Onkologie

Suppl. A
2010

www.solen.cz
ISSN 1803-5922
ROČNÍK 4.

VI. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

1.–3. prosince 2010

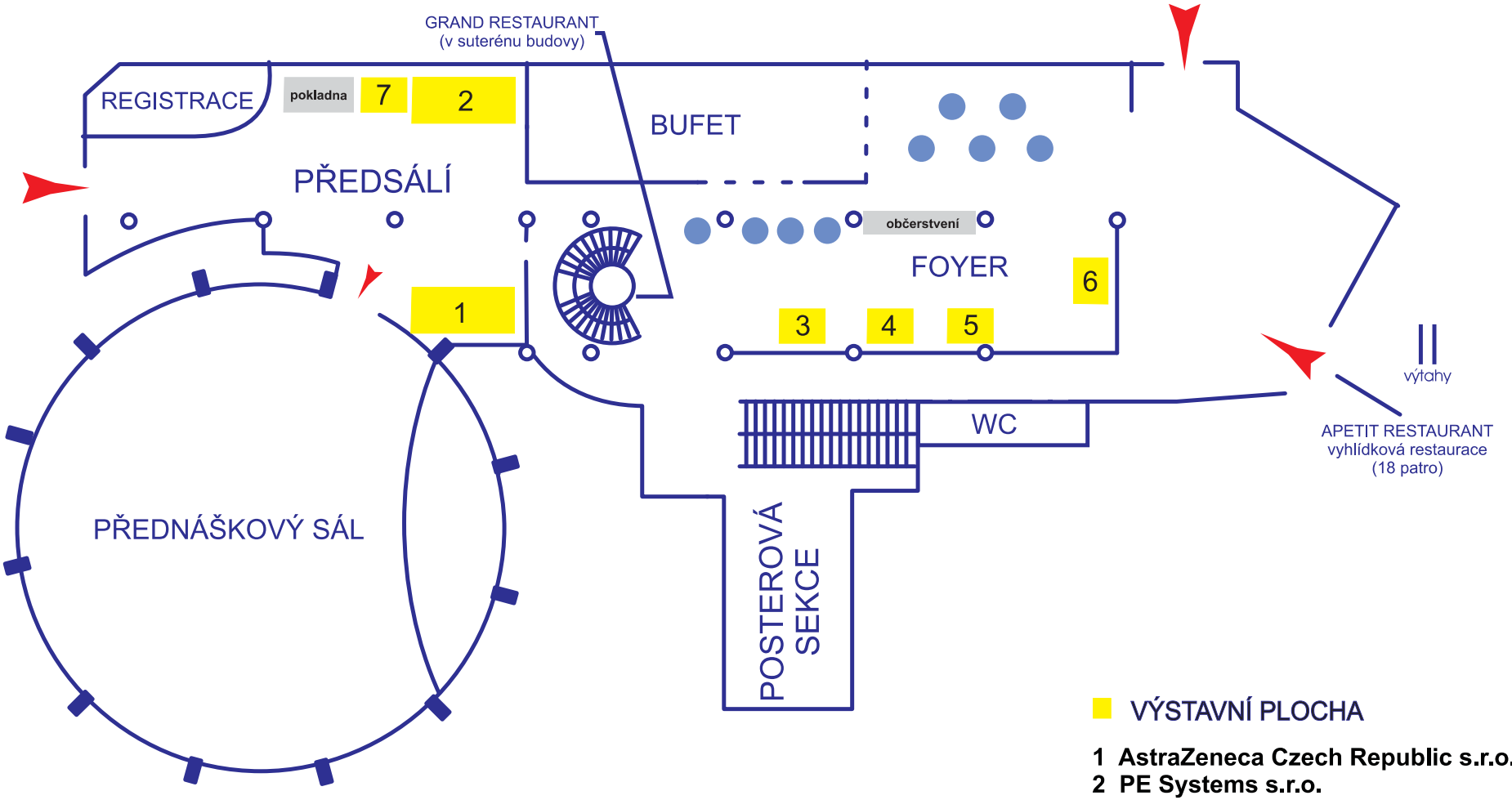
Regionální centrum Olomouc

Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti ČLS JEP, Ústav molekuální a translační medicíny LF UP a FN Olomouc, Komplexní onkologické centrum Olomouc, Nadace pro výzkum rakoviny – Rakovina věc veřejná, Sdružení Šance, společnost SOLEN

SOLEN
MEDICAL EDUCATION

Rozmístění vystavovatelů na vzdělávací akci
VI. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie

1. - 3. 12. 2010, REGIONÁLNÍ CENTRUM OLOMOUC



VÝSTAVNÍ PLOCHA

1 **AstraZeneca Czech Republic s.r.o.**
2 **PE Systems s.r.o.**
3 **ROCHE s.r.o.**
4 **INTIMEX s.r.o.**
5 **GENERI BIOTECH s.r.o.**
6 **Mary Kay**
7 **Leica Microsystems**

0 1 2 3 4 5 m

POŘADATELÉ

Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti ČLS JEP,
Ústav molekuální a translační medicíny LF UP a FN Olomouc,
Komplexní onkologické centrum Olomouc,
Nadace pro výzkum rakoviny – Rakovina věc veřejná,
Sdružení Šance – sdružení rodičů a přátel hematologicky a onkologicky nemocných dětí, o.s.,
společnost SOLEN, s.r.o.

PREZIDENT AKCE

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Ústav molekuální a translační medicíny LF UP Olomouc

ORGANIZAČNÍ VÝBOR

doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D., Ústav molekuální a translační medicíny LF UP Olomouc
MUDr. Petr Džubák, Ph.D., Ústav molekuální a translační medicíny LF UP Olomouc
RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D., Masarykův onkologický ústav v Brně
MUDr. Josef Srovnal, Ph.D., Ústav molekuální a translační medicíny LF UP Olomouc
MUDr. Marek Svoboda, Ph.D., Masarykův onkologický ústav v Brně
RNDr. Radek Trojanec, Ph.D., Ústav molekuální a translační medicíny LF UP Olomouc

ORGANIZÁTOR

SOLEN, s.r.o.
Lazecká 297/51, 779 00 Olomouc

kontaktní osoba:
Ing. Karla Břečková
tel.: 582 397 457
mob.: 777 714 677
e-mail: breckova@solen.cz

Olomouc 1.–3. 12. 2010
REGIONÁLNÍ CENTRUM OLOMOUC

Účast je v rámci celoživotního postgraduálního vzdělávání dle Stavovského předpisu č. 16 ČLK ohodnocena kredity pro lékaře, sestry, zdravotní laboranty a vysokoškolsky vzdělaný nelékařský personál.

Supplementum B časopisu **Onkologie**
Evidence MK ČR pod číslem 17305
Citační zkratka: Onkologie; 4(Suppl. A). ISSN 1803-5922
Grafické zpracování a sazba: Jan Sedláček, tel.: +420 724 984 451

Časopis je indexován v Bibliographia Medica Čechoslovaca
a v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR.

STŘEDA 1. PROSINCE / SÁL PEGASUS

13.00 Slavnostní zahájení

13.10–14.20 POKROKY V MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTICE A LÉČBĚ NÁDORŮ / Předsedající: Šmardová J., Slabý O.

- Šmardová J.: **Analýza nádorového supresoru p53 u DLBCL a MCL**
- Uldrijan S.: **Nové možnosti cíleného ovlivnění viability buněk maligního melanomu působením inhibitorů vybraných intracelulárních signálních drah**
- Slabý O.: **MikroRNA u solidních nádorů: od biomarkerů k terapeutickým cílům**
- **Diskuze**

14.20–14.35 Přestávka

14.35–16.00 PATOFYZIOLOGIE A LÉČBA NÁDOROVÝCH NEMOCÍ / Předsedající: Uldrijan S., Hraběta J.

- Megová M.: **Cytogenetické změny u glioblastoma multiforme: jejich význam v diagnostice a predikci léčby**
- Patera J.: **Vliv centrálních regulačních mechanizmů na vznik a průběh nádorových onemocnění**
- Mésarošová L.: **Inhibícia JAK/STAT signálnej dráhy ako efektívna a cielená liečba svetlobunkového adenokarcinómu obličiek**
- Hraběta J.: **Účinky reoviru na buňky mozkových nádorů v normoxii a hypoxii – studie in vitro**
- Cipro Š.: **Valproát je účinnější v hypoxických podmínkách: další důkaz pro jeho klinické testování**
- **Diskuze**

16.00–16.20 Přestávka

16.20–17.40 EXPRESNÍ ANALÝZA V MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNĚ – ZÁVĚREČNÝ WORKSHOP K PROJEKTU „POSÍLENÍ VÝZKUMNÉ INFRASTRUKTURY PRO INDIVIDUALIZACI LÉČBY CHRONICKY NEMOCNÝCH DĚTÍ", PODPOŘENÝ GRANTEM Z ISLANDU, LICHTENŠTEJNSKA A NORSKA V RÁMCI FINANČNÍHO MECHANIZMU EHP / Předsedající: Hajdúch M., Džubák P.

- **Úvod**
- Džubák P.: **Lymphocyte MDR1 expression and clinical relevance of MDR1 polymorphism in asthmatic children treated by inhaled corticosteroids**
- Špenerová M.: **Studium rezistence na kortikoidy u dětské akutní lymfoblastické leukemie**
- Srovnal J.: **DNA microarrays technologie v predikci odpovědi na glukokortikoidní terapii u pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií**
- Kollaready M.: **Characterization & Identification of Potential Tumor Resistance Mechanisms to CYC116, a novel Aurora kinase Inhibitor**
- **Diskuze**

eea grants
iceland liechtenstein norway

20.00 Společenský večer v Restauraci PODKOVA

ČTVRTEK 2. PROSINCE / SÁL PEGASUS

9.00–10.10 PROTEOMIKA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ / Předsedající: Eckschlager T., Džubák P.

- Šurinová S.: **Phased proteomics approach for biomarker discovery in colorectal cancer**
- Rylová G.: **Afinity purification coupled to mass spectometry – approach to drug target identification**
- Oždian T.: **Proteomic profile of oxaliplatin treatment in CEM lymphoblastoid cells**
- Čumová J.: **Srovnávací proteomická analýza myelomových buněk metodami SDS-PAGE/LC- MS/MS a 2-DE**
- **Diskuze**

10.10–10.30 Přestávka

10.30–11.40 PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY I. / Předsedající: Drábek J., Škarda J.

- Škarda J.: **Sledování prognostického a prediktivního významu exprese E-cadherinu a beta kateninu u nemalobuněčného karcinomu plic**
- Staněk L.: **Pilotní studie sledování exprese receptoru HER2, amplifikace genu HER2 a mutace genu KRAS jako predikce biologické léčby trastuzumabem u pacientů s karcinomem žaludku – pilotní studie**
- Koudeláková V.: **Prognostický a prediktivní význam genů C-MYC a CCND1 u pacientů s karcinomem prsu**
- Svoboda M.: **Kazuistika klinicky promptní a výrazné odpovědi na cílenou léčbu u bronchioloalveolárního plicního adenokarcinomu**
- **Diskuze**

11.40–11.50 Přestávka

11.50–12.45 PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY II. / Předsedající: Slabý O., Srovnal J.

- Drábek J.: **R462Q (G>A) polymorfizmus genu RNAseL v české populaci pacientů s nádorem a zdravých kontrol zjištěné pomocí endpoint genotyping qPCR**
- Svoboda M.: **Molekulární aspekty v etiopatogenezi, diagnostice a léčbě triple-negativního karcinomu prsu**
- Sedláková I., et al.: **Chemorezistence/chemosensitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria**
- Diskuze

12.45–13.15 Oběd

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie
reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

SATELITNÍ SYMPOZIUM MOLONKOL NA DNECH DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

Projekt „Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie", zkráceně „Molonkol" si klade za cíl vzdělat lékaře a přírodovědce v oblastech onkologického výzkumu, kde je potřeba mít souběžné znalosti: 1) o současné klinické praxi, 2) o současných možnostech molekulární onkologie, 3) o současných biostatistických a bioinformatických nástrojích a zároveň je potřeba ovládat grantové dovednosti řízení projektů a publikování výsledků v impaktovaných, anglicky psaných časopisech.

Webové stránky projektu jsou dostupné na adrese: http://www.molonkol.org/.

Aktivita projektu „Satelitní sympozium na Dnech diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie" v rámci Molonkolu přináší vyžádané přednášky národně i mezinárodně uznávaných odborníků na vybraná aktuální témata z oblasti onkologického výzkumu a vývoje.

Účastníci sympozijních prednášek obdrží studijní materiály a certifikát o účasti.

Na programu v roce 2010 budou přednášky:

13.15–15.15 SATELITNÍ SYMPOZIUM MOLONKOL NA DNECH DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE / Předsedající: Hajdúch M., Drábek J.

- Svoboda J.: **Retroviry v genetice, v patogenezi a v genové terapii**
- Šedo A.: **Anti-Oncogenic Potential of Dipeptidyl Peptidase-IV in Human Glioblastoma**
- **Diskuze**

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY.

15.15–15.20 Přestávka

15.20–16.35 MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA NÁDORŮ / Předsedající: Holubec L., Belej K.

- Eckschlager T.: **CD133+ buňky (nádorové kmenové buňky) v nádorech dětského věku – pilotní studie**
- Holubec L.: **Cytokeratines in predicting therapy response and prognosis of colorectal cancer patients**
- Benedíková A.: **Minimální reziduální choroba u pacientů s karcinomem plic – pilotní studie**
- Belej K.: **První zkušenosti s prostate cancer gene 3 (PCA3) při stanovení pooperační prognózy po roboticky asistované radikální prostatektomii**
- Ušiaková Z.: **Molekulární diagnostika cirkulujících nádorových buněk u pacientek s karcinomem prsu a její využití pro klinickou praxi**
- **Diskuze**

16.35–16.45 Přestávka

16.45–18.15 PREDIKTIVNÍ FAKTORY A LÉČIVA / Předsedající: Šmardová J., Svoboda M.

- Vykoukalová E.: **Aplikace Avastinu v MOÚ**
- Svoboda M.: **Výsledky léčby lokálně pokročilého adenokarcinomu rekta neoadjuvantní konkomitantní radioterapií a chemoterapií na bázi fluoropyrimidinů. Analýza souboru 201 pacientů léčených v MOÚ v letech 2002 až 2009. Identifikace klinicko-patologických a molekulárních prediktorů efektivity léčby.**
- Grimm J.: **5-fluorouracil v neoadjuvantní léčbě kolorektálního karcinomu**

- Frydrych I.: **2-substituované-3-hydroxychinoliny-4(1H)-karboxamidy jako potenciální protinádorová léčiva**
- Řehulka J.: **Diverse groups of tritepenoid compounds derived from betulinic acid rapidly inducing apoptosis and G2/M block**
- **Diskuze**

17.30–17.40 Ukončení konference a odevzdání ceny za nejlepší přednášku a poster

PÁTEK 3. PROSINCE / SÁL ANDROMEDA, 1. PATRO

MOŽNOSTI PODPORY VÝZKUMU A VÝVOJE PRO FIRMY V ČESKÉ REPUBLICE V OBLASTI MEDICINÁLNÍ CHEMIE A BIOTECHNOLOGIÍ – SEMINÁŘ KLASTRU MEDCHEMBIO KONANÝ V RÁMCI VI. DNŮ DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

9:30 Registrace účastníků
10:00 Zahájení semináře – Martin Fusek, MedChemBio
10:05 Úvodní slovo – náměstek hejtmana Olomouckého kraje – Ing. Pavel Horák
10:10 TAČR – podpora výzkumu a vývoje, současný stav – Martin Bunček, TAČR
10:40 Podpora pomocí „seed fondů" – Jakub Dvořáček, CzechInvest
11:10 Přestávka
11:30 Informace o programu MPO – TIP – zástupce Ministerstva průmyslu a obchodu ČR
11:50 Zkušenosti klastru CzechBio – Marek Polach, CzechBio
12:10 CzechInvest a podpora medicinální chemie – Jiří Krechl, CzechInvest
12:30 Zkušenosti Jihomoravského inovačního centra – Michal Kostka, JIC
13:00 Diskuze, závěr

Organizace semináře MedChemBio je spolufinancována z příspěvku Olomouckého kraje.

Olomoucký kraj

MedChemBio
klastr medicinální chemie a chemické biologie

Pořadatel si vyhrazuje právo na změnu programu.

POSTERY

1. **Almáši M.:** Frekvence jednonukleotidových polymorfizmů spojených s výskytem trombózy u pacientů s mnohočetným myelomem léčených thalidomidem
2. **Čížková M.:** Gene expression profiling reveals new aspects of PIK3CA mutation in ERalpha-positive breast cancer: major implication of the Wnt signaling pathway
3. **Dzian A.:** Riziko vzniku adenokarcinómu pľúc v asociácií s polymorfizmami génov GSTM1, GSTT1, GSTP1, hOGG1 a XRCC1
4. **Faltejsková P.:** Analýzy globálních profilů exprese mikroRNA u pacientů s kolorektálním karcinomem za účelem diagnostiky metastatického postižení lymfatických uzlin
5. **Gumulec J.:** Nové možnosti v laboratorní diagnostice karcinomu prostaty
6. **Héžová R.:** Význam mikroRNA v chemoprotektivním účinku fytochemikálií zeleniny rodu Brassica a jejich vliv na riziko kolorektálního karcinomu
7. **Kharaishvili G.:** Immunohistochemical analysis of collagen triple helix containing 1 protein in breast cancer patients
8. **Křížková S.:** Použití čipové kapilární elektroforézy pro detekci a studium agregace metalothioneinu v nádorových liniích a krevním séru pacientů s karcinomem prostaty
9. **Kyjovská D.:** Výsledky separací plazmatických buněk z transportovaných vzorků kostní dřeně
10. **Látalová P.:** Proteiny epitelo-mezenchymové tranzice: rozdíly v expresi Claudin1 a Snail u benigních a maligních kolorektálních nádorů
11. **Prošvic P.:** Nádory ledvin – soubor urologického oddělení Náchod
12. **Prošvic P.:** Agresivní karcinom prsu u pacienta léčeného Estracytem pro karcinom prostaty – kazuistika
13. **Rédová M.:** Analýza expresních profilů mikroRNA za účelem identifikace nových prognostických markerů časného metastazování po nefrektomii
14. **Skálová H.:** Altered expression of Her2/neu after neoadjuvant treatment of breast cancer – a case study
15. **Sztalmachová M.:** Vliv zinku na nádorové buněčné linie odvozené od karcinomu prostaty
16. **Šáňa J.:** Studium exprese vybraných mikroRNA pomocí Real-Time PCR a metylačního stavu promotoru MGMT metodou high-resolution melting u pacientů s glioblastomem
17. **Vaňásková J.:** Synchronní nádorová triplicita – karcinom ledviny, karcinom prostaty a maligní melanom, léčený vysokodávkovaným interferonem
18. **Vomáčková K.:** Využití PET-CT v plánování léčby karcinomu jícnu
19. **Dóka G.:** Sledovanie renalnej expresie mikroRNA v modeli doxorubicínom indukovanej nefrotoxicity

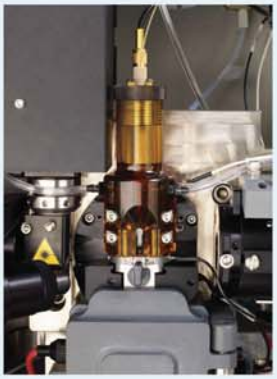
Supported by a grant from
Iceland, **Liechtenstein** and **Norway**
through the EEA Financial Mechanism
and the Norwegian Financial Mechanism

Zveme Vás na závěrečný workshop k projektu "Posílení výzkumné infrastruktury pro individualizaci léčby chronicky nemocných dětí." 1.12.2010 v 16:20 hod., RCO, sál Pegasus.

Cílem projektu je posílit výzkumnou infrastrukturu se zaměřením na výzkum farmakogenomiky u dětí a to zakoupením špičkového zařízení umožňujícího analýzu molekulárně biologických parametrů, které jsou provázány s rozvojem astmatu a dalších chronických zánětlivých onemocnění, včetně onemocnění nádorových. Jedná se jednak o vysokorychlostní průtokový cytometr vybavený sortovacím modulem, který umožnuje analýzu vybraných populací buněk podílejících se na zánětlivé a autoimunitní odpovědi a za druhé o zařízení umožňující genomickou a expresní analýzu na základě mikročipové technologie.

Výsledkem takto provedeného testování bude identifikace klíčových mechanismů rozvoje chronických dětských onemocnění a návrh stratifikace pacientů do skupin dle jejich expresního a funkčního profilu a následné přiřazení optimální terapie. Získané informace umožní optimalizaci dávkování léčiv a léčbu šitou na míru konkrétního dětského pacienta a to i po skončení projektu. Očekáváme, že se sníží výskyt nežádoucích účinků zmíněných léčiv a zvýší se kvalita života dospívajícího jedince. Řešitelem projektu je Laboratoř experimentální medicíny při Dětské klinice, LF UP Olomouc (www.lem.ocol.cz/cs/projekty).

Příjemce projektu: LF UP Olomouc
Celkové oprávněné výdaje k projektu: 933 959 Eur
z toho finanční mechanismus EHP: 793 865 Eur
Partnerem projektu je nadace Rakovina věc veřejná.
www.vecverejna.cz
Zahájení projektu: srpen 2008
Předpokládané ukončení projektu: prosinec 2010



Rakovina věc veřejná

Podpořeno grantem z Islandu, Lichtenštejnska a Norska v rámci Finančního mechanismu EHP.

POKROKY V MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTICE A LÉČBĚ NÁDORŮ

Předsedající: Šmardová J., Slabý O. – středa / 1. 12. 2010 / 13.10–14.20

Analýza nádorového supresoru p53 u DLBCL a MCL

doc. RNDr. Jana Šmardová CSc.,
Mgr. Lenka Štefančíková,
MUDr. Mojmír Moulis,
RNDr. Barbora Ravčuková,
MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.,
MUDr. Ingrid Vášová,
RNDr. Jan Mužík,
Bc. Iva Falková
Ústav patologie FN, PřF a LF MU Brno

Nádorový supresor p53 je sekvenčně specifický transkripční faktor, který se váže na DNA a řídí expresi mnoha svých cílových genů jako odpověď na buněčný stres. Reguluje apoptózu, buněčný cyklus a opravy DNA, udržuje integritu genomu. U nádorů patří p53 k nejčastěji mutovaným genům. Analyzovali jsme status p53 v nádorové tkáni 75 pacientů s difuzním velkobuněčným B lymfomem (DLBCL) a 44 pacientů s lymfomem z buněk plášťové zóny. Pomocí funkční analýzy separovaných alel v kvasinkách jsme stanovovali transkripční kompetenci proteinu p53. Zachycené mutace jsme analyzovali sekvenováním cDNA izolované z kvasinkových buněk. Hladinu proteinu p53 v nádorové tkáni jsme stanovovali imunoblotingem a ztrátu p53-specifického lokusu 17p13.3 jsme analyzovali pomocí iFISH. Celkem jsme nalezli 16 mutací p53 u DLBCL (21,3 %) a 11 u MCL (25 %). Všechny mutace byly lokalizovány v DNA-vazebné doméně. Většina mutací (13 u DLBCL a 9 u MCL) byly jednobodové záměny způsobující záměnu aminokyseliny. Dále jsme detekovali 4 krátké delece (2 u DLBCL a 2 u MCL), z nichž tři vedly k posunu čtecího rámce. U DLBCL jsme nalezli jednu mutaci, která vytvořila terminační kodon. Akumulace proteinu p53 byla u MCL spojena s přítomností mutace měnící smysl kodonu, u DLBCL jsme vysokou hladinu proteinu p53 nalezli pouze u 7 ze 13 takových případů. Deleci 17p13.3 jsme detekovali u 3 případů MCL (všechny měly mutaci p53) a 10 případů DLBCL (z nichž 6 mělo mutaci p53). Statistická analýza ukázala, že u pacientů s MCL je přítomnost mutace p53 spojena s výrazně kratším celkovým přežitím (17,6 měsíců vs. 64,8 měsíců). U DLBCL jsou aberace p53 spojeny s kratším celkovým přežitím u pacientů, u kterých se DLBCL vyvinul transformací z méně závažné formy onemocnění a u pacientů po relapsu DLBCL (37,6 měsíců vs. 79,9 měsíců). U pacientů s de novo onemocněním DLBCL je aberace p53 spojena s kratším bezpříznakovým přežíváním.

Práce byla podpořena granty MŠM 0021622415, GAČR 204/08/H054 a NR/9305-3 IGA MZČR.

Nové možnosti cíleného ovlivnění viability buněk maligního melanomu působením inhibitorů vybraných intracelulárních signálních drah

Mgr. Stjepan Uldrijan, CSc.
Biologický ústav, LF MU Brno

Incidence maligního melanomu na celém světě rychle narůstá, v některých populacích až o sedm procent ročně. Nicméně i přes tento nárůst tvoří melanom stále méně než pět procent všech kožních malignit, je však zodpovědný za přibližně 80 % úmrtí na nádory kůže. Na rozdíl od časných stadií melanomu, kdy je většina pacientů vyléčena chirurgickým odstraněním primárního nádoru, pokročilá stadia melanomu většinou neodpovídají na žádnou ze současných možností terapie a mají velice špatnou prognózu. Pravděpodobnost pětiletého přežití je u nich udávána jen okolo 6 procent a střední doba přežití je přibližně 6 měsíců.

Z nových, biologicky cílených léčebných postupů pro maligní melanom je v současné době nejintenzivněji testována možnost inhibice signální dráhy kinázy Erk, která je jednou z drah aktivovaných mitogeny (MAPK, z angl. mitogen-activated protein kinase). Tato signální dráha, která za normálních podmínek reguluje buněčnou proliferaci a přežití jako odpověď na extracelulární signály, bývá v buňkách maligního melanomu konstitutivně aktivována mutacemi v protoonkogenech N-Ras a B-Raf. Orálně podávaný inhibitor kinázy Raf Sorafenib je spolu s PLX4032, dalším inhibitorem stejné kinázy, zřejmě nejnadějnějším léčivem, které je v současné době v klinických testech pro cílenou terapii maligního melanomu. I když se zatím účinnost monoterapie sorafenibem v klinických testech nepotvrdila, předběžné výsledky klinického testování kombinací sorafenibu s různými chemoterapeutiky naznačují, že je kombinovaná léčba účinnější než použití samotných chemoterapeutik. V této souvislosti jsou velmi zajímavé nedávno publikované výsledky studie in vitro, jež naznačují, že pro dosažení maximálního účinku na pokročilá metastazující stadia melanomu bude zřejmě třeba vyřadit několik buněčných signálních drah současně. V naší experimentální práci jsme se proto zaměřili na studium účinků inhibitorů signálních drah kináz PI3K/Akt, které též často bývají v maligním melanomu aktivovány mutacemi, a kinázy p38 MAPK, jejíž význam pro vznik nebo přežití melanomu zůstává nejasný. Na modelových liniích melanomu jsme sledovali jejich růst a přežití v přítomnosti specifických inhibitorů výše zmíněných signálních drah a naše výsledky naznačují, že žádná z těchto dvou drah není sama o sobě kriticky důležitá pro přežití melanomu, neboť specifické inhibitory ovlivňují viabilitu modelových buněčných linií jen poměrně slabě. Důležité je však naše zjištění, že pokud je pro ovlivnění buněk melanomu použita kombinace inhibitorů kináz p38 a PI3K, jejich přežití se velmi výrazně snižuje. Naše další výsledky naznačují, že přinejmenším zčásti je za pozorovaný synergní účinek těchto inhibitorů zodpovědná inhibice autofagie, která podporuje přežití buněk ovlivněných inhibitorem p38 MAPK, současným působením inhibitoru PI3K. Autofagie je koordinovaný dynamický proces degradace cytoplazmatického materiálu, pomocí lysozomů a v závislosti na buněčném typu a stresovém podnětu může podporovat buď přežití buněk, nebo naopak buněčnou smrt. Zdá se, že indukce autofagie jako mechanizmus umožňující přežití buněk ovlivněných inhibitorem p38 MAPK je specifická jen pro několik málo typů nádorů, neboť v literatuře byla doposud popsána pouze u kolorektálního karcinomu a ani my jsme mimo maligního melanomu podobnou odpověď u buněčných linií pocházejících z jiných typů nádorů nezaznamenali.

Podpořeno granty Ministerstva zdravotnictví ČR (NS10236-3/2009) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (LC06077).

MikroRNA u solidních nádorů: od biomarkerů k terapeutickým cílům

RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.[1,2], MUDr. Marek Svoboda,Ph.D.[1], prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D.[2], prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.[1]

[1] Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

[2] Babákův výzkumný institut, Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, LF MU Brno

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA dlouhé 18–25 nukleotidů, které post-transkripčně regulují genovou expresi v průběhu rozličných buněčných procesů, jako jsou apoptóza nebo diferenciace, ale také onkogeneze, invazivita či metastazování. Změny v expresních profilech miRNA již byly pozorovány u většiny solidních nádorů. Mechanistické studie v nádorové buňce zase prokázaly schopnost jednotlivých miRNA vykazovat jak funkci nádorového supresoru, tak onkogenu. Tato pozorování zásadním způsobem rozšířila koncept molekulární patogeneze nádorových onemocnění a naznačila potenciál miRNA nejen jako diagnostických markerů, ale také jako potenciálních terapeutických cílů. U pacientů se solidními nádory byly úspěšně využity specifické expresní profily miRNA k predikci léčebné odpovědi na vybrané terapeutické režimy či stanovení prognózy nebo upřesnění diagnostiky u metastáz neznámého původu. Přítomnost miRNA byla prokázana také v krevním séru a plazmě, kde vykazovaly nejen extrémně vysokou míru stability, ale u vybraných solidních nádorů také velice dobré analytické vlastnosti. Příspěvek zahranuje úvod do biogeneze a funkce miRNA, význam miRNA v nádorové biologii a jejich zapojení do klíčových onkogenních signálních drah. Na základě našich vlastních výsledků potom také schopnost vybraných miRNA sloužit jako tkáňové biomarkery a potenciální terapeutické cíle u kolorektálního karcinomu, světlobuněčného karcinomu ledvin a glioblastomu.

Výzkum byl podpořen granty IGA MZ ČR NS 10361-3/2009, NS/9814-4/2008, NS 10352-3/2009, NS/11214-4/2010 a projektem MZ0MOU2005.

PATOFYZIOLOGIE A LÉČBA NÁDOROVÝCH NEMOCÍ

Předsedající: Uldrijan S., Hraběta J. – středa / 1. 12. 2010 / 14.35–16.00

Cytogenetické změny u glioblastoma multiforme: jejich význam v diagnostice a predikci léčby

Mgr. Magdalena Megová[1], RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.[1], MUDr. Ondřej Kalita, Ph.D.[2], Mgr. Vladimíra Koudeláková[1], Mgr. Lenka Stanovská[1], Bc. Eva Mikulíková[1], Mgr. Lenka Radová, Ph.D.[1], RNDr. Božena Braunerová[1], Soňa Mlčochová[1], doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1]

[1] Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc

[2] Neurochirurgická klinika FN Olomouc

Gliální nádory tvoří více jak polovinu nádorů centrální mozkové soustavy. Mezi tyto mozkové nádory se řadí vůbec nejčastější a nejmalignější nádory u dospělých, glioblastoma multiforme (GBM). Běžně se multiformní glioblastomy dělí do dvou skupin: primární, které jsou diagnostikovány tzv. de novo a vyskytují se zejména u starších pacientů okolo 60 let, a sekundární, které se vyvíjí z již zjištěných low-grade tumorů u pacientů mladších (okolo 45 let). Nejčastěji jsou GBM lokalizovány v temporálním laloku (31 %), v parietálním laloku (24 %), ve frontálním laloku (23 %) a v okcipitálním laloku (16 %). Glioblastoma multiforme se častěji vyskytuje u mužů než u žen, a to v poměru 1,2:1.

Pro glioblastoma multiforme je typická krátká anamnéza (týdny). Vhodná léčba dokáže prodloužit dobu přežití pacienta průměrně o 12 měsíců. Nicméně, i ve skupině se shodnou diagnózou existují případy jak s dlouhou dobou přežití, tak i pacienti, u nichž jsou stejné léčebné strategie neúčinné a doba přežití je řádově ve dnech až měsících. Také proto je dnešní výzkum zaměřen zejména na identifikaci genetických změn u obou typů GBM, na porozumění a odhalení všech molekulárních a buněčných markerů a signálních cest podílejících se na jejich vzniku a růstu.

Cílem našeho výzkumu je stanovit významné korelace mezi sledovanými cytogenetickými markery a prognosticky-prediktivními charakteristikami glioblastomů. Nalezené změny mohou pomoci nejen při výběru vhodné léčby, prognóze onemocnění, ale rovněž identifikovat nové molekulárně genetické cíle pro terapii „ušitou na míru" (targeted therapy).

Pomocí fluorescenční in situ hybridizace jsme vyšetřili u více jak 300 pacientských tkání (parafinových řezů) status genů p53, RB1 a EGFR1, chromozomálních oblastí 1p36.3, 9p21.3, 19q13, a počty kopií chromozomů 7, 10 a 13. Pro hybridizaci byly využity fluorescenční sondy od firmy IntellMed, s.r.o. Do statistiky byli zahrnuti pouze pacienti s kompletními klinickými i cytogenetickými údaji a diagnózou glioblastoma multiforme (67 pacientů). Pro statistické účely byly všechny sledované cytogentické markery považovány za amplifikované (resp. deletované), jestliže byl zaznamenán zvýšený (resp. snížený) počet signálu u více jak 20 % buněk nebo jestliže byl průměrný počet kopií markeru vyšší než 2,5 (resp. nižší než 0,85). Pro statistické vyhodnocení satusu genu EGFR1 byl využit poměr kopií EGFR1/chromozom 7. Gen EGFR byl považován za deletovaný v případě, že poměr EGFR1/CEP7 byl menší než 0,84, za normální v oblasti 0,85–1,3 a za amplifikovaný v případě, že poměr byl větší než 1,3.

V současné době byla provedena pilotní statistická analýza. Nejčastější aberací u vyšetřených tkání s GBM byla amplifikace genu EGFR1, která byla nalezena u 37 z 67 vyšetřených pacientů (55,2 %) a delece v chromozomální oblasti 9p21.3 (23 z 67 vyšetřených pacientů, 34,3 %). Byla nalezena statisticky významná korelace mezi celkovou dobou přežití (OS – overall survival), dobou přežití bez známek onemocnění (DFS – disease free survival) a statusem chromozomální oblasti 19q13. Rovněž byla nalezena statisticky významná korelace mezi počtem kopií chromozomu 7 a DSF. Tento jev je pravděpodobně spojen s faktem, že na chromozomu 7 je lokalizován gen EGFR, nicméně korelace mezi EGFR a DSF nebyla v našem souboru nalezena. Možným důvodem je nedostatečnost klinických dat v pilotní analýze. V současné době probíhá sběr dalších klinických údajů u zbylé části souboru a tato data budou prezentována.

Poděkování za podporu výzkumu patří grantům: MSM6198959216, LC07017, MPO Tip FR-TI1/525 (561100011), GAČR 303/09/H048, IGA NS10286-3.

Vliv centrálních regulačních mechanismů na vznik a průběh nádorových onemocnění

MUDr. Josef Patera, CSc.[1]
MUDr. Karel Dvořák[2]
Bc. Johny Patera[3]
[1] Privátní mammologická ordinace, Brno
[2] RDG, FNsP, Brno
[3] SKUPINER S.R.O., Brno

Naprostá většina výzkumu v oblasti patogeneze a predikce nádorových onemocnění se zabývá problémy z perspektivy buněk a molekul. Ale existuje i jiná perspektiva a tou je pohled z hlediska regulačních mechanizmů celého organizmu.

Při analýzách rizikových faktorů (RF) jsou jejich dopady vysvětlovány především přímým působením na cílové tkáně a buňky. Maximum pozornosti je věnováno odhalování genetických poruch. Predikce je založena výhradně na morfologických a funkčních charakteristikách nádorových tkání. Klasické léčebné metody, nebo nově různé způsoby biologické léčby jsou vedeny především snahou ovlivnit cílové buňky. Celkový stav organizmu a jeho jednotlivých součástí je na druhé straně analyzován omezeně a jeho poruchy jsou brány pouze jako omezující faktor terapie. Není to málo?

Jak jsme dospěli k závěru, že centrální regulační mechanizmy organizmu mají cosi společného se vznikem a průběhem nádorových onemocnění? Na začátku – nebyl v tomto případě velký třesk, ale byly to pochybnosti. Je pravda to, co se píše v tlustých knihách a časopisech o kancerogenezi? Je pro riziko vzniku nádorů tak zásadní pozitivní rodinná anamnéza nádorových onemocnění? Jsou rozhodující příčinou genové mutace? Mají RF (především zevního prostředí) přímý vliv na cílové buňky? Jaká je důležitost jednotlivých RF a jak vlastně působí? A odtud jsme začali. Provedli jsme rozsáhlou a velice podrobnou analýzu RF téměř 4000 žen. Polovina bez nádorových onemocnění a polovina s nádory mammy. U nádorových pacientek jsme hodnotili i běžné klinické parametry a průběh onemocnění. Vývoj závěrů a směřování dalšího výzkumu lze shrnout do několika etap.

V I. etapě jsme zjistili u pacientek s nádory prsu oproti kontrolám statisticky vysoce významně vyšší incidenci hypertenze, diabetu a obezity v osobní anamnéze a hypertenze a diabetu v rodinné anamnéze. Dále jsme zjistili, že je výrazně přeceňován vliv gynekologických RF a jejich spojení s estrogením působením. Našli jsme souvislosti mezi výše uvedenými RF a základními biologickými parametry onemocnění, výskytem recidiv, metastáz a celkovým přežíváním pacientek (a to bez ohledu na ostatní klasické prognostické faktory). V literatuře se v této fázi výzkumu objevovaly práce o vztahu mezi hypertenzí, diabetem a obezitou a nádory prsu, ale také nádory endometria, ovaria, prostaty, ORL, jícnu, žaludku, kolorekta, jater, pankreatu, ledvin a močového měchýře.

V II. etapě jsme postulovali vztah mezi vznikem nádorů mammy a rozvojem metabolického syndromu, k jehož součástem patří i hypertenze, diabetes a obezita. Také jsme došli k zásadním závěrům o mechanizmech působení jednotlivých RF na nádorové onemocnění.

V III. etapě jsme vytvořili hypotézu o přímém vztahu mezi stavem a poruchami centrálních regulačních mechanizmů organizmu na jedné straně a vznikem, parametry a průběhem nádorových onemocnění na straně druhé. Základní strukturou centrální regulace je autonomní nervový systém (ANS), který ovlivňuje veškeré funkce organizmu a dle naší hypotézy se účastní i na nádorových onemocněních. Jeho stav je dán jednak geneticky, ale také celoživotním vývojem za účasti mnoha různých faktorů vnitřního i zevního prostředí. ANS je nadřazen všem orgánovým, tkáňovým a buněčným regulacím a jeho poruchy se logicky projevují i v těchto nižších úrovních. Proto jsme se v posledních několika letech soustředili na analýzu stavu a poruch ANS (pomocí známé metody variability srdečního rytmu) a provedli srovnání s incidencí RF nádorů prsu. Zjistili jsme, že stav ANS neodpovídá jen aktuálnímu celkovému stavu organismu, ale také odráží velkou část vlivu sledovaných RF. Rozhodující RF (i zevního prostředí) nepůsobí přímo na cílové tkáně a buňky, ale cestou modifikace funkcí ANS. Zde dochází ke „sčítání" působení jednotlivých RF a takto vyvolané změny (a poruchy) funkcí ANS se zásadním způsobem účastní na kancerogenezi. Je ovšem potřeba chápat jeho vliv správně. Nejspíše nevyvolává přímo vznik nádorů, ale vytváří takové podmínky v jednotlivých orgánových systémech a tkáních, které spolu s dalšími, např. geneticky danými faktory vedou ke zvýšení kancerogenního potenciálu organizmu (zvyšování prozánětlivého stavu organizmu, vznik chronických nenádorových onemocnění, rozvrat hormonálního systému, omezování obranných mechanizmů a další). Prokázání vlivu stavu ANS na vznik a průběh nádorových onemocnění může mít zásadní dopad na prevenci, odhalování, léčbu a dispenzarizaci nádorových onemocnění.

Inhibícia JAK/STAT signálnej dráhy ako efektívna a cielená liečba svetlobunkového adenokarcinómu obličiek

Mgr. Lucia Mésarošová[1],
doc. RNDr. Soňa Fraňová, PhD.[1],
doc. MUDr. Ján Švihra, PhD.[2],
doc. PharmDr. Ján Klimas, PhD.[3],
PharmDr. Peter Křenek, PhD.[3],
prof. PharmDr. Ján Kyselovič, CSc.[3],
PharmDr. Peter Ochodnický, PhD.[3],
doc. MUDr. Ján Ľupták, PhD.[2],
prof. MUDr. Ján Kliment, CSc.[2],
MUDr. Pavol Slávik[4]
[1] Ústav farmakológie, Jesseniova lekárska fakulta UK Martin
[2] Urologická klinika, Jesseniova lekárska fakulta UK Martin
[3] Katedra farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta UK Bratislava
[4] Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta UK Martin

Úvod: Adenokarcinóm obličiek (RCC – renal cell carcinoma) tvorí 3 % všetkých diagnostikovaných malignít, v prípade Slovenska asi 600, v rámci Európy asi 40 000 a celosvetovo vyše 200 000 prípadov ročne. STAT (signal transducers and activators of transcription) sú proteíny, ktoré aktivujú transkripciu génov podieľajúcich sa na procesoch ako je bunkový rast, proliferácia a apoptóza. Aktivácia STAT3 a STAT5a, prostredníctvom fosforylácie, je spojená s mnohými typmi nádorových ochorení ako je nádorové ochorenie prostaty, mozgu a pľúc. Úloha STAT transkripčných faktorov v RCC nie je dostatočne preskúmaná, preto sme sledovali expresiu STAT transkripčných faktorov u pacientov s diagnózou svetlobunkový adenokarcinóm obličiek.

Metódy: V tumorových a kontrolných tkanivách od pacientov, ktorí podstúpili radikálnu nefrektómiu, sa zisťovali zmeny expresie STAT3 a STAT5a prostredníctvom metódy western blot. Zmeny expresie celkových proteínov ako aj ich fosforylovaná forma boli porovnané s TNM klasifikáciou.

Výsledky: V tumorových tkanivách sme pozorovali signifikantnú nadprodukciu STAT5a v porovnaní s kontrolnými tkaninami. Nezaznamenali žiadne zmeny v expresii STAT3 v tumorových tkanivách v porovnaní s kontrolnými, ale sledovali sme zvýšenú fosforyláciu STAT3 v tumoroch. Porovnaním s TNM klasifikáciou sme zaznamenali nadmernú fosforyláciu STAT3 v štádiách T3–T4 TNM klasifikácie.

Záver: Dokázali sme, že STAT5a môže byť novým špecifickým markerom pre pacientov s diagnózou svetlobunkoveho adenokarcinómu obličiek. Naše výsledky poukazujú na možnosť využitia inhibície STAT3 signálnej dráhy v cielenej terapii onkologických pacientov s adenokarcinóm obličiek.

Táto práca vznikla za podpory grantov VEGA 1/0103/09, VEGA 1/0707/09 a UK/125/2010.

Účinky reoviru na buňky mozkových nádorů v normoxii a hypoxii – studie in vitro

MVDr. Jan Hraběta, Ph.D.,
Mgr. Katarína Figová,
Šimon Cipro,
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.
Klinika dětské hematologie a onkologie,
2. LF UK a FN Motol, Praha

Hypoxie je charakteristická pro mikroprostředí solidních nádorů. V normálních tkáních je parciální tlak kyslíku 5–6 %, zatímco v nádoru 1 % nebo méně. Hlavním faktorem umožňujícím adaptaci buněk na hypoxii je hypoxií indukovaný transkripční faktor (HIF). Je tvořen dvěmi podjednotkami, konstitutivně exprimovanou HIF 1β/ARNT a hypoxií indukovanou HIF 1α s homology HIF 2α a HIF 3α. Za snížené tenze kyslíku je HIF 1α stabilizován, heterodimerizuje s HIF 1β a je translokován do jádra. Stabilizovaný heterodimer transaktivuje geny zapojené v regulaci pH, transportu glukózy, glykolýze a novotvorbě cév a umožňuje přežití nádorových buněk v hypoxii. Adaptace nádorových buněk na hypoxické podmínky má klinický význam. Hypoxie inhibuje apoptózu, zvyšuje genetickou nestabilitu nádorových buněk a chemorezistenci a podílí se na agresivnějším chovaní nádorů.

Onkolytické viry (OV) jsou viry, které infikují a následně lyzují nádorové buňky a nepostihují při tom normální buňky. Reovirus typ 3 kmen Dearing (RV) je přirozený OV množící se v buňkách s mutovaným nebo aktivovaným genem z rodiny Ras a probíhá s ním již i klinické zkoušení (preparát Reolysin). OV se musí replikovat ve specifických podmínkách nádorového mikroprostředí a efektivně se šířit v nádoru. Bylo prokázáno, že hypoxie snižuje účinnost chemoterapie, radioterapie a replikaci některých virů, např. v souvislosti se zvýšenou produkcí IFN- β, inhibicí apoptózy nebo změnou kinetiky buněčného cyklu. In vitro jsme sledovali působení RV na hypoxické buňky meduloblastomu (MBL) s konstitutivní aktivací HIF1α a glioblastomu (GL) a změny exprese HIF 1α. RV je schopen replikace v obou buněčných liniích v normoxii (21 % O2) i v hypoxii (1 % O2) a zvyšuje expresi HIF 1α proteinu a HIF 1α cílových genů VEGF a CAIX. Dynamika změn exprese HIF 1α byla závislá na buněčné linii. RV způsobil zástavu v G2/M fázi buněčného cyklu a eliminoval kumulaci buněk v G0/G1 fázi cyklu indukovanou hypoxií, která se může podílet na rezistenci k fázově specifickým cytostatikům. RV v hypoxii indukoval apoptótzu stejně jako v normoxii, na rozdíl od cisplatiny, kde hypoxie výrazně snížila apoptózu a zvýšila viabilitu. Inhibitor kaspáz (z-vad-fmk) snížil RV indukovanou apoptózu bez signifikantní změny viability.

Prokázali jsme, že RV se efektivně replikuje v hypoxických buňkách MBL a GB, významně ovlivňuje dynamiku exprese HIF 1α a HIF 1α cílových genů a indukuje buněčnou smrt nezávislou na kaspázách v normoxii i v hypoxii. RV může být efektivním nástrojem proti nádorovým buňkám, které se nacházejí v hypoxických oblastech nádorů a jsou méně citlivé k chemoterapii a radioterapii.

Příspěvek vznikl za podpory MSMT č.0021620893.

Valproát je účinnější v hypoxických podmínkách: další důkaz pro jeho klinické testování

Šimon Cipro,
MVDr. Jan Hraběta, Ph.D.,
Ing. Jana Hřebačková,
Mgr. Jitka Poljaková, Ph.D.,
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.
Klinika dětské hematologie a onkologie,
2. LF UK a FN Motol, Praha

Kyselina valproová (VPA), jedno z nejdéle užívaných antiepileptik, kromě toho inhibuje aktivitu histon-deacetyláz (HDAC). Inhibitory HDAC (HDACi) se v posledních letech ukazují jako nadějná protinádorová léčiva. Racionální podklad pro testování VPA v protinádorové terapii poskytuje její nízká toxicita i při dlouhodobém podávání.

Prakticky všechny solidní nádory obsahují oblasti s nižší tenzí kyslíku (1 % O2 a méně, dále označováno jako hypoxie). Buňky v těchto oblastech jsou často primárně rezistentní k chemoterapii. V naší práci jsme se věnovali účinku VPA na neuroblastomové (NBL) buněčné linie v normoxických a hypoxických podmínkách.

Experimenty jsme provedli na NBL liniích odvozených od nádorů vysokého rizika. Apoptózu jsme stanovili průtokovým cytometrem barvením propidium iodidem a fluorescenčně značeným anexinnem V. Aktivitu kaspáz jsme měřili kolorimetricky za použití specifických substrátů. Expresi na úrovni proteinů Western blotingem a na úrovni m-RNA RT PCR v reálném čase. Buňky byly inkubovány s různými koncentracemi VPA v rozsahu 0,5–10 mM po dobu 24, 48 a 72 hodin paralelně v normoxii a hypoxii.

Množství valproátem indukované apoptózy bylo v hypoxii u všech zkoumaných linií vyšší nebo přinejmenším stejné jako v normoxii. Např. linie UKF-NB-3 13,7 % v hypoxii a 8,2 % v normoxii po 72h inkubaci s 1mM VPA. Tato pozorování jsme podpořili měřením aktivity kaspázy-3 po inkubaci s VPA nebo cisplatinou. VPA na rozdíl od cisplatiny indukuje vyšší aktivitu kaspázy-3 v hypoxii než normoxii (3,25x vs. 2,5x akt. kontroly). Tyto výsledky ukazují, že hypoxie nezpůsobuje primární rezistenci NBL buněk k VPA.

K ověření, zda vyšší účinnost v podmínkách nižší tenze kyslíku je společnou vlastností všech inhibitorů histon deacetyláz, jsme stanovili apoptózu pomocí anexinnu V a aktivity kaspázy 3 s butyrátem sodným (NaB) a trichostatinem A a s choloridem lithným, který má shodné účinky na buňky s výjimkou inhibice HDAC. První výsledky těchto pokusů naznačují, že všechny inhibitory histon deacetyláz jsou účinnější v hypoxických podmínkách. Jednoznačný je tento závěr v případě VPA a NaB.

Western blotem jsme neprokázali štěpení proteinu bcl-2, což naznačuje, že VPA neindukuje mitochondriální apoptotickou dráhu. Zároveň jsme stanovili množství neaktivního bid. Jeho vysoké hladiny po inkubaci s VPA podporují hypotézu, že nedochází k přesmyku z receptorové do vnitřní apoptotické dráhy.

Řada neuroblastomů in i ex vivo má defektní vnější apoptotickou dráhu díky deleci nebo epigenetické modifikaci genu pro kaspázu 8. Pomocí qPCR jsme prokázali, že VPA obnovuje expresi této kaspázy v normoxii i hypoxii, čímž umožňuje použití látek indukujících apoptózu vnější cestou.

Naše výsledky rozšiřují znalosti o mechanizmech účinku VPA a naznačují možnost jejího užití i v oblastech, kde konvenční léčba často selhává. Naše výsledky i literární údaje podporují možnost použití VPA pro klinické zkoušení.

Tato práce vznikla díky laskavé podpoře GAUK (č.projektu 72208/2008) a Ligy proti rakovině, Praha.

EXPRESNÍ ANALÝZA V MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNĚ

ZÁVĚREČNÝ WORKSHOP K PROJEKTU „POSÍLENÍ VÝZKUMNÉ INFRASTRUKTURY PRO INDIVIDUALIZACI LÉČBY CHRONICKY NEMOCNÝCH DĚTÍ", PODPOŘENÝ GRANTEM Z ISLANDU, LICHTENŠTEJNSKA A NORSKA V RÁMCI FINANČNÍHO MECHANIZMU EHP

Předsedající: Hajdúch M., Drábek J. – středa / 1. 12. 2010 / 16.20–17.40

Lymphocyte mdr1 expression and clinical relevance of mdr1 polymorphism in asthmatic children treated by inhaled corticosteroids

MUDr. Petr Džubák, Ph.D.
prof. MUDr. František Kopřiva, Ph.D.,
MUDr. Jan Potěšil,
Bc. Anna Janošťáková,
Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.,
Mgr. Petr Konečný,
Renata Buriánová,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.
Laboratoř experimentální medicíny,
Ústav molekulární a translační medicíny
LF UP a FN Olomouc

Asthma bronchiale is a disease characterized by airway obstruction, varying both spontaneously and as a result of therapy. Majority of asthma bronchiale patients require daily anti-inflammatory treatment to maintain appropriate symptom control and life quality. However the successful pharmacotherapy of various diseases, including autoimmune diseases, is often limited by multidrug resistance. In the response to the corticosteroid therapy are discussed various factors like functionality of glucocorticoid receptors, impaired pathways and tissue glucocorticosteroids accessibility. In recent years it has been demonstrated that alterations in the expression and activity of the MDR transporters are seen in numerous tissues during an inflammatory response. The objective of our study was to verify the possible associations between the effects of inhaled corticosteroids and montelukast (antagonist of cysteinyl leucotriene receptors) and the level of MDR1 (PGP) expression in the lymphocytes of asthmatic patients. In parallel, the MDR1 gene polymorphism was also studied. In the group of 102 asthmatic children we observed significant decrease of PGP expression on peripheral blood lymphocytes of patients treated with corticoids compared to those without corticoid medication (p<10-4). We also found differences in frequency of the MDR1 genotype for SNP C3435T (rs1045642) and its association with expression of the MDR1 protein (p<10-3). Simillarly the patiens with inflammatory bowel diseases were studied.These data suggest that the gene expression and/or MDR1 variants may have clinical relevance in asthmatic patients modulating bioavailability and/or the anti-inflammatory effects of local corticosteroids.

The work was supported by grants LC07017, FM EEA/Norway FM EEA (CZ0099). and MSM6198959216, infrastructural part was supported by project Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C.1.05/2.1.00/01.0030.

Studium rezistence na kortikoidy u dětské akutní lymfoblastické leukemie

MUDr. Michaela Špenerová[1,2],
MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.[1,2],
MUDr. Petr Džubák, Ph.D.[1,2],
Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.[1], Mgr. Petr Konečný[1],
Bc. Anna Janošťáková[1], Mgr. Soňa Šálková[1],
Kateřina Kylarová[1], Věra Růžková[1],
Mgr. Lenka Radová, Ph.D.[1],
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1],
prof. MUDr. Jan Starý, DrSc.[3],
MUDr. Pavel Timr[4], MUDr. Jiří Hak[5],
MUDr. Bohumír Blažek[6],
MUDr. Zdeňka Černá[7],
doc. MUDr. Emília Kaiserová, CSc.[8],
doc. MUDr. Eva Bubanská, CSc.[9],
prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.[2]

[1] **Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc**
[2] **Dětská klinika LF UP a FN Olomouc**
[3] **Klinika dětské hematologie a onkologie UK 2. LF a FN Motol**
[4] **Dětská klinika Nemocnice České Budějovice a.s.**
[5] **Dětská klinika FN Hradec Králové**
[6] **Oddělení dětské hematologie a hematoonkologie Kliniky dětského lékařství FN Ostrava**
[7] **Dětská klinika FN Plzeň**
[8] **Onkologická klinika DFNsP Bratislava**
[9] **Detské onkocentrum NsP F.D.Roosevelta Banská Bystrica**

Úvod: Akutní lymfatická leukemie (ALL) je nejčastější dětskou hematologickou malignitou a zároveň i nejčastějším dětským nádorovým onemocněním. Základem léčby ALL v dětském věku je chemoterapie podle mezinárodních protokolů skupiny Berlin-Frankfurt-Munster (BFM group). Již desetiletí jsou nedílnou součástí léčebných protokolů dětské ALL kortikoidy (prednison, dexamethazon). Navzdory výraznému zlepšení léčebných výsledků v posledních desetiletích je zde stále přítomna skupina pacientů se špatnou odpovědí na aplikovanou léčbu.

Cíl: Studie je zaměřena na skupinu pacientů primárně rezistentních na kortikoterapii a mezi její hlavní cíle patří studium polymorfizmu glukokortikoidního receptoru a stanovení prognostických a prediktivních markerů odpovědi na terapii kortikoidy.

Materiál a metody: Pacientům je odebrána kostní dřeň v den diagnózy (den 0) a 8. den léčby (po prednisonové předfázi). Část materiálu je použita ke zpracování metodami průtokové cytometrie, kdy pomocí sorteru FACS Aria (Beckton Dickinson) třídíme značené populace leukemických buněk, které jsou identifikovány a rozděleny podle diferentní exprese antigenů CD10 a CD19. Z vybraných leukemických buněk dále izolujeme RNA a DNA k další analýze, která zahrnuje jak stanovení profilů genové exprese, tak i analýzu genového polymorfizmu a detekci chromozomálních změn. Na leukemických buňkách ve zbývajícím materiálu dále stanovujeme in vitro odpověď na prednison/dexamethazon pomocí cytotoxického MTT testu.

Výsledky: Prezentovány budou výsledky za období 6/2009–10/2010, kdy jsme v naší laboratoři vyšetřili celkem 64 pacientů s diagnózou ALL. U pacientů jsme pomocí cytotoxického testu stanovili chemosensitivitu/chemorezistenci nádorových buněk na prednison a dexamethazon a metodami průtokové cytometrie

jsme připravili sledované leukemické populace k další výše zmíněné analýze.

Závěr: In vitro predikce odpovědi na kortikoterapii, případně identifikace biomarkerů může být cenným nástrojem vedoucím ke zlepšení léčebné odpovědi na aplikovanou léčbu. Pacientům bude dle predikce podávána účinná léčba, s menšími nežádoucími účinky cytotoxické terapie, která představuje pro dětský organizmus vysokou zátěž.

Poděkování: Projekt je podpořen grantem Islandu, Lichtenšteinska a Norska v rámci finančního mechanizmu EHP/Norsko, CZ0099, grantem IGA MZ CR NS9939 a projektem Biomedicína pro regionální rozvoj a lidské zdroje (BIOMEDREG) C.1.05/2.1.00/01.0030.

DNA microarrays technologie v predikci odpovědi na glukokortikoidní terapii u pacientů s akutní lymfoblastickou leukemií

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.[1,2], MUDr. Michaela Špenerová[1,2], Mgr. Vladimíra Koudeláková[1], Bc. Michaela Sedláčková[1], Mgr. Lenka Radová[1], doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1], prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.[2]

[1] Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc

[2] Dětská klinika FN a LF UP Olomouc

Úvod: Cílem naší studie je analýza polymorfizmu glukokortikoidního receptoru u dětí s akutní lymfoblastickou leukemií a zhodnocení prognostického a prediktivního významu zjištěných polymorfizmů. Metoda DNA microarrays umožňuje stanovit míru genové exprese všech genů lidského organizmu, v dnešní době tedy kolem 23 tisíc genů. Metoda dále umožňuje stanovit, které varianty genu jsou exprimovány, dále dokáže analyzovat genové polymorfizmy či chromozomální mikropřestavby.

Metodika: Fenol-chloroformovou metodou byla izolována RNA a DNA ze vzorků kostní dřeně v 0. a 8. den léčby pacientů s ALL a dále ze stejných vzorků po inkubaci lymfoblastů s prednisonem anebo dexamethasonem v rámci testu chemorezistence (MTT). Po izolaci byla provedena DNA microarrays analýza pomocí GeneChip Human Gene 1.0 ST Array a Cytogenetics 2.7M Array (Affymetrix). Následně bylo provedeno statistické vyhodnocení dat.

Výsledky: Ve sdělení budou prezentována pilotní data projektu. Byla provedena mikročipová analýza u 6 pacientů s ALL. Budou prezentovány přínosy a perspektivy metody DNA microarrays v možnostech individualizace terapie dětí s ALL.

Závěr: Metoda DNA microarrays umožňuje identifikovat profily genové exprese vztahující se k chemorezistenci pacienta nejenom na glukokortikoidy. Projekt umožňuje díky korelacím s in vitro odpovědí buněk v rámci MTT testu eliminovat interindividuální variabilitu v metabolizmu, farmakokinetice, farmakogenetice a vylučování cytostatik v podmínkách in vivo. Budeme-li schopni predikovat chemorezistenci na glukortikoidy, můžeme návazně individualizovat kortikosteroidní terapii u dětí s ALL s cílem zlepšit léčebné výsledky anebo minimalizovat nežádoucí účinky léčby.

Práce na tomto projektu je podporována granty MŠMT CZ.1.07/2.3.00/09.0089, EHP CZ 0099 a IGA MZ ČR NS 9939.

Characterization & Identification of Potential Tumor Resistance Mechanisms to CYC116, a novel Aurora kinase Inhibitor

Mgr. Madhusudhan Reddy Kollareddy[1], doc. Daniella Zheleva, Ph.D.[2], MUDr. Petr Džubák, Ph.D.[1], doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1]

[1] Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital in Olomouc

[2] Cyclacel Ltd, Dundee, United Kingdom

Effective treatment of cancer by chemotherapy can be achieved by targeted therapy with minimum toxicites. In this decade significant number of targeted drugs towards a cancer cell have been discovered. Aurora kinases (serine/threonine) have recently emerged as a promising candidates for targeted therapy, due to the fact that many cancers abberantly express. Several Aurora inhibitors are in various phases of clinical trials and some are in preclinical development. CYC116 is a novel pan Aurora kinase and VEGFR2 inhibitor, which is currently undergoing one clinical study.

Drug induced tumor cell resistance is one of the major obstacles in successful chemotherapy. The emergence of acquired drug resistance largely depends on the nature of drug, mode of action and its mechanistic target. We focused our study in identification of potential tumor resistance mechanisms towards CYC116 and also used ZM447439 (AstraZeneca) as a reference compound. Two isogenic colon cancer cell lines namely HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- were used to study the resistance. Here we present the in-depth characterization data and also gene expression data. All the clones displayed high cross resistance to selecting agents and also showed cross resistance and acquired multidrug resistant phenotype. Cell cycle analysis revealed tetraploidy nature of all CYC116 resistant clones. Phosphohistone histone H3: Ser10 (biomarker of Aurora inhibition) was not inhibited in all clones. PgP or MRP1 is not upregulated as confirmed by flowcytometry. Western blotting revealed no overexpression of Aurora kinases. DNA sequencing studies revealed three novel Aurora B mutations (I216L, L152S, & A76V) in ZM447439 resistant clones. We also did global gene expression studies to determine significant differentially expressed genes. Statistically significant numbers of genes are either up-regulated or down-regulated in all resistant clones. Currently we validate these drug resistant signature expressions by further studies and we plan to identify potential key genes involved in CYC116 resistance. Proteomic studies to study differential expression in also underway. To our knowledge we are the first to study drug resistance phenomenon to such an in-depth extent. This extensive study could help in predicting CYC116 clinical response and also to design combination regimens to combat resistance, which may aid in CYC116 clinical development.

The work was supported by grants FM EEA/Norway FM EEA (CZ0099) and MSM6198959216, infrastructural part was supported by project Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C.1.05/2.1.00/01.0030.

PROTEOMIKA NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Předsedající: Eckschlager T. – čtvrtek / 2. 12. 2010 / 9.00–10.10

Phased proteomics approach for biomarker discovery in colorectal cancer

Mgr. Silvia Šurinová[1,2], Mgr. Marta Dziechciarková, Ph.D. [3], MUDr. Matej Skrovina[4], Mgr. Lenka Radová, Ph.D.[3], doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[3], prof. Ruedi Aebersold[1,2,5]

[1] **Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zürich, Zürich, Switzerland,**
[2] **Competence Center for Systems Physiology and Metabolic Diseases, ETH Zürich, Zürich, Switzerland,**
[3] **Laboratory of Experimental Medicine, Palacký University and University Hospital in Olomouc, Olomouc, Czech Republic,**
[4] **J.G.Mendel Oncology Centre, Novy Jicin, Czech Republic,**
[5] **Faculty of Science, University of Zürich, Zürich, Switzerland**

Diagnosis and monitoring of colorectal cancer relies on the accessibility of selective and stage-specific markers.

Epithelial cells were dissected from patient tumour and adjacent mucosa tissue and N-linked glycosylated peptides were isolated (Nat. Protoc. 2: 334–9, 2007). Peptide mixtures were analysed with high-resolution mass spectrometry. MS1 peptide ion features were extracted and aligned across runs. N-linked glycosylated peptides were isolated from plasma of the same patients. Selected reaction monitoring (SRM) was employed to develop SRM peptide assays and subsequently detect and quantify target peptides in plasma.

Differentially abundant glycopeptides were characterised from tissue epithelia and a list of more than 500 glycoprotein candidates was generated. SRM assays have been successfully developed for the majority of these proteins. High specificity and sensitivity of the SRM platform enabled the detection and quantification of 20% of the candidates over more than hundred plasma samples, spanning concentrations from micrograms to low nanogram per millilitre of plasma. Preliminary results show abundance gradients in intra-patient plasma sources (1: plasma taken from a tumour vein during tumour excision, 2: systemic plasma sampled at surgery, and 3: systemic plasma sampled one month after surgery) that might lead to the identification of colorectal cancer-specific biomarker candidates. Subsequently, these proteins will be tested in a larger cohort of patients from the target population.

In conclusion, targeted MS analysis of glycosylated proteins identified from enriched tumour epithelial cells enhanced the detection and quantification of colorectal cancer biomarker candidates in patient plasma.

Affinity purification coupled to mass spectrometry – approach to drug target identification

Mgr. Gabriela Rylová[1], MUDr. Petr Džubák, Ph.D.[1], MUDr. Michaela Špenerová[1], Bc. Anna Janošťáková[1], Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.[1], Mgr. Petr Konečný[1], Mgr. Dušan Holub[1], Mgr. Tomáš Oždian[1], MVDr. Dalibor Doležal[1], RNDr. Miroslav Soural, Ph.D.[2], doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.[2], doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1]

[1] **Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital in Olomouc, Olomouc, Czech Republic**
[2] **Department of Organic Chemistry, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc, Czech Republic**

Knowledge of protein targets for new cytotoxic compounds is crucial for structure optimalization and reducing undesirable effects. One promising group of anticancer compounds are quinolinone derivatives derived from quinolones well known for antibacterial effect. In previously published works identified DNA topoisomerases seems to be not only one target of quinolinone derivatives and quinolones as well as. We identified several cytotoxic quinolinone derivatives by MTT assay. The most effective compounds showed IC50 values bellow 1 µM. For protein targets identification of these derivatives we have synthesized biotinylated molecules of these original compounds. Biotinylated compounds were immobilized on the surface of streptavidin coated magnetic beads and whole complex (magnetic bead-streptavidin-biotin-derivative) was incubated with total protein cell lysate of CEM cell line. Thereafter non-bonded proteins were washed-out and specifically bonded proteins were separated on 1D SDS gel. Following silver-staining of the gel we compared sample lines with specifically bonded proteins to biotinylated compound and negative control. Specific proteins were cut off from gel and trypsinized to get peptides for protein identification. For mass spectrometry analyses we used liquid chromatography (HPLC) coupled with high capacity ion trap and MALDI TOF/TOF. ProteinScape software associated with Mascot algorithm and Swiss-prot database were used for spectra analysis and protein identification. Preliminary results point to involvement of proteins associated with translational regulation and glucose metabolism as targets of quinolinone derivatives.

The work was supported by grants LC07017, FM EEA/Norway (A/CZ0046/1/0022) and MSM6198959216, infrastructural part was supported by project Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C.1.05/2.1.00/01.0030.

Proteomic profile of oxaliplatin treatment in CEM lymphoblastoid cells

Mgr. Tomáš Oždian[1,2], Mgr. Dušan Holub[1], MUDr. Petr Džubák, Ph.D.[1], Mgr. Gabriela Rylová[1], Mgr. Madhusudhan Reddy Kollareddy[1], Mgr. Jiří Řehulka[1], doc. Ing. Vladimír Havlíček, Dr.[2] doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1]

[1] **Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital in Olomouc, Olomouc, Czech Republic.**
[2] **Institute of Microbiology, Prague, Czech Republic**

Oxaliplatin is platinum based drug usually used in combination with fluorouracile for the

treatment of colorectal cancer. We focused on proteomic profiling of oxaliplatin for better understanding to its mechanism of action and for future comparsion with proteomic profiles of other drugs. For this experiment, we have used CEM cancer cell line because of its good response to a broad scale of cytostatics and to allow us an easy comparsion among their profiles. CEM cell culture was grown in RPMI media with isotope labeled arginine and lysine (SILAC experiment) in the three bilogical replicates. Then the culture was treated with oxalitplatin in concentration 5xIC50 for 4 hours, mixed with the same amount of unlabeled cell culture, lyzed and separated by preparative SDS-PAGE electrophoresis. SDS-PAGE gel was chopped in 45 fractions and digested by trypsine. Digests were analyzed in parallel by HPLC-ESI and HPLC-MALDI. Results were processed by Proteinscape software and evaluated for quantitative changes of proteins occurring in at least two repetitions from totally six replicates. Totally 50 proteins were found up- and down-regulated. Biological pathway analysis performed by GeneGo software had shown that these proteins are mainly involved in DNA replication, oxidative stress and in lipoxin regulatory pathway.

The work was supported by grants LC07017, MSM6198959216, Czech Science Foundation (H-084) and Infrastructural part was supported by project Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C.1.05/2.1.00/01.0030.

Srovnávací proteomická analýza myelomových buněk metodami SDS-PAGE/LC-MS/MS a 2-DE

Mgr. Jana Čumová[1], Petra Vidláková[1,2], Mgr. David Potěšil[3], Mgr. Karel Stejskal[3], Mgr. Lenka Jedličková[3], Danuše Fridrichová[3], doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr. [3], prof. MUDr. Roman Hájek, CSc.[1,4]

[1] Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina, Babákův výzkumný institut, LF MU, Brno
[2] Oddělení klinické hematologie, FN Brno
[3] Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Ústav experimentální biologie, PřF MU, Brno
[4] Interní hematoonkologická klinika, LF MU a FN Brno

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je stále nevyléčitelné onemocnění charakterizované klonální expanzí maligních plazmatických (myelomových) buněk především v kostní dřeni (KD). Nové léky (thalidomid, bortezomib, lenalidomid aj.) dále zlepšují prognózu nemocných. Bohužel i na tato léčiva je zpravidla 1/3 nemocných rezistentní. Cílem této práce byla analýza proteomu separovaných myelomových buněk metodou SDS-PAGE/LC-MS/MS a porovnání identifikovaných proteinů s 2-DE referenční mapou proteomu MM[1].

Materiál a metody: Myelomové buňky byly získány imunomagnetickou separací (MACS) z KD dvou pacientů nemocných MM. Frakce separovaných buněk byly podrobeny lýzi a spojeny do jedné proteinové frakce, která byla podrobena štěpení trypsinem. Směs proteinů byla analyzována pomocí SDS-PAGE/LC-MS/MS proteomického přístupu. Pro určení funkce identifikovaných proteinů byl využit PANTHER klasifikační systém[2].

Výsledky: SDS-PAGE/LC-MS/MS proteomickým přístupem jsme identifikovali celkem 1007 unikátních proteinů. Srovnáním výsledků s 2-DE referenční mapou MM byly nalezeny rozdíly např. ve skupině cytoskeletárních a membránových proteinů (10,0 % 2-DE versus 4,9 % SDS-PAGE/LC-MS/MS; 0,7 % 2-DE versus 3,5 % SDS-PAGE/LC-MS/MS).

Závěry: SDS-PAGE/LC-MS/MS proteomickým přístupem jsme v proteomu myelomových buněk identifikovali přibližně 3x větší množství proteinů. Na základě našich výsledků tento přístup nabízí možnost hlubšího prozkoumání proteomu MM než analýza proteomu metodou 2-DE/MALDI-TOF/TOF. Pro objektivní analýzy proteinových změn je nezbytné pak tento přístup spojit s vhodnou kvantifikační technikou.

Práce byla podpořena granty MŠMT LC06027, MSM0021622434 a MSM0021622415.

Literatura

1. Lu CH, Ge F, Liu Z, et al. Detection of abundant proteins in multiple myeloma cells by proteomics. J Proteomics Bioinform. 2010; 3(1): 005–9.

2. Mi H, Dong Q, Muruganujan A, et al. PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. Nucleic Acids Res. 2010; 38 (Database issue): D204-10. http://www.pantherdb.org

PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY I.

Předsedající: Drábek J., Škarda J. – čtvrtek / 2. 12. 2010 / 10.30–11.40

Sledování prognostického a prediktivního významu exprese E-cadherinu a beta kateninu u nemalobuněčného karcinomu plic

MUDr. et MVDr. Jozef Škarda, Ph.D[3], Mgr. Mária Janíková[4], MUDr. Josef Srovnal[4], Mgr. Lenka Radová, Ph.D.[4], Mgr. Marta Dziechciarková, Ph.D.[4], Dr. Eddie Fridman[1,2]

[1] Cancer Research Center, Chaim Sheba Medical Center, Tel Hashomer, Israel
[2] Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel,
[3] Department of Pathology and Laboratory of Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital in Olomouc, Czech Republic
[4] Department of Pediatrics and Laboratory of Experimental Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital in Olomouc, Czech Republic

Je obecně známo, že komplex E-cadherinu a beta kateninu se významnou mírou podílí na procesu mezibunečných adhezí. Uvedené proteiny jsou také zapojené do signálních drah regulujících apoptózu. Porucha exprese uvedených proteinů je u různých nádorů spojována s nádorovou progresí, metastazováním a rezistencí na protinádorovou terapii. Z uvedeného důvodu jsme studovali expresi těchto proteinů v rámci jednotlivých histologických subtypů nemalobuněčného karcinomu plic a prognostický význam jejich imunohistochemické exprese u 110 pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic, za použití tkáňových mikroerejí. Dále jsme korelovali expresi daných proteinů s proteiny asociovanými s výskytem vzdálených metastáz, sfingozinkinázy 1, VEGF a s výsledky testu viability buněk primárního tumoru.

Nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly v expresi těchto proteinů mezi histologickými subtypy nemalobuněčného karcinomu plic. Exprese beta katenimu signifikantně korelovala s kratším intervalem bezpříznakového období u pacientů ve stadiu IIIa (p=0,045). Byla také zjištěna signifikantní korelace mezi cytoplazmatickou expresí E-cadherinu a rezistencí na daunorubicin (p=0,0542). Zároveň byla zjištěná signifikantní korelace mezi expresí E-cadherinu, Sfingozinkinázy 1 a VEGF (p=0,0346 a p=0,0300).

Uvedené výsledky potvrzují a dále rozšiřují naše poznatky o molekulárních mechanizmech vývoje MDR. Zároveň potvrzují možný význam imunohistochemických a in vitro vyšetření pro určení individuální odpovídavosti na léčbu.

Tato práce byla podpořena granty MŠMT 61875921, IGA MZ ČR 10259-3, 9959-3 a vnitřním grantem LF UP 91110281.

Pilotní studie sledování exprese receptoru her2, amplifikace genu *ERBB2* a mutace genu *KRAS*, jako predikce biologické léčby trastuzumabem u pacientů s karcinomem žaludku

Mgr. Ing. Libor Staněk, Ing. Daniel Tvrdík, Ph.D., Bc. Štěpánka Melčáková, MUDr. Ivana Vítková, MBA, prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.
Ústav patologie, VFN a 1. LF UK Praha

Karcinom žaludku je zhoubné nádorové onemocnění, které vzniká maligní přeměnou žaludeční sliznice s jejím postupným prorůstáním a častým metastazováním do plic, jater a dalších orgánů, za současné infiltrace lymfatických uzlin. Tento karcinom patří mezi malé procento nádorů, u nichž je zaznamenán pokles incidence. Dosavadní léčba spočívala v radikálním chirurgickém zákroku, avšak s velice častou recidivou. V současné době je sledována biologická „cílená" léčba pomocí monoklonální protilátky transtuzumabu proti lidskému receptoru epidermálního růstového faktoru 2 v kombinaci s fluorouracilem/cysplatinou. Jako predikce této léčby se jeví sledování exprese HER 2 (Erb 2) imunohistochemicky (IHC) a amplifikace příslušného genu fluorescenční in situ hybridizací (FISH).

Cílem naší pilotní studie bylo stanovit na skupině 10 pacientů amplifikaci genu *ERBB2* in situ hybridizací pomocí kitu LSI HER2/neu Probe Kit (Abbott) a ověřit přímou korelaci s overexpresí HER 2 receptoru pomocí imunohistochemie s Kitem HercepTest (Dako). Současně jsme sledovali u těchto pacientů i možnou mutaci genu *KRAS* přímou amplifikací v reálném čase (Real-Time PCR) s kitem TheraScreen: K-RAS Mutation Kit (Roche) a u další větší skupiny chceme posoudit, zda zvýšená exprese HER2 může korelovat s mutací onkogenu *KRAS*.

V naší skupině pacientů byla nalezena overexprese genu *ERBB2* u čtyřech pacientů. U šesti pacientů nebyla amplifikace nalezena. Exprese receptoru HER2 byla imunohistochemicky prokázána rovněž u stejných čtyřech pacientů s klasifikací 3+, u kterých byla prokázána i amplifikace příslušného genu. Ostatních šest pacientů mělo negativní reakci, klasifikace 0. Mutace onkogenu *KRAS* byla prokázána u dvou pacientů, u kterých byla současně detekována amplifikace genu HER2/neu.

Závěrem lze říci, že existuje přímá korelace mezi amplifikací genu *ERBB2* a zvýšenou produkcí receptoru HER2. Ve sledování korelace mezi amplifikací genu *ERBB2* a mutací onkogenu *KRAS* budeme nadále pokračovat. Námi používané metody se jeví jako dostatečně specifické s dobrou reprodukovatelností výsledků.

Prognostický a prediktivní význam genů C-MYC a CCND1 u pacientů s karcinomem prsu

Mgr. Vladimíra Koudeláková[1], RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.[1], MUDr. Kateřina Bouchalová, Ph.D.[1], Bc. Hana Ondryášová[1], Mgr. Jana Fürstová[1], Mgr. Lenka Radová, Ph.D.[1], doc. Ladislav Dušek, Ph.D.[3], Mgr. Magdalena Megová[1], Soňa Mlčochová[1], prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.[2], doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1]

[1] Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc
[2] Onkologická klinika, LF UP a FN Olomouc
[3] Institut biostatistiky a analýz, Masarykova Univerzita, Brno

U pacientek s karcinomem prsu je rutinně vyšetřováno několik biologických markerů, které pacientky člení do jednotlivých diagnostických skupin, určují prognózu a predikují účinnost zvoleného léčebného režimu. Mezi nejvýznam-

nější markery patří vyšetřování estrogenových a progesteronových receptorů a genu/proteinu *ERBB2*. Na základě pozitivity těchto markerů jsou pacientky léčeny hormonální terapií (ER+, PR+) a/nebo monoklonální protilátkou trastuzumab (Her-2/neu+). Zavedení trastuzumabu do léčebných protokolů karcinomu prsu výrazně změnilo dříve prognosticky znevýhodněnou skupinu pacientek s *ERBB2* pozitivitou na pacientky s poměrně příznivou prognózou. Gen *ERBB2* je v současné době jediným rutinně používaným genetickým markerem, který predikuje u karcinomu prsu účinnost cílené biologické léčby. Snahou je hledat další genetické markery, které by predikovaly účinnost léčebného režimu či pomohly určit prognózu onemocnění.

Pro naši studii jsme si vybrali onkogeny *C-MYC*, *CCND1*, *TOP2A* a *RARA*, jejichž aberace bývají u karcinomu prsu často nalézány. Byl vybrán soubor 151 pacientek s karcinomem prsu s námi již dříve vyšetřeným počtem kopií genu *ERBB2*, *TOP2A* a chromozomu 17. U těchto pacientek byly metodou FISH stanoveny počty kopií genů *C-MYC*, *CCND1* a *RARA* a chromozomů 8 a 11, na kterých jsou tyto geny lokalizovány. Z Herceptinového registru byla získána zaslepená a anonymizovaná klinická data, ta byla korelována s našimi cytogenetickými výsledky.

Prozatímní výsledky ukazují, že existuje statisticky významná spojitost ($p<0,05$) mezi zvýšeným počtem kopií genu *CCND1* a pozitivitou hormonálních (estrogenových i progesteronových) receptorů, což potvrzuje několik již publikovaných studií. Byly nalezeny rovněž významné korelace mezi zvýšeným počtem kopií chromozomu 17 a věkem pacientek či stadiem onemocnění. Velmi zajímavé je rovněž zjištění, že existuje vztah mezi nalezenými cytogenetickými aberacemi a výskytem jaterních a plicních metastáz. Amplifikace genu *C-MYC* je navíc spojena s kratším intervalem do progrese (PFS; progression-free survival), naopak zvýšený počet kopií chromozomu 8 je spojen s delším PFS. V současnosti dokončujeme sběr dat a statistické analýzy u dalšího souboru pacientů, abychom zvýšili signifikanci již nalezených korelací a ověřili platnost nalezených trendů. Předpokládáme, že nalezené korelace pomohou objasnit prediktivní či prognostický význam amplifikace *C-MYC*, *RARA* a/nebo *CCND1* genu a přispět tak k výběru optimální léčby pro pacientky s invazivním karcinomem prsu.

Tato práce je podporována granty MSM6198959216, IGA NS10286-3, LC07017 a GACR 303/09/H048. Zvláštní poděkování patří všem spolupracujícím klinickým i laboratorním pracovištím a pacientům.

Kazuistika klinicky promptní a výrazné odpovědi na cílenou léčbu u bronchioloalveolárního plicního adenokarcinomu

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.,
MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.,
RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.,
Ing. Marcela Staňková,
MUDr. Radim Němeček,
MUDr. Radek Lakomý,
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.
Masarykův onkologický ústav,
Klinika komplexní onkologické péče, Brno;
Institute of Applied Biotechnologies, Praha

Abstrakt nedodán.

PROGNOSTICKÉ A PREDIKTIVNÍ FAKTORY II.

Předsedající: Eckschlager T., Srovnal J. – čtvrtek / 2. 12. 2010 / 11.50–12.45

R462Q (G>A) polymorfizmus genu RNAseL v české populaci pacientů s nádorem a zdravých kontrol zjištěné pomocí endpoint genotyping qPCR

doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
Miroslava Rabčanová
Veronika Holinková, DiS.
Mgr. Jana Stránská, Ph.D.
Mgr. Sylwia Jančík
MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Mgr. Lenka Radová, Ph.D.
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.
Ústav molekulární a translační medicíny, Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc

RNAseL je ribonukleáz indukovaná interferonem, která je důležitou součástí vrozené imunity člověka. Po své aktivaci RNAseL ničí RNA virů a napadených buněk v těle. Její plně funkční stav znemožňuje virům vstup do buňky. Pokud přece jen virus přes tuto obrannou bariéru pronikne, podlehne napadená buňka apoptóz.

Polymorfizmus RNaseL R462Q predisponuje svého nositele k nádoru prostaty a je kandidátní alelou pro hereditární nádor prostaty 1 (HPC1). Navíc byl identifikován ve větší míře u osob, infikovaných virem Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV). XMR virus je asociován s nehereditárním nádorem prostaty (zvláště u nádorů vysokého gradingu) a s chronickým únavovým syndromem. Existuje však široká škála publikovaného procentuálního zastoupení XMRV u nádorů prostaty (0 až 27 %) i u chronického únavového syndromu (0 až 67 %), naznačující důležitou roli dalšího faktoru nebo potřebu metodologické standardizace.

V tomto projektu jsme zavedli genotypizační metodu pro R462Q na bázi endpoint genotyping qPCR. Metodu jsme validovali a aplikovali na DNA vzorky zdravých kontrol, pacientů s nádorem plic, nádorem kolorekta a minimální reziduální chorobou. V tomto příspěvku prezentujeme své nálezy.

Poděkování: Projekt byl částečně financován z grantů CZ.1.05/2.1.00/01.0030, MSM6198959216, LC07017, IGA NS9959, a NR9076. Dílčí výsledky již byly prezentovány na konferencích: Brněnské onkologické dny 2010 a Forensica 2010.

Molekulární aspekty v etiopatogenezi, diagnostice a léčbě triple-negativního karcinomu prsu

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.,
RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.,
MUDr. Jiří Navrátil,
MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.,
Mgr. Roman Hrstka, Ph.D.,
MUDr. Marie Navrátilová, Ph.D.,
RNDr. Eva Macháčková, Ph.D.,
MUDr. Lenka Foretová, Ph.D.,
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.
Klinika komplexní onkologické péče, Brno

Abstrakt nedodán.

Chemorezistence/chemosensitivita in vitro u pacientek s karcinomem ovaria

MUDr. Iva Sedláková, Ph.D.[1],
prof. MUDr. RNDr. Miroslav Červinka, CSc.[2],
doc. MUDr. Jindřich Tošner, CSc.[1],
MUDr. Jan Laco, Ph.D.[3],
Mgr. Kateřina Brigulová[2],
MUDr. Adam Řezáč[1],
doc. MUDr. Jiří Špaček, CSc.[1],
MUDr. Peter Škapinec[1]

[1] **Porodnická a gynekologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta UK v Praze, Hradec Králové**
[2] **Ústav lékařské biologie a genetiky, Lékařská fakulta UK v Praze, Hradec Králové**
[3] **Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice, Hradec Králové**

Cíl: Zhodnocení chemorezistence/chemosenzitivity ovariálních nádorových buněk ze solidního nádoru a ascitu in vitro u pacientek s karcinomem ovaria.

Typ studie: Prospektivní klinická studie.

Metodika: Pomocí WST-1 testu jsme stanovili chemorezistenci/chemosensitivitu in vitro u 45 vzorků ovariální nádorové tkáně a 26 vzorků ascitu získaných při primární operaci u pacientek s karcinomem ovaria. Testovali jsme paklitaxel, cisplatinu, karboplatinu, topotekan, gemcitabin a etoposid.

Výsledky: Chemorezistenci in vitro jsme nejčastěji prokázali u gemcitabinu (81,5 %), etoposidu (72,4 %) a karboplatiny (50,0 %). Nejvyšší chemosenzitivitu in vitro jsme zaznamenali u topotekanu (79,4 %) a cisplatiny (69,0 %). Zjistili jsme rozdíly v chemorezistenci (9,9 % x 50,0 %) a chemosenzitivitě (69,0 % x 20,0 %) in vitro u cisplatiny a karboplatiny. Stadium a stupeň diferenciace významně neovlivnily chemorezistenci/chemosensitivitu in vitro u pacientek s karcinomem ovaria. Chemorezistence/chemosenzitivita in vitro na karboplatinu a cisplatinu byla ovlivněna histologickým typem ovariálního karcinomu.

Závěr: Testování chemorezistence/chemosenzitivity ovariálních nádorových buněk by mohlo přispět k lepšímu pochopení nádorové biologie, k individualizaci terapie a následně ke zvýšení úspěšnosti léčby pacientek s karcinomem ovaria.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA MZ CR NS 9737-3.

EVROPSKÁ UNIE
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie
reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

SATELITNÍ SYMPOZIUM MOLONKOL

NA DNECH DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

Projekt „Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie", zkráceně „Molonkol" si klade za cíl vzdělat lékaře a přírodovědce v oblastech onkologického výzkumu, kde je potřeba mít souběžné znalosti: 1) o současné klinické praxi, 2) o současných možnostech molekulární onkologie, 3) o současných biostatistických a bioinformatických nástrojích a zároveň je potřeba ovládat grantové dovednosti řízení projektů a publikování výsledků v impaktovaných, anglicky psaných časopisech.

Webové stránky projektu jsou dostupné na adrese: http://www.molonkol.org/.

Aktivita projektu „Satelitní sympozium na Dnech diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie" v rámci Molonkolu přináší vyžádané přednášky národně i mezinárodně uznávaných odborníků na vybraná aktuální témata z oblasti onkologického výzkumu a vývoje.

Účastníci sympozijních prednášek obdrží studijní materiály a certifikát o účasti.

Na programu v roce 2010 budou přednášky:

13.15–15.15 **SATELITNÍ SYMPOZIUM MOLONKOL** NA DNECH DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE / Předsedající: Hajdúch M., Drábek J.

- Svoboda J.: **Retroviry v genetice, v patogenezi a v genové terapii**
- Šedo A.: **Anti-Oncogenic Potential of Dipeptidyl Peptidase-IV in Human Glioblastoma**
- **Diskuze**

SATELITNÍ SYMPOZIUM MOLONKOL

NA DNECH DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

předsedající: Hajdúch M., Drábek J. / čtvrtek / 2. 12. 2010 / 13.15–15.15

Retroviry v genetice, v patogenezi a v genové terapii

prof. RNDr. Jan Svoboda, Ph.D., DrSc.
Ústav molekulární genetiky AV ČR, Praha

Abstrakt nedodán.

Anti-Oncogenic Potential of Dipeptidyl Peptidase-IV in Human Glioblastoma

prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc.,
Jana Němečková,
MUDr. Eva Balážiová,
MUDr. Petr Bušek,
Bc. Dalibor Košek,
MUDr. Marek Hilšer,
Květoslava Vlašicová
Institute of Biochemistry and Experimental Oncology of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

Molecules with dipeptidyl peptidase (DPP)-IV enzymatic activity including canonical DPP-IV, fibroblast activation protein-alpha (FAP), DPP 8 and 9 belonging to the group of „Dipeptidyl peptidase-IV activity and/or structure homologues" (DASH) process a number of biologically active peptides involved in cancer pathogenesis, including gliomagenesis. In parallel, DASH also exhibit biological functions independent on their intrinsic hydrolytic activity. In primary cell cultures, derived from glioblastoma, we observed coexpression of DPP-IV, 8, 9 and FAP. Inhibition studies as well as correlative comparisons of mRNA expression of individual DASH suggest that at least the major part of DPP-IV-like enzymatic activity in primary cell cultures may be attributed to canonical DPP-IV and FAP. The higher cell surface DPP-IV enzymatic activity was associated with both higher population doubling time and slower cell migration. Overexpression of transgenic DPP-IV transfected glioma cell lines led to the decrease of their proliferation, migration and adhesion, which was not reverted by DPP-IV activity inhibition. Using a stereotactically controlled orthotopic implantation of transfected U373 cells into the immunodefficient mice, overexpression of a wild as well as mutated enzymatically inactive DPP-IV significantly reduced tumor growth.

In conclusion, we demonstrate that DPP-IV interfere with the growth of glioma cells in vitro as well as to hamper tumorigenic potential of transformed astrocytic cells. Together, our data suggests anti-oncogenic effect of DPP-IV in glioma cells which likely involves nonproteolytic mechanisms.

This work was supported by MSMT 0021620808

EVROPSKÁ UNIE

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie
reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

Cíl: Projekt „Molonkol" si klade za cíl vzdělat lékaře a přírodovědce

1) o současné klinické praxi,
2) o současných možnostech molekulární onkologie,
3) o současných biostatistických a bioinformatických nástrojích,
4) v dovednostech řízení projektů,
5) v publikování výsledků v impaktovaných, anglicky psaných časopisech.

Molonkol

1) Semináře v rámci Komplexního onkologického centra Olomouc — **24 + 6 akcí, 600 proškolených**
2) Satelitní sympozium na Dnech klinické a praktické pediatrie v Olomouci — **3 akce, 150 proškolených**
3) Satelitní sympozium na Dnech diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie v Olomouci — **3 akce, 150 proškolených**
4) Academic writing course — **1 dvoufázová akce, 20 proškolených**
5) Kurz softwarového řízení onkologického výzkumu — **1 akce, 20 proškolených**

Zahájení: červenec 2009

Ukončení: červen 2012

Webové stránky: www.molonkol.org

Kontakty: doc. Mgr. Jiří Drábek, PhD. / řešitel
jiri_drabek@seznam.cz),

Ing. Jana Lukešová / projektová manažerka
jana.lukesova@upol.cz),

Věra Drozdová / asistentka
drozdova.vera@centrum.cz

MUDr. Petr Džubák, PhD. / garant aktivity 1
dzubakp@gmail.com

MUDr. Josef Srovnal / garant aktivity 2
josef.srovnal@seznam.cz

RNDr. Radek Trojanec, PhD. / garant aktivity 3
Radek.Trojanec@seznam.cz

Zuzana Cibulková, DiS. / garantka aktivity 4
zucib@seznam.cz

Mgr. Marta Dziechciarková, PhD. / garantka aktivity 5
mdziechciarkova@seznam.cz

Tento projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA NÁDORŮ

Předsedající: Holubec L., Belej K. – čtvrtek / 2. 12. 2010 / 15.20–16.35

Cd133+ buňky (nádorové kmenové buňky) v nádorech dětského věku – pilotní studie

prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.[1], MUDr. Mohamed Ashraf Abdel Rahman[1], MUDr. Aleš Vícha, Ph.D., MUDr. Daniela Kodetová[2]

[1] Klinika dětské hematologie a onkologie a 2. Ústav patologie a molekulární medicíny UK Praha

[2] 2. LF UK a FN Motol, Praha

Úvod: Kmenové nádorové buňky (CSC) jsou subpopulací nádorových buněk odpovědných za vznik a vývoj onemocnění, u kterých se předpokládá asymetrické dělení[1]. Experimentální studie ukazují, že tyto buňky jsou již v malém množství schopny přenést nádor při transplantaci imunodeficitním myším[2] a jsou rezistentní k řadě cytostatik i k radioterapii[3,4]. U většiny lidských nádorů se jedná o buňky nesoucí na svém povrchu antigen CD133[5].

Cílem naší práce bylo získat údaje o výskytu CD133+ buněk v nádorech dětského věku a o jejich možném prognostickém významu.

Metoda a pacienti: Zastoupení CD133+ buněk v homogenátech nádorové tkáně jsme zjišťovali průtokovou cytometrií za použití protilátky anti CD133/2 PE (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, SRN). Vyšetřili jsme 34 nádorů (7 mozkové, 7 sarkomy měkkých tkání, 5 neuroblastom, 3 osteosarkomy, 2 hepatoblastomy, 2 nefroblastomy, po jednom mezoblastickém nefromu, Burkitově lymfomu, Ewingovu sarkomu, nazofaryngeálním karcinomu, histiocytoze z Langerhansových buněk, teratom s maligní složkou, maligním rhabdoidním nádoru srdce, solidním papilárním nádoru pankreatu).

Výsledky a diskuze: Průměrná hodnota zastoupení CD133+ buněk byla 7,69 s.d. 18,82 rozmezí 0,2–97, po vyloučení tří extrémně vysokých hodnot nad 20 % byl průměr 2,44 a s.d. 3,58. Nejvyšší podíl CD133+ buněk obsahovaly rhabdomyosarkomy (průměr 4,52, s.d. 6,63) a mozkové nádory (průměr 8,2, s.d. 15,2). Extrémní zastoupení CD133+ buněk bylo v embryonálním paratestikulárním rabdomyosarkomu – 19 %, anaplastickém ependymomu – 43 %, maligním rahbdoidním nádoru srdce – 51 % a solidním papilárním nádoru pankreatu – 97 %. Rhabdoidní nádory mají velmi špatnou prognózu. V literatuře je popsaný vysoký výskyt CD133+ buněk v rhabdoidních nádorech CNS. CD133+ buňky izolované z těchto nádorů jsou schopné vyvolat tvorbu nádorů po transplantaci SCID myším[6]. Solidní papilární nádor pankreatu je nízce maligní nádor, který metastazuje zřídka, proto je velké zastoupení CD133+ buněk překvapivé. Je otázkou, zda tyto CD133+ buňky byly skutečně kmenové.

Nenalezli jsme signifikantní vztah k předchozí chemo a/nebo radioterapii. Protože nádory u dětí léčených předchozí chemoterapií neměly vyšší zastoupení CSC, nelze spekulovat o tom, že CSC „vždy více přežívají chemoterapii". Vyšší zastoupení CD133+ buněk bylo v primárních nádorech pacientů s hematogenními metastázami (průměr 8,44, s.d. 18,52).

Souhrn: Naše první výsledky ukazují, že zastoupení CD133+ buněk v nádorech významně kolísá a liší se u jednotlivých histologických typů, ale kolísá i v rámci jednotlivých nádorů – u rhabdomyosarkomu 0,4–97 %. Informace o zastoupení CD133+ buněk může být významným prognostickým nebo prediktovním znakem, protože experimentální studie prokazují jejich chemorezistenci[3,4].

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT-VZ MSM0021620813.

Literatura

1. Kell SE, et al: PLoS ONE 2010; 5: e10035
2. Mizrak D, et al: J Pathol 2008; 214: 3
3. Vangipuram SD, et al: Pediatr Blood Cancer. 2010;54:361
4. Jiang X, et al: BMC Cancer. 2010 Mar 26;10:116
5. Neuzil J, et al: Biochem Biophys Res Commun 2007; 355:85
6. Chiou S-H, et al.: PLOSOne 2009; 3. doi:10.1037

Cytokeratines in predicting therapy response and prognosis of colorectal cancer patients

doc. MUDr. Luboš Holubec[1], MUDr. Vít Martin Matějka[2], Dr.med. Stefan Holdenrieder[4], doc. MUDr. Jindřich Fínek, Ph.D.[1], Dr.med. Petra Stieber[4], MUDr. Václav Liška, Ph.D.[3], prof. MUDr. Vladislav Třeška, DrSc.[3], RNDr. Martin Pešta, Ph.D.[2], prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.[2]

[1] RTO FN a LF UK Plzeň

[2] ONM a CRL FN a LF UK Plzeň; Chirurgická klinika FN a LF UK Plzeň

[3] Institute of Clinical Chemistry, University of Munich, Germany

Abstract: Aim: Cytokeratines are valuable markers in diverse cancer diseases. Here we investigate their role in predicting therapy response and estimating prognosis in colorectal cancer (CRC) patients undergoing chemotherapy.

Methods: We analyzed the courses of CYFRA 21-1, TPA, TPS, M30, CEA and CA 19-9 in prospectively collected sera of 30 patients with colorectal cancer during adjuvant (N=15) and primary (N=15) chemotherapy and correlated the marker levels with therapy response after two months and overall survival (OS).

In addition we investigated pretherapeutic serum levels of CYFRA 21-1, M30, CEA and CA 19-9 in 42 CRC patients, 45 with benign colorectal diseases and 51 healthy controls.

Results: Median values of cytokeratins, CEA and CA 19-9 were not different in the adjuvant and primary setting. Concerning response of primary therapy, pretherapeutic (BV1) and values before cycle 2 (BV2) of CYFRA 21-1, TPA and TPS were lower in responding patients, and also M30 (BV1). Further, kinetics from cycle 1 to 2 (BV1-2) or 1 to 3 (BV1-3) discriminated between response groups. Favourable 3-year OS was indicated by low BV1 of CYFRA 21-1, TPA, TPS, CEA and CA 19-9 as well as by low BV1-3 of TPA, CEA and CA 19-9. In adjuvant therapies, a favourable 3-year OS was indicated by low BV1 of M30, CEA and CA 19-9 as well as by low BV1-3 of all cytokeratins.

Similar to CEA and CA 19-9, CYFRA 21-1 was elevated in CRC patients as compared with benign diseases and healthy controls and showed stage-dependency, while M30 was not stage dependent.

Conclusion: Cytokeratins may be useful as additive markers in predicting therapy response and estimating prognosis in colorectal cancer patients and should be included in future multimarker analyses.

Supported by the research project VZMSM 0021620819, and grant IGA MZ CR 10230.

Minimální reziduální choroba u pacientů s karcinomem plic – pilotní studie

Mgr. Andrea Benedíková[1], MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.[1], prof. MUDr. Jiří Klein, Ph.D.[2],

MUDr. Pavel Skalický, Ph.D.[2],
MUDr. Marek Szkorupa[2],
Věra Růžková[1],
Mgr. Lenka Radová, Ph.D.[1],
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1]
[1] Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc
[2] I. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

Úvod: Minimální reziduální chorobou (MRD) u pacientů s karcinomem plic rozumíme přítomnost izolovaných nádorových buněk v těle pacienta, u něhož byl odstraněn primární tumor a který je v současnosti bez klinických známek onemocnění. Tyto izolované nádorové buňky lze na základě současných znalostí považovat za prekurzory mikrometastáz. Posouzení MRD u pacientů s tímto vysoce maligním onemocněním by mohlo eliminovat provedení zatěžujícího chirurgického výkonu u nemocných se systémovou molekulární diseminací nemoci a zpřesnit prognózu onemocnění.

Metody: Pro vyšetření přítomnosti MRD u pacientů s karcinomem plic jsme validovali metodu RT-PCR v reálném čase za použití karcinoembryonálního antigenu (CEA), receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), lung-specific X proteinu (LUNX) a receptoru pro hepatocytární růstový faktor (c-met) jako markerů nádorových buněk. Do studie bylo poté zařazeno 58 pa-cientů operovaných s kurativním záměrem pro karcinom plic.

Výsledky: Na základě vyšetření vzorků krve od 98 zdravých dobrovolníků a kostní dřeně od 12 pacientů s nenádorovými a nezánětlivými onemocněními byly statistickými analýzami stanoveny cut-off hodnoty pro jednotlivé markery v daném kompartmentu. Dále byla provedena analýza exprese zvolených markerů v nádorové tkáni nejčastějších tumorů. LUNX je vysoce specificky exprimován v nádorech plicního původu, stejně jako EGFR a CEA. C-met tuto specificitu postrádá. Po vyšetření přítomnosti MRD u pilotního souboru 58 pacientů s karcinomem plic byly naměřené hodnoty exprese testovaných markerů korelovány s klinicko-patologickými charakteristikami a s parametry přežití.

Závěr: Z výsledků analýz je možno usuzovat, že LUNX je vhodným kandidátem na pozici markeru MRD u pacientů s karcinomem plic v krvi i kostní dřeni. Stanovení MRD u karcinomu plic je potencionálním prognostickým markerem, její význam však zůstává ne zcela objasněn.

Práce na tomto projektu je podporována grantem IGA MZ ČR 10285-3.

První zkušenosti s prostate cancer gene 3 (PCA3) při stanovení pooperační prognózy po roboticky asistované radikální prostatektomii

MUDr. Kamil Belej, Ph.D., FEBU
MUDr. Ondřej Kaplan
MUDr. Oto Kőhler, CSc.
MUDr. Jiří Kočárek, Ph.D.
Urologické oddělení,
Ústřední vojenská nemocnice, Praha

Úvod: Dostupné prognostické faktory před radikální prostatektomií u nemocných s karcinomem prostaty jsou nepřesné. U většiny nemocných se předoperační prognóza po operaci zhorší a zjistí se rozsáhlejší lokalizovaný či lokálně pokročilý karcinom, případně jeho agresivnější forma stanovená na základě Gleasonova skóre (GS). Uvedené skutečnosti vedou k hledání dalších prognostických ukazatelů, kdy kromě již zavedené sérové hladiny prostatického specifického antigenu (PSA), se do praktického použití dostala detekce molekulárně genetických faktorů. Jedním z nich je diagnostika mRNA genu s vysokou expresí u karcinomu prostaty s názvem prostate cancer gene 3 (PCA3). Zlepšení odhadu pooperačních nálezů by umožnilo mnohem přesnější využití současných technických možností při radikální prostatektomii (jedno/oboustranné zachování erektilních nervů, zachování hrdla močového měchýře nebo pahýlu močové trubice).

Metodika: V prospektivní studii byl hodnocen PCA3 u pacientů indikovaných k roboticky asistované radikální prostatektomii (RARP) pro biopticky prokázaný lokalizovaný (T1–2) nebo nízkoobjemový lokálně pokročilý (non-bulky T3) adenokarcinom prostaty. Do studie byli zařazeni nemocní schopni celkové anestezie bez dalších indikačních omezení z hlediska hladiny PSA nebo hodnoty GS. Od ledna do března 2010 bylo operováno čtyřicet pět mužů. Kromě výše uvedených ukazatelů (T klasifikace, GS z biopsie, hladina PSA) byl hodnocen i počet pozitivních biopsií, objem prostaty a lateralita pozitivních biopsií. Před operací byla po vyšetření prostaty per rectum v první porci moče vyšetřena mRNA genu PCA3 pomocí komerčně dostupného kitu pro diagnostiku PCA3 v moči (ProgensaTM, Gen-Probe Inc., USA). Výsledek byl hodnocen jako skóre PCA3, tzn. poměr mRNA PCA3 a referenční mRNA PSA vynásobený 1000.

Výsledky: Operace byla provedena u 45 po sobě jdoucích nemocných s průměrným věkem 65 let (46–77 let, medián 67 let) a průměrnou hladinou PSA 7,62 ng/ ml (2,49–15,7 ng/ml, medián 7,19 ng/ml). Dvacet osm ze 44 (64 %) nemocných mělo lokalizovaný karcinom prostaty (pT2) a 40 z 44 (91 %) mužů mělo GS ≤ 7. U jednoho nemocného nebyl nalezen karcinom (pT0). PCA3 v moči nebylo hodnotitelné u jednoho muže (třetí odběr v pořadí), ale opakovaný odběr byl úspěšný. Hodnoty skóre PCA3 nesouvisely s objemem prostaty, hladinou PSA ani s počtem pozitivních vzorků (p>0,05). Byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi patologickou klasifikací karcinomu (pT) a skóre PCA3 (p=0,0465). Vzhledem k nízkému výskytu jiných hodnot bylo provedeno srovnání GS 5 a 6 s GS 7. Nebyla zjištěna statisticky významná souvislost těchto hodnot z hlediska skóre PCA3 (p=0,5587).

Závěr: Výsledky dosavadních studií, včetně naší, přinesly rozporuplné výsledky díky různým inkluzním kritériím a způsobu hodnocení nálezů. K definitivnímu stanovení možností skóre PCA jako prognostického faktoru je potřeba provést studie s větším počtem nemocných.

Projekt byl podpořen Nadací Tomáše Bati.

Molekulární diagnostika cirkulujících nádorových buněk u pacientek s karcinomem prsu a její využití pro klinickou praxi

MUDr. Zuzana Ušiaková,
Mgr. Katarína Kološtová, Ph.D.[3],
Ing. Daniela Pintérová[3],
MUDr. Vladimír Bobek, Ph.D.[3],
RNDr. Ivana Janatková, CSc.[4],
Mgr. Veronika Mikulová[4],
MUDr. Milan Brychta[2],
MUDr. Josef Valchář[2],
doc. RNDr. Ladislav Pecen, CSc.[5],
RNDr. Marianna Romžová, Ph.D.[5],
Ing. Vendula Rusňáková[5],
prof. Mikael Kubista, Ph.D.[5],
doc. MUDr. Petra Tesařová, CSc.[1],
MUDr. Martina Kubecová, Ph.D.[2]
[1] Onkologická klinika VFN a 1. LF UK v Praze,
[2] Radioterapeutická a onkologická klinika FNKV a 3. LF UK v Praze,
[3] Gynekologicko-porodnická klinika FNKV a 3. LF UK, Oddělení nádorové biologie, 3. LF UK v Praze,
[4] ÚKLBD VFN a 1. LF UK, v Praze,
[5] Laboratoř genové exprese, AV ČR, Praha

Úvod: Hlavním cílem prezentovaného projektu je sledování změn genové exprese v cirkulujících nádorových buňkách (CTC) u pacientek s karcinomem prsu a jejich korelace s klinicko-

patologickými vlastnostmi primárního nádorového onemocnění. Hlavním předpokladem je, že genový profil by mohl odrážet riziko generalizace základního onemocnění a může být tak informativní pro volbu terapeutického přístupu u vysoce rizikových pacientek. Odběr periferní krve pro CTC izolaci by mohl v budoucnu představovat tzv. "real-time" biopsii tumoru, která by se mohla stát prostředkem pro sledování dynamiky onemocnění.

Metodika: Do studie bylo v období let 2008–2010 zařazeno 197 pacientek s diagnózou Ca mammy různých stadií (I–IV) léčených neoadjuvatně, adjuvantně nebo paliativně. K vyšetření přítomnosti CTC byl proveden jeden nebo více odběrů periferní krve (5 ml), u pacientek s primárním tumorem před, v průběhu a po ukončení chemoterapie, u generalizovaných pacientek při progresi, před zahájením další linie terapie. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí AdnaTest BreastCancer kitu (AdnaGen AG, Langenhagen, Germany) na principu imunomagetické separace CTC s následnou izolací RNA, reverzní transkripcí a multiplex-PCR analýzou pro detekci EpCAM, MUC-1 a HER-2 transkriptů. Genově specifická pre-amplifikace cDNA z jednotlivých vzorků umožnila zavedení testování genové exprese (qPCR-kvantitativní polymerázová řetězová reakce) dalších 48 markerů na „microfluidic" chipu Biomark® (Fludigm, USA). Získaná data byla analyzována pomocí programu GenEx ver. 5.0 (MultiD, SE) a korelovány s daty klinickopatologickými.

Výsledky: Získané výsledky potvrzují, že expresní profily CTC-buněk u pacientek s karcinomem prsu jsou příbuzné buňkám samotného primárního nádoru. Naopak u pacientek s metastatickou formou onemocnění se CTC-expresní profily od primárního nádoru výrazně liší, což potvrzuje teorii, že nádorová buňka prochází několika změnami pro dosažení metastatického potenciálu. Z celkového počtu pacientek (n=197) byla CTC pozitivita v minimálně jednom odběru průkazná v 32 % případů. Zajímavostí je, že z 44 tripple negativních pacientek byla CTC pozitivita detekována v poměrně vysokém počtu případů (36 %). U ER pozitivních pacientek byla CTC pozitivita stanovena v 28 %. Ve skupině pacientek léčených neoadjuvantně a adjuvantně byly vyčleněny 2 skupiny nemocných, které byly odebrány jak před zahájením terapie, tak v jejím průběhu a po ukončení léčby. Výsledky ukazují, že před terapií byl počet CTC pozitivních vzorků vyšší než po dvou cyklech chemoterapie nebo po jejím ukončení. Pacientky s generalizovaným onemocněním (n=42) byly odebrány při progresi nemoci nebo suspektní progresi, CTC pozitivita v minimálně jednom odběru byla detekována u 38 % pacientek. Výsledky CTC-testů byly dále korelovány s klinickými daty jednotlivých pacientek. Korelace přítomnosti CTC s velikostí tumoru, gradem, stavem hormonálních receptorů ani počtem postižených lymfatických uzlin se nejeví být průkazná, probíhá statistická analýza. CTC se zdají být vhodným biomarkerem definující pacientku s horší prognózou. Naše výsledky ale poukazují na jejich možné využití i v sledování účinnosti terapie. Geny rozdělující pacientky na jednotlivé skupiny jsou předmětem dalšího zkoumaní a první výsledky budou po ukončení statistických analýz brzy prezentovány.

PREDIKTIVNÍ FAKTORY A LÉČIVA

Předsedající: Šmardová J., Svoboda M. – čtvrtek / 2. 12. 2010 / 16.45–18.15

Aplikace Avastinu v MOÚ

Eva Vykoukalová,
Eva Vránová
Masarykův onkologický ústav Brno

Biologická léčba se stala významnou součástí komplexní onkologické léčby, přičemž významně ovlivnila léčebné postupy.

Maximální přizpůsobení léčby zohledňující genetický profil pacienta a specifické charakteristiky jednotlivých nádorů (např. specifické receptory, poruchy signálních drah, …),

tzv. „LÉČBA NA MÍRU" umožňuje dosahovat nejlepších terapeutických výsledků, ale také maximálně sníží počet či závažnost nežádoucích účinků a v neposlední řadě i náklady spojené s léčbou.

K tomu, aby tato léčba mohla probíhat co nejefektivněji a dosáhla nejlepších úspěchů, musí nelékařský personál dobře znát zásady aplikace těchto léků. Proto jsou sestry pravidelně školeny a seznamovány s účinky léků, jejich způsobem podání a možnými reakcemi. Sestra musí zavčas rozpoznat eventuální symptomy a informovat ošetřující lékaře.

Pacienta a jeho rodinu správně edukovat a získat si je pro dobrou spolupráci, která má nezastupitelné místo při této léčbě.

Jedním z prvních používaných biologických léků je Avastin.

Avastin je humanizovaná monoklonální protilátka proti VEGF (cévní endotelový růstový faktor). Vychytává cirkulující VEGF v plazmě a tím snižuje jeho stimulační efekt na nádorovou angiogenezi.

Výsledky léčby lokálně pokročilého adenokarcinomu rekta neoadjuvantní konkomitantní radioterapií a chemoterapií na bázi fluoropyrimidinů.

Analýza souboru 201 pacientů léčených v MOÚ v letech 2002 až 2009. Identifikace klinicko-patologických a molekulárních prediktorů efektivity léčby.

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.,
MUDr. Ilona Kocáková, Ph.D.,
MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.,
RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.,
MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.,
Mgr. Lenka Radová, Ph.D.,
MUDr. Ingrid Garajová, Ph.D.,
MUDr. Ivo Kocák, Ph.D.,
doc. MUDr. Roman Šefr, Ph.D.,
MUDr. Lukáš Sirotek,
MUDr. Zdeněk Eber,
MUDr. Lenka Slámová,
MUDr. Lukáš Pochop,
MUDr. Jana Gombošová,
MUDr. Petr Čoupek,
MUDr.Eva Krejčí,
MUDr. Miloš Pacal,
MUDr. Jaroslav Staníček,
MUDr. Zdeněk Kaplan, Ph.D.,
MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.,
prof. MUDr. Pavel Šlampa, CSc.,
doc. MUDr. Marian Hajdúch, Ph.D.,
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, Ph.D.
Masarykův onkologický ústav,
Klinika komplexní onkologické péče, Brno

Abstrakt nedodán.

5-fluorouracil v neoadjuvantní léčbě kolorektálního karcinomu

MUDr. Jiří Grim, Ph.D.[1], MUDr. Peter Priester[1], prof. MUDr. Jiřina Martínková, CSc.[2], Ing. Miloš Hroch[2]

[1] Klinika onkologie a radioterapie, FN Hradec Králové

[2] Ústav farmakologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové

Neoadjuvantní chemoradioterapie kolorektálního karcinomu je standardním léčebným postupem u lokálně pokročilého onemocnění ve stadiu Dukes B a C. Ačkoliv je lokoregionální kontrola většinou dostatečná, problémem zůstává i nadále disseminace onemocnění a jeho relapsy. Na souboru zatím 10 nemocných jsme proto proměřovali hodnotu dosažené koncentrace 5-fluorouracilu (5-FU) podávaného intravenózně kontinuálně v 7denní infuzi konkomitantě s radioterapií. Ani v jednom případě se nepodařilo dosáhnout expozice doporučované v odborné literatuře.

2-Substituted-3-Hydroxyquinoline-4(1*H*)-one-Carboxamides as potential anti-cancer drugs

Mgr. Ivo Frydrych[1], MUDr. Petr Džubák, Ph.D.[1], RNDr. Miroslav Soural, Ph.D.[2], doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.[2], Ing. Petr Funk[2], Mgr. Petr Konečný[1] doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1]

[1] Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translation Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital in Olomouc

[2] Department of Organic Chemistry, Institute of Molecular and Translation Medicine, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Structure-activity relationship at derivatives of 2-substituted-3-hydroxyquinoline-4(1*H*)-one-7-cyrboxamides was systematically studied using combinatorial solid-phase synthesis and in vitro cytotoxic activity on representative cancer lines. The effect of substituent type in position 2 as well as of the carboxamide group was investigated via synthesis of generic libraries constructed with respect to polarity, hydrophility and bulkiness of appropriate substituents. The process of development afforded set of compounds with significant cytotoxic activity. Subsequently, corresponding 2-substituted-3-hydroxyquinoline-4(1*H*)-one-8-carboxamides were prepared to evaluate the influence of the carboxamide group position on the resulting biological activity.

To predict the potential cellular targets of compounds action, panel of flow-cytometry methods was used. Distinct effects on cell cycle progression, RNA or DNA synthesis as well as on apoptosis induction have been observed among certain compounds.

The work was supported by grants LC07017, FM EEA/Norway (A/CZ0046/1/0022) and MSM6198959216, infrastructural part was supported by project Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C.1.05/2.1.00/01.0030.

Diverse groups of tritepenoid compounds derived from betulinic acid rapidly inducing apoptosis and G2/M block

Mgr. Jiří Řehulka[1], MUDr. Petr Džubák, Ph.D.[1], Mgr. Dušan Holub[1], Mgr. Tomáš Oždian[1], Bc. Alžběta Kameníčková[1], Mgr. Petr Konečný[1], Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.[1], Mgr. Soňa Šálková[1], RNDr. Jan Šarek, Ph.D.[2], RNDr. Miroslav Kvasnica, Ph.D.[2], Ing. Miloš Vlk, CSc.[3], doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.[1]

[1] Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital in Olomouc

[2] Department of Organic Chemistry, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Science, Palacky University

[3] Dept. of Nuclear Chemistry, Faculty of Nuclear Sciences and Physical Engineering, Czech Technical University

Betulinic acid and its derivatives are cytotoxic compounds with the specific effect to the tumor cells. In our betulinic acid derivative chemical library we have identified several potent compounds which were highly active in the wide spectrum of the cancer cell lines and the primary tumour cells as well as. Cell cycle modulating effects of selected compounds were monitored and surprisingly the compounds with different effect on the cell cycle profile were observed. Some derivatives were inhibiting the progression through the early S or G2-M phases and some were rapidly inducing the apoptosis. To identify the mechanisms of the action we have used genomic expressional (Affymetrix) and proteomic profiling (LC-MS/MS, SILAC). Derivatives inducing the rapid induction of the apoptosis were identified to regulate and affect the mRNA expression of the genes and proteins closely related to the oxidative stress and to the detoxification enzymes. Glutathione detoxification pathway and the oxidative phosphorylation cascade (upregulation of glutathion peroxidase, peroxiredoxine, thioredoxin, sulfiredoxine, cytochrome c oxidase, down regulation of glutathion S transferase) were affected and direct interaction of derivatives with cytochrome c was observed. All previously mentioned mechanisms are closely related to the mitochondrion damage. However, derivatives inducing the G2/M block were also increasing the expression of the tubulin chaperone cofactor A (TBCA) and the underexpression of other proteins like chaperonin containing TCP1, subunit 3 (CCT3) related to tubulin polymerization pathway and cell cycle regulation. β-tubulin/CCT complex was recently suggested to be potential target for the cancer therapy and current works are showing the upregulation of tubulin chaperone cofactor C correlated to the suppression of the tumor growth and increased chemosensitivity in resistant cancer phenotypes.

This work was supported by the GACR 301/09/P433, GACR 305/09/1216 and CZ.1.05/2.1.00/01.0030). Infrastructural part was supported by project Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C.1.05/2.1.00/01.0030.

MOŽNOSTI PODPORY VÝZKUMU A VÝVOJE PRO FIRMY V ČESKÉ REPUBLICE V OBLASTI MEDICINÁLNÍ CHEMIE A BIOTECHNOLOGIÍ

SEMINÁŘ KLASTRU MEDCHEMBIO KONANÝ V RÁMCI VI. DNŮ DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE

pátek / 3. 12. 2010 / Sál Andromeda, 1. patro

Program semináře:

9:30 Registrace účastníků
10:00 Zahájení semináře – Martin Fusek, MedChemBio
10:05 Úvodní slovo – náměstek hejtmana Olomouckého kraje – Ing. Pavel Horák
10:10 TAČR – podpora výzkumu a vývoje, současný stav – Martin Bunček, TAČR
10:40 Podpora pomocí „seed fondů" – Jakub Dvořáček, CzechInvest
11:10 Přestávka
11:30 Informace o programu MPO – TIP – zástupce Ministerstva průmyslu a obchodu ČR
11:50 Zkušenosti klastru CzechBio – Marek Polach, CzechBio
12:10 CzechInvest a podpora medicinální chemie – Jiří Krechl, CzechInvest
12:30 Zkušenosti Jihomoravského inovačního centra – Michal Kostka, JIC
13:00 Diskuze, závěr

ORGANIZACE SEMINÁŘE MEDCHEMBIO JE SPOLUFINANCOVÁNA Z PŘÍSPĚVKU OLOMOUCKÉHO KRAJE.

Olomoucký kraj

MedChemBio
klastr medicinální chemie a chemické biologie

POSTERY

Frekvence jednonukleotidových polymorfizmů spojených s výskytem trombózy u pacientů s mnohočetným myelomem léčených thalidomidem

Ing. Martina Almáši, Ph.D.[1], Mgr. Sabina Ševčíková, Ph.D.[1], Bc. Petra Kaisarová[1], Mgr. Hana Šváchová[1], MUDr. Luděk Pour, Ph.D.[1,2,3], Barbora Sáblíková[1], Drahomíra Kyjovská[1,3], Petra Vidláková[1,3], prof. MUDr. Roman Hájek, CSc.[1,2,3]

[1] **Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina, Babákův výzkumný institut, LF MU Brno**

[2] **Interní hematoonkologická klinika, LF MU a FN Brno**

[3] **Oddělení klinické hematologie FN Brno**

Úvod: Žilní tromboembolie (VTE) a pozdější možný rozvoj plicní embolie je častým vedlejším účinkem léčby thalidomidem u pacientů s mnohočetným myelomem (MM). Kandidátní, dědičné, jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs), založené na záměně jedné báze v DNA, spojované s výskytem trombózy, byly vybrány na základě výsledků projektu BOAC („Bank On A Cure").

Cíl: Cílem této práce bylo zjistit prevalenci polymorfizmů spojovaných s výskytem trombózy u pacientů s MM v české populaci.

Soubor pacientů a metody: Pro zjištění frekvence genotypů kandidátních genů bylo provedeno testování genomové DNA od 65 pacientů s diagnostikovaným MM (32 žen/33 mužů); průměrný věk při zahájení terapie 59,3 let. K výskytu trombózy došlo u 25 % sledovaných pacientů (16/65) léčených thalidomidem, z nichž 94 % (61/65) bylo bez antitrombotické profylaxe a 6 % (4/65) s profylaxí. Pro analýzy jednonukleotidových polymorfizmů byla použita metoda real-time PCR na přístroji Step-One (Applied Biosystems). Data byla zpracována ve statistickém programu StatSoft CR s r. o. (2007). Hardy-Weinbergerova rovnováha, vycházející ze stejné frekvence alel napříč generacemi, byla testována u každého polymorfizmu pomocí testu χ^2, zvlášť ve skupině pacientů s trombózou a bez trombózy. Pro statistické analýzy byl použit model logistické regrese k vyjádření poměru šancí (ORs, odds ratio) a 95 % intervalu spolehlivosti (CI). Všechny testy byly provedeny na 5 % hladině významnosti. Homozygot nejčetnější alely byl zvolen jako referenční skupina, ke které se vztahoval poměr šancí.

Výsledky: Polymorfizmus genu ALDH-1A1 (rs168351) nesplňoval podmínky H.-W. rovnováhy a byl dále vyřazen z analýzy. Ostatní polymorfizmy tyto podmínky splňovaly; gen CINP (rs7011) pacienti s trombózou (χ^2=1,778; P=0,411) a pacienti bez trombózy (χ^2=0,108; P=0,947), gen CETP (rs289747) (χ^2=0,236; P=0,888) a (χ^2=0,218; P=0,897), gen ALDH1A1 (rs610529) (χ^2=1,985; P=0,371) a (χ^2=0,208; P=0,901), gen CDKN1A (rs3829963) (χ^2=0,852; P=0,653) a (χ^2=0,783; P=0,676), gen GAN (rs2608555) (χ^2=0,000; P=1,000) a (χ^2=0,109; P=0,947), gen VEGF (rs699947) (χ^2=0,000; P=1,000) a (χ^2=0,980; P=0,613). U několika genotypů jsou výsledky blízké statistické významnosti: u pacientů s trombózou byla pozorována zvýšená frekvence genotypu CC genu ALDH-1A1 (rs610529) (43,8 % vs. 20,4 %; ORs=3,03 ve srovnání s ostatními genotypy; p=0,072) a snížená frekvence genotypu CC genu VEGF (rs699947) (6,3 % vs. 26,5 %; ORs=0,13 ve srovnání s genotypem AA; p=0,066). Pro ověření naznačených vztahů bude nutné vyšetření rozsáhlejšího souboru pacientů, který doplňujeme o další MM pacienty s trombózou.

Závěr: Zjištěné údaje o frekvenci variantních polymorfizmů spojených s výskytem trombózy mohou napomoci k efektivnějším a racionálnějším profylaktickým opatřením této komplikace léčby u pacientů s MM.

Práce vznikla za podpory grantů MŠMT LC06027 a MSMT0021622434.

Gene expression profiling reveals new aspects of *PIK3CA* mutation in ERalpha-positive breast cancer: major implication of the Wnt signaling pathway

Magdalena Čížková[1,2*], Géraldine Cizeron-Clairac[1*], Sophie Vacher[1], Aurélie Susini[1], Catherine Andrieu[1], Rosette Lidereau[1], Ivan Bièche[1]

[*] **These authors contributed equally to this work**

[1] **Laboratoire d'Oncogénétique – INSERM U735, Institut Curie/Hôpital René Huguenin**

[2] **Laboratory of Experimental Medicine, Department of Paediatrics, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic**

Background: The PI3K/AKT pathway plays a pivotal role in breast cancer development and maintenance. *PIK3CA*, encoding the PI3K catalytic subunit, is the oncogene exhibiting a high frequency of gain-of-function mutations leading to PI3K/AKT pathway activation in breast cancer. *PIK3CA* mutations have been observed in 30% to 40% of ERα-positive breast tumors. However the physiopathological role of *PIK3CA* mutations in breast tumorigenesis remains largely unclear.

Methodology/Principal Findings: To identify relevant downstream target genes and signaling activated by aberrant PI3K/AKT pathway in breast tumors, we first analyzed gene expression with a pangenomic oligonucleotide microarray in a series of 43 ERα-positive tumors with and without *PIK3CA* mutations. Genes of interest were then investigated in 249 ERα-positive breast tumors by real-time quantitative RT-PCR. A robust collection of 19 genes was found to be differently expressed in *PIK3CA*-mutated tumors. *PIK3CA* mutations were associated with over-expression of several genes involved in the Wnt signaling pathway *(WNT5A, TCF7L2, MSX2, TNFRSF11B)*, regulation of gene transcription *(SEC14L2, MSX2, TFAP2B, NRIP3)* and metal ion binding *(CYP4Z1, CYP4Z2P, SLC40A1, LTF, LIMCH1)*.

Conclusion/Significance: This new gene set should help to understand the behavior of *PIK3CA*-mutated cancers and detailed knowledge of Wnt signaling activation could lead to novel therapeutic strategies.

Riziko vzniku adenokarcinómu pľúc v asociácií s polymorfizmami génov GSTM1, GSTT1, GSTP1, hOGG1 a XRCC1

MUDr. Anton Dzian, PhD.[1], RNDr. Tatiana Matáková, PhD.[2], doc. RNDr. Erika Halašová, PhD.[3], doc. MUDr. Julián Hamžík, PhD.[4], MUDr. Elena Kavcová, PhD.[5], RNDr. Jozef Hatok, PhD.[6], doc. MUDr. Dušan Mištuna, PhD.[7]

[1] **Chirurgická klinika JLF UK a Univerzitnej nemocnice Martin**

[2] **Ústav lekárskej biochémie JLF UK**

[3] Ústav lekárskej biológie JLF UK
[4] Chirurgická klinika JLF UK a UNM
[5] Klinika tuberkulózy a pľúcnych chorôb JLF UK a UNM
[6] Ústav lekárskej biochémie JLF UK
[7] Chirurgická klinika JLF UK a UNM

Úvod: Karcinóm pľúc je najčastejším typom zhubného nádoru v ľudskej populácii a patrí k nádorovým ochoreniam s najvyššou letalitou. Asi 90 % karcinómov pľúc je spôsobených fajčením, 10–15 % profesionálnou expozíciou karcinogénom, 1–2 % sú v dôsledku znečistenia ovzdušia. Zaujímavý je údaj, že z celkového počtu fajčiarov len 10–25 % naozaj ochorie na karcinóm pľúc a 10–15 % všetkých pľúcnych karcinómov sa vyskytuje u nefajčiarov. Jedným z vysvetlení tejto individuálnej susceptibility môže byť fakt, že organizmus disponuje rozsiahlym biotransformačným enzymatickým systémom s cieľom detoxifikácie xenobiotík a ďalšími enzymatickými systémami zúčastňujúcimi sa na reparačných procesoch poškodenej DNA. V procese II. fázy detoxifikácie xenobiotík zohrávajú centrálnu úlohu glutatión-S-transferázy (GSTs), ktoré katalyzujú konjugáciu elektrofilných molekúl s glutatiónom, čo umožňuje ich ďalší metabolizmus a následnú premenu na deriváty ľahko vylúčiteľné močom. Najintenzívnejšie študované sú polymorfizmy génov GSTT1, GSTM1, GSTP1. V GSTM1 a GSTT1 génoch boli identifikované delečné mutácie, ktoré majú za následok kompletnú stratu aktivity enzýmov. V prípade polymorfizmu GSTP1 ide o zámenu aminokyselín (Ile→Val) v polohe 105. Výsledkom sú tri variantné genotypy, kde heterozygotná a homozygotná varianta Val105 má za následok zníženú aktivitu enzýmu. Na ochranu genómu má bunka vyvinutý efektívny reparačný systém, na ktorom sa podieľa asi 150 génov. Opravy DNA procesom bázovej excíznej reparácie (BER) sa zúčastňuje okrem iných aj gén XRCC1. Genetický polymorfizmus génu XRCC1 spôsobuje zámenu aminokyselín (Arg→Gln) v polohe 399, čo má za následok zníženú účinnosť tejto opravy. Asi najvyskytovanejším oxidatívnym aduktom DNA báz je 8-oxoguanín, pričom jeho prítomnosť je mutagénna. Hlavným mechanizmom odstraňovania 8-oxoguanínu je bázová excízna oprava, ktorá sa uskutočňuje pomocou enzýmu hOGG1. Polymorfizmus génu hOGG1 má za následok substitúciu Ser→Cys na kodóne 326, čo je spojené so zníženou enzýmovou aktivitou. Cieľom práce bolo sledovanie výskytu polymorfizmov biotransformačných a reparačných génov, ich kombinácií, ako možných prediktívnych faktorov v rozvoji adenokarcinómu pľúc. Pľúcny adenokarcinóm sa za posledné roky stal najčastejším typom pľúcneho karcinómu, s prevahou jeho výskytu u nefajčiarov. Taktiež boli popísané rôzne genetické a epigenetické alterácie v nádorových bunkách karcinómu pľúc, ktoré sa odlišujú podľa jednotlivých histologických typov a tým poukazujú na rozdielne patogenetické cesty vývoja jednotlivých typov karcinómu pľúc. Preto by mohli byť aj niektoré polymorfizmy preferenčne asociované s rôznymi typmi karcinómu pľúc.

Metodika: Do štúdie typu case-control bolo zaradených 118 pacientov s histologicky verifikovaným adenokarcinómom pľúc. Do kontrolnej skupiny bolo zaradených 290 zdravých dobrovoľníkov a pacientov hospitalizovaných s nenádorovým ochorením. Genomická DNA bola izolovaná fenol-chloroformovou extrakciou z venóznej krvi. Genetické polymorfizmy GSTM1, GSTT1, GSTP1, XRCC1 a hOGG1 boli determinované použitím polymerázovej reťazovej reakcie a PCR-RFLP. Produkty PCR boli analyzované gélovou elektroforézou. Štatistické vyhodnotenie výsledkov a zhoda genotypových distribúcií s Hardy-Weinbergovou rovnováhou bola testovaná pomocou chí-kvadrát testu. ODDs ratio (OR) a 95 % konfidenčný interval (95 % CI) bol použitý k výpočtu rizika rozvoja karcinómu pľúc vo vzťahu k jednotlivým polymorfizmom, ako aj ich kombináciám.

Výsledky: Riziko vzniku a rozvoja adenokarcinómu pľúc bolo štatisticky signifikatne zvýšené v prípade polymorfizmu GSTT1 a predstavovalo 2,13 násobné riziko (95 % CI =1,29–3,51; P=0,004). Polymorfizmy GSTM1 a GSTP1 nepredstavovali v našom sledovaní zvýšené riziko pre pľúcny adenokarcinóm. Pri pľúcnom adenokarcinóme bolo preukázané pri kombinácii genotypov GSTT1null a GSTM1+ 2,17 násobné štatisticky významné riziko pre vznik tohto histologického typu pľúcneho karcinómu (95 % CI=1,07–4,39; P=0,046). Taktiež štatisticky významné riziko s OR=2,83 predstavovala kombinácia genotypov GSTT1null a Ile/Val alebo Val/Val (OR=; 95 % CI=1,34–6,01; P=0,009). Riziko vzniku a rozvoja pľúcneho adenokarcinómu nebolo asociované s polymorfizmom hOGG1 ani XRCC1 génu. Taktiež pri vzájomných dvoj kombináciách genotypov týchto BER génov nebola nájdená žiadna asociácia. V rámci kombinácií genotypov génov metabolických enzýmov a génov reparačných enzýmov bolo pri pľúcnom adenokarcinóme pri kombinácii GSTT1null a Ser/Ser nájdené 2,22 násobné riziko, pričom ide o štatisticky významný vzťah (95 % CI=1,16–4,23; P=0,023). Ďalšou štatisticky signifikantnou asociáciou k vzniku pľúcneho adenokarcinómu bola kombinácia GSTT1null a Arg/Arg, ktorá predstavuje 2,73 násobne zvýšené riziko (95 % CI=1,16–6,41; P=0,034) pri tomto type karcinómu.

Záver: Metabolizmus karcinogénov a opravy DNA sú pod genetickou kontrolou a sú dôležitým faktorom v determinácii a modulácii individuálnej susceptibility ku karcinómu pľúc. Recentné štúdie a taktiež naša case-control štúdia potvrdzujú nejednoznačnosť a nejednotnosť výsledkov výskumu genetických polymorfizmov, ktoré pravdepodobne vyplývajú z rasy, etnika, histologického typu nádoru, veku, fajčenia, expozície na xenobiotiká. Aby sa potvrdil vplyv genetických polymorfizmov prispievajúcich k náchylnosti k vzniku a rozvoju karcinómu pľúc, bude potrebná komplexná genotypizácia ďalších génov zúčastňujúcich sa na detoxifikačných a reparačných procesoch so samostatnou analýzou individuálnych charakteristík ovplyvňujúcich genetické polymorfizmy.

Analýzy globálních profilů exprese mikroRNA u pacientů s kolorektálním karcinomem za účelem diagnostiky metastatického postižení lymfatických uzlin

Bc. Petra Faltejsková[1], RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.[1,2], MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.[1], Mgr. Renata Hežová[1,2], Mgr. Lenka Radová, Ph.D.[3], MUDr. Radim Němeček[1], Andrej Bešše[2], Mgr. Sabina Ševčíková, Ph.D.[2], Mgr. Jiří Šána[1,2], Mgr. Martina Rédová[1], prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D.[2], prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.[1]

[1] Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno
[2] Babákův výzkumný institut, Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, LF MU, Brno
[3] Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc

U pacientů s kolorektálním karcinomem podstupujících radikální chirurgický zákrok je určujícím faktorem pro vývoj onemocnění a indikaci adjuvantní systémové léčby postižení lymfatických uzlin. Zatímco v případě I. a IV. klinického stadia je prognostický význam TNM klasifikace jednoznačný, u skupiny pacientů, kteří jsou dia-

gnostikováni ve II. (bez postižení lymfatických uzlin) a III. klinickém stadiu (s diseminací do uzlin), tomu tak není. Dokazuje to skutečnost, že u 30 % pacientů II. klinického stádia dochází do pěti let k relapsu nádorového onemocnění a pouze 45 % pacientů III. klinického stadia dosahuje pětiletého přežití, a to i přesto, že podstoupili radikální chirurgický zákrok. Je tedy evidentní, že stávající staging onemocnění založený na kritériích TNM klasifikace není optimální, selhává-li u takto významné části pacientů s nepokročilým onemocněním. Jednou z příčin tohoto stavu je jak existence tzv. „understagingu" regionálních lymfatických uzlin (podhodnocení N stadia) z důvodu nedostatečného množství odebraných a/nebo vyšetřených uzlin, tak i skutečnost, že kritéria TNM klasifikace nezahrnují molekulární prediktory biologického chování nádoru. Cílem studie je molekulární charakterizace primárních nádorů tlustého střeva a konečníku pomocí moderního a progresivního přístupu, který je založen na analýze expresních profilů 667 mikroRNA metodou kvantitativní Real-Time PCR arrays na souboru 70 důkladně klinicky charakterizovaných pacientů s kolorektálním karcinomem za účelem identifikace mikroRNA umožňujících diagnostikovat metastatické postižení lymfatických uzlin již z tkáně primárního tumoru. Výsledky této studie budou součástí našeho sdělení. Předpokládáme, že ať již vlastní mikroRNA nebo proteiny, jejichž proteosyntézu ve svém důsledku mikroRNA ovlivňují, bude možné v budoucnosti použít jako nové prediktivní markery rozsahu onemocnění a přiblíží tak realitě možnost individualizace léčby, a tím i dosažení lepších léčebných výsledků a vyšší kvality života u pacientů se zhoubnými nádory tlustého střeva a konečníku.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NS/9814-4/2008 a výzkumným záměrem MZ0MOU2005.

Nové možnosti v laboratorní diagnostice karcinomu prostaty

MUDr. Jaromír Gumulec[1], RNDr. Michal Masařík, Ph.D.[1], Ing. Soňa Křížková, Ph.D.[2], doc. PharmDr. Petr Babula, Ph.D.[3], MUDr. Roman Hrabec[4], MUDr. Arne Rovný[4], Mgr. Natalia Cernei[2], Mgr. Monika Masaříková[1,2], doc. Ing. René Kizek, Ph.D.[2]

[1] Ústav patologické fyziologie, LF MU Brno,
[2] Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně
[3] Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně
[4] Urologické oddělení, Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

Nádorová onemocnění prostaty patří k nejčastějším nádorovým onemocněním mužů v Evropě i ve světě. Díky vysoké incidenci tohoto onemocnění dosahuje také úmrtnost alarmujících hodnot. Nicméně, ve většině případů jde o klinicky němé formy, často prokázané až při pitvě zemřelých na jinou příčinu. Stanovení hladiny PSA nekoreluje s klinickou závažností onemocnění a inklinuje k „prediagnostikování" pacientů. Důsledkem tohoto je zejména významná – zbytečná – psychická zátěž pacientů a ne nevýznamné ekonomické důsledky spojené s dalšími diagnostickými procedurami. Cílem práce je nalézt nové markery tohoto onemocnění. Sarcosin je přírodní, ve vodě rozpustná aminokyselina, která není toxická. I v případě raných stadií vývoje nádoru je sarcosin cenným vodítkem. Nejméně cenné je i to, že ve vzorcích moči odebraných zdravým pacientům nebyl vůbec přítomen. Tím se minimalizuje pravděpodobnost falešné pozitivity. Podle zveřejněných výsledků je sarcosin podstatně lepší indikátor postupující rakoviny než PSA. Přítomnost aminokyseliny sarcosinu upozorňuje právě na agresivní nádory. Pro tento účel je hledána vhodná a jednoduchá analytická metodika.

Dále je nádorová transformace karcinomu prostaty spojena s dysregulací metabolizmu těžkých kovů. Dochází proto – dosud neznámými mechanizmy – ke zvýšení sérové hladiny metalothioneinu (MT), nízkomolekulárního, na cystein bohatého proteinu s antioxidačním potenciálem, účastného detoxikace těžkých kovů. Hladina MT je statisticky významně zvýšena ($p<0,01$) v séru pacientů s biopticky ověřeným acinárním adenokarcinomem (nejčastější formou Ca prostaty) o stagingu T 1c–4; oproti kontrolnímu souboru jsou hladiny zvýšeny více než trojnásobně. Senzitivita zvýšení je v souboru pacientů 100 %. Hladina MT není závislá (koeficient korelace $r<0,2$, případně vyšší a statisticky nevýznamný) na hladině PSA, na stagingu onemocnění a na přítomnosti komorbidit hypertenzní nemoci, hyperlipoproteinémie a ischemické choroby srdeční. Hladina MT se snižuje se zvyšujícím gradingem nádoru ($r=-0,3$ při $p<0,05$).

Protože je MT antioxidant, je zvýšen u řady zánětlivých stavů, nicméně, narozdíl od karcinomu je toto zvýšení hladin přechodným jevem. Mimo karcinom prostaty je hladina MT zvýšena také u dalších nádorových onemocnění – u karcinomu prsu, u nádorů hlavy a krku a u některých lymfomů. To staví MT do pozice možného, velmi přesného markeru řady nádorových onemocnění.

Výzkum této problematiky je podporován granty GACR 301/09/P436, IGA MZ 10200-3 a 9/2010/FaF.

Literatura

ADAM, V., et al.: Zeptomole Electrochemical Detection of Metallothioneins. PLOS ONE, 5(7),e11441, 2010.

ADAM, V., et al.: Vertebrate Metallothioneins as Target Molecules for Analytical Techniques. TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, 29(5),409–418, 2010.

Význam mikroRNA v chemoprotektivním účinku fytochemikálií zeleniny rodu Brassica a jejich vliv na riziko kolorektálního karcinomu

Mgr. Renata Héžová[1,2], RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.[1,2], MUDr. Milena Šachlová[1], Mgr. Veronika Březková[1], Bc. Petra Faltejsková[1,2], Mgr. Sabina Ševčíková, Ph.D.[2], MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.[1], RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.[3], prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D.[2], prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.[1]

[1] Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno
[2] Babákův výzkumný institut, Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, LF MU Brno
[3] Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha – Ruzyně

Brassica je rod řádu rostlin křížatých (Cruciferae), do kterého spadá například hlávkové zelí, čínské zelí, kapusta, květák či brokolice. Důkazy o chemoprotektivním efektu těchto rostlin potvrzují epidemiologické studie z celého světa, ve kterých byl potvrzen pozitivní vztah mezi konzumací tohoto druhu zeleniny a sníženým rizikem nádorových onemocnění různých lokalizací včetně tlustého střeva a konečníku. Deregulace mikroRNA (miRNA) je jednou z kauzálních událostí v kancerogenezi nádorů tlustého střeva a konečníku. Schopnost miRNA regulovat na úrovni translace přibližně třetinu genů lidského genomu dává předpoklad jejich zapojení rovněž do regulace genů metabolizace, případně mechanizmů chemoprotekce fytochemikálií obsažených v zelenině

rodu Brassica. Polymorfizmy zmíněných genů v jejich vazebných oblastech pro miRNA tak ovlivňují vazebnou afinitu dané mRNA k miRNA a schopnost miRNA negativně regulovat jejich translaci. Předpokládáme proto, že tyto polymorfizmy mohou být dalšími genetickými faktory, které utváří schopnost jedince mít prospěch z potenciálně chemoprotektivního účinku fytochemikálií obsažených v zelenině rodu Brassica. V naší pilotní práci jsme identifikovali profily exprese mikroRNA spojené s působením isothiokyanátů (iberinu, erucinu a sulforaphanu) na nenádorovou buněčnou linii střevního epitelu NCM460 a kolorektálního karcinomu DLD1. Dále jsme v asociační studii na souboru 200 pacientů s kolorektálním karcinomem a 150 zdravých kontrol validovali dříve pozorované vztahy vybraných polymorfizmů v biotransformačních enzymech druhé fáze – gluthathion-S-transferázách (GTSM1, GSTT1, GSTP1) k riziku vzniku kolorektálního karcinomu.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NS 10352-3/2009 a výzkumným záměrem MZ0MOU2005.

Immunohistochemical analysis of collagen triple helix containing 1 protein in breast cancer patients

Gvantsa Kharaishvili, MD[1], Magdalena Cizkova, MD[2], Eva Sedlakova MSc[1], Zdenek Kolar, MD, Ph.D., Prof.[1], Jan Bouchal, Ph.D.[1]

[1] **Laboratory of Molecular Pathology of Institute of Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc**

[2] **Laboratory of Experimental Medicine, Pediatric Clinics of Medical Faculty of Palacky University and Faculty Hospital**

Background: We and others have previously identified collagen triple helix containing 1 (CTHRC1) by expression profiling as breast cancer related protein. It has been reported to affect Wnt signalling, collagen deposition and bone formation and generally it belongs to extracellular matrix proteins which are abnormally expressed in tumor microenvironment. As CTHRC1 has not been studied by immunohistochemistry in breast cancer yet we decided to verify its expression in our patients set together with other relevant proteins.

Material and methods: Formalin fixed paraffin embedded tissues of 173 invasive carcinomas (21 with metastases in bone, 29 with other distant metastases), 27 lymph node metastases, 36 benign and 31 normal cases were stained immunohistochemically for proteins CTHRC1, versican, periostin, E-cadherin and beta-catenin. Invasive carcinomas were classified according to hormone receptors and Her-2 expression into luminal, triple-negative and Her2 molecular subtypes. Statistical analysis was performed with SPSS software using Spearman correlation, Wilcoxon and Mann-Whitney U test.

Results: Unless otherwise specified below, CTHRC1 was predominantly localized in cancer cell cytoplasm and extracellular matrix, while versican and periostin were expressed mostly by stromal cells. Expressions of CTHRC1, versican and periostin were significantly higher in breast cancer tissue in comparison to normal ($p<0.001$) and benign ($p<0.001$) ones. Furthermore, CTHRC1 and versican were upregulated (both $p<0.001$) in invasive lobular carcinoma compared to invasive ductal ones, while periostin was downregulated ($p=0.12$). Versican was also upregulated in luminal subtype, compared to both Her-2 and triple-negative cases (both $p<0.01$). Periostin was downregulated in Her2 subtype compared to triple-negative cases ($p=0.018$) and, importantly, its expression was higher in patients with positive lymph nodes compared to negative ones ($p=0.04$). There was no difference for epithelial expression of CTHRC1 between subtypes but its stromal expression was significantly higher in triple negative cases compared to luminal ones (both $p=0.013$). Importantly, stromal expression of CTHRC1 was higher in patients metastasizing to bone compared to non-metastisizing ones ($p=0.04$).

Conclusions: For the first time ever, we analyzed expression of CTHRC1 by immunohistochemistry in breast cancer patients. We confirmed that CTHRC1, versican and periostin are cancer related proteins as previously found by expression profiling experiments. Stromal expression of CTHRC1 may be associated with bone metastases but further experiments are required to clarify this.

This work was supported by grants NS 9956-4 from the Czech Ministry of Health and MSM 6198959216 from the Czech Ministry of Education. Gvantsa Kharaishvili was also supported by LF_2010_006.

Použití čipové kapilární elektroforézy pro detekci a studium agregace metalothioneinu v nádorových liniích a krevním séru pacientů s karcinomem prostaty

Ing. Soňa Křížková, Ph.D.[1], Mgr. Markéta Ryvolová, Ph.D.[1], MUDr. Jaromír Gumulec[2], RNDr. Michal Masařík, Ph.D.[2], prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.[3], doc. Ing. René Kizek, Ph.D.[1]

[1] **Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně**

[2] **Ústav patologické fyziologie, LF MU v Brně**

[3] **Klinika dětské hematologie a onkologie, II. lékařská fakulta, Univerzita Karlova**

Metalothionein (MT) je všudypřítomný na cystein bohatý protein. Jedna z jeho nejznámějších funkcí je detoxifikace a udržování homeostáz těžkých kovů. Nyní je známo, že MT hraje roli také v regulaci genové exprese, transkripce, embryogeneze a imunomodulaci, kromě toho bylo zjištěno, že má také antiapoptotickou funkci. Kromě toho je diskutována jeho úloha v karcinogenezi. Molekulární mechanizmus těchto procesů doposud není dostatečně prozkoumán.

Předpokládá se, že biologická funkce MT je spojena s jeho schopností vázat a uvolňovat těžké kovy a následnou změnou konformace. Za fyziologických podmínek MT obsahuje ionty Zn vázané v cysteinových klastrech. Nedávno bylo zjištěno, že MT je schopen tvorby funkčních agregátů v závislosti na redoxním prostředí a koncentraci těžkých kovů v buňce. Tyto agregáty pravděpodobně hrají roli v jemné regulaci koncentrace Zn, což vede k aktivaci či deaktivaci dalších buněčných procesů. Sledování a posouzení agregovaných a monomerních forem MT při udržování homeostáz těžkých kovů by mohlo přinést zcela nový pohled na biologické procesy spojené s kovy.

Kapilární elektroforéza v čipovém uspořádání umožňuje rychlou a jednoduchou separaci jednotlivých forem MT. Proto byla tato metoda použita pro studium vlivu Zn2+ na agregaci oxidovaného a redukovaného MT a následně také pro analýzu vzorků nádorových linií a krevního séra.

K oxidovanému a redukovanému apo-MT byl přidán ZnCl2 (0, 5, 25, 50 a 100 µM). Interakce Zn2+ s MT probíhala po dobu 1 h při 37°C. Průběh reakce byl monitorován spektrofotometricky (200–300 nm). V získaných spektrech byl pozo-

rován pík s maximem 254 nm, který odpovídal vazbě Zn2+ do struktury MT. Ze získaných dat bylo zjištěno, že rychlost vazby zinku do oxidovaného a redukovaného MT jsou v poměru 0.7, tj., že Zn se váže rychleji do redukovaného MT. Na čipových CE elektroforeogramech byl pozorován pokles zastoupení monomerní formy MT (15 kDa) v závislosti na koncentraci zinku a zároveň nárůst zastoupení agregovaných forem MT (25, 37, 47, 60 a 78 kDa). Agregáty o podobné velikosti byly pozorovány také u prostatických nádorových buněk PC-3 kultivovaných v přítomnosti 0, 5, 25, 50 a 100 µM ZnCl2. V případě analýzy vzorků krevního séra pacientů s karcinomem prostaty a zdravých jedinců byla v elektroforeogramech pacientů pozorována přítomnost píků o velikosti 48–60 kDa, které nebyly přítomny u kontrol. Tyto proteiny vykazovaly imunoreaktivitu se slepičí protilátkou proti MT.

Práce byla podporována výzkumnými projekty GA AV IAA401990701, GA ČR 301/09/P640 a 9GA ČR P301/10/0356

Literatura

KRIZKOVA, S., et al.: Study of metallothionein oxidation by using of chip capillary electrophoresis. Electrophoresis, 30(23), 4029–4033, 2009.

KRIZKOVA, S., et al.: Effects of redox conditions and zinc(II) ions on metallothionein aggregation revealed by chip capillary electrophoresis. J. Chrom. A, 2010 v tisku.

Výsledky separací plazmatických buněk z transportovaných vzorků kostní dřeně

Kyjovská Drahomíra[1,2]
Hanáková Božena[1,2]
MUDr. Pour Luděk, Ph.D.[1,2,3]
RNDr. Burešová Ivana[1,2]
MVDr. Štossová Jana[1]
Mgr. Čumová Jana[1]
prof. MUDr. Hájek Roman, CSc.[1,2,3]

[1] **Univerzitní výzkumné centrum – Česká myelomová skupina, Babákův výzkumný institut, LF MU Brno**
[2] **Oddělení klinické hematologie FN Brno**
[3] **Interní hematoonkologická klinika, LF MU a FN Brno**

Úvod: Mnohočetný myelom (MM) je v České republice relativně vzácné nádorové onemocnění s incidencí 4/100 tis. obyvatel za rok. Naší snahou proto bylo získat další množství biologického materiálu pro výzkum v oblasti MM. V loňském roce jsme zahájili svoz nativních vzorků kostní dřeně (KD) z několika center v České republice a v zahraničí (SR, Polsko). Tato práce prezentuje výsledky, resp. úspěšnost separací plazmatických buněk (PB) z těchto vzorků po dvou letech projektu.

Materiál a metody: V prvním roce projektu bylo přivezeno celkem 219 vzorků KD od pacientů v různých klinických stadiích MM z 8 různých externích pracovišť. Vzorky KD byly transportovány při teplotě do 25°C a zpracovány s prodlevou 3–30 hodin našimi standardními postupy. V prvním kroku byla provedena izolace mononukleární frakce metodou gradientové centrifugace, dále byla provedena buď magnetická separace, nebo třídění na buněčném sorteru, event. kombinace obou. U transportovaných vzorků byla pomocí průtokové cytometrie hodnocena čistota separovaných buněk (% CD138+ buněk) a stanoven absolutní počet buněk pozitivní frakce počítáním v Bürkerově komůrce po obarvení Trypanovou modří.

Výsledky: Z 219 vzorků s mediánem 18 ml (2 – 25 ml) KD bylo přímo po izolaci mononukleární frakce pro nízkou celkovou buněčnost a/nebo nízké zastoupení PB zamraženo bez separace celkem 52 (23,7 %) vzorků. Medián čistoty separovaných PB byl 96,3 % (15,0–99,8 %) s mediánem absolutního počtu buněk pozitivní frakce 0,66 x 106 (0,00–73,60 x 106). Ve srovnatelném období bylo při magnetické a nebo fluorescenční separaci 166 vzorků KD (medián: 30 ml, rozmezí: 5–60 ml) na IHOK FN Brno dosaženo mediánu čistoty pozitivní frakce 94,8 % (24,8–100,0 %) s mediánem absolutního počtu buněk 0,24 x 106 (0,00–168,00 x 106). U transportovaných vzorků PB o čistotě >70 % resp. >80 % je nejčastěji prováděno cytogenetické vyšetření chromozomálních změn u MM (88,1 % vzorků) a komplexní genomový screening pomocí techniky CGH (26,2 % vzorků).

Závěr: Během přípravy projektu transportu vzorků se jako největší rizikový faktor projevil pokles exprese klíčového znaku CD138, kterým identifikujeme buňky pro separaci. V reálné praxi se ale tento pokles v období prvních 3–30 hodin po odběru projevuje jen velmi mírně a nekoliduje s kvalitou separace. Dosažené výsledky čistot frakce PB jsou srovnatelné s netransportovanými odběry realizovanými ve stejném období. Zvažovaná (nákladná a ne zcela spolehlivá) stabilizace transportovaného materiálu se ukázala jako zbytečná a transport nativní KD v protisrážlivém roztoku (EDTA nebo heparin) jako vyhovující.

Tato práce byla podpořena granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky LC06027, MSM0021622434 a grantem IGA NS10406.

Proteiny epitelo-mezenchymové tranzice: rozdíly v expresi Claudin1 a Snail u benigních a maligních kolorektálních nádorů

MUDr. Pavla Látalová[1],
MUDr. Svetlana Brychtová, Ph.D.[1],
Mgr. Michala Bezděková, Ph.D.[1],
Mgr. Eva Sedláková[1],
MUDr. Martin Tichý, Ph.D.[2],
MUDr. Jaroslav Hirňák[3]

[1] **Laboratoř molekulární patologie a Ústav patologie LF UP a FN Olomouc, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP v Olomouci**
[2] **Klinika chorob kožních a pohlavních FN Olomouc**
[3] **Oddělení plastické a estetické chirurgie FN Olomouc**

Úvod: Mechanizmus epitelo-mezenchymové tranzice (EMT) je znám již od 80. let jako významný proces embryogeneze. V současnosti je tento proces předmětem výzkumu v souvislosti s kancerogenezí v rámci složitých interakcí tkáňového mikroprostředí, a to mezi buňkami nádorového stromatu a neoplastickým epitelem. Při EMT hrají jednu z nejvýznamnějších rolí proteiny mezibuněčných spojení a vybrané transkripční faktory. Claudin1, protein tight-junction, se uplatňuje v tvorbě mezibuněčných adhezí, ovlivňuje polaritu epitelových buněk a změny cytoskeletu. Transkripční faktor Snail je pokládán za jeden z centrálních proteinů EMT; kromě jiného ovlivňuje expresi proteinů Claudin1 a E-cadherin.

Cíle: Vzhledem k vlivu stromálního mikroprostředí na různé stupně kancerogeneze jde o možnou cestu k nalezení prognostických a prediktivních markerů a případně cílů molekulárních strategií léčby nádorových onemocnění.

Materiál, metody: V pilotní studii jsme vyšetřili 67 kolorektálních karcinomů a 11 adenomů zpracovaných na parafinové řezy formalínem fixovaných tkání za použití metody nepřímé imunohistochemie na barvicím automatu Ventana Benchmark. Použili jsme myší monoklonální protilátky anti-Claudin1 (sc-81796) v ředění 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, INC) a králičí polyklonální protilátky anti-Snail, v ředění 1:150 (Abcam). Výsledky byly hodnoceny pomocí H-skóre.

Výsledky: Pozitivita Claudin1 se zvyšovala od slabé membránové u normálního epitelu krypt po silnou cytoplazmatickou a/nebo membránovou u adenokarcinomu. Dále jsme

prokázali jeho vyšší pozitivitu u morfologicky normální sliznice v blízkosti adenokarcinomu ve srovnání se vzdálenějším epitelem. Vyšetření proteinu Snail prokázalo signifikantní rozdíly na subcelulární úrovni buněk epitelu, kdy nenádorové buňky vykazovaly pouze jadernou pozitivitu, která byla vystřídána kombinovanou jadernou a cytoplazmatickou pozitivitou u neoplastického epitelu. Dále byla zjištěna výrazně silnější pozitivita nádorového stromatu oproti nenádorovému.

Závěry: Naše současné výsledky Claudin1 korelují s teorií nádorového pole, kdy změny na molekulární úrovni je možné detekovat již v morfologicky normálním epitelu a nejsilnější intenzita IHC pozitivity proteinu je ve shodě s progresí neoplázie. Signifikantní rozdíl pozitivity proteinu Snail ve stromatu neoplázie by mohl pomoci určit nový prognostický marker časných forem kolorektálního karcinomu. Zajímavým zjištěním byla souvislost subcelulární lokalizace a dysplastické/neoplastické transformace epitelu, která zároveň otevírá další otázky v této problematice.

Práce byla podpořena GAČR 304/10/1070 a MSM 6198959216.

Nádory ledvin – soubor urologického oddělení Náchod

MUDr. Petr Prošvic[1], MUDr. Abdulbaset Hafuda[1], MUDr. Vladimír Straka[2]
[1] Urologické oddělení, Oblastní nemocnice Náchod a. s
[2] Patologicko-cytologické oddělení, Oblastní nemocnice Náchod a. s.

Karcinom ledviny je šestý nejčastější nádor u mužů (4.6 % všech nádorů) a sedmý nejčastější u žen (2.8 % všech nádorů). Vzhledem k radiorezistenci a chemorezistenci tohoto nádoru je, bez včasné diagnostiky umožňující radikální chirurgické řešení, pravděpodobnost vyléčení prakticky nulová, přestože nová cílená léčba umožňuje alespoň dočasnou léčitelnost onemocnění, jehož prognóza byla dříve zpravidla zcela infaustní.

V letech 2001–2010 bylo na urologickém oddělení v Náchodě provedeno 252 operací (nefrektomie, resekce ledviny a enkapsulace nádoru, otevřených operací a laparoskopických) pro diagnózu nádoru ledviny (D41.0 – novotvar nejistého či neznámého chování – ledvina, s předpokládanou diagnózou C64 – ZN- ledvina mimo pánvičku).

Sledovali jsme zastoupení věku, pohlaví, stranového výskytu, uložení nádoru na ledvině, jeho velikosti dle zobrazovacích metod a při patologickém vyšetření, TNM a pTNM klasifikace, gradingu nádorů, histologických typů a populace kuřáků.

Operace byla provedena u 163 mužů a 84 žen. Při histologickém vyšetření byl karcinom ledviny prokázán ve 225 případech, ve třech, resp. v jednom případě se jednalo o dva, resp. tři nádory postihující jednu ledvinu a ve čtyřech případech o synchronní nádor obou ledvin. Jedenkrát byla operována lokální recidiva po enkapsulaci. Ve 33 případech (pouze u dvou žen) byl histologicky prokázán papilární renální karcinom (PRCC), u dvou mužů mucinózní a vřetenobuněčný karcinom, v jednom případě karcinom z Belliniho duktů a v jednom případě chromofóbní renální karcinom (CRCC). Ve zbylých případech se jednalo o konvenční světlobuněčný karcinom.

V šesti případech byl prokázán uroteliální karcinom. U mužů byl v osmi případech zjištěn benigní nádor (1x angiomyolipom, 1x multicystický nefrom a 6x onkocytom). U žen byly benigní nádory u jedenácti (1x metanefrický nefrom, 4x angiomyolipom a 6x onkocytom). U dvou mužů byl zjištěn infarkt ledviny, resp. benigní cysta. Tyto nálezy (celkem 27) byly ze souboru vyřazeny.

U části pacientů byla zjištěna neúplná data. Tito byli z daných vztahů vyloučeni.

Agresivní karcinom prsu u pacienta léčeného Estracytem® pro karcinom prostaty – kazuistika

MUDr. Petr Prošvic[1], MUDr. Šárka Lukešová, Ph.D.[1], doc. MUDr. Otakar Kopecký, Ph.D.[1], MUDr. Vladimír Straka[2]
[1] Oddělení klinické onkologie, Oblastní nemocnice Náchod a. s.
[2] Patologicko-cytologické oddělení, Oblastní nemocnice Náchod a. s.

Karcinom prsu u mužů patří mezi vzácné nádory. V roce 2007 se vyskytlo pouze 42 případů. Incidence byla 0.8/100 000, což bylo 0.1 % ze všech nádorových onemocnění u mužů. Karcinom prostaty je naopak nejčastější nádor mužů s incidencí 100.9/100 000 a podílem na nádorových onemocněních 13.2 %.

U pacienta byl v srpnu 2008 zjištěn špatně diferencovaný adenokarcinom, Gleasonovo skóre 8 (4+4), na podkladě biopsie prostaty pro elevaci PSA na 88.5 ng/ml. Klinické stadium bylo stanoveno na IV (cT4, N1, M0). Od září 2008 byl léčen trvalou hormonální léčbou. Pro lokální a biochemickou progresi od října 2009 léčen estramustin fosfátem v dávce 2x280 mg p. o. V dubnu 2010 byla provedena radioterapie pánve 50 Gy ve 25 frakcích s boostem na prostatu 16 Gy v 8 frakcích. V červenci 2010 byla hladina PSA 0.45 ng/ml. Scan kostí byl bez onkologické suspekce.

Od posledního týdne v červnu 2010 pozoroval nebolestivé zvětšení levého prsu se zvětšenými hmatnými uzlinami v levé axile. Estracyt byl ihned vysazen. Dle mammografie provedené v polovině července 2010 byl zjištěn pokročilý infiltrativní nádor levého prsu s vícečetným uzlinovým postižením levé axily a uzlin v okolí levého klíčku a mnohočetnými metastázami jater. Z biopsie zjištěn tzv. triple-negativní hůře diferencovaný duktální karcinom mléčné žlázy. Pacient umírá koncem července 2010 na generalizaci karcinomu prsu.

Analýza expresních profilů mikroRNA za účelem identifikace nových prognostických markerů časného metastazování po nefrektomii

Mgr. Martina Rédová[1], RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.[1,3], Mgr. Jan Hodek[4], MUDr. Radek Lakomý[1], MUDr. Alexandr Poprach[1], MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.[1], Mgr. Lenka Radová, Ph.D.[5], MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.[2], Iliev R.[3], RNDr. Jaroslava Ovesná, CSc.[4], prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D.[3], prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.[1]
[1] Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno
[2] Masarykův onkologický ústav, Oddělení onkologické a experimentální patologie, Brno
[3] Babákův výzkumný institut, Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, Lékařská fakulta MU, Brno
[4] Výzkumný ústav rostlinné výroby, Praha – Ruzyně
[5] Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc

Renální karcinom tvoří přibližně 3 % zhoubných nádorů dospělé populace a z urologických malignit dosahuje nejvyšší letality. Výzkum v ob-

lastech vzniku a vývoje renálního karcinomu vedl k identifikaci klíčových signálních drah a následně i cílené protinádorové léčby prodlužující čas do progrese onemocnění, případně i celkové přežití léčených pacientů. Jedním z nejmodernějších přístupů k molekulární charakterizaci solidních nádorů, včetně renálního karcinomu, je analýza mikroRNA. MikroRNA jsou krátké nekódující RNA tvořící mladou a velice progresivní oblast molekulárně-biologického výzkumu. MikroRNA mají schopnost post-transkripčně regulovat genovou expresi a podle odhadu bioinformatiků jsou schopny regulovat až jednu třetinu lidských genů. Dnes již víme, že některé z těchto genů jsou také významné onkogeny či nádorové supresory. Geny regulované pomocí mikroRNA jsou nejen součástí procesu onkogeneze, podílejí se také na nádorové invazivitě, diseminaci nebo lékové rezistenci. V databázi lékařské literatury PubMed přibývají v současnosti publikace na téma mikroRNA exponenciálně, proto je monitorování nových poznatků, ale i vlastní výzkum v této oblasti velice žádoucí. Cílem naší práce je pomocí přístupu založeného na analýze expresních profilů 667 mikroRNA metodou kvantitativní Real-Time PCR arrays na souboru 38 světlobuněčných renálních karcinomů důkladně klinicky charakterizovaných pacientů identifikovat mikroRNA umožňující predikovat čas do progrese po nefrektomii. Výsledky této studie budou součástí našeho sdělení. Předpokládáme, že ať již vlastní mikroRNA, nebo proteiny, jejichž proteosyntézu ve svém důsledku mikroRNA ovlivňují, by mohly doplnit současný skórovací systém užívaný ke stanovení prognózy, být jedním z určujících faktorů pro indikaci cílené léčby (bevacizumab, sunitinib, sorafenib, temsirolimus) a imunoterapií a stát se tak dalším krokem směrem k individualizaci terapie a dosažení lepších léčebných výsledků u pacientů se světlobuněčným renálním karcinomem.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NS 10361-3/2009 a výzkumným záměrem MZ0MOU2005.

Altered expression of Her2/neu after neoadjuvant treatment of breast cancer – a case study

MUDr. Helena Skálová[1], doc. MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.[1], prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.[1], MUDr. Zuzana Velenská[1], prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.[2], Ing. Daniel Tvrdík, Ph.D.[1]

[1] Institute of Pathology, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague

[2] Department of Oncology, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague

ERBB2 (Her2/neu) proto-oncogene amplification and protein overexpression is observed in 20–40 % of patients with breast cancer and play a crucial role in invasive breast cancer disease and its treatment. Number of studies have postulated the stability of Her2/neu gene expression, showing that in most patients the status of expression was not significantly changed after neoadjuvant treatment. However, some other studies presented higher rate of patients with altered status, mostly within the meaning of increased and only rare cases of decreased Her2/neu expression.

We present a case of Her2/neu expression alteration from strongly positive in pre-treatment biopsy to negative in post-treatment surgery specimen, which was evaluated on all DNA, RNA and protein levels by using fluorescence in situ hybridization (FISH), quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry, respectively. The causes of these differences are still unclear. Possible explanation may be in coexistency of at least two clones of tumor cells with different level of Her2/neu expression and thus different sensitivity to neoadjuvant therapy.

This work was supported by Grant IGA MZ ČR NS/10575-3.

Vliv zinku na nádorové buněčné linie odvozené od karcinomu prostaty

Markéta Sztalmachová[1,2], MUDr. Jaromír Gumulec[1], Mgr. Marián Hlavna[1], doc. PharmDr. Petr Babula, Ph.D.[3], Ing. Soňa Křížková, Ph.D.[2], RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.[2], prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.[4], RNDr. Michal Masařík, Ph.D.[1], doc. Ing. René Kizek, Ph.D.[2]

[1] Ústav patologické fyziologie, LF MU Brno

[2] Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

[3] Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita v Brně

[4] Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. lékařská fakulta UK Praha

Zinek je významným esenciálním prvkem, nutným pro růst a vývoj všech živých organizmů. Až 10 % lidského genomu kóduje proteiny schopné vázat tento prvek. Zinečnaté ionty jsou součástí řady enzymů, figurují v řadě signálních drah a jsou nezbytné pro udržování struktury cytoskeletu. Je tedy možné říci, že zinečnaté ionty zasahují významnou měrou do široké řady buněčných procesů, mnohdy klíčových pro přežívání buněk. Není proto překvapující, že odchylky v metabolizmu tohoto iontu, ať již způsobené jeho nedostatečným příjmem, či poruchou molekulárních mechanizmů zajišťujících hospodaření se zinkem, způsobují řadu onemocnění.

Prostatická tkáň je ve vztahu k zinečnatým iontům velmi výjimečná. Sekretorické buňky laterálních laloků prostatické tkáně jsou totiž schopny akumulovat tento kov až v desetinásobně větším množství oproti jiným tkáním. Zinek se zde podílí na metabolizmu organických kyselin, energetickém hospodaření buněk a odolnosti buněk vůči apoptóze. Tato situace se však zásadně mění u nádorového onemocnění prostaty. Bylo totiž zjištěno, že u pacientů s karcinomem prostaty jsou v buňkách laterálního laloku tohoto orgánu hladiny zinku signifikantně nižší oproti normálním hodnotám. Maligně změněné prostatické buňky jsou totiž charakteristické nevratnou ztrátou schopnosti akumulovat zinek a tento efekt není zatím zcela spolehlivě vysvětlen.

V naší práci jsme se proto zabývali analýzou nádorových buněčných linií odvozených od karcinomu prostaty a jejich ovlivněním různými koncentracemi zinečnatých iontů. Pracovali jsme se třemi nádorovými liniemi (PC-3, LNCaP, 22Rvl) a jednou nenádorovou prostatickou buněčnou linií (PNT1A). Prováděli jsme jednak měření pomocí klasického MTT cytotoxického testu a pak také real-time monitorování buněk pomocí přístroje XCELLigence. Z výsledků vyplývá, že buněčná linie odvozená z normálního prostatického epitelu má větší schopnost akumulovat zinečnaté ionty oproti liniím nádorovým. Pomocí přístroje XCELLigence jsme získali unikátní výsledky, které by mohly přispět k objasnění metabolizmu zinku v nádorové prostatické tkáni.

Výzkum na tomto projektu byl podpořen grantem GAČR 301/09/P436, IGA MZ ČR č. 10200–3 a projektem 9/2010/FaF.

Literatura

KRIZKOVA, S., et al.: Study of metallothionein oxidation by using of chip capillary electrophoresis. Electrophoresis, 30(23), 4029–4033, 2009.

KRIZKOVA, S., et al.: Effects of redox conditions and zinc(II) ions on metallothionein aggregation revealed by chip capillary electrophoresis. J. Chrom. A, 2010 v tisku.

Studium exprese vybraných mikroRNA pomocí Real-Time PCR a metylačního stavu promotoru MGMT metodou high-resolution melting u pacientů s glioblastomem

Mgr. Jiří Šána[1,3], MUDr. Radek Lakomý[1], RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.[1,3], MUDr. Eva Lžičařová[2], MUDr. Leoš Křen, Ph.D.[4], MUDr. Pavel Fadrus[5], Hankeová S.[3], MUDr. Martin Smrčka, Ph.D.[5], prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.[1], prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D.[3]

[1] Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno
[2] Masarykův onkologický ústav, Oddělení onkologické a experimentální patologie, Brno
[3] Babákův výzkumný institut, Univerzitní centrum buněčné imunoterapie, LF MU Brno
[4] Patologicko-anatomický ústav FN Brno
[5] Neurochirurgická klinika FN Brno

Multiformní glioblastom (GBM) je nejčastějším intrakraniálním nádorem astrocytárního původu. V současné době dostupnou terapií je u pacientů postižených tímto onemocněním dosahováno mediánu přežití 12–15 měsíců od stanovení diagnózy, což GBM řadí mezi nejvíce letální nádory, jejichž prognóza je i při optimálním průběhu léčby infaustní. V posledních dvou letech bylo s úspěchem provedeno několik studií zaměřených na prediktivní význam metylace promotorové oblasti genu pro DNA-reparační protein O6-metylguanin-DNA metyltransferázu (MGMT) pro léčbu novým alkylačním činidlem, temozolomidem (TMZ). V této studii jsme se rozhodli validovat uvedená pozorování v našich podmínkách a rozšířit je o kvantitativní analýzu vybraných mikroRNA (miR-21, miR-125b, miR-128a, miR-181a, miR-181b, miR-181c, miR-195, miR-196a, miR-196b, miR-221 a miR-222) vytipovaných na základě in-silico analýz a suspektních z post-transkripční regulace MGMT, ale i jiných genů zodpovědných za invazivitu, progresi a imunorezistenci glioblastomových buněk, například komponenty TGFbeta signalizace. MikroRNA jsou nekódující jednořetězcové RNA o délce 18–25 nukleotidů tvořící nedávno objevenou skupinu regulátorů genové exprese, jejichž deregulace byla potvrzena jako jedna z kauzálních událostí v kancerogenezi mnoha nádorových onemocnění. Zavedli jsme metodiku kvantitativního stanovení metylace promotoru genu pro MGMT založenou na bisulfitové konverzi s následnou analýzou tání s vysokým rozlišením (HRM) na přístroji LightCycler LC480 a variantu metody Real-Time PCR pro stanovení mikroRNA (stem-loop RT –PCR). Do studie jsme zařadili 45 pacientů s histopatologicky diagnostikovaným GBM podstupujících chirurgický zákrok na Neurochirgické klinice FN Brno a konkomitantní chemoradioterapii s temozolomidem (RT/TMZ) na Masarykově onkologickém ústavu v Brně, kde zůstali nadále dispenzarizováni. Souvislost metylace promotoru MGMT a hladin výše uvedených mikroRNA s odpovědí GBM na konkomitantní RT/TMZ, ale i na parametry přežití a jiné klinicko-patologické parametry GBM v současnosti vyhodnocujeme, výsledky budou součástí našeho sdělení.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NS/11214-4/2010 výzkumným záměrem MZ0MOU2005.

Synchronní nádorová triplicita – karcinom ledviny, karcinom prostaty a maligní melanom, léčený vysokodávkovaným interferonem

Jarmila Vaňásková[1], MUDr. Jiří Grim, Ph.D.[1], prof. MUDr. Jiří Petera, CSc.[1], MUDr. Eugen Kubala[1], MUDr. Petr Prošvic[2,3], MUDr. Miroslav Podhola, Ph.D.[4]

[1] Klinika onkologie a radioterapie, FN a LF UK Hradec Králové
[2] Oblastní nemocnice Náchod, a.s., Oddělení klinické onkologie
[3] Oblastní nemocnice Náchod, a.s., Urologické oddělení
[4] Fingerlandův ústav patologie, FN a LF UK Hradec Králové

58letému pacientovi byl v srpnu 2009 diagnostikován amelanotický exulcerovaný nodulární maligní melanom řešený radikální excizí s exenterací pravé axily, pT3N0M0 a v rámci stagingových vyšetření v horizontu 3 měsíců tumor ledviny cT1N0M0 dle CT a na podkladě elevace PSA adenokarcinom prostaty cT2aN0M0, Gleason skóre 3 + 3, G2. Pacient podstoupil laparoskopickou nefrektomii (pT1N0M0, G2) a radikální prostatektomii (pT2apN0M0) a je pro tyto nádory dispensarizován. Mezitím došlo opakovaně k recidivám maligního melanomu, řešeným reexcizemi, a na přelomu července – srpna 2010 podstoupil terapii vysokodávkovaným interferonem v dávkování 20 MIU/m2 intravenózně 5 dní v týdnů. Nyní pokračuje udržovacím schématem 10 MIU/m2 subkutánně 3krát týdně. Stran karcinomu prostaty a ledviny je pacient nyní bez známek recidivy. Vzhledem k tomu, že karcinomy ledviny a prostaty byly zjištěny během stageinových vyšetření a vzhledem k jejich předpokládáným generačním časům můžeme hovořit o synchronní triplicitě.

Využití PET-CT v plánování léčby karcinomu jícnu

MUDr. Katherine Vomáčková[1], doc. MUDr. Čestmír Neoral, CSc.[1], MUDr. René Aujeský, CSc.[1], MUDr. Radek Vrba, Ph.D.[1], doc. MUDr. Miroslav Mysliveček, CSc.[2], Radim Formánek[2]

[1] I. chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc
[2] Klinika nukleární medicíny LF UP a FN Olomouc

Cíl práce: Posouzení významu PET-CT při stanovení přesného stagingu onemocnění a význam pro strategii terapie u karcinomu jícnu. Grantová studie zahrnuje kontrolní PET-CT po provedené neoadjuvanci. Cílem studie je mimo jiné zjistit ekonomický dopad v závislosti na charakteru další terapie zejména u pokročilejších stavů.

Materiál a metodika: Na I. chirurgické klinice bylo od roku 2006 vyšetřeno PET-CT celkem 221 nemocných s karcinomem jícnu. Autoři analyzují přínos vyšetření ke stanovení stagingu onemocnění a strategii léčby. K vyloučení generalizace základního onemocnění je PET-CT vyšetření provedeno primárně u všech nemocných s karcinomem jícnu. U nemocných po neoadjuvantní onkologické terapii indikujeme v souvislosti s grantovou studii kontrolní PET-CT, pokud je zaznamenána progrese onemocnění chirurgická léčby není indikována.

Výsledky: Zatím ze sestavy nemocných nebyla u 163 pacientů pomocí PET-CT zjištěna generalizace onemocnění. Celkem 140 nemocných prodělalo neoadjuvantní radiochemoterapii. U 23 pacientů nebyla onkologická neoadjuvantní léčba indikována pro jejich výraznou polymorbiditu. Chirurgickou resekční léčbu, exstirpaci jícnu, podstoupilo 78 pacientů. U 19 nemocných byla při

kontrolním PET-CT vyšetření prokázána generalizace onemocnění do vzdálených lymfatických uzlin, chirurgická léčba nebyla indikována. U 14 nemocných s proximální lokalizací tumoru byla po provedené onkologické léčbě konstatována remise onemocnění, pacienti jsou dispenzarizováni na naší klinice. U zbývajících 29 nemocných po neoadjuvantní léčbě nebyla operace indikována pro celkově špatný stav, nebo v důsledku progrese onemocnění. U 58 nemocných byla primárním PET-CT vyšetřením prokázána generalizace onemocnění. Pacienti byli indikováni k paliativní onkologické léčbě, nebo k symptomatické terapii, měli implantován stent a léčbu bolesti.

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.

Sledovanie renalnej expresie mikroRNA v modeli doxorubicínom indukovanej nefrotoxicity

Mgr. Gabriel Dóka
PharmDr. Peter Ochodnický, PhD.
Mgr. Katarína Turčeková
Mgr. Hana Černecká
doc. PharmDr. Ján Klimas, PhD.
Katedra Farmakológie a toxikológie FaFUK, Bratislava

Úvod: MikroRNA sú ~22 nt dlhé jednovláknové nekódujúce RNA endogénneho pôvodu, ktoré posttranskripčne regulujú expresiu cieľových génov – spôsobujú represiu translácie alebo degradáciu mRNA na princípe parciálnej komplementarity. Táto úloha je zásadná vo fyziologických ako aj patologických procesoch. MikroRNA môžu byť preto biomarkermi rozličných ochorení, medzi ktoré patrí aj kardio- a nefrotoxicita vyvolaná liečbou antracyklínovými cytostatikami. V súčasnosti je výskum v oblasti mikroRNA ešte v počiatkoch, ale v budúcnosti by mohli byť účinným terapeutickým cieľom a/alebo terapeutickým nástrojom.

Metódy: Potkanom kmeňa Wistar bol aplikovaný doxorubicín (DOXO; jednorázovo i.v.; 2,5 mg/kg), doxorubicín a pioglitazón (DOXO-PIO; DOXO jednorázovo i.v.; 2,5 mg/kg; PIO, 12 mg/kg/deň v krmive po dobu 6 týždňov) a vehiculum (CTRL). Metódou kvantitatívnej RT-PCR sme stanovili expresiu hsa-miR-30a-5p.

Výsledky: Zmena expresie hsa-miR-30a-5p oproti kontrole nebola signifikantná ani v skupine DOXO, ani v skupine DOXO-PIO

Záver: Expresia miR-30a nie je ovplyvnená v modeli doxorubicínom indukovanej nefropatie a expresiu neovplyvňuje ani terapia pioglitazónom. V nasledujúcej fáze experimentu je nutné definovať ďalšie mikroRNA, ich potenciálne ciele ako aj spôsob ovplyvnenia.

POŘADATELÉ

- SDPO ČOS ČLS JEP
- Ústav molekuální a translační medicíny LF UP a FN Olomouc
- Komplexní onkologické centrum Olomouc
- Nadace pro výzkum rakoviny – Rakovina věc veřejná
- Sdružení Šance

VI. dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie

1.– 3. prosince 2010, Olomouc

HLAVNÍ PARTNEŘI

AstraZeneca

PerkinElmer
For the Better

PARTNEŘI

GENERI BIOTECH s.r.o.

INTIMEX s.r.o.

LEICA MICROSYSTEMS

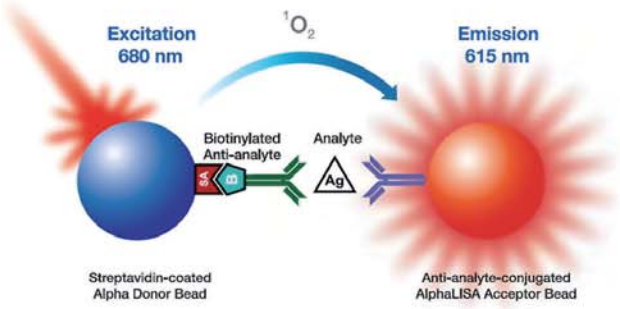
ROCHE s.r.o.

MEDIÁLNÍ PARTNER

Onkologie

POŘADATELÉ DĚKUJÍ UVEDENÝM FIRMÁM ZA SPOLUÚČAST NA FINANČNÍM ZAJIŠTĚNÍ KONGRESU

AlphaLISA® : ELISA bez promývacích kroků



1. *Alpha Donor Bead (modrá) je potažena streptavidinem, který váže biotinylovanou protilátku.*
2. *Alpha Acceptor Bead (červená) je potažena analyt-specifickou protilátkou.*
3. *Vazba analytu k protilátkám obě partikule dostává do blízkosti.*
4. *Při excitaci laserem 680 nm uvolní Alpha Donor Bead singletový kyslík, který přechází na Alpha Acceptor Bead, kde vyvolává emisi 615 nm.*

AlphaLISA®
je alternativou
ke konvenční technologii ELISA

AlphaLISA® klíčové výhody oproti ELISA:

- *Snadný protokol - bez promývacích kroků*
- *Minimalizovaný objem vzorku (5 µL i méně)*
- *Vysoká citlivost v řádu od pg/mL*
- *Široký dynamický rozsah (4-5 log)*

AlphaLISA® je volbou v případech:

- *Stanovení cytokinů až proteinových komplexů*
- *Solubilních i intracelulárních cílových molekul*
- *Komlexních matric (sérum, plazma, buněčné lyzáty, supernatanty atd.)*
- *Stanovení interakcí protein-protein*

K dispozici je celá řada kitů pro stanovení biomolekul v oblastech výzkumu angiogeneze, rakoviny, kardiovaskulárních chorob, CNS, prozánětlivých cytokinů a metabolismu.

Podrobné informace naleznete na webových stránkách PerkinElmer.

www.perkinelmer.com/nowashELISA

PerkinElmer
For the Better

EnVision™ & EnSpire™ Multilabel Plate Readers

EnVision™ *- rychlý, citlivý a univerzální stolní reader pro technologii AlphaLISA, luminiscenci flash i glow, fluorescenci, TRF, FRET, BRET, fluorescenční polarizaci a UV/absorbanci. Nejrychlejší Alpha reader na trhu! Plně integrovatelný s robotickým systémem JANUS™.*

EnSpire™ *- vysoce výkonný a cenově dostupný stolní monochromátorový Alpha reader pro fluorescenci, UV/absorbanci, AlphaScreen a Enhance luminiscenci. Než zcela přejdete na AplhaLISA technologii, EnSpire vám umožňuje měření stávajících ELISA protokolů. Snadné intuitivní ovládání pomocí dotykového displaye, mnohouživatelské softwarové rozhraní.*

JANUS™ Liquid Handling System *- robotický systém pro práci s kapalinami. Ideální ve spojení s technologií AlphaLISA. Automatizace pipetování koplexních experimentů, od přípravy vzorku k plné automatizaci detekce a anylýzy.*

Modulární a plně upgradovatelný systém sestavitelný dle vašich potřeb.

PerkinElmer
For the Better

PE Systems, s.r.o. *- autorizovaný distributor pro Českou republiku*
Pastevců 471
149 00 Praha 4 - Újezd u Průhonic

Tel: +420 241 430 534
Fax: +420 241 430 535
E-mail: info@pesystems.cz