičnan kademnatý, dusičnan zinečnatý a ostatní použité chemikálie byly získány od firmy Sigma Aldrich. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 10 $\mu g.ml^{-1}$) byly připraveny v ACS vodě (Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při teplotě –20°C. Pracovní roztok byl připravován denně ředěním zásobních roztoků. Hodnoty pH byly měřeny s použitím WTW inoLab Level 3 (Weilheim, Německo), spojeným s osobním počítačem (Weilheim). pH-electroda (SenTix-H) byla pravidelně kalibrována souborem WTW pufrů. Všechny roztoky byly před analýzou filtrovány přes teflonový filtr 0.45 μm (MetaChem, Torrance, CA, USA).

Příprava komplexu GS-Pt

GS-Pt komplex byl připraven podle práce autorů Ishikawa a Ali-Osman [18]. Ve zkratce, inkubovali jsme GSH (60 $\mu g.ml^{-1}$) s cisplatinou (30 $\mu g.ml^{-1}$) v 500 μl 100 mM fosfátového pufru pH 7.8 ve tmě při teplotě 37°C (thermostat BTV Brno) [19].

Stacionární elektrochemický systém

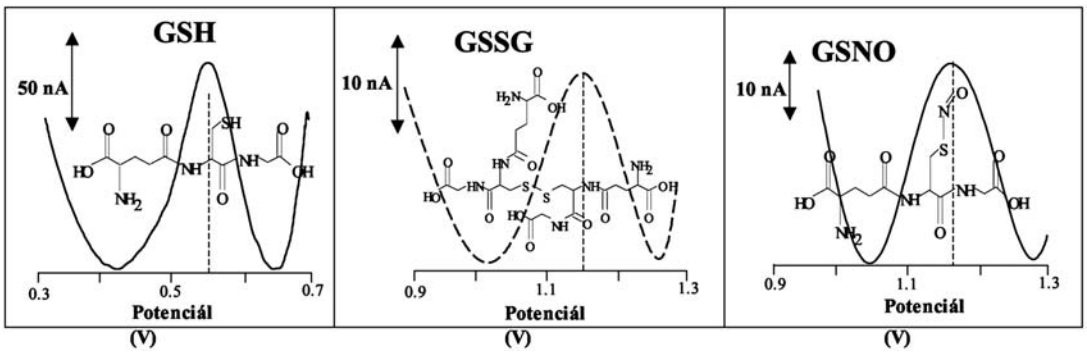
Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko). Byl použit tříelektrodový systém skládající se z uhlíkové pastové elektrody, argentochloridové elektrody (Ag/AgCl/3 $mol.l^{-1}$ KCl) jako referentní elektrody a uhlíkové tyčky jako pomocné elektrody. Analyzované vzorky byly před měřením deoxygenovány probubláním argonem (99.999%), saturovaném ve vodě po 120 s. Všechny experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Software GPES (EcoChemie) byl použit pro zpracování hrubých dat (vyhlazování, korekce na základní hladinu). Pro analýzy thiolů byla použita square wave voltametrie s následující parametry: Jako základní elektrolyt byl použit borátový pufr (pH 9.2). SWV parametry: počáteční potenciál –0.2 V, koncový potenciál 1.5 V, frekvence 200 Hz a potenciálový krok 5 mV.

Průtokový elektrochemický systém

Průtočný systém byl složen z chromatografické pumpy (Model 583 ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), Guard cely (Model 5020 ESA, USA), reakční smyčky (1 m) pro průtokovou injekční analýzu (FIA) a elektrochemického detektoru. Detektor je složen z průtočné amperometrické analytické cely (Model 5040, ESA, USA) obsahující referentní (hydrogen-paládiová), pomocnou uhlíkovou a pracovní elektrodu ze skelného uhlíku a kontrolního modulu Coulochem III, který slouží také k ovládání detektoru. Vzorek (5 μl) byl injektován manuálně. Data z detektoru byla zpracována pomocí software CSW 32.

Výsledky a diskuse

V našich experimentech jsme se primárně zaměřili na sledování oxidačních signálů redukovaného (GSH), oxidovaného (GSSG) a S-nitroso (GSNO) glutathionu na pevné uhlíkové pastové elektrodě (CPE) v přítomnosti borátového pufru jako základního elektrolytu. Zjistili jsme, že všechny námi studované glutathiony je možné pomocí CPE detekovat v koncentracích pod 1 μM. Redukovaný glutathion poskytoval oxidační signály kolem 0.56 V, oxidovaný glutathion kolem 1.16 V a nitrosoglutathion kolem 1.19 V. Pozorovaný posun potenciálů glutathionů pravděpodobně souvisí s výrazně obtížnější oxidací S-S a S-NO vazby ve srovnání s volnými -SH skupinami GSH (Obr. 1).



Obr. 1 Voltametrické signály glutathionů (10 μM).

Elektrochemická analýza glutathionů v průtokovém systému

Jak bylo popsáno výše glutathion je velmi významná biologická molekula, která ovlivňuje redoxní stav všech živých organismů. Jeho snadná, senzitivní a selektivní detekce je právě pro tyto účely velmi potřebná. Proto jsme se zaměřili na analýzu glutathionů pomocí elektrochemické detekce v průtokovém systému s pracovní elektrodou ze skelného grafitu. Ze získaných experimentálních dat bylo možné určit jako nejvhodnější průtok elektrolytu FIA kolem 1.0 $ml.min^{-1}$, kdy pozorované signály byly velmi dobře vyvinuté a symetrické.

Vliv aplikovaného potenciálu

Pro získání co nejlepší elektrochemické odpovědi bylo nezbytné navrhnout závislost výšky signálu glutathionů (30 $ug.ml^{-1}$) na aplikovaném potenciálu. V případě GSH byl pozorován nejprve velmi rychlý vzestup signálu, až do aplikovaného potenciálu 900 mV a pak signál GSH rychle snižuje. V případě GSSG a GSNO dochází k výraznějšímu vzestupu elektrochemické odpovědi od aplikovaného potenciálu 800 mV. Oxidační signál GSSG a GSNO vzrůstal až do aplikovaného potenciálu 1 300 mV. Pro další detekci jsme vybrali následující detekční potenciály: GSH 850 mV; GSSG a GSNO 1100 mV. U vyšších aplikovaných potenciálů bylo pozorováno delší ustalování základní linie, což bylo nevýhodné pro další studium glutathionů.

Vliv koncentrace glutathionů

Při takto vybraných a charakterizovaných podmínkách jsme sledovali vliv koncentrace glutathionů na získanou proudovou odpověď. Všechny závislosti vykazují nelineární závislost podobnou Langmuirovské isotermě, avšak je možné při nižších koncentracích nalézt lineární úseky závislosti. Pozorovaná nelinearita, pravděpodobně souvisí s nahromaděním zkoumaného analytu u povrchu pracovní elektrody, což mění vlastnosti elektrodové dvojvrstvy. Získané elektrochemické signály byly velmi dobře reprodukovatelné s chybou analýzy 2-5%. Nejnižší proudové odpovědi poskytoval GSSG. V koncentračním rozsahu 0.1 až 2.5 $\mu g.ml^{-1}$ byla závislost lineární ($y = 5.4816x + 0.4914$; $R^2 = 0.9939$), kdy se limit stanovení pohyboval kolem 50 $ng.ml^{-1}$. GSNO vykazoval lineární závislost na koncentraci v rozsahu 1 až 500 $ng.ml^{-1}$ ($y = 0.0052x + 0.2099$; $R^2 = 0.9957$) a limit stanovení se pohyboval kolem 300 $pg.ml^{-1}$. GSH poskytoval lineární závislost v intervalu koncentrací 0.5 až 4 $ng.ml^{-1}$ ($y = 11.315x – 0.5146$; $R^2 = 0.9969$) a limit stanovení se pohyboval kolem 100 $pg.ml^{-1}$.

Studium interakce GSH s cisplatinou

Jak je dobře známo protinádorová léčiva interagují s řadou biologicky aktivních látek, obzvláště takových, které ve své molekule obsahují –SH skupinu. V našem experimentu jsme navrhli velmi jednoduchou možnost rozlišení vazby GSH na cisplatinu. Byly vybrány koncentrace cisplatiny, které jsou běžně terapeuticky využívány (3, 15 a 30 $\mu g.ml^{-1}$). Zjistili jsme, že vytvořený GS-Pt komplex poskytuje asi o 40-60% nižší proudovou odezvu v porovnání s volným GSH. Průběh hydrodynamických voltamogramů byl také mírně odlišný. U hydrodynamického voltamogramu GS-Pt komplexu se proudová odpověď do aplikovaného potenciálu asi 750 mV zvyšovala velmi pozvolna, po té však dochází k rychlému nárůstu s maximem při potenciálu 900-950 mV. Signál GS-Pt komplexu byl asi o 50-100 mV posunutý směrem do pozitivních potenciálů. Proto bylo výhodné monitorovat vzniklý GSH-Pt komplex při potenciálu 950 mV. Ze získaných výsledků je zřejmé, že během 20 h interakce při 37°C došlo k poklesu signálu o více jako 40% a po více jako 60 h lze předpokládat, že při daných experimentálních podmínkách došlo k vytvoření maxima GS-Pt komplexu. Tvorba komplexu byla navíc monitorována spektrofotometricky jako změna absorbance při 280 nm. Získané spektrofotometrické výsledky vykazovaly obdobný průběh závislosti, jako v případě elektrochemické detekce.

Závěr

Elektrochemická detekce představuje alternativní možnost pro stanovení biologicky významných látek. Navíc, jak je ukázáno, je velmi vhodná pro studium interakce mezi takovými látkami a léčivy.

Poděkování
Příspěvek vznikl za podpory grantů LPR 2006, RASO 2007, GAAV IAA401990701, MSM 6215712402 a INCHEMBIOL 0021622412.

Literatura

1. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. Mol Cancer Ther. 2002;1(3):227-35.
2. Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Perez JM. Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. Curr Med Chem. 2003;10(3):257-66.
3. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. Nature. 1965;205:698-9.
4. Wong E, Giandomenico CM. Current status of platinum-based antitumor drugs. Chem Rev. 1999 Sep;99(9):2451-66.
5. McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, et al. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. N Engl J Med. 1996 Jan 4;334(1):1-6.
6. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. J Clin Oncol. 1999;17(1):409-22.
7. See HT, Freedman RS, Kudelka AP, Burke TW, Gershenson DM, Tangjitgamol S, et al. Retrospective review: re-treatment of patients with ovarian cancer with carboplatin after platinum resistance. Int J Gynecol Cancer. 2005;15(2):209-16.
8. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, Corner GA, Aranes MJ, Nicholas C, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. Brit J Cancer. 2004;91(11):1931-46.
9. Grothey A, Goldberg RM. A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. Expert Opin Pharmaco. 2004;5(10):2159-70.
10. Kozubik A, Horvath V, Svihalkova-Sindlerova L, Soucek K, Hofmanova J, Sova P, et al. High effectiveness of platinum(IV) complex with adamantylamine in overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro. Biochem Pharmacol. 2005;69(3):373-83.
11. Zak F, Turanek J, Kroutil A, Sova P, Mistr A, Poulova A, et al. Platinum(IV) complex with adamantylamine as nonleaving amine group: Synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity against a panel of cisplatin-resistant cancer cell lines. J Med Chem. 2004;47(3):761-3.
12. Page JD, Husain I, Sancar A, Chaney SG. Effect of the diaminocyclohexane carrier ligand on platinum adduct formation, repair, and lethality. Biochemistry. 1990;29(4):1016-24.
13. Chaney SG, Campbell SL, Temple B, Bassett E, Wu YB, Faldu M. Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. J Inorg Biochem. 2004;98(10):1551-9.
14. Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. Mutat Res-Fund Mol M. 2001;478(1-2):1-21.
15. Kasparkova J, Novakova O, Vrana O, Intini F, Natile G, Brabec V. Molecular aspects of antitumor effects of a new platinum(IV) drug. Mol Pharmacol. 2006 Nov;70(5):1708-19.
16. Ramos-Lima FJ, Vrana O, Quiroga AG, Navarro-Ranninger CN, Halamikova A, Rybnickova H, et al. Structural characterization, DNA interactions, and cytotoxicity of new transplatin analogues containing one aliphatic and one planar heterocyclic amine ligand. J Med Chem. 2006 Apr;49(8):2640-51.
17. Brabec V, Kasparkova J. Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. Drug Resist Update. 2002 Jun-Aug;5(3-4):147-61.
18. Ishikawa T, Aliosman F. Glutathione-Associated Cis-Diamminedichloroplatinum(Ii) Metabolism and Atp-Dependent Efflux from Leukemia-Cells - Molecular Characterization of Glutathione-Platinum Complex and Its Biological Significance. J Biol Chem. 1993 Sep 25;268(27):20116-25.
19. Arner ESJ, Nakamura H, Sasada T, Yodoi J, Holmgren A, Spyrou G. Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. Free Radic Biol Med. 2001 Nov 15;31(10):1170-8.

254 Studium obsahu metalothioneinu v buňkách zhoubných nádorů.

Fabrik I.[1,2], Húska D.[1], Adam V.[1,2], Binková H.[3], Horáková Z.[3], Thotová E.[3], Salzman R.[3], Eckschlager T.[4], Kizek R.[1]
1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
2) Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
3) Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Brno
4) Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. lékařská fakulta, Univerzity Karlovy v Praze
Korespondenční autor: René Kizek, Ústav chemie a biochemie MZLU v Brně • e-mail: kizek@sci.muni.cz

Klíčová slova: *Metalothionein – Zhoubné nádory v oblasti hlavy a krku – Diferenčně pulzní voltametrie – Brdičkova reakce – Spinocelulární karcinom*

Úvod

Metalothionein je malý, termostabilní metaloprotein, o molekulové hmotnosti mezi 6 a 7 kDa, přičemž asi 30% jeho obsahu tvoří cystein. Konkrétně obsahuje 20 molekul cysteinu a v jeho struktuře se nevyskytuje žádná aromatická aminokyselina. Právě cystein propůjčuje metalothioneinu jeho zásadní vlastnosti, totiž vázat ionty těžkých kovů. MT je rozdělen na dvě domény (α, β) přičemž první z nich je schopna vázat 3 ionty těžkého kovu a druhá 4 dvouvazné ionty [1]. Díky tomu může vykonávat v organismu svoji funkci významného přenašeče kovů, zejména zinku [2]. Vysokou afinitu má ale také ke kadmiu a rtuti [3], jejichž vyvázáním v případě intoxikace udržuje homeostázu. Předpokládá se, že komplexy MT a těžkých toxických kovů jsou degradovány v ledvinách. Svoji ochrannou úlohu hraje i při oxidativním stresu buněk [4]. Nejen proto je pozorován jeho zvýšený obsah právě v nádorových buňkách, kde chrání jejich buněčný aparát. Metalothionein (MT) se vyskytuje v celé živočišné říši a i vyšší rostliny syntetizují obdobné metaloproteiny [5]. Orgány s největším obsahem MT u živočichů jsou játra, ledviny, slinivka a střevo a jeho množství se může lišit v závislosti na druhu, stáří, stravovacích návycích a mnoha dalších komplexních faktorech. Schopnost vázat těžké kovy se ukazuje jako zásadní při léčbě nádorů cytostatiky, zejména cisplatině [6]. MT dokáže část podaného léku vyvázat a tím snížit jeho účinnost [7].

Materiál a metody

Pro naši studii jsme zvolili vzorky tumorové tkáně z oblasti hlavy a krku od pacientů z ORL kliniky FN sv. Anny v Brně. Jednalo se o převážně o spinocelulární karcinomy laryngu, orofaryngu, hypopharyngu, vedlejších dutin nosních a kůže. Vzorky byly ihned zamraženy na –20°C až do doby jejich dalšího zpracování. Celkově bylo analyzováno 49 vzorků tumorózních tkání od 41 mužů a 8 žen, konkrétně 21 případů zhoubného nádoru střední části hltanu (průměrný věk 60,9 let), 21 případů zhoubného nádoru hrtanu (průměrný věk 64,3 let), 4 případy zhoubného nádoru dolní části hltanu (průměrný věk 49,5 let), 3 případy zhoubného nádoru vedlejší dutiny nosní (průměrný věk 64,7 let). Rozsah primárního onemocnění, přítomnost lokoregionálních nebo vzdálených metastáz byly stanovena TNM klasifikací, dále byl sledován stupeň diferenciace nádoru.

Příprava vzorků

Vzorky tumorozní tkáně nejprve byly homogenizovány a zředěny 1 ml fosfátového pufru (pH 7). Následně byly 15 minut denaturovány při 100°C v termobloku (Eppendorf 5430, USA) a centrifugovány při 16 000 ot/min a 4°C celkem 30 minut (Eppendorf 5402, USA). Díky svojí termostabilitě zůstává i po denaturaci metalothionein přítomen v roztoku. Poté byl odebrán supernatant a 1 000x zředěn, opět fosfátovým pufrem (pH 7) a změřeny námi upraveným postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenčí pulzní voltametrií (DPV). Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μl.

Eletroanalytické stanovení metalothioneinu metodou AdTS DPV s použitím *Brdičkovy reakce*

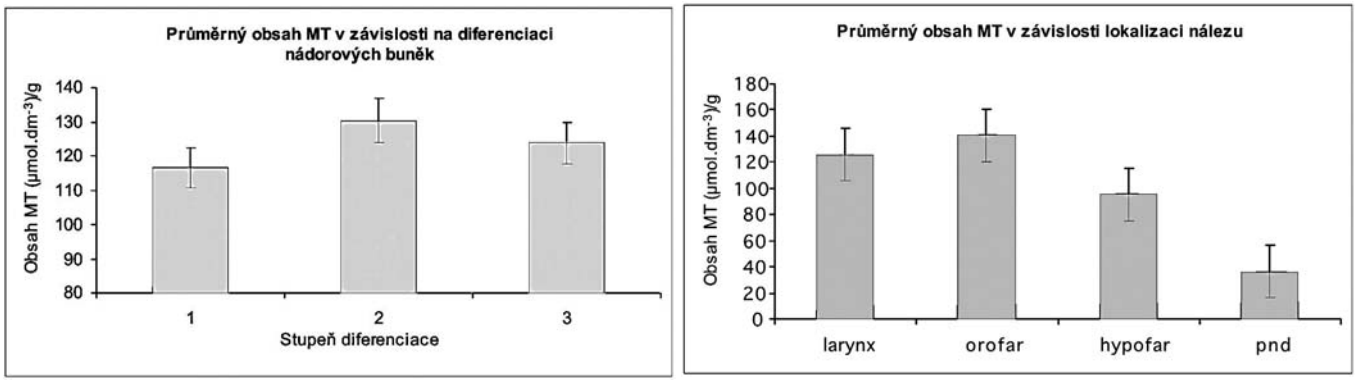
Analýza probíhala na přístroji Autolab Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA – Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Jako pracovní elektroda byla použita visící kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm^2; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocná grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 mmol.dm^{-3} $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ a amonný pufr; NH_3(aq) a NH4Cl o pH 9,6) byl měněn každých 5 měření. AdTS DPV byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál –0,6 V, konečný potenciál –1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, E_{ads} = 0 V, teplota elektrolytu 4°C.

Výsledky a diskuse

Rizikové faktory pro vznik nádorů v oblasti hlavy a krku jsou dnes již dobře známy. Jsou to zejména kouření a pití alkoholických nápojů, zvláště destilátů. Léčba pacienta postiženého rakovinou v oblasti hlavy a krku se odvíjí od stádia nádoru. Časná stádia jsou léčena chirurgicky nebo radioterapií, případně obojím. U pokročilejších stadií se jako další modality využívá chemoterapie. Zde figurují preparáty, které právě MT váže a snižuje tak zasažení nádorových buněk a celkově účinnost léčby.

Analýza MT

Elektrochemická analýza MT představuje jeden z vhodných analytických nástrojů pro detekci v biologických vzorcích [9]. V současnosti prakticky neexistuje žádná vhodná analytická metoda pro rutinní stanovení MT. Téměř všechny klinické studie jsou založeny na imunohistochemickém stanovení za použití různých protilátek proti MT, případně detekce hladiny mRNA za využití technik molekulární biologie. Nedávno bylo ukázáno, že pro citlivé stanovení MT Brdičkovou reakcí je výhodné provádět měření za snížené teploty v rozmezí 5-10°C. My jsme v našich experimentech metodou AdTS a DPV tento výsledek potvrdili [10]. Na získaných voltamogramech jsou pozorovatelné signály vzniklého komplexu MT s ionty kobaltu (RS_2Co) a typické katalytické signály Cat1 a Cat2 [11]. Katalytický signál Cat2 se s klesající koncentrací MT lineárně snižoval (y_{Cat2} = 0,6616x + 10,211; R^2 = 0,9955).



Obr. 1

Průměrné koncentrace MT v závislosti na diferenciaci buněk a v závislosti na lokalizaci nálezu. Měřeno AdTS DPV metodou, Brdičkovou reakcí, doba akumulace 120 s, další podrobnosti jsou uvedené v sekci Metody a materiál.

Obsah MT ve zhoubných nádorech

Námi zjištěný průměrný obsah MT v nádorových tkáních byl v rozmezí 30-180 µmol.dm^{-3} na 1 g zhoubného nádoru. V závislosti na stupni diferenciace byl nejvyšší obsah MT zjištěn u pacientů s G2, nejnižší obsah u pacientů s G1 (Obr. 1). Ověřili jsme, že obsah MT je závislý i na postižené oblasti konkrétně nejvyšší koncentrace byly zjištěny v tumorových tkáních pacientů s nádorovým onemocněním oropharyngu (140-160 µmol.dm^{-3} na 1 g vzorku) a nejnižší v tkáních pacientů s nádorem vedlejší dutiny nosní (30-50 µmol.dm^{-3} na 1 g vzorku) (Obr. 1). Hladina MT kolísala také v závislosti na stádiu nádorového onemocnění. Nejvyšší koncentrace byly zjištěny ve stadiu I nádoru (130-150 µmol.dm^{-3} na 1 g vzorku) a předběžné výsledky ukazují na klesající tendenci u pozdějších stádií nemoci.

Závěr

Zjištěné výsledky potvrzují, že je výhodné dále se zabývat vztahem MT ke zhoubným nádorům a pokračovat ve snahách o objasnění jeho funkce v metabolismu nádorových buněk.

Poděkování

Práce byla podporována výzkumnými projekty Ligy proti rakovině Praha 2006 a Během Terryho Foxe 2007.

Literatura

1. Kizek R, Vacek J, Adam V, Vojtesek B. Vztah metalothioneinu k rakovine a protinadorove lecbe. Klin. Biochem. Metab. 2004;12:72-78.
2. Strouhal M, Kizek R, Vecek J, Trnkova L, Nemec M. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast Yarrowia lipolytica. Bioelectrochemistry 2003;60(1-2):29-36.
3. Adam V, Petrlova J, Potesil D, et al. Study of metallothionein modified electrode surface behavior in the presence of heavy metal ions-biosensor. Electroanalysis 2005;17(18):1649-1657.
4. Potesil D, Petrlova J, Adam V, et al. Simultaneous femtomole determination of cysteine, reduced and oxidized glutathione, and phytochelatin in maize (Zea mays L.) kernels using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Chromatography A 2005;1084(1-2):134-144.
5. Adam V, Zehnalek J, Petrlova J, et al. Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy-metal ion biosensor. Sensors 2005;5(1-2):70-84.
6. Blastik O, Petrlova J, Adam V, et al. Interakce metalothioneinu s tezkymi kovy a protinadorovymi lecivy zalozenych na bazi platiny. XXIX. Brnenske onkologicke dny 2005, Brno, Ceska republika: 108-110.

7. Prusa R, Svoboda M, Blastik O, et al. Increase in content of metallothionein as marker of resistence to cisplatin treatment. Clinical Chemistry 2006;52(6):A174-A175.
8. Petrlova J, Potesil D, Zehnalek J, et al. Cisplatin electrochemical biosensor. Electrochimica Acta 2006;51(24):5169-5173.
9. Petrlova J, Blastik O, Adam V, et al. Detekce zeptomolarnich hladin metalothioneinu chronopotenciometrickou rozpousteci analyzou na rtutove elektrode. XXIX. Brnenske onkologicke dny 2005, Brno, Ceska republika: 111-113.
10. Blastik O, Svoboda M, Prusa R, et al. Overeni senzitivity elektrochemickeho stanoveni metalothioneinu jako potencionalniho markeru nadorovych onemocneni. Dny diagnosticke, prediktivni a experimentalni onkologie 2005, Olomouc, Czech republic: 35-36.
11. Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Klejdus B, Havel L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins. Chem. Listy 2004;98(4):166-173.

255 Hladina metalothioneinu v melanomech.

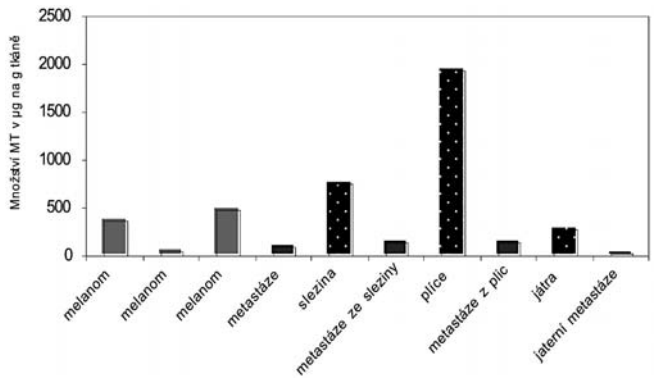
Šobrová P.[1], Adam V.[1,2], Fabrik I.[1,3], Křížková S.[1], Kukačka J.[4], Průša R.[4], Strnádel J.[5,6], Horák V.[5], Kizek R.[1,*]

1) Ústav chemie a biochemie
2) Ústav výživy zvířat a pícninářství, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
3) Katedra biochemie, Masarykova univerzita, Brno
4) Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně
5) Laboratoř biologie nádorů, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Liběchov
6) Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze
**) Korespondenční autor: kizek@sci.muni.cz*

Klíčová slova:
Metalothionein – melanom – metastáza – krevní sérum a plasma – adsorptivní přenosová technika – diferenční pulzní voltametrie

Úvod

Maligní melanom vzniká maligní přeměnou melanocytů, buněk neuroektodermálního původu, které se vyskytují především v kůži, v duhovce a spojivce, méně ve sliznicích. Tyto melanocyty jsou uloženy ve spodní vrstvě pokožky a vytvářejí hnědé barvivo zvané melanin. Melanin je odpovědný za barvu kůže. Mateřská znaménka jsou příkladem seskupení mnoha melanocytů dohromady. Nejčastěji se vyskytují kožní formy melanomu. Slizniční melanomy jsou vzácné. Rizikovým faktorem pro vznik maligního melanomu vznikajícího nejčastěji z plošného pigmentového névu je expozice UV záření, zejména jeho UVB složce. Nárazové intenzivní opalování (především v dětství) vedoucí k popálení kůže a solární dermatitidě tak zvyšuje pravděpodobnost výskytu melanomu. I když maligní melanom vzniká z mateřských znamének jen někdy, vzrůstá při jejich vyšším počtu úměrně i riziko vzniku tohoto nádoru. Familiární výskyt melanomu (u zhruba 10% pacientů) ukazuje rovněž na vliv genetických faktorů při vzniku tohoto nádorového onemocnění.



Obr. 1
Množství MT v melanomech a metastázách u miniaturních prasat linie MeLiM

Melanom metastazuje lymfogenně i hematogenně, ve většině případů se však metastázy objeví nejprve v regionálních uzlinách nebo lymfatikách ve směru k regionální uzlinové oblasti. Značnou afinitu má melanom ke kůži a podkoží. I vzdálený rozsev je často po dlouhou dobu omezen pouze na výskyt kožních a podkožních metastáz, jichž může být i několik desítek až stovek, bez viscerální diseminace.

Zlom při progresi onemocnění se dostaví až při rozvoji plicních, jaterních nebo mozkových metastáz. Základní a jedinou vskutku účinnou léčbou je chirurgický výkon, jehož kurativní možnosti jsou však omezeny pouze na časné a lokalizované fáze

onemocnění. Radioterapie je s ohledem na radiorezistenci melanomu používána zřídka a jen jako paliativní zákrok Chemoterapie vykazuje velmi malou účinnost s příznivým efektem trvajícím jen několik měsíců [2,10].

V několika studiích byla ukázána souvislost mezi hladinou metalothioneinu (MT) a progresí zhoubného nádoru [3,4]. Naše experimentální práce se zabývá studiem MT v lidském a prasečím melanomu, v lidském krevním séru a ve stabilních buněčných liniích derivovaných z lidských melanomů. Jak nejnovější výzkum naznačuje, hladina MT může souviset s průběhem nádorového onemocnění. Objev MT je datován rokem 1957, kdy Margoshes a Valee izolovali MT z koňských ledvin [5]. MT patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů (obsah cysteinu až 30% v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti 6-10 kDa [6,7]. Metalothioneiny se skládají ze dvou vazebných domén α a β, které jsou složeny z cysteinových klastrů. N-terminální část peptidu je označena jako β-doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty; C-terminální část peptidu (α-doména) má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem 12 atomů [8].

Materiál a metody

Biologické vzorky

Melanomové nádorové linie byly získány z Masarykova onkologického ústavu v Brně. Konkrétně se jednalo o linie primárního melanomu wM4, wM9 a metastatické melanomové linie wM12, wM15. Tyto linie jsou považovány z hlediska jejich chování *in vitro* za stabilní. Melanomy byly získány z miniaturních prasat linie MeLiM (Ústav živočišné fyziologie AV ČR, v.v.i. v Liběchově). Pro naše analýzy byly použity vzorky melanomů z kůže a z orgánů postižených metastázami (jater, sleziny a plic).

Byla získána séra od pacientů léčených pro melanom ve FN Motol. Krevní séra byla ihned zmražena na –20°C do doby jejich dalšího zpracování.

Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení

Ze získaných vzorků bylo odebráno 100 μl a denaturováno 15 min. při 99°C v termobloku. Zde bylo využilo termostability metalothioneinu, který zůstal zachován v nativní formě ve vzorku. Po centrifugami byl oddělen supernatant od sedimentu a vzorky byly 1000x zředěny fosfátovým pufrem o pH=7 a analyzovány námi upraveným postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulzní voltametrií (DPV). Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μl.

Vzorky z melanomů, metastáz a buněčných linií byly ještě předem mechanicky zhomogenizovány po zmražení kapalným dusíkem a pro jejich převedení do roztoku byl přidán 1 ml fosfátového pufru o pH = 7. Vzorky se pak denaturovaly, centrifugovaly a dále analyzovaly stejným postupem jako v případě vzorků krve a krevního séra.

Elektroanalytické stanovení metalothioneinu pomocí Brdičkovy reakce metodou adsorptivní přenosové rozpouštěcí techniky ve spojení s diferenční *pulsní voltametrií*

Vzorky byly analyzovány na přístroji AUTOLAB Analyser (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda (HMDE) s plochou kapky 0,4 mm^2; referentní elektrodou byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. Základní elektrolyt (1 $mmol/dm^3$ amonný pufr; $NH_3(aq) + NH_4Cl$ (Sigma Aldrich, ACS), pH = 9,6) byl po každých 5 analýzách vyměněn. Parametry adsorptivní přenosové rozpouštěcí techniky ve spojení s diferenční pulsní voltametrií (AdTS DPV) byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál –0,6 V, konečný potenciál –1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, Eads = 0 V, teplota 4°C.

Výsledky a diskuse

V práci jsou popsány experimentální výsledky stanovení obsahu MT v jednotlivých biologických vzorcích. Stanovili jsme množství MT v suspenzích z lidských melanomových buněčných linií, dále jsme sledovali MT u zvířat a následně jsme povedli stanovení MT v lidském séru a plazmě pacientů s nádorem v oblasti hlavy a krku.

Detekce metalothioneinu v melanomových nádorových linií

Byly porovnávány buněčné linie primárního melanomu a též metastatické melanomové linie. Jako použité vzorky sloužily stabilní buněčné linie kultivované v Masarykově onkologickém ústavu v Brně. Tyto vzorky byly připraveny pro analytické stanovení a naředěny na počty buněk 600 000, 100 000, 10 000 a 500 buněk v 1 ml. Bylo pozorováno, že největší odezvu signálů dává počet buněk 100 000 s limitem detekce 500 buněk/ml. Vyšší počty buněk při stanovování vykazovaly již známky vysoké saturace elektrody. Pomocí elektrochemické analýzy bylo detekováno množství metalothioneinu u jednotlivých linií. Stanovené množství se u jednotlivých linií lišilo koncentrací, která byla v rozmezí od 6,16 – 11,2 μmol/l. Nejnižší množství bylo stanoveno u metastatické melanomové linie wM12 a to 4.16 μmol/l a nejvyšší u linie melanomů wM4, kde byla koncentrace 11.2 μmol/l.

Detekce metalothioneinu v melanomech u zvířat

Při stanovování množství metalothioneinu v živočišných tkáních byly použity primární kožní melanomy a vzorky z vnitřních orgánů (játra, plíce, slezina) s metastázami odebrané od miniaturních prasat linie MeLiM. U vzorků z vnitřních orgánů bylo porovnáváno množství MT přímo v metastázách a rovněž v okolní zdravé tkáni. Bylo zjištěno, že hladina metalothioneinu v melano-

mu se pohybovala převážně v hodnotách 400 – 500 μg/g tkáně. Při porovnávání hladiny metalothioneinu v metastázách a v okolní zdravé tkáni bylo zjištěno, že hladina v metastázích je až 12 x nižší. Pravděpodobně v metastatických buňkách došlo k výrazným biochemickým změnám, které souvisejí se syntézou MT. Toto snížení je i znát mezi poměrem zdravé tkáně a velmi rozsáhlého melanomu, kdy je tento rozdíl zhruba pětinásobný. Nejvyšší množství metalothioneinu bylo stanoveno v plicích, kde se hodnota pohybovala okolo 1950 μg/g, dále ve slezině 756.1 μg/g a v játrech 281.0 μg/g.

Detekce metalothioneinu v lidské **plné krvi a krevním séru**

Pro naše účely jsme získaly vzorek plné krve a krevního séra odebrané ze stejného jedince a ve stejném čase. Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v sekci „Materiál a metody“. Nejdříve jsme studovali změny elektrochemických signálů MT v závislosti na teplotě základního elektrolytu. Pozorovaný analytický signál se zvyšuje v závislosti na snižující teplotě (asi o 3% výšky píku na°C), navíc je reprodukovatelnost měření velmi dobrá a chyba stanovení klesá pod 5%. Z těchto důvodů je velmi výhodné provádět analýzy MT při teplotách v rozmezí 5-10°C. Významným ukazatelem detekce MT je také doba akumulace na povrch pracovní elektrody. V našich experimentech jsme potvrdili, že doba akumulace 120 s je nejvhodnější pro analýzu krevních vzorků, pravděpodobně pro výhodné pokrytí povrchu pracovní elektrody. Z řady našich experimentálních výsledků jsme zjistili, že správné ředění biologického vzorku výrazně ovlivňuje stanovení MT. V našem experimentu jsme provedli ředění lidského krevního séra i plné krve (10, 100, 1 000 a 10 000 x fosfátovým pufrem). V případě obou námi testovaných vzorků jsme zjistili, že nejvhodnější je ředění krevních vzorků 1000 x. Zde byl nalezen velmi dobře vyvinutý signál použitelný pro běžné analýzy. Dále byl pozorovatelný rozdíl v obsahu MT v krevním séru a plné krvi. Ten je způsoben přítomností MT v erytrocytech, kde se účastní ochrany buněk před oxidačním stresem a také udržování iontové rovnováhy.

Detekce metalothioneinu v krevním séru u pacientů s melanomem

Nejčastěji se vyskytují kožní formy melanomu. Slizniční melanomy jsou vzácné. Incidence melanomu celosvětově u bělošské populace v posledních desetiletích trvale stoupá u mužů i u žen. Proto je této malignitě věnována značná pozornost. Byl studován vztah mezi zvýšenou hladinou MT a výrazně horší prognózou. V naší studii jsme při stanovování hladiny metalothioneinu a porovnávání výsledků zjistili, že hladina MT byla u všech pacientů s melanomem zvýšená v porovnání s kontrolní skupinou (0.6 μmol/l). Průměrná hladina MT u pacientů s nádorem je 1.97 μmol/l. U tří pacientů byl obsah MT vyšší než 1 μmol/l a u dvou pacientů přesáhla hladina MT 2 μmol/l.

Závěr

Získané experimentální výsledky naznačují, že studium hladiny metalothioneinu je nejen zajímavé z hlediska obecného poznání jeho vztahu k malignímu melanomu, ale přináší i nové poznatky pro pochopení léčebné odpovědi u tohoto typu nádorového onemocnění.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory grantů Liga proti rakovině Praha 2006 a Běh Terryho Foxe 2007.

Literatura

1. Lauerova L, Dusek L, Simickova M, Kocak I, Vagundova M, Zaloudik J, et al. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. Neoplasma. 2002;49(3):159-66.
2. Kavanagh D, Hill ADK, Djikstra B, Kennelly R, McDermott EMW, O'Higgins NJ. Adjuvant therapies in the treatment of stage II and III malignant melanoma. Surg J R Coll Surg Edinb Irel. 2005 Aug;3(4):245-56.
3. Sauerbrey A, Zintl F, Volm M. Expression of metallothionein in initial and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Ann Haematol. 1994;69:111-5.
4. Weinlich G, Bitterlich W, Mayr V, Fritsch PO, Zelger B. Metallothionein-overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. Brith J of Dermatol. 2003;149:535-41.
5. Margoshes M, Vallee BLA. A cadmium protein from equine kidney cortex. J Am Chem Soc. 1957;79:4813-4.
6. Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, et al. Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer lines to cisplatin. Cancer Res. 1991;51(12):3237-42.
7. Kizek R, Vacek J, Trnkova L, Klejdus B, Havel L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins. Chem Listy. 2004;98(4):166-73.
8. Kagi JHR, Schaffer A. Biochemistry of Metallothionein. Biochemistry. 1988;27(23):8509-15.
9. Zelger BWH, Sidoroff A, Stanzl U. Deep penetrating dermatofibroma vs. dermatofibrosarcoma protruberans - a clinicopathologic comparison. Am J Surg Pathol. 1994;18:677-86.
10. Klener P.: Klinická onkologie. Galén a Karolinum, 2002, 519-528

256 Elektroanalytické stanovení obsahu metalothioneinu v krvi u pacientů s karcinomy hlavy a krku.

Horáková Z.[1,*], Tóthová E.[1], Salzman R.[1], Binková H.[1], Adam V.[2], Fabrik I.[2], Šmerdová P.[1], Křičková J.[1]
1) Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice U sv. Anny v Brně
2) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně
**) Korespondenční autor: zuzana.horakova@fnusa.cz*

Úvod

Metalothioneiny (MT) patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních, na cystein bohatých proteinů o molekulové hmotnosti 6-10 kDa. MT se skládá ze dvou vazebných domén α a β, které jsou složeny z cysteinových klastrů. Sulfhydrylové zbytky cysteinů se účastní kovalentní vazby atomů kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem až 12 atomů. Lidské MT patří do I. třídy metalothioneinů a jsou kódovány rodinou genů tvořící 10 isoforem. Vzniklé proteiny jsou rozděleny do čtyř skupin: MT-1, MT-2, MT-3 a MT-4. MT-1 a MT-2 jsou exprimovány v lidském organismu ubikvitně ve velmi nízkých koncentracích. K primárním rolím MT v organismu patří udržování homeostázy zinku, detoxikace těžkých kovů a ochrana před oxidativním stresem. Exprese MT je indukovatelná mnoha exogenními a endogenními faktory jako jsou UV záření, těžké kovy, stresové hormony, volné kyslíkové radikály, mediátory zánětu, infekt, trauma nebo onkogeneze.

Recentní výzkumy podporují názor o roli MT v buněčné proliferaci a diferenciaci resp. v kancerogenezi. MT lze považovat za protein závislý na buněčném cyklu a za marker proliferace exprimovaný v S fázi buněčného cyklu. Tato teorie byla potvrzena imunohistochemickou verifikací zvýšené exprese MT u mnoha histologicky rozličných typů nádorů (prsu, tlustého střeva, ledvin, močového měchýře, plic, ovaria, prostaty, slinné žlázy, nosohltanu, hrtanu). Exprese MT většinou korelovala s vysokou proliferační kapacitou buněk, s agresivitou biologického chování nádorů, predikovala horší parametry přežití, souvisela s rezistencí na radio, resp. chemoterapii. Výsledky jednotlivých studií hodnotící míru exprese MT v nádorové tkáni i jeho vztah k histopatologickým parametům a prognose onemocnění nejsou vzájemně konsistentní. Za negativní prognostický faktor může být považován na základě publikovaných výsledků například u duktálního karcinomu prsu, malobuněčného karcinomu plic nebo maligního melanomu. Naopak snížená exprese byla popsána u hepatocelulárního karcinomu. Předpokládá se, že subcelulární lokalizace MT ovlivňuje jeho funkčnost; závisí na typu tumoru, růstové fázi, diferenciaci a apoptotickém indexu. V nenádorové tkáni dominuje cytoplasmatická lokalizace MT, v nádorové buňce naopak převažuje nukleární lokalizace MT.

Ačkoliv je MT protein převážně intracelulární, nízké koncentrace byly zjištěny také v extracelulárních tekutinách jako plasma, žluč, moč. K elevaci plasmatických koncentrací metallothioneinu dochází s rostoucím věkem, při expozici xenobiotikům, oxidativnímu stresu, u některých typů hepatopatií (primární biliární cirhosa, primární sklerotizující choangitis), akutního zánětu, autoimunních onemocnění.

Materiál a metodika

Klinický materiál

Zkoumaný soubor tvořili pacienti s maligními nádory hlavy a krku léčení na Klinice ORL a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice U svaté Anny v Brně v roce 2006. Podmínkou zařazení byla histologická verifikace dříve neléčeného maligního tumoru hlavy a krku. Vyloučeni byli pacienti s hematologickými malignitami, recidivami primárních tumorů a pacienti s duplicitami. Vzorky plné krve k analýze byly odebrány před zahájením terapie. V našem souboru bylo hodnoceno celkem 98 pacientů s verifikovanými karcinomy hlavy a krku, z nichž bylo 86 mužů a 12 žen, věkový průměr činil 62 let (medián 62±9; min 40, max 88).

Nejčastější lokalizací nádorů byl orofarynx (29), larynx (25), hypofarynx (13) a dutina ústní (12) ostatní lokalizace byly zastoupeny jen okrajově (dutina nosní a pnd -5, nasofarynx -1, slinné žlázy -3, metastázy do krčních uzlin neznámého prima -4, kožní nádory –5, parafaryngeální nádor –1).

Dle histologické klasifikace převažoval jednoznačně spinocelulární karcinom, v 89 případech. Ostatní histologické typy se vyskytovaly vyjimečně (adenokarcinom –3, velkobuněčný karcinom –1, drobnobuněčný karcinom –1, karcinom z acinárních buněk –1, bazocelulární karcinom –3).

Při rozdělení spinocelulárních karcinomů dle stupně diferenciacejsme nejčastěji nalezli typ středně diferencovaný (33) dále nízce diferencovaný (28), dobře diferencovaný (10) a nediferencovaný (5). U ostatních nebyla diferenciace stanovena.

Pokročilost onemocnění byla hodnocena dle mezinárodní TNM klasifikace. Bez ohledu na lokalitu byla většina nádorů diagnostikována až v pokročilém stadiu. (st IV- 59, st III- 19, st II- 8, st I- 8). Rovněž podle hodnot T převažovaly lokálně pokročilé nádory (T 4- 40, T 3- 23, T2-17, T 1-13). O relativně vysokém metastatickém potenciálu svědčí nádorové postižení krčních lymfatických uzlin téměř u 60% pacientů v době verifikace (N+ vs N0 : 59 vs 34). Vzdálené metastázy jsou u karcinomů hlavy a krku vzácné, vyskytly se pouze ve dvou případech.

Obecně lze říci, že v souladu s dostupnými literárními zdroji byly diagnostikovány laryngeální nádory v časnějším stadiu (T1+2 vs T3+4 : 9vs16; N 0 vs N+ : 15 vs 10; st I+II vs III+IV: 8 vs 17), narozdíl od karcinomů orofaryngu a dutiny ústní (T1+2 vs T3+4 : 13 vs 28; N 0 vs N+: 9 vs 32; st I+II vs III+IV: 3 vs 38) a zejména od karcinomů hypofaryngu (T1+2 vs T3+4: 3 vs 10; N 0 vs N+: 2 vs 11; st I+II vs III+IV: 1vs 12).

Příprava vzorků pro elektroanalytické stanovení metalothioneinu

Ze získaných vzorků plné krve bylo odebráno 100 ěl a umístěno na 15 min. při 99°C do termobloku (Eppendorf 5430, USA). Poté byly vzorky ochlazeny na 4°C a centrifugovány při 4°C, 15 000 g po dobu 30 min. (Eppendorf 5402, USA). Metalothioneiny patří k termostabilním proteinům, které zůstávají přítomné v roztoku i po jeho tepelné denaturaci. Takto připravené vzorky byly analyzovány námi upraveným postupem adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulsní voltametrií (DPV) na přístroji AUTOLAB v klasickém tříelektrodovém uspořádání. AdTS DPV parametry byly následující: čas akumulace 120 s, počáteční potenciál –0,6 V, konečný potenciál –1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, E_{ads} = 0 V, teplota 20°C. Množství analyzovaného vzorku bylo 5 μl.

Výsledky

Při analýze naměřených hodnot MT nebyla v popsaném souboru nalezena souvislost mezi koncetracimi MT a věkem ani rozdíly mezi pohlavími (muži: n=86; průměr 8,76; medián 9,40 +4,79 ženy n=12; průměr 7,53; medián 8,28±5,02) p=0,37.

Výsledky byly statisticky hodnoceny a korelovány se standardními klinickými a histopatologickými parametry.

V závislosti na lokalitách nádoru nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hladinách MT (larynx vs hypofarynx vs orofarynx vs cavum oris) p=0,95 (Kruskal–Wallis).

Vzhledem ke zcela jednoznačné převaze histologického typu spinocelulárního karcinomu nebylo možné provést validní srovnání s dalšími histologicky odlišnými malignitami.

Různé stupně diferenciace, grading, spinocelulárních karcinomů se rovněž nelišily hodnotami MT (dobře vs středně vs nízce vs nediferencovaný typ spinocelulárního karcinomu) p=0,95 (Kruskal–Wallis).

MT významně nesouvisel s pokročilostí nádorů v žádném ze srovnávaných parametrů, tj. s hodnotami T (T1+2 vs 3+4: p=0,89 Mann–Whitney; p=0,75 Kruskal–Wallis), N (N0 vs N+: p=0,98 Mann–Whitney; p=0,15 Kruskal–Wallis), ani stadiem (st I+II vs st III+IV: p=0,75 Mann–Whitney; p=0,77 Kruskal–Wallis).

lokalita	n	T1+2	T3+4	I+II	III+IV	N0	N+	MT
larynx	25	9	16	8	17	15	10	9,91±4,83
hypofarynx	13	3	10	1	12	2	11	9,22±5,16
orofarynx	29	9	20	2	27	7	22	9,79±5,19
cavum oris	12	4	8	1	11	2	10	9,06±4,87

Tab. 1: rozdělení pacientů dle lokalizace nádoru

Závěr

Na základě dostupných literárních informací hraje ve složitém procesu karcinogeneze svou zatím neúplně objasněnou roli také MT. Imunohistochemicky byla na mnoha studiích potvrzena zvýšená exprese MT u různých typů nádorů. Často jeho hodnoty korelovaly s nízkým stupněm diferenciace, pokročilostí nádorů, metastatickým šířením; tj. zvýšená exprese MT byla v těchto případech navržena za negativní prognostický faktor.

V popsaném souboru byly analogicky porovnávány hladiny MT v plné krvi se standardními, v praxi etablovanými, klinickými a patologicko-anatomickými parametry nádorů. Hypotézy a možné souvislosti mezi výše zmíněnými charakteristikami a MT se na našem souboru nepotvrdily. Koncentrace MT v krvi nekorelovala s TNM, stagingem ani gradingem nádorů. Nelišila se statisticky významně ani mezi jednotlivými lokalizacemi hlavy a krku.

Otázkou do budoucnosti zůstává možnost srovnání MT s parametry přežití (OAS a DFS) při dlouhodobějším sledování pacientů; tj. selekce pacientů s horší prognosou vyžadující rasantnější protinádorovou léčbu.

257 Použití polyklonálních slepičích protilátek pro imunochemickou detekci metalothioneinu.

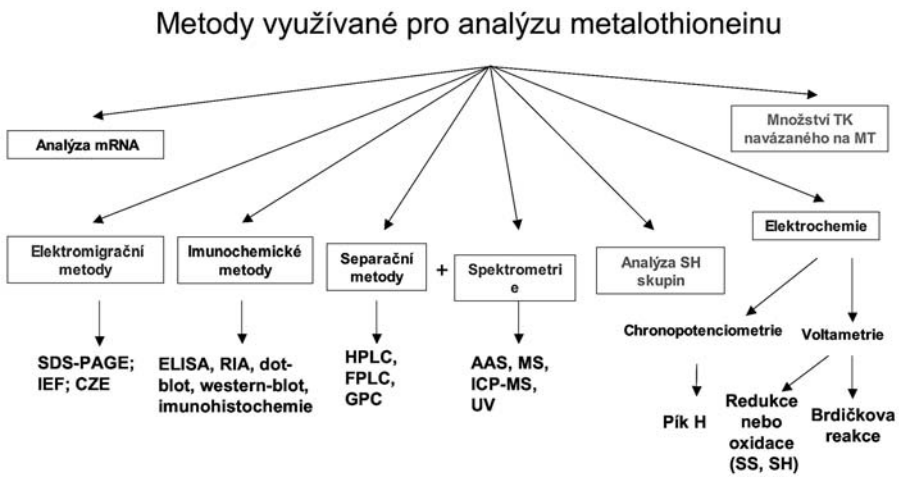
Křížková S.[1,2], Bláhová P.[1], Šobrová P.[1], Adam V.[1,2], Hodek P.[3], Stiborová M.[3], Binková H.[4], Kizek R.[1]
1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, MZLU, Brno
2) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno
3) Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha
4) Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

Klíčová slova: *Metalothionein – ELISA – Elektrochemie – Protilátky – Zhoubné nádory*

Úvod

V České Republice jsou zhoubné novotvary druhou nejzávažnější příčinou úmrtí. Podobně je tomu i ve světě. Ročně je u nás nově diagnostikováno více jak 50 tisíc případů nádorového onemocnění u lidí různého věku a polovina z nich nádorovému onemocnění podlehne [1,2]. Včasná, rychlá a senzitivní diagnostika umožní zahájit léčbu onemocnění v počátku onemocnění, což v řadě případů vede k úplnému vyléčení. Proto jsou hledány nové diagnostické postupy, které mohou včasné diagnostice nádorového onemocnění napomoci. Pro tento účel je třeba najít jasné a zřetelné ukazatele (markery), že v organismu je přítomen nebo vzniká zhoubný nádor. Naše experimentální práce se zabývá studiem metalothioneinu (MT) [3]. Jak nejnovější výzkum naznačuje, hladina MT může souviset s průběhem nádorového onemocnění. Objev metalothioneinu (MT) je datován rokem 1957, kdy Margoshes a Valee izolovali MT z koňských ledvin [4]. Metalothionein patří do skupiny intracelulárních, nízkomolekulárních na cystein velmi bohatých proteinů (obsah Cys až 30% v molekule proteinu) o molekulové hmotnosti 6-10 kDa. MT se skládají ze dvou vazebných domén α, β které jsou složeny z cysteinových klastrů. N-terminální část peptidu je označena jako β-doména, má tři vazebná místa pro dvojmocné ionty; C-terminální část peptidu (α-doména) má schopnost vyvázat čtyři dvojmocné ionty kovů. V případě jednomocných iontů kovů je MT schopen vázat celkem 12 atomů [5,6].

Pro tento účel lze využít několik metod, které se mezi sebou významně liší v citlivosti detekce, použité instrumentaci, časové a finanční náročnosti, náročnosti na personál a potenciálu pro rutinní stanovení. Pro sledování hladiny MT u velkého množství pacientů je potřebná metoda, která je rychlá, dostatečně senzitivní, nevyžaduje speciálně vyškolený personál a náročnou instrumentaci. Jednotlivé analytické přístupy jsou shrnuty ve schématu na Obr. 1.



Obr. 1: Shrnutí různých přístupů k analýze metalothioneinu

Materiál a metody

Chemikálie. Pokud není uvedeno jinak, všechny chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich, USA.

Příprava polyklonálních slepičích protilátek. Protilátky byly připraveny firmou HENA, s. r. o. Dvě slepice byly imunizovány komerčně dodávaným metalothioneinem (1 mg směsi MT 1 a MT 2, Sigma – Aldrich, USA), který byl ponechán po dobu sedmi dní při pokojové teplotě za účelem polymerace. Ze žloutků vajec byla získána frakce IgY vykazující reaktivitu proti MT. Protilátky v PBS byly stabilizovány 0,1% azidem sodným. Koncentrace proteinů v imunoglobulinové frakci byla 54,7 a 5,7 mg/ml. Dále se byla použita frakce o vyšší koncentraci proteinů.

Biologické vzorky

Vzorky R-3-2 a R-3-4 byly odebrány od pacientů léčených pro zhoubný nádor v oblasti hlavy a krku z FN u Svaté Anny v Brně. Melanomové nádorové linie – byly získány z Masarykova onkologického ústavu a to linie primárního melanomu wM4, wM9, a metastázovaného melanomu wM12, wM15. Jedná se o stabilní linie, které jsou dlouhodobě stabilizovány a kultivovány.

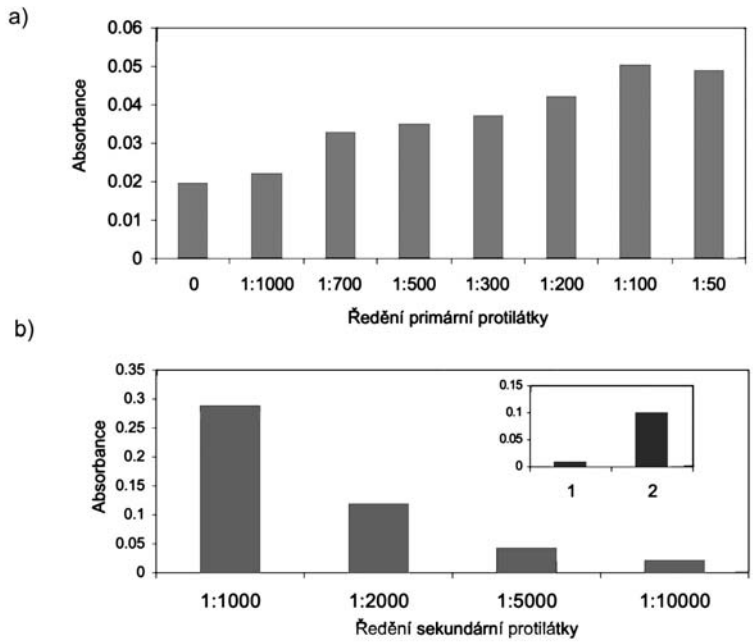
Příprava biologického vzorku

Vzorky byly mechanicky homogenizovány za snížené teploty, zcentrifugovány po dobu 30 min při 4°C, 15 000 *g* (Eppendorf 5402, USA). Většina balastních proteinů byla u obou typů vzorku odstraněna tepelnou denaturací (15 min po dobu 99°C v termobloku Eppendorf 5430, USA) a následnou centrifugací při 4°C, 15 000 *g* po dobu 15 min (Eppendorf 5402, USA). Takto připravené vzorky byly analyzovány buď pomocí adsorptivní přenosové techniky (AdTS) s diferenční pulsní voltametrií (DPV) nebo pomocí ELISA metody. 5 μl 1000x naředěného vzorku bylo analyzováno dle již dříve publikované procedury.

Imunochemické stanovení

ELISA

100 μl standardu MT nebo vzorku 10000x naředěného v 0,05M uhličitanovém pufru pH 9,6 bylo adsorbováno na polystyrenovou mikrotitrační destičku (Schoeller, Česká republika) po dobu 1h při 37°C. Volný povrch destičky byl blokován pomocí 2% (w/v) roztoku BSA v PBS pufru po dobu 14 h při teplotě 4°C. 100 ěl primární protilátky v PBS bylo aplikováno po dobu 2 h při teplotě 37°C. Konjugát sekundární protilátky s křenovou peroxidasou (králičí, proti slepičímu IgG, Sigma-Aldrich, USA) v množství 100 ěl byl aplikován po dobu 1 h při teplotě 37°C. Mezi jednotlivými kroky byly nenavázané složky odstraňovány promýváním PBS pufrem s obsahem 0,05% (v/v) Tween-20. Množství primární i sekundární protilátky bylo optimalizováno. Před aplikací chromogenního substrátu byla destička inkubována 15 min s promývacím roztokem. Substrát pro křenovou peroxidasu (0,001% (w/v) TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin) v substrátovém pufru (2 M octan sodný/kys. citronová, pH 5,8) byl aplikován v množství 100 μl. Reakce byla zastavena pomocí 50 μl 0,5M H_2SO_4. Absorbance byla měřena při 450 nm na přístroji TECAN Sunrise (Schoeller, Česká republika). Analýza každého vzorku nebo standardu byla prováděna ve dvou paralelách.



Obr. 2:
Závislost absorbance ředění primární protilátky, ředění sekundární protilátky: 1:5000, koncentrace MT: 20 ng/ml (a), změna absorbance na ředění sekundární protilátky, ředění primární protilátky: 1:200, koncentrace MT 20 ng/ml, ve výřezu: porovnání reaktivity vzorku (1) s chromogenním substrátem a (2) s primární a sekundární protilátkou (b).

Výsledky a diskuze

Za účelem ověření nepřítomnosti interferující peroxidasové aktivity ve vzorku byl vzorek inkubován s chromogenním substrátem (0,001% TMB, viz Materiál a metody). Poté, co bylo ověřeno, že vzorky vykazují dostatečně nízkou reaktivitu s TMB (viz obr. 2), byl na povrch mikrotitrační destičky adsorbován MT o koncentraci 20 ng/ml a byla aplikována různá ředění jak slepičí primární (1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:500, 1:700 a 1:1000) tak králičí sekundární protilátky (1:1000, 1:2000, 1:5000 a 1:10000). Byl sledován nárůst absorbance při 450 nm. Jako nejvhodnější kombinace bylo vybráno ředění primární protilátky 1:200 a u sekundární protilátky 1:5000 jako nejnižší ředění, při kterém je možno detekovat koncentraci 20 ng/ml MT a zároveň je dostatečně nízká absorbance u referenčního vzorku bez primární protilátky. (viz obr. 2). S těmito koncentracemi primární a sekundární protilátky byla zkonstruována kalibrační závislost ve tvaru y= 0,0002 x + 0,095 s koeficientem spolehlivosti R^2= 0,96 v rozsahu koncentrací (3 -200 ng/ml). Detekční limit metalothioneinu byl kolem 1 ng/ml.

Za těchto optimalizovaných podmínek byl stanoven obsah metalothioneinu ve vzorcích buněčné kultury melanomu a spinocleulárních karcinomů z oblasti hlavy a krku. Výsledky jsou shrnuty v tab. 1. Pro ověření metodiky bylo množství metalothi-

oneinu ve stejných vzorcích bylo stanoveno také pomocí Brdičkovy reakce, elektrochemické metody využívající katalytické vylučování vodíku na rtuťové kapkové elektrodě v přítomnosti kobaltnatých iontů (Tab. 1).

Vzorek/ Stanovení	Brdičkova reakce (μM)	ELISA (μM)
wM4	4,16	3,0
wM9	10,95	2,12
wM12	11,19	1,19
wM15	6,43	6,23
R-3-2	5,40	4,10
R-3-4	4,40	0,26

Tab. 1: Srovnání výsledků stanovení mealothioneinu obdržených pomocí ELISA a Brdičkovy reakce

Námi dosažený limit detekce 1 ng/ml je srovnatelný s jinými ELISA metodami pro detekci MT a další optimalizací podmínek může být snížen. Srovnání výsledků obdržených pomocí Brdičkovy reakce a ELISA metody poskytuje řádově stejné výsledky. Metody se liší v limitu detekce, kdy u Brdičkovy reakce je 0,7 ng/ml. Odlišnosti ve stanovení lze vysvětlit tím, že v lidském organismu existuje deset isoforem MT 1 a jedna isoforma MT 2. Kombinace ELISA metody a elektrochemie může dát přesnější informaci o typech exprimovaných isoforem metalothioneinů, resp. o jejich podílu na výšce sledovaného katalytického signálu. Z porovnání množství vzorků, které lze změřit za den obě metody vycházejí stejně, v případě metody ELISA však délka stanovení se snižujícím se počtem vzorků výrazně neklesá, zato v případě stanovení MT pomocí Brdičkovy reakce se čas se snižujícím se počtem vzorku rapidně snižuje.

Závěr

Pomocí nově vyvinuté ELISA metody jsme stanovili koncentraci metalothioneinu ve dvou typech biologického vzorku – nádoru a nádorové buněčné linii. Toto stanovení potvrdilo výsledky získané elektrochemickou metodou, která je pro stanovení metalothioneinů v naší laboratoři rutinně používána (Brdičkova reakce). Obě metody mají potenciál pro další aplikace v určení hladiny MT ve velkém množství klinických vzorků.

Poděkování: *Práce na tomto projektu byla podpořena granty: Liga proti rakovině Praha 2006 a Běh Terryho Foxe 2007.*

Literatura

1. Abrhamova J. Národní onkologický registr. http://wwwuziscz/cz/nor/norindxhtm. 2005.
2. Jurickova L. Zhoubné nádory v roce 2003. Aktuální informace ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky. 2006(2):1-4.
3. Zelena J, Potesil D, Vacek J, Adam V, Hradecky J, Prusa R, et al. Metalothionein jako prognosticky marker nadoroveho onemocneni. Klinická onkologie. 2004;17(6):190-5.
4. Margoshes M, Vallee BLA. A cadmium protein from equine kidney cortex. J Am Chem Soc. 1957;79:4813-4.
5. Kägi JHR. Overview of metallothionein. Metallobiochemistry Part B: metallothionein and related molecules. Methods Enzymol. 1993;205:613-26.
6. Kägi JHR, Schäffer A. Biochemistry of Metallothionein. Biochemistry. 1988;27(23):8509-15.
7. Petrlova J, Potesil D, Mikelova R, Blastik O, Adam V, Trnkova L, et al. Attomole voltammetric determination of metallothionein. Electrochim Acta. 2006; in press.
8. Apostolova M, Nachev C, Koleva M, Bontchev PR, Kehaiov I. New competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of metallothionein in tissue and sera. Talanta. 1998 Jun;46(2):325-33.
9. Kizek R, Vacek J, Trnková L, Klejdus B, Havel L. Application of catalytic reactions on a mercury electrode for metallothionein electrochemical detection. Chem Listy. 2004;98(4):160-7.

258 Obsah metalothioneinu v buňkách neuroblastomu ve vztahu k rezistenci vůči platinovým cytostatikům.

Hraběta J.[1], Figová K.[1], Eckschlager T.[1], Průša R.[2], Baštík O.[3], Křížková S.[3], Adam V.[3], Cinatl J.[4], Michaelis M.[4], Kizek R.[3]
1) Klinika dětské hematologie a onkologie
2) Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2LF a FN Motol,
3) Ústav chemie a biochemie MZLU v Brně
4) Institut für Medizinische Virologie, Klinikum der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Germany

Úvod

Metalothioneiny (MT) jsou intracelulární, nízkomolekulární proteiny (6,5 kDa) bohaté na cystein. Byly poprvé popsány v roce 1957 jako proteiny vážící kadmium (Margoses and Valle, 1957). V současné době je známo 15 MT rodin a 38 MT podrodin. MT jsou strukturálně konzervativní proteiny s velkým stupněm sekvenční homologie, kterou nacházíme mezi většinou obratlovců i bezobratlých živočichů. Tyto proteiny mají klíčovou roli při udržování homeostázy iontů kovů v organismech. V buňkách jsou lokalizovány v cytoplazmě i subcelulárních organelách jako jsou mitochondrie, lysozómy a/nebo v jádře. Význam přítomnosti MT v různých buněčných kompartmentech není zcela vysvětlen. Jejich buněčná lokalizace je ovlivňována fází buněčného cyklu – MT jsou v G0/G1 fázi buněčného cyklu lokalizovány v cytoplazmě, ale v časné S-fázi jsou rychle translokovány do jádra (Nagel and Valle,1995). Zdá se, že intranukleární lokalizaci MT ovlivňuje také oxidativní stres, UV záření či expozice látkám poškozujících DNA. Z těchto důvodů se lze domnívat, že MT se mohou podílet na DNA reparativních mechanismech a/nebo chránit DNA před poškozením (Ghoshal and Jakob, 2001). MT mají neuroprotektivní účinky a významně snižují hladiny prozánětlivých cytokinů a reaktivních forem kyslíku v nervové tkáni. Geny pro MT jsou u člověka lokalizovány v oblasti 16q12-22. V současné době jsou u člověka známy 4 hlavní izoformy MT (MT I-IV), MT I je kódován 11 geny (MT I-A, -B, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K, -L a -X) a každá další izoforma MT jedním genem (MT-II A gen, MT-3 gen a MT-4 gen) (Ghoshal and Jacob, 2001). Transkripce MT genů je regulována „*Metal-regulatory transcription factor-1*“ (MTF-1). Transkripce MT je iniciována vazbou MTF-1 na „*metal responsive elements*“ v promotorové oblasti MT genu (Gunes et al, 1998). Hlavní biologickou funkcí MT je detoxikace těžkých kovů. MT vyvazují ionty kovů a charakteristickým způsobem je inaktivují nebo transportují do metabolicky neaktivních kompartmentů buňky. Významným regulačním prvkem vazebných vlastností MT je glutathion (∫-glutamyl-cysteinylglycin), který ovlivňuje oxidačně redukční vlastnosti sulfhydrylových skupin MT. Často diskutovanou otázkou je schopnost MT transportovat atomy kovů k apoenzymům a jejich aktivní zapojení do homeostázy esenciálních prvků. Schopnost MT transportovat kov do regulačních proteinů má význam v procesu karcinogeneze a pravděpodobně souvisí s inhibicí některých proapoptotických proteinů (p53, caspasa-3) (Cherian and Apostolova, 2000). MT I je exprimován v místech probíhající angiogeneze a jeho transkripce je pod kontrolou „*Vascular endothelial zinc finger 1*“ transkripčního faktoru. Snížení exprese MT I inhibuje angiogenezi v *in vitro* a i v *in vivo* modelech (Miyashita H and Sato Y 2005). V posledním desetiletí byly publikovány práce, které dokumentují význam MT u některých nádorových onemocnění. U maligního melanomu je zvýšená exprese MT spojena se zvýšeným rizikem progrese onemocnění a zkrácením celkové délky přežití. Zvýšená exprese MT u tohoto nádoru je signifikantní a nezávislý prediktivní faktor a koreluje s ostatními používanými prognostickými znaky (Clarkova stupnice, velikost nádoru, ulcerace, lokalizace, věk) (Weinlich et al, 2006). Prognosticky významné bylo zjištění exprese MT též u karcinomu prsu, jícnu, močového měchýře a některých dalších nádorů (Cherian et al, 2003, Jin et al, 2004).

Chemorezistence nádorových onemocnění je jedním z hlavních důvodů neúspěšnosti protinádorové léčby. Je známo, že na rezistenci k protinádorovým léčivům se též podílejí intracelulární thioly (glutathion, metalothioneiny). MT snižují cytotoxicitu cisplatiny a carboplatiny neutralizací Pt iontu a experimentální studie prokazují, že zvýšená exprese metalothioneinu se u některých nádorů (ependymom, ca jícnu a ORL oblasti) může podílet na rezistenci k těmto cytostatikům, ale bylo prokázáno, že snižují účinnost i některých dalších cytostatik (etoposid, 5-fluorouracil, irinotekan, BCNU) (Andrews et al, 1987; Bacolod et al, 2002).

MT jsou také důležité látky z hlediska ochrany proti radiačnímu a oxidačnímu stresu. Je tedy zřejmé, že MT se na vzniku rezistence nepodílejí pouze mechanistickým vyvázáním Pt iontu, ale i dalšími mechanizmy.

Cíle

1) Na experimentálním modelu ověřit metodu elektrochemického vyšetření buněčného MT.
2) Určit hladiny MT v neuroblastomové buněčné linii a od ní odvozené linie rezistentní k cisplatině a jejich změny po inkubaci s cisplatinou a karboplatinou.

Metoda

Buněčné linie: UKF-NB-4 (připravena z recidivy neuroblastomu vysokého rizika do kostní dřeně, s amplifikací MYCN, del1p34.2-ter, del13iso17q) a od ní odvozená linie UKF-NB-4$^{(cddp)}$ s *in vitro* navozenou rezistencí k cisplatině. Rezistence byla navozena dlouhodobou kultivací v mediu se stoupající koncentrací cisplatiny. Citlivost obou linií k cisplatině a karboplatině jsme stanovili MTT testem. IC50 cisplatiny byla téměř čtyřikrát vyšší a karboplatiny více než pětkrát vyšší u UKF-NB-4$^{(cddp)}$ než

u UKF-NB-4. Linie UKF-NB-4$^{(cddp)}$ měla na rozdíl od mateřské linie zmnožení 16q13-22, kde se nacházejí geny pro MT a neamplifikovala gen MDR-1 ani zvýšeně neexprimovala P-glykoprotein (Bedrníček et al, 2005). Rezistentní linii UKF-NB-4$^{(cddp)}$ jsme kultivovali 5 pasáží bez cisplatiny, za tu dobu tato linie neztratila svojí rezistenci k cisplatině ani karboplatině. Následně jsme přidávali cisplatinu a karboplatinu v koncentracích 0,01, 0,1 a 1,0 μg/ml, resp. 0,1, 1,0 a 10 μg/ml. Ve stejných koncentracích jsme přidali cis-platinu a karboplatinu k linii UKF-NB-4.

Elektrochemické stanovení MT: Vzorky jsme zmrazili kapalným dusíkem a homogenizovali za přidání 1 ml fosfátového pufru (pH 6,8). Po centrifugaci jsme je inkubovali 15 min při 99°C. Jako standard jsme použili MT z králičích jater (Sigma Aldrich). Analýzu jsme prováděli adsorptivní přenosovou technikou s diferenční pulzní voltametrií na přístroji AUTOLAB Analyser (Eco-Chemie) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla visící rtuťová kapková elektroda s plochou 0,4 mm^2; referenční Ag/AgCl/3M KCl a pomocnou grafitová elektroda. AdTS DPV parametry byly následující: počáteční potenciál –0,6 V, konečný potenciál –1,6 V, modulační čas 0,057 s, časový interval 0,2 s, potenciálový krok 1,05 mV/s, modulační amplituda 250 mV, Eads = 0 V, teplota 5°C.

Výsledky a diskuze

U „mateřské“ senzitivní linie UKF-NB-4 jsme neprokázali významnější vzestup metalothioneinů v žádném z časových intervalů (1 – 72 hodin) při žádné testované koncentraci cisplatiny (0,01, 0,1 a 1,0 μg/ml) ani karboplatiny (0,1, 1,0 a 10 μg/ml). U linie rezistentní k cisplatině jsme prokázali indukci metalothioneinů jak po cisplatině tak po karboplatině. Poněkud odlišná byla dynamika hladin intracelulárních metalothioneinů – po cisplatině bylo maximum jejich vzestupu mezi 6 a 24 hodinou, u karboplatiny byl vzestup rychlejší – maximum jsme prokazovali již v první hodině. Nejvyšší indukci jsme prokázali po nejnižších dávkách cisplatiny (0,01 μg/ml) a karboplatiny (0,1 μg/ml). Maximální zvýšení hladin metalothioneinů po cisplatině bylo o dva řády, po karboplatině bylo asi padesátinásobné.

Naše výsledky ukazují, že průkaz metalothioeinů v bioptickém vzorku nebude přinášet informace o rezistenci k platinovým cytostatikům, podstatnější jsou jejich změny po vystavení účinkům těchto léků. Rovněž nález nejvyšší indukce metalothioneinů nejnižšími (subterapeutickými) koncentracemi naznačuje, že vyšší dávky platinových cytostatik mohou být účinné i u nádorů se schopností exprimovat metalothioneiny. Tento paradoxní jev, kdy nejvyšší účinek na indukci tvorby metalothioneinů má nejnižší dávka cytostatika si vysvětlujeme toxickými účinky vyšších dávek, které buňky poškozují do té míry, že mají omezenou schopnost proteosyntézy.

Závěry

1) Ověřili jsme použitelnost elektrochemické metody pro stanovení metalothioneinů v buňkách.
2) Buňky neuroblastomové linie s experimentálně navozenou rezistencí k cisplatině mají zmnožení 16q13-22, kde se nacházejí geny pro MT a neexprimují P-glykoprotein ani neamplifikují gen MDR-1 (Bedrníček et al, 2005). Tato linie je rezistentní k cisplatině i karboplatině. Inkubace po dobu pěti pasáží bez cisplatiny nesnižuje rezistenci k cisplatině ani ke karboplatině.
3) Buňky neuroblastomové linie rezistentní k cisplatině mají schopnost odpovídat na expozici cisplatinou a karboplatinou zvýšením hladin MT. Tato schopnost je u linie na cisplatinu senzitivní vyjádřena podstatně méně.

Práce vznikla za podpory MŠMT VZ č. 0021620813

Literatura

1. Andrews PA, Murphy MP, et al. Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. Cancer Chemother Pharmacol 19: 149-154, 1987.
2. Bacolod MD, Johnson SP, et al. Mechanisms of Resistance to 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in Human Medulloblastoma and Rhabdomyosarcoma Molecular Cancer Therapeutics, 1:727- 736, 2002.
3. Bedrnicek J, Vicha A, et al. Characterization of drug-resistant neuroblastoma cell lines by comparative genomic hybridization. Neoplasma 52:415-9, 2005.
4. Ghoshal K, Jacob ST. Regulation of metallothionein gene expression. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 66, 357-384, 2001.
5. Gunes C, Heuchel R, et al. Embryonoc lethality and liver degeneration in mice lacking the metal- responsive transcriptional activator MTF-1. EMBO J 17:2846- 2854, 1998.
6. Cherian MG, Jayasurya A et al. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. Mutat Res 533: 201-209, 2003.
7. Cherian MG, Apostolova MD. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. Cell Mol Biol 46: 347-356, 2000.
8. Jin R, Bay BH, et al. Metallothionein 1F mRNA expression correlates with histological grade in breast carcinoma. Breast Caner Res Treat 66: 265-272, 2001.
9. Margoses M, Valle BC. A cadmium binding protein for equine kidney cortex. J Am Chem Soc, 79:4813-4814, 1957.

10. Miyashita H, Sato Y. Metallothionein 1 is a downstream target of vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1) in endothelial cells and participates in the regulation of angiogenesis. Endothelium, 12:163-70, 2005.
11. Nagel WW, Valle BL. Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells. Proc Natl Acad Sci, 92: 579-583, 1995.
12. Weinlich G, Eisendle K, et al. Metallothionein – overexpression as a highly significant prognostic factor in melanoma: a prospective study on 1270 patients. Br J Cancer 9 4: 835-841, 2006.

POZNÁMKY