



**Univerzita Karlova v Praze**

**1.lékařská fakulta**

Autoreferát dizertační práce

**Predikce chemosenzitivity na 5-fluorouracil  
a jeho deriváty u nemocných léčených  
chemoterapií pro kolorektální karcinom**

**MUDr. Martina Zimovjanová**

Praha 2009

## Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze  
a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady:  
Prof.MUDr.Stanislav Trojan, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav patologické fyziologie 1.LF UK

Autor: MUDr.Martina Zimovjanová

Školitel: Prof.MUDr.Emanuel Nečas, DrSc.

Školitelka konsultantka:  
Doc.MUDr. Marie Ludvíková Ph.D.

Oponenti:

.....  
.....  
.....

Autoreferát byl rozeslán dne: .....

Obhajoba se koná dne: ..... v ..... hod.  
kde .....  
.....

S dizertací je možno se seznámit na děkanátě  
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

## PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla v rámci postgraduálního doktorského studia biomedicíny na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze.

Poděkování patří především mému školiteli Prof. MUDr. E. Nečasovi, DrSc. a školitelce-konsultantce Doc. MUDr. M. Ludvíkové Ph.D. za odborné vedení.

Za podporu a podmínky pro zvládnutí studia děkuji Prof. MUDr. L. Petruželkovi CSc. a MUDr. J. Novotnému Ph.D. z Onkologické kliniky VFN a 1.LF UK a dále také Mgr. V. Sýkorovi z Ústavu patologické fyziologie 1.LF UK.

Velký dík patří mým rodičům, manželovi a dcerám, kteří měli pro mé studium pochopení.

## **OBSAH**

Seznam zkratek 5

Souhrn 6

Summary 8

## **KAPITOLY**

1.Úvod 10

2.Hypotézy a cíle práce 12

3.Soubor pacientů a metody 13

4.Výsledky 16

5.Diskuze 23

6.Závěry 25

7.Použitá literatura 27

8.Seznam publikací autorky 29

## Seznam zkratk

5-FU	5-fluorouracil
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CI	konfidenční interval
CRC	kolorektální karcinom
DFI	interval bez známek onemocnění
DFS	přežití bez známek onemocnění
DPD	dihydropyrimidindehydrogenáza
GAPDH	glyceraldehydfosfátdehydrogenáza
HR	poměr rizik
IHC	imunohistochemická analýza
mCRC	metastazující kolorektální karcinom
mRNA	ribonukleová kyselina (messenger RNA)
OS	celkové přežití
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
T:R	poměr cílový/referenční gen
TNM	klasifikace rozsahu nádorového onemocnění
TP	thymidinfosforyláza
TS	thymidylátsyntáza
TTP	doba do progrese onemocnění
UICC	patologická klasifikace rozsahu onemocnění CRC
UZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky

## Souhrn

*Cíle:* 5-fluorouracil (5-FU) je nejčastěji a nejdéle používaným cytostatikem v léčbě kolorektálního karcinomu (CRC). V úvodu této práce jsme vyhodnotili stupeň exprese klíčových enzymů metabolismu 5-FU - thymidylátsyntázy (TS), thymidinfosforylázy (TP) a dihydropyrimidindehydrogenázy (DPD) ve vzorcích kolorektálního karcinomu a v okolní střevní sliznici za použití metody RT-PCR a imunohistochemické analýzy. Odlišné exprese ve studovaných tkáních mohou mít vliv na protinádorovou aktivitu a toxicitu léčby fluoropyrimidiny. Publikované výsledky analýz genové a proteinové exprese nejsou jednotné, proto jsme korelovali genovou expresi TS a TP mRNA z čerstvě zmražené tkáně stanovenou pomocí kvantitativní RT-PCR a proteinovou expresi stanovenou imunohistochemickou analýzou z parafinem-fixovaných vzorků kolorektálního karcinomu. Dále jsme u pacientů s lokalizovaným CRC studovali prognostický a prediktivní význam klíčových enzymů metabolismu 5-FU, který doposud není jednoznačně určen.

*Materiál a Metody:* Analýza exprese TS, TP a DPD mRNA stanovená pomocí kvantitativní RT-PCR a analýza proteinové exprese stanovené imunohistochemicky byla provedena ve tkáňových vzorcích u 66 nemocných s CRC. Výsledné hodnoty exprese klíčových enzymů metabolismu 5-FU byly korelovány v nádorové tkáni a ve zdravé okolní sliznici, za použití obou metod analýz. Porovnání kvantitativních a kvalitativních parametrů bylo provedeno pomocí parového Sign testu a Chi-kvadrát testu. Výsledky analýz stanovených pomocí RT-PCR a imunohistochemie byly porovnány ve 44 vzorcích CRC. Korelace stupňů exprese a metod analýz byly provedeny pomocí Spearmanova koeficientu. Prognostický význam exprese TS, TP, DPD byl vyhodnocen u 41 pacientů s lokalizovaným CRC a u 17 pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem pro CRC. Prediktivní význam TS a TP exprese byl vyhodnocen u 21 pacientů léčených adjuvantní chemoterapií s 5-FU. Ke stanovení období bez známek onemocnění

(DFI) a celkového přežití (OS) byla použita Kaplan-Meierova metoda, byl počítán Log-rank test. Coxův regresní model jsme použili k výpočtu výše rizika (HR). Za statisticky významné byly považovány hodnoty  $p < 0,05$ .

*Výsledky:* Nalezli jsme signifikantně vyšší expresi DPD mRNA ve zdravé střevní sliznici ve srovnání s tkání nádorovou ( $p=0,03$ ); nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi TS mRNA ( $p=0,34$ ) a TP mRNA ( $p=1,0$ ) v nádorové a zdravé tkáni. Imunohistochemická analýza prokázala signifikantně vyšší TS expresi v nádorové tkáni ve srovnání se zdravou sliznicí a signifikantně vyšší TP expresi ve stromatu nádoru ve srovnání s expresí ve zdravé sliznici ( $p < 0,001$ ). Nebyl nalezen žádný vzájemný vztah mezi expresí TS mRNA, TP mRNA a proteinovou expresí TS, TP v nádorové tkáni ( $p=0,28$  resp.  $p=0,87$ ). Vysoká exprese TP mRNA byla negativním prognostickým faktorem ( $p=0,05$ , HR 4,1) v parametrech DFS a OS, exprese TS mRNA a DPD mRNA neměla prognostický význam. Vysoká exprese TP a nízká exprese TS stanovené imunohistochemicky měly negativní prognostický význam u pacientů s lokalizovaným CRC (hraniční statistická významnost  $p=0,08$  HR 3,1 resp.  $p=0,07$  HR 0,2). Vysoká IHC exprese TP v nádorovém stromatu byla negativním prediktivním faktorem u pacientů s CRC léčených adjuvantní chemoterapií s 5-FU (hraniční statistická významnost  $p=0,06$ ), exprese TS, TP mRNA a proteinová exprese TS neměly prediktivní význam.

## Summary

*Aim:* 5-Fluorouracil (5-FU) is the most commonly used anticancer drug for colorectal cancer (CRC). Initially, we aimed to compare expression of 5-FU metabolic enzymes genes: thymidylate synthase (TS), thymidin phosphorylase (TP) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in colorectal cancer and normal colon mucosa. We have tried to prove the correlation of the mRNA levels in fresh frozen tissues and protein expression using immunohistochemistry in paraffin-embedded colorectal cancer and adjacent normal tissues. Finally, we aimed to clarify the prognostic and predictive value of the expression of the 5-FU metabolic enzyme genes in patients with early colorectal cancer.

*Patients and Methods:* The analysis of TS, TP and DPD levels, determined by RT-PCR and immunohistochemistry, was performed in 66 colorectal cancer patients. Resulting levels of the 5-FU metabolic enzyme genes were correlated in tumor and normal colon tissue, using both methods of analyses. RT-PCR and IHC analyses were correlated in 44 samples of CRC. Quantitative and qualitative variables were compared by Sign test and Chi-square test. Correlation in expression levels were evaluated by Spearman's correlation coefficient. Prognostic value of TS, TP, DPD levels was evaluated in 41 patients with early CRC and in 17 patients treated by resection alone. Predictive value of TS and TP was evaluated in 21 patients treated by resection plus adjuvant 5-FU based chemotherapy. DFS and OS were analysed with Kaplan-Meier method and compared using Log-rank test. Cox regression analysis was performed for estimation of HR.

*Results:* We have found significantly higher DPD mRNA levels in normal colon tissue than in tumor tissue ( $p=0,03$ ), but no significant differences in TS mRNA ( $p=0,34$ ) and TP mRNA ( $p=1,0$ ) levels in tumor and normal tissue. Immunohistochemically we have determined significantly higher TS expression in tumor than in normal tissue ( $p=0,02$ ) and significantly higher TP expression in stroma



cancer tissue than in normal tissue ( $p < 0,001$ ). No linear relationships were found between mRNA expression and protein TS and TP expression ( $p = 0,28$  resp.  $p = 0,87$ ). High TP mRNA expression associated with worse prognosis ( $p = 0,05$  HR 4,1), also high protein expression of TP and low protein expression of TS associated with trends to worse prognosis in patients with stage II and III CRC ( $p = 0,08$  HR 3,1 resp.  $p = 0,07$  HR 0,2). High protein expression of TP in stromal tissue associated with trends to worse prognosis in patients treated adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil ( $p = 0,06$ ). In contrast there were no significant differences between TS mRNA, TP mRNA, protein TS high and low expression groups in disease-free and overall survival rates.

## 1. ÚVOD

Kolorektální karcinom (CRC) je nejčastějším nádorovým onemocněním trávicího traktu. V roce 2006 byl v České republice kolorektální karcinom diagnostikován u 7801 osob (UZIS ČR Novotvary, 2006). Nejužívanějším chemoterapeutikem v adjuvantní i paliativní léčbě kolorektálního karcinomu je již ~ 50 let cytostatikum ze skupiny pyrimidinových analog - 5-fluorouracil (5-FU) (Waters J, 2001). Pro zvýšení efektivity léčby se v současnosti 5-FU používá v kombinacích s cytostatiky s jiným mechanismem účinku a s moderní biologickou léčbou, která zasahuje cílové molekulární struktury nádorových buněk (Pfeiffer P et al., 2007). Klinická efektivita i toxicita léčby 5-FU je u pacientů variabilní (Sobrero et al., 1997). Proto je snahou optimalizovat a individualizovat léčbu CRC s cílem zvýšení léčebného efektu a minimalizaci vedlejších účinků léčby. V nádorové tkáni CRC bylo studováno přibližně 25 možných prognostických a prediktivních markerů, mezi které patří také enzymy metabolismu 5-FU. Doposud žádný ze studovaných markerů senzitivity a rezistence na 5-FU nemá dostatečné množství důkazů pro zavedení do standardní praxe - doporučení ASCO 2006 (Locker et al., 2006).

Protinádorový efekt 5-FU je zprostředkovan především inhibicí thymidylátsyntázy (TS), esenciálního enzymu syntézy DNA. Thymidinfosforyláza (TP) je enzymem nezbytným pro syntézu DNA, účastní se také metabolismu fluoropyrimidinů, přeměnou 5-deoxy-fluorouridinu na 5-fluorouracil. Předpokládá se, že tento enzym vykazuje vyšší aktivitu v nádorové tkáni CRC než v okolní střevní sliznici, což by mělo zvyšovat terapeutický poměr cytostatik, které jsou prostřednictvím TP aktivovány např. kapecitabin (Malet-Martino and Martino, 2002). Základním enzymem katabolické přeměny 5-fluorouracilu na neaktivní metabolity je dihydropyrimidindehydrogenáza (DPD), jejíž vysoká aktivita v nádorové tkáni snižuje terapeutický účinek 5-FU. Nízká aktivita DPD ve zdravé střevní sliznici (v důsledku mutace v genu DPD) může vést k závažné toxicitě při léčbě fluoropyrimidiny (Van Kuilenburg et al., 2000).

Metaanalýza 20 klinických studií prokázala, že vysoké exprese enzymů pyrimidinového metabolismu v nádorové tkáni- TS, TP a DPD jsou negativním prognostickým faktorem u pacientů s pokročilým kolorektálním karcinomem (Popat et al, 2004). Otázka prognostického a prediktivního významu těchto enzymů u pacientů s lokalizovaným CRC je také intenzivně studována, nicméně výsledky těchto studií přináší často protichůdné závěry.

Mezi nejčastěji používané metody stanovení exprese enzymů TS, TP a DPD v nádorové tkáni patří imunohistochemická analýza proteinové exprese a genová analýza exprese příslušných mRNA. Obě metody mají své limitace – imunohistochemická analýza přináší pouze kvalitativní či semikvantitativní vyhodnocení stupně exprese (skóre 0-3), genová exprese pomocí RT-PCR při studiu čerstvě zmražené tkáně nezajistí kontrolu morfologie vzorku a nezachytí postranskripční regulace. Výsledky studií při použití různých metod analýz exprese jsou často odlišné.

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem výzkumu, jenž byl součástí postgraduálního doktorandského studia, bylo posouzení využitelnosti stanovení exprese klíčových enzymů metabolismu 5-fluorouracilu: thymidylátsyntázy, thymidinfosforylázy a dihydropyrimidin-dehydrogenázy jako faktorů, které by mohly zpřesnit informace o závažnosti nádorového onemocnění a ovlivnit léčebné rozhodování.

K dosažení tohoto cíle bylo navrženo několik na sebe navazujících experimentů.

1. Srovnání genové exprese TS, TP a DPD na základě stanovení množství jejich příslušných mRNA ve vzorcích kolorektálního karcinomu a v okolní střevní sliznici pomocí RT-PCR.

2. Srovnání proteinové exprese TS a TP na základě stanovení stupně jejich exprese ve vzorcích kolorektálního karcinomu a v okolní střevní sliznici imunohistochemickou analýzou.

3. Korelace exprese enzymů TS a TP na úrovni proteinů a na úrovni jejich mRNA v nádorové a zdravé tkáni.

4. Stanovení prognostického a prediktivního významu exprese enzymů TS, TP a DPD u pacientů s CRC.

Konečným cílem bylo přispět k posouzení možnosti individualizace léčby tak heterogenního onemocnění, jakým je kolorektální karcinom, na základě studia prognostických a prediktivních faktorů.

### 3. SOUBOR PACIENTŮ A METODY

Do studovaného souboru bylo zařazeno 66 pacientů v období let 2002 až 2003, kteří byli diagnostikováni a léčeni pro karcinom tlustého střeva a konečníku na Onkologické klinice VFN v Praze a onkologických odděleních nemocnic Atlas Zlín, Opava, Jihlava a UVN v Praze. Odběr vzorků byl proveden na základě písemného souhlasu pacienta a podepsání „Informovaného souhlasu“ schváleného Etickou komisí dané nemocnice. Vzorky nádorové tkáně byly získány při peroperační biopsii nebo při endoskopických výkonech na střevě u pacientů s diagnózou CRC. Vzorek nádorové tkáně každého pacienta byl rozdělen na dvě části. Jedna část nádorové tkáně byla neprodleně vložena do roztoku RNA later (Ambion, Inc. USA) a skladována při teplotě 4°C po dobu maximálně 1 týdne. Vzorky byly následně zmrazeny na teplotu -20°C až do doby izolace RNA. Druhá část vzorku nádorové tkáně byla zalita do parafínu pro standardní histologické vyšetření a vyšetření imunohistochemické (stejný postup u vzorků zdravé střevní sliznice).

**Kvantitativní RT-PCR.** Izolace RNA byla provedena za použití Perfect RNA minikitu (Eppendorf Scientific, Mc.Germany, Quagen). Kvantifikace cílových genů TS, TP, DPD mRNA probíhala jako dvoustupňový proces za pomoci komerčně dostupných kitů pro kvantitativní RT-PCR: LightCycler–TS, TP, DPD mRNA Quantification Kit plus (Roche Diagnostics GmbH). V prvním kroku jsme provedli reverzní transkripci z RNA do cDNA pomocí reverzní transkriptázy a TS (TP, DPD) specifických primerů. Dále byla provedena druhá transkripce z RNA do cDNA pomocí reverzní transkriptázy a glukozo–6-fosfát dehydrogenázy (G6PDH) specifických primerů. V druhém kroku byly fragmenty mRNA amplifikovány z cDNA za pomoci PCR v LightCycleru při využití specifických primerů. PCR byla zahájena opakovanými cykly denaturace při 95°C po dobu 5 minut. Následně probíhala amplifikace za těchto podmínek: 10 sekund při 95°C, 10 sekund při 62°C a 10 sekund při 72°C v průběhu 45 cyklů. Výsledné amplikony byly detekovány fluorescenčně. Pomocí LightCycler relative

Quantification Software jsme množství mRNA cílových genů vyjádřili poměrem k referenčnímu genu G6PDH. Konečné výsledky byly vyjádřeny jako poměr (T:R) ve vzorku k poměru (T:R) v kalibrátoru.

**Imunohistochemické vyšetření (IHC)** bylo provedeno s protilátkami proti thymidylátsyntáze (TS 106, Dako Cytomation) a thymidinofosforyláze (PGF 44C Neo Marker). Řezy 4 $\mu$ m silné byly nejprve odparafínovány v xylenu a rehydratovány v sestupné řadě alkoholů. Při průkazu všech antigenů byla uplatněna nepřímá peroxidázová imunohistochemická metoda s použitím supersenzitivního streptavidin-biotinového vizualizačního systému Novostain ABC (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). Demaskování epitopu TS bylo prováděno v citrátovém pufru ve vodní lázni při teplotě 95-99 $^{\circ}$ C. Průkaz TP nevyžadoval předchozí demaskování. Jako chromogen byl ve všech případech použit 3,3-diaminobenzidín-tetrachlorid (DAB, Fluka). Výsledná pozitivní reakce dávala hnědou pozitivitu cytoplazmatickou, perinukleární a nukleární. Exprese enzymů TS a TP byly hodnoceny semikvantitativně v mikroskopu Olympus BX-40 a to ve tkáni vlastních nádorových buňek, ve stromálních buňkách nádoru a ve zdravé střevní sliznici. Nízká exprese sledovaných enzymů byla hodnocena stupni 0, 1 (0-10%), vysoká exprese stupni 2, 3 ( $\geq$ 10%).

**Statistická analýza** byla provedena pomocí softwaru CRAN 2.4.0. a programu Statistica 98 Edition. Pro kvantitativní parametry v souboru byly počítány základní statistické veličiny (průměr, směrodatná odchylka, median, minimum, maximum). Vybrané statistické údaje byly zpracovány do Box & Whisker plot diagramů. Párová pozorování byla hodnocena užitím neparametrického párového testu (Sign test). Statistické vyhodnocení IHC exprese enzymů v jednotlivých tkáních bylo provedeno pomocí Chi-kvadrát testu. Pro zjištění závislostí zkoumaných znaků byl použit Spearmanův koeficient korelace. Klinická data byla vyhodnocena ve vztahu k věku a pohlaví pacientů, TNM a UICC stadiu, lokalizaci nádoru a typu léčby. U pacientů s lokalizovaným CRC byl stanoven počet recidiv, období bez známek onemocnění (DFI) a celkové

přežití (OS), u pacientů s generalizovaným CRC byla stanovena doba do progresu (TTP) a celkové přežití (OS) (Kaplan-Meier distribuční křivka, Log-rank test, Coxova regresní analýza). K vyhodnocení prognostického a prediktivního významu TS, TP a DPD genové a proteinové exprese byla provedeno srovnání s incidencí recidiv, s % pacientů bez známek onemocnění (DFS) a s celkovým přežitím (OS) u všech pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem a dále ve skupině pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem (prognostický význam) a ve skupině pacientů léčených adjuvantní chemoterapií s 5-FU (prediktivní význam) (Kaplan-Meierova metoda, Log-rank test, Coxova regresní analýza). Za statisticky významné byly považovány hodnoty  $p < 0,05$ .

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. SROVNÁVACÍ ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE TS, TP A DPD mRNA

Izolace RNA byla provedena úspěšně ve 132 vzorcích od 66 pacientů s CRC. Analýza exprese TP mRNA ve vzorku kolorektálního karcinomu a okolní zdravé sliznici byla vyhodnocena u všech 66 pacientů, analýza exprese TS mRNA u 28 pacientů a analýza DPD mRNA u 23 pacientů. Výsledky kvantitativní exprese TS, TP, DPD mRNA vyjádřené poměrem k referenčnímu genu G6PDH jsou znázorněny v (**Tab. 1**).

Rozdíly v expresi TS mRNA a TP mRNA v nádorové tkáni a ve zdravé sliznici nejsou statisticky signifikantní (Sign test TS mRNA  $p=0,344$ , TP mRNA  $p=1,0$ ). V kontrastu s těmito výsledky byla zjištěna 2x vyšší exprese DPD mRNA ve zdravé sliznici (DPD mRNA 24,1) než exprese DPD mRNA ve vlastní nádorové tkáni (DPD mRNA 11,34) a rozdíly mezi expresemi v nádorové a zdravé tkáni jsou statisticky signifikantní ( $p= 0,034$ ).

**Tab.1. Výsledky kvantitativní genové exprese TS, TP a DPD mRNA ve vzorcích kolorektálního karcinomu a okolní zdravé sliznice**

GEN	počet	vzorek	průměr	±SD	medián	min	max	p
TS	28	nádor	2,69	2,49	1,82	0,03	10,41	p=0,34
	28	sliznice	2,9	4,14	1,8	0,01	20,7	
TP	66	nádor	3,68	4,87	2,23	0,05	31,43	p=1,0
	66	sliznice	3,74	4,63	2,56	0,05	29,94	
DPD	23	nádor	11,34	13,35	5,29	0,51	53,7	<b>p=0,034</b>
	23	sliznice	24,1	19,23	19,27	0,01	60,35	

SD - směrodatná odchylka, p - hodnota - párový Sign test, výsledné hodnoty jsou uvedeny jako poměr exprese cílového genu k expresi referenčního genu G6PDH



## 4.2. SROVNÁVACÍ ANALÝZA PROTEINOVÉ EXPRESE TS, TP

Úspěšné imunohistochemické stanovení exprese enzymu TS bylo provedeno v 63 vzorcích vlastní nádorové tkáně, v 66 vzorcích nádorového stromatu a ve 28 vzorcích okolní zdravé sliznice. Proteinová exprese TS byla statisticky signifikantně vyšší ( $p < 0,001$ ) v tkáni nádorových buněk než v nádorovém stromatu. Proteinová exprese enzymu TS byla statisticky významně vyšší v nádorové tkáni než ve zdravé sliznici ( $p = 0,026$ ) (**tab.2**).

**Tab.2. Vyhodnocení IHC exprese thymidylátsyntázy (TS) v nádorových buňkách, v nádorovém stromatu a ve zdravé sliznici**

EXPRESE TS	Nádorové buňky N = 63		Nádorové stroma N = 66		Zdravá sliznice N = 28	
	N	%	N	%	N	%
<b>0</b>	29	46%	53	80%	21	75%
<b>1</b>	17	27%	8	12%	2	7%
<b>≥ 2</b>	17	27%	5	8%	5	18%

Chi- kvadrát test nádorové buňky versus nádorové stroma **p < 0,001**

Chi- kvadrát test nádorové buňky versus zdravá sliznice **p = 0,026**

Úspěšné imunohistochemické stanovení exprese enzymu TP bylo provedeno v 60 vzorcích vlastní nádorové tkáně, v 64 vzorcích nádorového stromatu a ve 24 vzorcích okolní zdravé sliznice. Imunohistochemická exprese enzymu TP byla statisticky významně vyšší v nádorovém stromatu než v nádorových buňkách ( $p < 0,001$ ). Imunohistochemická exprese TP ve vlastních nádorových buňkách nebyla statisticky významně vyšší než v okolní zdravé sliznici ( $p = 0,07$ ), na rozdíl od statisticky významně vyšší exprese TP v nádorovém stromatu ve srovnání se zdravou sliznicí ( $p < 0,001$ ) (**tab.3**).

**Tab.3. Vyhodnocení IHC exprese thymidinfosforylázy (TP) v nádorových buňkách, v nádorovém stromatu a ve zdravé sliznici**

EXPRESSE TP	Nádorové buňky N = 60		Nádorové stroma N = 64		Zdravá sliznice N = 24	
	N	%	N	%	N	%
<b>0</b>	46	77%	14	22%	14	58%
<b>1</b>	9	15%	26	40%	9	38%
<b>≥ 2</b>	5	8%	24	38%	1	4%

Chi-kvadrát test nádorové buňky versus nádorové stroma **p<0,001**  
 Chi-kvadrát test nádorové buňky versus zdravá sliznice p=0,072  
 Chi-kvadrát test nádorové stroma versus zdravá sliznice **p<0,001**

#### 4.3. KORELACE ANALÝZ GENOVÉ A PROTEINOVÉ EXPRESSE TS A TP

Korelace výsledků při studiu exprese enzymu TS pomocí metody RT-PCR a IHC byla provedena ve 44 vzorcích CRC. Vzájemný vztah exprese TS pomocí obou metod stanovení v nádorové a zdravé tkáni byl vyhodnocen pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Nebyla zjištěna statisticky významná korelace mezi hodnotami proteinové exprese TS a hodnotami TS mRNA v nádorové tkáni (Spearmanův koeficient -0,16, p=0,28) či ve zdravé sliznici (Spearmanův koeficient -0,61, p=0,139). Obě metody stanovují odlišné hodnoty exprese (**Tab. 4**).

**Tab.4. Korelace metod stanovení exprese TS pomocí RT-PCR a IHC**

RT-PCR VERSUS IHC TS	POČET KORELACÍ	SPEARMANŮV KOEFCIENT	P
<b>Nádorová tkáň</b>	44	-0,16	p=0,280
<b>Zdravá sliznice</b>	7	-0,61	p=0,139

Korelace při studiu exprese enzymu TP pomocí metody RT-PCR a IHC byla provedena ve vzorcích 39 pacientů s kolorektálním karcinomem. Vzájemný vztah exprese TP pomocí obou metod stanovení v nádorové tkáni (tkáň vlastních nádorových buněk a nádorové stroma) a ve zdravé tkáni byl vyhodnocen pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Nebyla zjištěna statisticky významná korelace mezi hodnotami proteinové exprese TP a hodnotami TP mRNA v nádorové tkáni (Spearmanův koeficient 0,15,  $p=0,36$ ) či v okolní sliznici (Spearmanův koeficient -0,22,  $p=0,42$ ). Obě metody stanovují odlišné hodnoty exprese (**Tab. 5**).

**Tab.5. Korelace metod stanovení exprese TP pomocí RT-PCR a IHC**

<b>RT-PCR VERSUS IHC TP</b>	<b>POČET KORELACÍ</b>	<b>SPEARMANŮV KOEFIČIENT</b>	<b>P</b>
<b>Nádorová tkáň</b>	39	0,15	$p=0,36$
<b>Zdravá sliznice</b>	16	-0,22	$p=0,42$

#### 4.4. PROGNOTICKÝ A PREDIKTIVNÍ VÝZNAM EXPRESE ENZYMŮ TS, TP, DPD

Studium a vyhodnocení klinických dat bylo provedeno u 55 nemocných s kolorektálním karcinomem. Vyhodnocení klinické odpovědi bylo provedeno zvlášť ve skupině pacientů nemocných léčených pro lokalizovaný CRC (N=41) a zvlášť ve skupině pacientů s metastazujícím CRC (mCRC) (N=14).

Medián doby sledování pacientů s lokalizovaným CRC byl 60 měsíců (rozmezí 4-72 měsíců); medián doby sledování pacientů s mCRC byl 8 měsíců (rozmezí 4-28 měsíců). Během doby sledování zemřelo 13 pacientů (32%) léčených pro lokalizovaný CRC a 14 pacientů (100%) s mCRC. Medián DFS a OS u pacientů s lokalizovaným CRC zatím nebyl dosažen (**tab.6**). U pacientů s mCRC byl stanoven medián doby do progresu (TTP) 3,5 měsíce a medián OS 7,5 měsíce.

Vyhodnocení prognostického významu genové exprese TS, TP, DPD mRNA a proteinové IHC exprese TS, TP jsme provedli u všech pacientů s lokalizovaným CRC a dále u těch pacientů, kteří byli léčeni pouze chirurgickým výkonem. Poté jsme vyhodnotili jsme klinická data 21 pacientů léčených adjuvantní chemoterapií s 5-FU ve vztahu k expresi prediktorů TS a TP. Mezní hodnoty pro TS, TP, DPD mRNA byly odvozeny z mediánu dané proměnné.

V naší práci byl vyhodnocen kratší DFS u pacientů s vysokou genovou expresí TP mRNA (TP mRNA  $\geq 2,6$ ) v nádorové tkáni (Cox model  $p=0,05$ , HR 4,08). Na hranici statistické významnosti byl zjištěn kratší DFS u pacientů s nízkou IHC expresí TS v nádoru (Cox model  $p=0,08$ , HR 0,2) a s vysokou IHC expresí TP v nádorovém stromatu (Cox model  $p=0,08$ , HR 3,15). U pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem bez adjuvantní chemoterapie neměla exprese enzymů TS a TP prognostický význam. Prediktivní význam (na hranici statistické významnosti) ve smyslu kratšího DFS byl zjištěn u pacientů s vysokým stupněm imunohistochemické exprese TP v nádorovém stromatu (Cox model  $p=0,06$ ). **Tab.7** znázorňuje vyhodnocení prognostického a prediktivního významu u pacientů s lokalizovaným CRC.

**Tab. 6 Souhrn statistického vyhodnocení klinického průběhu onemocnění u pacientů s lokalizovaným koorektálním karcinomem**

Parametry	Pacienti N	Recidiva N	DFS %	P
Věk < 65 let	16	5	69%	p=0,94
Věk ≥ 65 let	25	8	68%	
muži	25	6	76%	p=0,13
ženy	16	7	56%	
C18 + C19	27	5	82%	<b>p=0,025</b> <b>HR 3,5</b>
C20	14	8	43%	
T1+T2	8	0	100%	<b>p=0,045</b> <b>HR N/A</b>
T3+T4	33	13	61%	
N0	27	10	63%	p=0,36
N+	14	3	79%	
UICC I	3	0	100%	p=0,24
UICC II	24	10	58%	
UICC III	14	3	88%	
Chemo +	24	6	75%	p=0,35
Chemo -	17	7	59%	

DFS - procenta pacientů přežívajících bez známek onemocnění, p-Log-rank test, Coxova regresní analýza, HR-poměr rizik  
Kratší DFS zjištěn u pacientů s diagnosou C20 (p=0,025) a ≥T3 velikostí nádoru (p=0,045).

**Tab. 7 Vyhodnocení prognostického a prediktivního významu expresí TS, TP a DPD u pacientů s lokalizovaným CRC.**

<b>Studovaný enzym Metoda, tkáň</b>	<b>Exprese (nízká v vysoká)</b>	<b>HR</b>	<b>CI</b>	<b>p</b>
<b><u>Prognostický význam (celkově)</u></b>				
Nízká TS versus vysoká TS RT-PCR	14 v 13	1,00	0,25-4,01	p=0,95
Nízká TP versus vysoká TP RT-PCR	15 v 14	4,08	0,8-20,3	<b>p=0,05</b>
Nízká DPD versus vysoká DPD RT-PCR	6 v 6	1,67	0,27-10,04	p=0,59
nízká TS versus vysoká TS IHC nádorové buňky	19 v 10	0,20	0,25-1,6	<u>p=0,08</u>
nízká TP versus vysoká TP IHC nádorové buňky	26 v 3	1,56	0,19-12,7	p=0,67
nízká TP versus vysoká TP IHC nádorové stroma	19 v 11	3,15	0,75-13,2	<u>p=0,08</u>
<b><u>Prognostický význam (pouze chirurgie)</u></b>				
Nízká TS versus vysoká TS RT-PCR	7 v 8	1,18	0,19-7,1	p=0,85
Nízká TP versus vysoká TP RT-PCR	4 v 4	N/A	N/A	p=0,13
nízká TS versus vysoká TS IHC nádorové buňky	8 v 6	0,27	0,03-2,4	p=0,27
nízká TP versus vysoká TP IHC nádorové buňky	13 v 1	N/A	N/A	p=0,48
nízká TP versus vysoká TP IHC nádorové stroma	11 v 3	2,8	0,4-17,3	p=0,24
<b><u>Prediktivní význam (5-FU chemoterapie)</u></b>				
Nízká TS versus vysoká TS RT-PCR	6 v 6	0,53	0,04-5,86	p=0,67
Nízká TP versus vysoká TP RT-PCR	10 v 11	2,25	0,41-12,3	p=0,34
nízká TS versus vysoká TS IHC nádorové buňky	11 v 4	N/A	N/A	p=0,19
nízká TP versus vysoká TP IHC nádorové buňky	13 v 2	5,07	0,44-57,7	p=0,19
nízká TP versus vysoká TP IHC nádorové stroma	8 v 8	N/A	N/A	<u>p=0,06</u>

p- Cox model, HR-poměr rizik, CI 95%, mezní hodnoty TS 1,1, TP 2,6, DPD 3,8

## 5. DISKUZE

Enzymy TS a TP hrají klíčovou roli v mechanismu účinku fluoropyrimidinů, enzym DPD má nejdůležitější úlohu v katabolismu 5-FU a tedy vliv na toxicitu léčby ve zdravých tkáních.

Proto jsme si kladli otázku: „Je exprese klíčových enzymů TS, TP, DPD v nádorové tkáni kolorektálního karcinomu a v okolní střevní sliznici odlišná? Lze hodnoty expresí stanovené metodou RT-PCR a imunohistochemickou analýzou porovnávat?“

V naší práci nevykazovala TS mRNA, TP mRNA stanovená pomocí RT-PCR odlišnou expresi v nádorové tkáni a zdravé sliznici (také Lassmann et al., 2006). Podařilo se nám prokázat statisticky významnou vyšší expresi DPD mRNA ve vzorcích zdravé střevní sliznice (Sign test  $p=0,034$ ), což je klinicky významné a ve shodě s dalšími studii (Miyamoto et al., 2001, Lassmann et al., 2006, Amatori et al., 2006). V kontrastu s výsledky genové exprese, je imunohistochemické vyhodnocení exprese TS a TP v nádorové a ve zdravé tkáni statisticky významně odlišné ( $p=0,026$  resp.  $p<0,001$ ). Stupeň proteinové exprese TP je pak statisticky signifikantně vyšší ve stromatu nádoru oproti vlastním nádorovým buňkám ( $p<0,001$ ), (také Yasuno et al., 2005, Ogawa et al., 2005). V naší práci jsme při použití Spearmanova koeficientu korelace nenalezli žádný statisticky významný vztah mezi hodnotami TS, TP mRNA stanovenými pomocí RT-PCR a stupni IHC exprese proteinů TS, TP v nádorové tkáni ( $p=0,28$  resp.  $p=0,39$ ) (také Miyamoto et al., 2001, Akamoto et al., 2008). Obě metody analýzy mají své limity (RT-PCR nezachytí posttranskripční regulace, imunohistochemická analýza je závislá na subjektivním hodnocení) a přinášejí odlišné závěry.

V druhé části práce jsme si kladli otázku: „Existuje vztah mezi stupněm exprese daného prediktoru a obdobím bez známek onemocnění (DFS resp. OS) u pacientů s lokalizovaným CRC? (resp. u pacientů léčených pouze chirurgickým výkonem a u pacientů léčených adjuvantní chemoterapií s 5-FU?)“

Negativní prognostický význam v této práci prokazovala vysoká exprese TP (TP mRNA  $p=0,05$ , HR 4,08, hraničně IHC TP exprese v nádorovém stromatu  $p=0,08$ , HR 3,15) a nízká IHC

exprese TS v nádorových buňkách (hraničně  $p=0,08$ , HR 0,2). Jako negativní prediktivní faktor u pacientů léčených adjuvantní chemoterapií s 5-FU byla nalezena vysoká proteinová exprese TP v nádorovém stromatu (hraničně  $p=0,06$ ). Hodnocení genové exprese TS mRNA a DPD mRNA neprokázalo prognostický a prediktivní význam. V práci Meropola (Meropol et al., 2006) také vyhodnocení expresí TS mRNA a DPD mRNA nemělo vztah ke klinické odpovědi, zatímco vysoká exprese TP v nádorových buňkách CRC (stanovená metodou RT-PCR a IHC) byla pozitivním prediktivním faktorem při léčbě kombinovanou chemoterapií kapecitabin+irinotekan.

Otázka prognostického a prediktivního významu exprese klíčových enzymů metabolismu 5-FU zůstává nejednoznačná a komplikovaná. Vzhledem k heterogennímu charakteru kolorektálního karcinomu je nutno dále studovat tyto a další potencionální prediktivní markery, nejspíše pomocí tkáňových microarrays, které umožňují stanovení molekulárního podpisu desítek až stovek genů.



## 6. ZÁVĚRY

K mnoha studovaným prognostickým a prediktivním faktorům, které by mohly pomoci individualizovat a optimalizovat cytostatickou léčbu kolorektálního karcinomu, patří také klíčové enzymy metabolismu 5-fluorouracilu-TS, TP a DPD, jejichž problematika je věnována předkládaná práce.

Z výsledků předkládané práce vyplývá:

- 1) Expze TS a TP posuzovaná podle množství jejich mRNA, stanovené pomocí RT-PCR, se neliší v nádorové tkáni a v okolní střevní sliznici.
- 2) Expze DPD mRNA stanovená pomocí RT-PCR je vyšší ve fyziologické střevní sliznici než ve vlastní nádorové tkáni.
- 3) Proteinová expze TS stanovená pomocí imunohistochemické analýzy je vyšší v nádorové tkáni než v okolní střevní sliznici.
- 4) Proteinová expze TP stanovená pomocí imunohistochemické analýzy je vyšší v tkáni nádorového stromatu než ve vlastních nádorových buňkách a vyšší než v okolní střevní sliznici.
- 5) Metody RT-PCR a IHC stanovují odlišné hodnoty expze prediktorů TS a TP. Výsledky genové a proteinové expze spolu nekorelují, nelze je porovnávat.
- 6) Prognostický význam u pacientů s časným kolorektálním karcinomem v naší studii vykazuje anatomická lokalizace nádoru a histopatologická klasifikace rozsahu primárního nádoru (stadium T).
- 7) Vysoká expze TP mRNA stanovená pomocí RT-PCR je negativním prognostickým faktorem u pacientů s lokalizovaným CRC; expze DPD mRNA a TS mRNA nemají prognostický význam.
- 8) Vysoká proteinová expze TP v nádorovém stromatu a nízká expze TS v nádorových buňkách stanovené pomocí imunohistochemické analýzy jsou negativními

prognostickými faktory (na hranici statistické významnosti) u pacientů s lokalizovaným CRC.

- 9) Vysoká proteinová exprese TP v nádorovém stromatu stanovená pomocí imunohistochemické analýzy je negativním prediktivním faktorem u pacientů s lokalizovaným kolorektálním karcinomem léčených chemoterapií s 5-FU (hraniční statistická významnost).
- 10) Expres TS (stanovená metodami RT-PCR a IHC) nemá prediktivní význam u pacientů s lokalizovaným CRC léčených chemoterapií s 5-FU.

Tato experimentálně - klinická studie je příspěvkem k úsilí o individualizaci léčby pacientů s nádorovým onemocněním na základě poznání a stanovení možných prediktivních a prognostických faktorů u kolorektálního karcinomu. Jedná se o velmi komplexní problematiku, což odráží i naše jednotlivé výsledky týkající se specifických cílů, které byly předmětem našeho výzkumu. Jsou tedy dílčím příspěvkem k celkovému úsilí o poznání patogeneze kolorektálního karcinomu, s cílem správné péče o nemocné, zvýšení úspěšnosti a minimalizace nežádoucích účinků léčby.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

**Akamoto S, Usuki H, Haba R, Kakinoki K, Okamo K, Izuishi K, Wakabayashi H, Suzuki Y.** The discrepancy in thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression depending on measurement methodologies in stage 4 gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. 2008; 55 (86-87): 1882-6

**Amatori F, Di Paolo A, Del Tacca M, Fontanini G, Vannozi F, Boldrini L, Bocci G, Lastella M, Danesi R.** Thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer and normal mucosa in patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2006 Nov; 16(11): 809-16

**Lassmann S, Henning M, Rosenberg R, Nährig J, Schreglmann J, Krause F, Poignee-Heger M, Nekarda H, Höfler H, Werner M.** Thymidine phosphorylase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase mRNA expression in primary colorectal tumors - correlation to tumor histopathology and clinical follow-up. *Int J Colorectal Dis*. 2006; 21: 238-247

**Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr.** ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumour markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 5313-5327

**Malet-Martino M, Martino R.** Clinical studies of three oral prodrugs of 5-fluorouracil (Capecitabine, UFT, S-1): A review. *The Oncologist*. 2002; 7: 288-323

**Meropol NJ, Gold PJ, Diasio RB, Andria M, Dhani M, Godfrey T, Kovatich AJ, Lund KA, Mitchell E, Schwarting R.** Thymidine phosphorylase expression is associated with response to capecitabine plus irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24(25): 4069-77

**Miyamoto Y, Ochiai A, Boku N, Ohtsu A, Tahara M, Yoshida S, Okabe H, Takechi T, Fukushima M.** Discrepancies between the gene expression, protein expression, and enzymatic activity of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in human gastrointestinal cancers and adjacent normal mucosa. *Int J Oncol*. 2001; 18: 705-713

**Ogawa M, Ikeuchi K, Takao Y, Kobayashi T, Eto K, Ushigome T, Watanabe M, Anazawa S, Yamazaki Y, Yanaga K.** The activities of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer depend on where the sample is taken. *Oncol Rep*. 2005 Aug;14(2): 331-5

**Pfeiffer P, Qvortrup C, Eriksen JG.** Current role of antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncogene* 2007; 26(25): 3661-78

**Popat S, Matakidou A, Houlston RS.** Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer. A systematic Review and meta – analysis. *J Clin Oncol.* 2004; 22(3): 529-536

**Sobrero A, Aschele C, Bertino J:** Fluorouracil in colorectal cancer-a tale of two drugs: implication for biochemical modulation. *J Clin Oncol.* 1997;15: 368-381

**Soong R, Shah N, Salto-Tellez M, Tai BC, Soo RA, Han HC, Ng SS, Tan WL, Zeps N, Joseph D, Diasio RB, Iacopetta B.** Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Ann of Oncol.* 2008; 19: 915-919

**UZIS ČR, Novotvary 2006 ČR, Zdravotnická statistika 2006,** Cancer incidence 2006 in the Czech Republic 51-60

**Van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, Maring JG, Vreken P, van Gennip AH.** Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: Identification of new mutations in the DPD gene, *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 4705-4712

**Waters J, Cunningham D.** The changing face of chemotherapy in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2001 Jan 5; 84(1): 1-7

**Yasuno M, Mori T, Koike M, Takahashi K, Toi M, Takizawa T, Shimizu S, Yamaguchi T, Matsumoto H.** Importance of thymidine phosphorylase expression in tumor stroma as prognostic factor in patients with advanced colorectal carcinoma. *Oncol Rep.* 2005;13(3): 405 - 12

## 8. LITERATURA AUTORKY

### 1. Původní články v časopisech s impaktovaným faktorem (IF)

1. **Zimovjanová M**, Sýkora V, Novotný J, Gatěk J, Petruželka L, Holubec L Jr, Pecen L. Comparative analysis of thymidylate synthase, thymidine phosphohorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase expression in colorectal cancer and surrounding normal tissue. *Neoplazma* 2005; 52, 3: 208-210, **IF** 1,2, cit. 2

2. Krásná L, Netíková I, Chaloupková A, Taišlová E, **Zimovjanová M**, Veselý P, Daneš J, Petruželka L, Matoušková E. Assesment of in vitro drug resistance of human breast cancer cell subcultured from biopsy specimens. *Anticancer Res* 2003; 23(3B): 2593- 2599, **IF** 1,41, cit. 5

3. Janků F, Příbylová O, **Zimovjanová M**, Pazdrová G, Šafanda M, Petruželka L. 4-years results of weekly trastuzumab and paclitaxel in the treatment with women with HER2/neu overexpressing advanced breast cancer: single prospective study. *Bull Cancer* 2004; 91,10: 279-283, **IF** 0,89, cit 1

### 2. Publikace v odborných časopisech s recenzním řízením

1. Kleiblová P, Kleibl Z, **Zimovjanová M**, Sýkora V. Detekce mutací a genové exprese dihydropyrimidindehydrogenasy (DPD) - laboratorní výsledky a klinické využití. *The Lancet Oncology*, české vydání, 2004; 3, 2.

2. Novotný J, Kleibl Z, **Zimovjanová M**, Petruželka L. Projekt DPD online: možnost predikce toxicity 5- fluorouracilu a jeho derivátů. *Klinická onkologie* 2003; 16, 6: 276- 278

3. Janků F, Petruželka L, Příbylová O, Vedralová J, Honová H, Pecen L, **Zimovjanová M**, Pazdrová G, Šafanda M, Konopásek B a kol. Efficacy of weekly trastuzumab and paclitaxel in the treatment of women with HER-2/neu overexpressing metastatic breast cancer. The impact of taxane free interval on treatment outcomes. *Radiology and Oncology* 2002; 36,2, 121-129

### 3. Publikace v domácích odborných časopisech

1. **Zimovjanová M**. Program DPD online - možnosti predikce toxicity protinádorové léčby. *Zdravotnické noviny* 2004; 53, (34), příloha Lékařské Listy

2.**Zimovjanová M**, Chroust K. Megestrolacetát v léčbě anorexie a kachexie u pacientů s nádorovým onemocněním. *Medicina po promoci* 2005; 6 (10): 74- 76

3.**Zimovjanová M**, Genetické poradenství v onkologii. *Eva 35 info* 2006; 1, (1) 10-11

#### **4. Abstrakta prezentací na zahraničních kongresech publikovaných v časopisech s IF**

1.**Zimovjanová M**, Kleibl Z, Sýkora V, Novotný J, Petruželka L. DPD mutations and expression in patients with serious toxicity dutiny therapy with 5-FU based regiments: National project. *The ASCO 2004 Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 25, abstrakt 3118

2.**Zimovjanová M**, Tesařová P, Novotný J, Petruželka L, Konopásek B, Příbylová O, Mužík J. EVA35- project of cancer care for young women in the Czech Republic. Meeting poster. *Annals of Oncology* 2008, 19, Suppl.5, 137-138, **IF** 4,87

3.Petruželka L, **Zimovjanová M**. Fulvestrant in postmenopausal women with metastatic breast cancer progressing on prior endocrine therapy- results from compassionate use program. *The ASCO 2004 Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 25, abstrakt 730

4.Netíková I, Brožová M, Janků F, **Zimovjanová M**, Skřičilová G, Spěváková K, Krásná L, Matoušková E. Assesment of in vitro drug resistance from malignant effusions cells as a possibility for the individualisation of the chemotherapy for patients with advanced cancer. Meeting poster. *The Ninth International Symposium on Oncology- Pharmacy Practice* 2004

5.Petruželka L, Janků F, Příbylová O, Honová H, **Zimovjanová M**. et al. Weekly administration of Trastuzumab and Paclitaxel. *Journal of Tumor marker Oncology* 2001, abstrakt 348-349

#### **5. Abstrakta ve sbornících z domácích konferencí**

1.**Zimovjanová M**, Novotný J, Konopásek B. Genetické poradenství u mladých žen s rizikem karcinomu prsu. 14. onkologicko-urologické sympozium a 10. mammologické sympozium 2006, abstrakt 25

2.Novotný J, **Zimovjanová M**, Sýkora V, Gatěk J, Petruželka L, Holubec L, Pecen L. Rozdílná exprese thymidinofosforylázy ve střevní sliznici a v primárním

kolorektálním nádoru, racionální základ pro selektivní aktivaci kapecitabinu v nádoru. XXIX. Brněnské onkologické dny 2005, abstrakt 101

3.Petruželka L, **Zimovjanová M**, Aschermannová A. Nové možnosti hormonální léčby postmenopauzálních žen s karcinomem prsu. XXVIII.Brněnské onkologické dny 2004, abstrakt 79

4.Petruželka L, **Zimovjanová M**. Kontroverze v adjuvantní léčbě postmenopauzálních žen s karcinomem prsu. 9. ročník odborného sympozia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii 2004, abstrakt 20

5.Tesařová P, Barkmanová J, **Zimovjanová M**, Příbylová O, Konopásek B, Petruželka L. Neoadjuvantní chemoterapie a patologická kompletní remise u pacientek do 35 let. XXXII. Brněnské onkologické dny 2008, abstrakt 173

6.Janků F, Konopásek B, **Zimovjanová M**, Petruželka L. Léčba kožních metastáz karcinomu prsu. VII.Jihočeské onkologické dny 2000, abstrakt 32

7.Novotný J, Kleibl Z, Kleiblová P, **Zimovjanová M**, Sýkora V. Program DPD online- program predikce toxicity způsobené fluoropyrimidiny. XXVIII. Brněnské onkologické dny 2004, abstrakt 79

8.Petruželka L, Tesařová P, Příbylová O, **Zimovjanová M**. Adjuvantní terapie u žen s karcinomem prsu ve věkové skupině pod 35 let. 9. ročník odborného sympozia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii 2004, abstrakt 52

9.Netíková I, Vašutová P, Havrilová P, Krásná L, **Zimovjanová M** a kol. Léčba palmární-plantární erytrodysthesie po podávání fluoropyrimidinů 10% uridinovou mastí. 13.dny profesora Vladimíra Staška 2008, sborník 94-95

10.Petruželka L, Konopásek B, Příbylová O, Tesařová P, **Zimovjanová M**. Léčba metastazujícího karcinomu prsu ve světle nových možností chemoterapie, hormonální léčby a bioterapie. 13.ročník odborného sympozia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii 2008, abstrakt 15.

11.Petruželka L, Konopásek B, Novotný J, Příbylová O,Tesařová P, **Zimovjanová M**. Projekt integrované péče o ženy mladší věkové skupiny s karcinomem prsu. 13.dny profesora Vladimíra Staška 2008, sborník 86-88