

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

**Farmakologický přístup k výsledkům vyšetření
estrogenových a progesteronových receptorů
v nádorech prsu**

Diplomová práce

Školitel: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Hradec Králové 2008

Vlasta Bařinková

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND MEDICAL
SCIENCES

**Pharmacological approach to results of testing
estrogen and progesteron receptors
in carcinoma of the breast**

Thesis

Supervisor: MUDr. Jiří Hochmann, CSc.

Hradec Králové 2008

Vlasta Bařinková

Poděkování

Děkuji školiteli MUDr. Jiřímu Hochmanovi, CSc. za cenné rady a všestrannou pomoc při vzniku této diplomové práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Obsah

1. SOUHRN	8
2. SUMMARY	10
3. ÚVOD.....	12
4. TEORETICKÁ ČÁST – UČEBNICOVÁ LITERATURA.....	13
4.1. Nádorová patologie mléčné žlázy	13
4.1.1. Neinvazivní karcinom.....	13
4.1.2. Invazivní karcinom.....	13
4.2. Estrogenové a progesteronové receptory.....	14
4.2.1. Estrogenové receptory	14
4.2.2. Progesteronové receptory.....	14
4.3. Léčba karcinomu prsu.....	15
4.3.1. Klasická současná léčba	15
4.3.2. Genová terapie	19
4.3.2.1. Nemoci léčené na somatické úrovni	19
4.3.2.2. Metodika léčby delecí na somatické úrovni	20
4.3.2.3. Genová terapie rakoviny	21
4.3.2.4. Nebezpečné komplikace genové terapie.....	22
4.3.2.5. Genová terapie a etické problémy	23
4.3.2.6. Vektory pro přenos genů do bakterií	24
4.3.2.7. Transplantace genů do eukaryotických buněk.....	25
5. VÝSLEDKY HLEDÁNÍ – PŘEDEVŠÍM V ZAHRANIČNÍ ČASOPISOVÉ LITERATUŘE	27
5.1. Spory o klinickém významu vyšetřování progesteronových receptorů.....	27
5.1.1. Názory, že vyšetření PR je zbytečné.....	27
5.1.2. Názory, že vyšetření PR je výhodné až nezbytné.....	29
5.1.2.1. Přímá kritika názorů Olivotta a spol.	29
5.1.2.2. Komplexnější úvahy	33
5.1.2.3. České práce o využití poměru ER/PR.....	34
5.1.2.4. Příbuzná problematika karcinomů dělohy	35
5.2. Genová terapie	36
5.2.1. Mutační kompenzace diferenciačních genů	37
5.2.1.1. Přenos genu pro PR do karcinomu dělohy.....	37
5.2.1.2. Vnesení genu pro estrogenový receptor (ER) do nádorových buněk	38
5.2.1.3. Inhibice mitogenních signálů vložení diferenčních genů pro specifickou inhibiční RNA.....	38
5.2.1.4. Apoptóza a inhibice růstu vlivem melanomového genu pro diferenciaci39	

5.2.2.	Vložení genu regulujícího apoptózu.....	40
5.2.2.1.	Léčba pacientek přenosem zdravého genu p53	40
5.2.2.2.	Proapoptotický vliv genu BCL-2 antisense a jeho spojení s cytostatickou terapií.....	42
5.2.2.3.	Usmrcování nádorových buněk vlivem siRNA, která potlačuje expresi survivinu – inhibitoru apoptózy	43
5.2.2.4.	„Mylně proapoptotická“ skupina – apoptóza vlivem jiných než apoptotických genů	44
5.2.3.	Vložení genu způsobujícího nekrózu nebo inhibici růstu buňky v netoxických podmínkách.....	45
5.2.3.1.	Vložení genu, který spotřebovává methionin a blokuje růst na methioninu závislých nádorů.....	45
5.2.3.2.	Vnesení bakteriofágového genu pro lýzu buněk indukovanou tetracyklinem	46
5.2.4.	Vložení genu zvyšujícího citlivost na podané chemikálie.....	47
5.2.4.1.	Biochemická aktivace antivirotik - thymidinkinázové principy.....	47
5.2.4.1.1.	Vnesení genu HSVtk (rAAV-2/HSVtk/Tet-On systém) transformujícího toxický ganciklovir za indukce doxycyklinem	48
5.2.4.1.2.	Modifikace protiproudové nepřekládané oblasti pro tkáňovou specifitu ganciklovirové terapie	49
5.2.4.1.3.	Terapie suicidním genem – vzájemné porovnání thymidinkinázy dvou virů a čtyř antivirotik	50
5.2.4.1.4.	Zvýšení cytotoxicity RIP-TK/GCV (ganciklovirové) terapie vložemím genu pro transkripční faktor (PDX-1)	50
5.2.4.1.5.	Ganciklovir aktivující genová terapie v kombinaci s antiangiogenním endostatinem.....	51
5.2.4.2.	Biochemická aktivace cytostatik	52
5.2.4.2.1.	Přenos genu pro oxidační aktivaci cytostatik v kombinaci s replikativním šířením viru	52
5.2.4.2.2.	Cytosindeaminázová tvorba 5-fluoruracilu v kombinaci s ozářením	53
5.2.5.	Antiangiogenní genová terapie	54
5.2.5.1.	Antiangiogenní endostatinová genová terapie v kombinaci s ganciklovirem	54
5.2.5.2.	Kombinace integrinové siRNA a ozařování při antiangiogenní léčbě rakoviny prsu.....	55
5.2.6.	Genetická imunopotencionace	56
5.2.7.	Ochrana kostní dřeně transplantací geneticky modifikovaných buněk..	56
5.2.7.1.	Vnesení genů mnohalékové rezistence	56
5.2.8.	Zabezpečování tkáňové specifičnosti s nedořešením terapeutického mechanismu nebo s použitím pro viroterapii.....	57
5.2.8.1.	Vylepšování obalu virových vektorů transmembránovými zakotvovacími strukturami	57
5.2.8.2.	Tumor-specifická exprese pomocí promotoru heparinázy	57
5.2.8.3.	Tkáňově specifické promotory pro glykoprotein, cyklooxygenázu a pro receptor chemokinu využité k zabezpečení tkáňové specifičnosti přenosu genů nebo viroterapie	58
5.2.8.4.	Použití liposomů pro genovou terapii a jinou léčbu nádorů prsu	58

6. DISKUZE	60
6.1. Estrogenové a progesteronové receptory.....	60
6.1.1. Důležitost vyšetření PR	60
6.2. Genová terapie	61
6.2.1. Pokusy prováděné na lidech.....	62
6.2.2. Pokusy prováděné na zvířatech	63
6.2.3. Pokusy prováděné na tkáňových kulturách	64
6.2.4. Zastoupení metod genové terapie z hlediska nejpoužívanějších principů.....	64
6.2.5. Ovlivnění genové terapie výsledkem vyšetření ER.....	65
a PR	65
6.2.6. Genová terapie ve výuce.....	66
7. ZÁVĚR	67
8. SEZNAM ZKRATEK	68
9. SEZNAM LITERATURY	70

1. Souhrn

V částech věnovaných diskuzi různých autorů o významu progesteronových receptorů (PR) jsme se zaměřili především na práce zahraničních autorů publikované v odborných časopisech.

Názory těchto odborníků jsme rozdělili na ty, které uvádí, že testování PR je zbytečné a na část o výhodnosti tohoto testování.

V kapitole o důležitosti vyšetření PR někteří autoři kritizují, že některé pacientky negativní na estrogenové receptory (ER) – a to takové, které jsou zároveň PR-pozitivní – by mohly být ochuzeny o hormonální terapii, protože by jim vyšetření PR nebylo provedeno. A navíc by jim byla přednostně podána jiná – v tomto případě méně efektivní léčba. Vyšetření PR je důležité také proto, aby se rozlišila skupina ER-pozitivních nádorů s negativním PR u níž je malá pravděpodobnost, že nádory budou reagovat na hormonální léčbu (na rozdíl od ER+/PR+).

V části věnované genové terapii jsme nejprve popsali poznatky z učebnicové literatury. Dále jsme popsali různé metody genové terapie karcinomu prsu publikované v zahraniční časopisové literatuře. Třídění, v nich uvedené, jsme pak dále modifikovali dle naší potřeby na tyto podkapitoly: (1) mutační kompenzace diferenciačních genů, (2) vložení genu regulujícího apoptózu, (3) vložení genu způsobujícího nekrózu nebo inhibici růstu buňky v netoxických podmínkách, (4) vložení genu zvyšující citlivost na podané chemikálie, (5) antiangiogenní genová terapie, (6) genetická imunopotenciace, (7) ochrana kostní dřeně transplantací geneticky modifikovaných buněk, (8) zabezpečování tkáňové specifičnosti s nedořešením terapeutického mechanismu.

Kromě prací, provedených výhradně na tkáňových kulturách jsme našli 10 prací, v nichž byla genová terapie provedena na zvířatech, jimž byly implantovány buňky karcinomu prsu. Našli jsme zatím pouze 2 studie, ve kterých byla genová terapie karcinomu prsu pokusně prováděna na pacientkách.

Z hlediska zohlednění výsledku vyšetření ER a PR v genové terapii karcinomu prsu lze říci, že jsme takové práce našli, ale byly v menšině proti pracím např. o přenosu toxických genů. Pouze 1 z přibližně 25 nalezených prací se věnovala kompenzaci ER

negativity. Včlenění genu (naopak) pro PR se věnovala pouze práce – nikoliv o karcinomu prsu, ale dělohy. Obě tyto práce zatím nehovoří o výsledcích z pokusů in vivo.

2. Summary

In the part devoted to discussion of different authors about the importance of the progesterone receptor (PR) value we concentrated primarily to the works of foreign authors published in professional journals.

We divided the opinions of this experts to such, which show that PR testing is needless and to the part about profitability of this testing.

In the chapter about importance PR testing some authors criticize, that some patients – negative in estrogen receptors (ER) (such of them that are simultaneously PR-positive) could be deprived in the possibility of hormonal therapy, because PR testing wouldn't be made. And in the addition, the other – (in this case) the less effective treatment would be given them preferentially. PR testing is important also for detection of the group of ER-positive tumors with PR negativity. At this group is the smaller possibility that the tumors would respond to the hormonal treatment (in contrast to ER+/PR+).

In the part devoted to gene therapy we described first the information about learning from the textbooks. Futher we describe different modes of classification of the gene therapy of the breast cancer in the foreign literature.

We modified their classification further according to our necessity to these subheads: (1) mutation compensation of differentiation genes, (2) insertion of gene regulating the apoptosis, (3) insertion of gene causing the necrosis or inhibition of cell growth in nontoxic conditions, (4) insertion of gene increasing the sensitivity to administered chemicals, (5) antiangiogenic gene therapy, (6) genetic immunopotentialiation, (7) protection of bone marrow by transplantation of the genetically modified cells, (8) ensuring of the tissue specificity with unsolved therapeutic mechanism.

Except of the works performed only in the tissue cultures, we found 10 works in which the gene therapy was performed in the animals – to those the breast cancer cells were implanted. Meantime, we found only 2 works in which the experimental gene therapy was performed even in the patients.

From the point of view of taking into account the ER and PR results in the breast cancer gene therapy – it is possible to say that we found such works, but they were in the minority – in comparison with the works e.g. about the transferring of the toxic genes. Only 1 from approximately 25 works (found by us) concerned the compensation of ER negativity. Also only one work concerned the insertion of the gene (on the contrary) for PR – but not to the breast cancer but to the uterine cancer. Both these works do not speak about the in vivo results.

3. Úvod

V návaznosti na zadání diplomové práce jsme hledali informace o významu receptorového vyšetření karcinomů prsu. Zvolili jsme si dvě oblasti zkoumání. Jednak příklady z velmi praktických výměn názorů z klinických studií a jednak ze zcela opačné problematiky, a to z téměř ryze teoretické oblasti genové terapie. V naší práci jsme se více soustředili na progesteronové, ale o jejich důležitosti jsme se dozvíдали pouze v části klinické. V problematice týkající se genového inženýrství jsme použili výhradně publikace, u kterých byly ovlivňovány buňky karcinomu prsu. Ta však byla převážně zaměřena jinak než na receptory.

4. Teoretická část – učebnicová literatura

4.1. Nádorová patologie mléčné žlázy

Karcinom prsu dělíme na hlavní dva typy: neinvazivní a invazivní karcinom. Většina karcinomů vychází z TDLU (terminální duktulární lobulární jednotka).

4.1.1. Neinvazivní karcinom

Neinvazivní karcinom (in situ karcinom) je definován intaktní bazální membránou, maligní buňky proliferují uvnitř dilatovaného duktálního nebo acinárního prostoru a neprostupují přes bazální membránu (Skálová 2006). Rozlišujeme dva základní typy in situ karcinomu, vycházející z duktální jednotky (duktální carcinoma in situ, DCIS) nebo vycházející z lobulární jednotky (lobulární carcinoma in situ, LCIS).

4.1.2. Invazivní karcinom

Invazivní karcinom se vyznačuje invazivním růstem a schopností metastázovat do jiných tkání. Dle histologické klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) se do této skupiny řadí: invazivní duktální karcinom (DIC), invazivní lobulární karcinom (LIC), medulární karcinom (MC), mucinózní invazivní karcinom (GIC), invazivní papilární karcinom (PIC), tubulární karcinom (TIC), adenoidně cystický karcinom (ACC), sekreční karcinom (SJC), apokrinní karcinom (AIC) a karcinom s metaplazií (MIC) (Motlík a Živný 2001) (Celbová – 2007).

4.2. Estrogenové a progesteronové receptory

4.2.1. Estrogenové receptory

Estrogeny působí v tkáních přes ER. Jsou to látky bílkovinného charakteru, obsažené v cytoplazmě buněk některých orgánů. Pro svůj hormon mají vysokou afinitu (Rochefort a kol. – 1987).

Vazbou hormon-receptor dojde ke změně konformace bílkoviny a vzniku aktivovaného komplexu. Pevný komplex hormon-receptor prochází jadernou membránou, uvede v činnost genetický aparát, který zahájí tvorbu jiné regulační bílkoviny. Jde o pozitivní regulaci, na jejímž podkladě vzniká v buňce několik typů proteinů, mimo jiné i PR. Tím dochází ke změně vlastností buňky i celé tkáně, např. množení buněk nutné pro rozvoj říje, těhotenství nebo laktace (Rochefort a kol. – 1987).

Neobsazené ER jsou pravděpodobně velmi volně vázány na jádra buněk, které jsou hormonálně citlivé. Toto potvrzuje imunocytochemická metoda stanovení receptorů (Horáčková-1997 citovala z Greene-1988).

Počet ER patrně souvisí s hladinou estrogenů. Při poklesu estrogenů v krvi např. ukončením produkce po menopauze, se počet ER v cytoplazmě zvyšuje (Kobilková a kol.-1990) (Marešková – 2006).

4.2.2. Progesteronové receptory

Progesteron je steroidní pohlavní hormon ze skupiny gestagenů. Je secernován hlavně žlutým tělískem vaječníků a kůrou nadledvin. Ovlivňuje druhou polovinu ovulačního cyklu a průběh gravidity. Progesteron působí podobným receptorovým mechanismem jako estrogeny. Progesteronové receptory (PR) se vyskytují zejména v buňkách vejcovodů a dělohy, ale i v mléčné žláze a jejích nádorech (Horton a kol.-1982) (Marešková – 2006).

4.3. Léčba karcinomu prsu

4.3.1. Klasická současná léčba

Základem terapie nadále zůstává chirurgické odstranění nádoru s excisí části prsu (tzv.kvadrantektomie), případně odstranění uzlin v podpaží, pokud jsou postiženy metastázováním nádoru. Mastektomie (tj. odstranění celého prsu) se provádí tzv. ablací, rozhodující kritéria pro toto řešení jsou velikost nádoru (T), jeho umístění v prsu, mikroskopická struktura nádoru.

Po operaci následuje pomocná léčba (tzv.adjuvantní) (*Dvořáková – 2007*). **Léčba adjuvantní** - „Zajišťovací“ léčba je prováděná po radikální chirurgické léčbě u nemocných bez známek metastáz nádoru. Podává se v případech, kdy je riziko, že se nádor z primárního ložiska začal již šířit do jiných orgánů a tkání a založil zde mikrometastázy. Cílem je tyto mikrometastázy léčbou zničit dříve než se zvětší. V adjuvantní léčbě se používá některý typ léčby medikamentózní, radioterapie, popř. kombinace obou těchto způsobů.

Ozařování je nedílnou součástí léčby kostních metastáz. Provádí se vždy po částečném výkonu a někdy i po odstranění celého prsu, jsou-li přítomny rizikové faktory jako nadměrně velký nádor šířící se k hrudní stěně, popř. zasahující do podpažních uzlin. Mezi vedlejší účinky patří únava, otoky a ztlustění kůže v místě ozařování.

Chemoterapie se v léčbě nádoru prsu používá stále častěji. Lze ji dělit na cytostatickou a hormonální, i když často je pod pojmem chemoterapie míněna právě cytostatická léčba. Někdy se k ní přistupuje ještě před samotnou operací, aby se zmenšil rozsah nádoru a metastáz. Léčba je ambulantní a klade si za cíl snížit riziko recidiv. Konkrétní léky i doba jejich podávání se liší podle druhu nádoru. Nejčastěji používaná cytostatika jsou cyklofosfamid, methotrexát, 5-fluorouracil a adriamycin. Léky II. volby jsou hormony nebo jejich analogy - gestageny, estrogeny, androgeny a kortikosteroidy (*Novotný 2007*).

Hormonální terapie je nyní v ČR využívána ve více než 50% (Dvořáková – 2007). Hormonální terapie při léčbě rakoviny prsu je založena na snížení produkce estrogenů nebo blokády signálu zprostředkovaného estrogenu. Toho lze dosáhnout několika různými způsoby:

- **Ablativní způsob** znamená odstranění orgánu produkujícího estrogenu nebo odstranění orgánu ovlivňujícího jejich produkci. Stejný účinek má vyřazení orgánu z funkce jiným způsobem.

K ablativním metodám patří:

- chirurgická ovariectomie (ooforektomie) - tato metoda byla první formou ovariální ablace. Způsobuje okamžitou a trvalou ztrátu ovariální steroidní produkce. Současné možnosti laparoskopicky prováděné ovariectomie podstatně snížily operační morbiditu i mortalitu. Ovariectomie snižuje rovněž riziko ovariálního karcinomu u geneticky predisponovaných žen.

- radiační ovariectomie - radiačně indukovaná ovariální ablace používá různé radioterapeutické režimy od 4–5 Gy v jedné frakci až po 10–20 Gy v 5–6 frakcích.

- medikamentózní vyřazení funkce vaječnicků (analoga LHRH – gonadoliberinu). Gonadoliberin je hypothalamický hormon, který uvolňuje z hypofýzy luteinizační hormon (LH) a folikulostimulační hormon (FSH). Podáváním jeho analog (LHRH, GnRH) se dosáhne zástavy sekrece gonadotropinů a vyvolá se tak centrální hypogonadismus (farmakologická, medikamentózní kastrace). Nejčastěji používaná analoga gonadoliberinů jsou goserelin (Zoladex), buserelin (Suprefact), leuprolin (Carcinil), triptorelin (Decapeptyl). V ČR je indikován pro léčbu karcinomu prsu z celé skupiny agonistů LHRH pouze goserelin (Zoladex) (Abrahámová a spol. - 2006). Zatímco chirurgická a radiační kastrace jsou ireverzibilní, medikamentózní zásah je vratný a po vysazení léku je funkce obnovena. Tyto výkony se provádějí u premenopauzálních žen.

- **Kompetitivní inhibice** znamená nemožnost přenosu signálu na vazební místo – estrogení receptor – buď obsazením vazebního místa, nebo jeho degradací. Látky, které jsou schopné vazbou na ER antagonizovat jeho funkci, se nazývají **selektivní modulatory estrogenních receptorů** (SERM). Patří sem především tamoxifen. U žen s časným karcinomem prsu, které jsou po menopauze a mají pozitivní hormonální receptor, je tamoxifen hlavní léčebnou adjuvantní strategií podávaný v dávce 20 mg

denně po dobu pěti let (*Abrahámová a spol. – supplementum1*). Tamoxifen má však proliferační účinek na endometrium, který při dlouhodobém používání 2-4 násobně zvyšuje riziko karcinomu endometria, i přes tyto rizika je dosud celosvětově nejvíce předepisovaným protinádorovým lékem (*Marešková – 2006*).

Dále do této skupiny patří čisté steroidní antiestrogeny (fulvestrant) nejen antagonistující ER, ale způsobují též jeho degradaci (SERD – selektivní degradátory estrogenních receptorů) (*Abrahámová a spol. – supplementum1*). Jedná se o steroidní analog 17 β -estradiolu, který se váže na ER a vyvolává jeho konformační změny, které zabraňují receptorové dimerizaci. Receptor je rychle degradován a dochází ke snížení množství buněčných ER. V klinických studiích byla potvrzena účinnost fulvestrantu u pacientek s ER+ pokročilým karcinomem prsu jak v první, tak ve druhé linii (*Perey a spol. – 2007*).

• **Inhibice syntézy estrogenů** se provádí blokádou enzymů, které jsou rozhodující pro syntézu estrogenů v nadledvinách a tukové tkáni u žen po menopauze. K tomu se používají **inhibitory aromatáz** (IA)– látky, jež snižují koncentraci estrogenů u postklimakterických žen i ve vlastní nádorové tkáni. V současnosti jsou k dispozici inhibitory aromatáz III. generace (letrozol, anastrozol, exemestan). Nepoužívají se u žen před menopauzou (*Abrahámová a spol. - supplementum1*).

Letrozol a anastrozol jsou nesteroidní inhibitory kompetující s endogenními substráty o přístup na aktivní místa. Třetí generace IA představuje léčiva vysoce selektivní v inhibici enzymu aromatázy a vysoce účinná. Způsobují téměř kompletní supresi enzymatické aktivity in vivo. Současné studie prokázaly, že IA výrazně zvýšily, ve srovnání s tamoxifenem, sledovaný parametr pětiletého přežití.

Exemestan je naopak steroidní inaktivátor, který soutěží s endogenními substráty androstendionem a testosteronem o aktivní místo enzymů, kde fungují jako falešné substráty. Jsou metabolizovány na intermediární produkty, které se váží na aktivní místa a způsobují ireverzibilní inhibici enzymů (*Abrahámová - 2007*).

• **Aditivní blokáda** znamená vyřazení vazby na hormonální receptor (HR) vyššími dávkami gestagenů (megestrol acetát, medroxyprogesteron acetát). Používají se až po selhání předchozí hormonální léčby a v adjuvanci nemají uplatnění. Léčba vyššími dávkami estrogenů či androgenů, dříve užívaná u pokročilého karcinomu prsu, se dnes považuje za obsoletní.

• Specifika adjuvantní hormonální léčby

Přítomnost ER v nádorové tkáni predikuje odpověď na endokrinní léčbu. To znamená, že hormonální léčba se neindikuje, chybějí-li ER. U pacientek ER-negativních se dává přednost cytotoxické léčbě.

Klinické studie u pokročilého onemocnění ukázaly, že největší účinek na inhibici nádorového růstu mají prostředky endokrinní léčby především u karcinomu prsu s pozitivními ER. Tento poznatek se prokázal jak *in vitro*, tak *in vivo*. Potvrdilo se však, že 5–10 % žen, jejichž nádor neměl prokázané receptory (ER–), přesto odpovídá na hormonální léčbu (*Abrahámová a spol. - supplementum1*).

Jiná negenová léčba

Nověji se v praxi začíná využívat imunoterapie monoklonální protilátkou transtuzumabem (Herceptin) u karcinomu prsu vysoce exprimující gen Her-2/Neu (receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2) a u metastatického karcinomu prsu. Protilátka (Ab) se váže na nádorové buňky, a tak umožňuje imunitnímu systému jejich rozpoznání a zničení. Lék je účinný pouze v těch případech, kdy se na povrchu nádorových buněk vyskytuje bílkovina p185 (= HER-2). Proto se může lék použít pouze u 10 - 15 % žen. Nejčastěji se podává v kombinaci s chemoterapií 1x týdně u těch žen, u kterých běžná protinádorová léčba selhala. Tento lék je k dispozici pouze na vybraných pracovištích v České republice (*Dvořáková – 2007*).

4.3.2. Genová terapie

Pod pojem genová terapie můžeme zahrnout všechny postupy, které využívají přenosu genetického materiálu do buněk pacienta k léčebným účelům. Metodologie genové terapie je uplatnitelná tam, kde je známa molekulární podstata nemoci. Vzhledem k tomu, že poznatků o patogenezi chorobných stavů na molekulární úrovni přibývá, rozšiřuje se i okruh indikací pro genovou terapii.

V současné době se genová terapie potýká s mnoha problémy, ale málokdo pochybuje, že její vstup do humánní medicíny je neodvratný, a že v nejbližších letech změní zásadním způsobem léčbu mnoha lidských nemocí.

Ačkoliv se při zrodu genové terapie uvažovalo především o jejím využití při léčbě vrozených chorob, většina probíhajících klinických studií se zaměřuje na choroby získané. Mezi nimi dominují zhoubné nádory, ale intenzívně se její postupy prověřují také např. při léčbě kardiovaskulárních a metabolických chorob, degenerativních nervových onemocnění, AIDS a také v transplantační medicíně (*Vonka – 2002*).

I na naší fakultě je této problematice věnován předmět nazvaný Genová terapie, který je přednášen PharmDr. Miroslavem Miletínem, Ph.D. a RNDr. Radovanem Haluzou a jinými.

4.3.2.1. Nemoci léčené na somatické úrovni

V současnosti jsou léčeny genovou terapií pouze některé **dědičné genové deficiencie** (chybění genů) nebo takové mutace těchto genů, které mají za následek tvorbu nefunkčního proteinu (především enzymatické deficiencie). Jsou založeny na přidání chybějícího genu do genomu některých buněk.

Druhá skupina nemocí, zkoumaných z hlediska genové terapie na somatické úrovni je rakovina. Obě tyto skupiny metod nejsou geneticky nebezpečné, neboť musí být prováděny takovým způsobem, který není infekční pro jiné lidi (neinfekční vektory) a není nebezpečný pro zárodečné buňky pacienta.

Učebnicové příklady genové terapie na somatické úrovni jsou **enzymatické deficience a hormonální deficience**.

Například **ADA** (= absence **adenosin deaminázy**) způsobuje nadbytek 2-deoxyadenosinu, který je toxický pro lymfocyty a způsobuje letální imunodeficienci. Genové inženýrství zde může být použito místo substituční terapie bovinní adenosin deaminázou. Tato choroba je rutinně léčena genovou terapií (*Nečas a spol. – 2000*).

Jako teoretický příklad pro výuku této problematiky může sloužit také nedostatek růstového hormonu. Ale je zde velké množství dalších teoretických příkladů, které budou řešeny v budoucnosti.

4.3.2.2. Metodika léčby delecí na somatické úrovni

Přenos genů je prováděn nejčastěji v buněčných kulturách (pouze výjimečně pomocí lipozomů, cirkulujících v krvi). Jestliže jsou jako vektory použity viry, musí být defektní v genu pro infekční protein.

Jako reprezentativní případ je v různých zde citovaných učebnicích popsána metoda, využívající přenos genů v podmínkách buněčné kultury:

- 1) **Explantace** buněk pacienta s genovým defektem do podmínek *in vitro* a kultivace v buněčné kultuře.
- 2) **Fúze** těchto buněk s vektorem, majícím dotyčný zdravý gen.
- 3) Klonová selekce a **mnohonásobné namnožení** těchto buněk v buněčné kultuře.
- 4) **Transplantace** takovýchto buněk do organismu pacienta – např. do jeho břišní dutiny. Ty zde žijí a produkují potřebné sloučeniny nebo enzymy nebo hormony (podobně jako při kultivaci buněčných kultur v peritoneální dutině myši – místo ve skleněných miskách).

Krvetvorné (= hematopoetické) buňky – po svém vyléčení pomocí transplantace genu v buněčné kultuře – mohou být transplantovány injekcí do žíly pacienta. Jsou schopné cestovat v krvi a po náhodném vstupu do kostní dřeně jsou schopny se v tomto orgánu usadit.

4.3.2.3. Genová terapie rakoviny

Je většinou pouze ve stádiu experimentů. Nejdůležitější principy lze dělit podle toho, zda je genová manipulace provedena přímo v nádorových buňkách, nebo naopak v cytotoxických lymfocytech, které účinkují proti nádorovým buňkám:

Lymfocyty: Jsou použity takové geny, které ničí nádorové buňky. Např. do “**nádor infiltrujících lymfocytů**” může být ve tkáňové kultuře vložen gen pro **tumor necrosis factor** (= TNF). Po mnohonásobném namnožení v těchto podmínkách jsou tyto geneticky modifikované lymfocyty injikovány intravenózně a mohou pak zabít nádorové buňky (*Postlethwait a Hopson – 1992*).

Nádorové buňky: Často používanými metodami v genové terapii nádorů je transfekce (= fagocytóza volné DNA = genů) nebo použití lipozomů, neboť vlastností nádorových buněk je snadno přijímat genetickou informaci z okolí. Jsou tedy náchylné k tomu, aby byly geneticky modifikovány tímto způsobem – bez virového vektoru. Nejznámější jsou následující příklady:

a) **Zdravé geny p53**, včleněné do adenovirů: Mohou být injikovány dlouhou jehlou do středu takového nádoru, který před injekcí nebyl schopen provádět apoptózu (*Nečas a spol. – 2000*).

b) Intravenózní aplikace genů pro HLA 57 (**transplantační antigen** cizí osoby = nehostitelského typu): Po jeho translaci v nádorových buňkách vzniká **transplantační imunitní reakce** proti buňkám, které inkorporovaly tento gen. O systému HLA se v publikaci *Obecná biologie pro lékařské fakulty* zmiňuje také Nečas a spol. (2000).

c) Přenos genů, které produkují **jiný specifický antigen** (ne transplantační antigen): Ten stimuluje zdravé lymfocyty k tomu, aby produkovaly „tumor necrotic factor“ (= TNF). Je to **jiná než protitransplantační imunitní reakce** pacienta proti nádoru – podobná autoimunitě. (V tomto případě je možno přenos genů do nádorových buněk pacienta provést ve tkáňové kultuře a těmito buňkami lze pak pacienta imunizovat.)

4.3.2.4. Nebezpečné komplikace genové terapie

Toto nebezpečí se týká jak genové terapie delecí, tak genové terapie rakoviny. Lze je rozdělit následovně:

1) **Nebezpečí vzniku infekčních nemocí z vektorového viru** je eliminováno tím, že chromozom tohoto vektoru nemá geny pro tvorbu nových kapsidových a infekčních proteinů. Je zde kontrast mezi tím, že transplantovaný gen musí mít promotor, ale virus jako vektor nesmí mít gen pro infekční protein (*Červinka – 1993*).

2) **Nebezpečí rekombinace virových vektorů** je pravděpodobně pouze teoretickou otázkou. Toto nebezpečí pravděpodobně **není větší než po různých normálních virových infekcích**. V učebnicích nejsou popsány žádné praktické zkušenosti (jako aféry, způsobené vznikem takovýchto komplikací). Tyto možnosti mohou být rozděleny na:

a) Vzájemnou rekombinaci vektorových virů **jednoho typu s jiným typem**. Přichází v úvahu po opakované genové terapii za použití různých vektorových virů. Je zde důležitá otázka, zda může následovat nějaké zvýšení inzerční nebo transpoziciční mutageneze.

b) Rekombinace neinfekčního **vektorového viru s nějakými infekčními nevektorovými retroviry** by mohlo způsobovat nebezpečí vzniku nových druhů virů.

c) Rekombinace vektorového viru s **protoonkogeny**: Transpozicí protoonkogenů hostitele pod vládu virového promotoru by mohly vznikat onkogeny. To by se mohlo týkat i vlády promotoru vektorového viru nad protoonkogenem hostitele. Tomuto nebezpečí zabráňuje použití virových vektorů, zbavených jejich vlastních promotorů. Transplantovaný gen pak pracuje pouze tehdy, když je vložen pod vládu nějakého promotoru hostitele. Transpozice hostitelského protoonkogenu pod patologickou vládu nesprávného hostitelského promotoru není pravděpodobně z kvantitativního hlediska nebezpečná (*Červinka – 1993*).

3) **Nebezpečí inzerční mutageneze** se týká především vypínání (inaktivace) různých důležitých genů hostitele vlivem inzercí a transpozic vektorů. V případě teoretických úvah o (zakázané) léčbě oocyty nebo blastocysty by mohly u vzniklého dítěte (kromě terapeutického výsledku) být tímto způsobem vyvolány nové genetické

defekty. Při větším předávkování vektorů může embryo zahynout, protože je tvořeno velkým procentem potomků buněk, předávkovaných transplantedými geny (Červinka – 1993).

Ale při genové terapii delecí na somatické úrovni předávkování genových transplantátů (s takovými vektory) zaviní pouze smrt geneticky nejvíce modifikovaných buněk nebo ztrátu všech transplantedých buněk. Ale transplantace geneticky modifikovaných buněk může být opakována.

4) **Znovu objevení se léčené nemoci v další generaci:** To se týká nejen genové terapie na somatické úrovni, ale především terapie např. zygoty. Díky náhodnosti tohoto procesu jsou transplantedé geny vloženy téměř vždy pouze do chromozomálních míst, které **nejsou identické s nemocným genem**.

Tudíž nemocný genový lokus není léčen. **Transplantedý gen** je v nové pozici “patologicky” **nadbytečný** a je z hlediska sousedních genů nesprávný. Proto může být eliminován “reparační” excizí při mitotickém procesu. Nové gamety mohou tak díky ztrátě transplantedého genu dát vznik potomkům s původním onemocněním. Z toho vyplývá, že **genová terapie zárodečných buněk nemá žádnou výhodu**. U potomků by musela být opakována. Proto je lepší genová terapie na úrovni somatických buněk (= u dětí a dospělých).

4.3.2.5. Genová terapie a etické problémy

Genová terapie vajíček nebo zygot je považována za nebezpečnou a nesmí být u člověka používána. Pohlavní rozmnožování takovýchto transgenních lidí by bylo spojeno s problémy crossing overu a ztrátou nově zavedených genů.

Navíc, každý nový experimentální projekt genové terapie člověka musí být podroben diskusi při ratifikační proceduře a je nutno požádat o jeho povolení (**certifikát organizace "Recombination DNA Advisory Committee"**), aby se zabránilo poškození zdraví pacienta (Červinka – 1993).

V případě genové terapie dětí a dospělých bylo dosaženo některých cenných úspěchů. Jsou používány takové metody, že nevzniká žádné známé nebezpečí.

4.3.2.6. Vektory pro přenos genů do bakterií

Vektorem (= **přenašečem**) – je míněna struktura, do které je umístěn transplantovaný gen, aby mohl být převeden do hostitelské buňky. Plazmidy a viry jsou vektory, které mají DNA, kdežto micela je „non-DNA vektor“.

Jak transplantovaný gen tak DNA vektor (v těchto odstavcích plazmid) jsou používány ve formě dvojvlákna DNA. Gen pro transplantaci je izolován od okolních sekvencí DNA pomocí **restrikční endonukleázy**. Zcela stejný typ štěpícího enzymu je použit pro příčné rozštěpení DNA cirkulárního plazmidu (linearizace).

Je použit takový typ restrikční endonukleázy, který štěpí dvouvlákno DNA takovým způsobem, že linie štěpení vede nejprve kolmo skrz jedno vlákno, pak mezi oběma vlákny a pak kolmo skrz druhé vlákno. Na konci je z tohoto důvodu jedno vlákno např. o 4 nukleotidy delší než druhé. Takovéto konce mohou díky komplementaritě bází navzájem renaturovat (reasociovat) a tím slepit zpět (příčně) rozštěpená dvojvlákna DNA. Pomocí těchto „lepivých“ (= židličkovitých = **adhezních**) **konců** lze také připojit DNA transplantovaného genu k DNA vektoru. V tom případě se používá termín hybridizace (ne reasociace), neboť je vytvořen biologický kříženec (hybrid).

Tyto uměle změněné **plazmidy** mohou být inkorporovány do bakteriálních buněk pomocí velké **změny osmotického tlaku** (na rozdíl od fyziologického přenosu plazmidů mezi dvěma buňkami při sexuálních procesech).

Často je jako vektor používán místo plazmidu také **fág Lambda** (*Červinka – 1993*), protože plazmid je schopen přenášet pouze malé sekvence – v porovnání s velkou kapacitou tohoto fága. Může být inkorporován do bakterií infekčními mechanismy. Umělými vektory jsou **kosmidy**. Jsou připraveny kombinací plazmidu a viru. Jsou schopny přenášet větší sekvence než fág.

4.3.2.7. Transplantace genů do eukaryotických buněk

Na rozdíl od bakteriálního genového inženýrství – geny, transplantované do eukaryontů musí být inkorporovány do chromozomů hostitelské buňky, aby nebyly ztraceny během mitózy. Navíc, **prokaryotické vektory neumožňují správnou expresi genů v eukaryotických buňkách.**

1) **Živé vektory** mají nejlepší expresi inkorporovaných genů v porovnání s ostatními možnostmi přenosu DNA do eukaryontů. Jsou používány **retroviry**, ale ty mají nevýhodné „vedlejší účinky“ – z nichž uvádíme ty, které komplikují genovou terapii člověka:

- a) infekce jiných buněk, pokud je vektorový virus podán např. nitrožilně,
- b) nebezpečí reprodukčního namnožení transplantovaného vektorového viru s infekcí do jiných buněk a orgánů i po transplantaci geneticky modifikovaných buněk z buněčných kultur do živočicha,
- c) spontánní transpozice transplantovaného genu.

Retroviry jsou velmi často pro genovou terapii nemocí, léčených na somatické úrovni. Výhodné je, že tento vektor je inkorporován do predeterminovaných známých sekvencí hostitelských chromozomů.

2) **Neživé vektory** mohou být reprezentovány **fosfolipidovými mikrosférami (= micelami)**, které obsahují transplantovanou DNA. Tyto váčky mohou fúzovat s buňkami a tak jim předat geny, které mají být transplantovány. Před fúzí rostlinných buněk s fosfolipidovými mikrosférami musí být enzymaticky **odstraněna buněčná stěna**, neboť pouze **“protoplasty”** vzniklé tímto způsobem mohou fúzovat s makrosférami (*Červinka – 1993*).

3) Práce **bez vektorů** jsou prováděny především pomocí **mikroinjekcí**. Je to pomalá metoda, která umožňuje „ošetřit“ pouze malý počet buněk. Tato metoda je nejčastěji používána při transplantaci genů **do vajíčka** (*Červinka – 1993*).

Možností, jak transplantovat také geny bez jakéhokoliv vektoru a dokonce bez mikroinjekce je **transfekce**: Eukaryotické buňky mohou volnou DNA pro transplantaci fagocytovat. Ta je pak **inkorporována do chromozomů**. Ve tkáňových kulturách dochází k lepšímu efektu, když je přenášena DNA ovlivněna calcium fosfátem

(mikroprecipitace). Jinou možností je zvýšení fagocytózy elektrickým polem nebo hypotonizací.

Micely jako vektory nebo transdukce (v případě eukaryontů = transgenóze) bez použití vektoru jsou efektivní pouze u malého procenta buněk.

Tento oddíl teoretické části vychází z pracovní verze skript MUDr. Hochmanna odeslaných k recenzi.

5. Výsledky hledání – především v zahraniční časopisové literatuře

5.1. Spory o klinickém významu vyšetřování progesteronových receptorů

5.1.1. Názory, že vyšetření PR je zbytečné

Někteří autoři uvádí např., že, ačkoli pacientky ER+/PR- měly možná nižší odpověď na hormonální manipulaci než pacientky ER+/PR+, hormonální terapie je doporučována u obou skupin. Na základě této informace lze uvažovat, že výsledek vyšetření PR není používán k rozhodnutí o terapii. Tito autoři tedy nepodávají stoprocentní argument k zavrnutí vyšetření PR a z tohoto údaje vyplývá, že výsledek by mohl být alespoň z části využit k předvídání účinku hormonální terapie.

Tito autoři – Olivotto a spol. (2004) však nazvali svůj článek: „Time to stop progesterone receptor testing“ (Čas k tomu, aby bylo zastaveno vyšetřování progesteronových receptorů).

Navíc také analyzují důsledky nízkých hodnot (tentokrát) ER – z pohledu otázky, jaký smysl má vyšetření PR, když vyšetření ER různými metodami dává různý výsledek. Toto dilema řeší posuzováním klinického přínosu – tedy jiným způsobem než z jejich pohledu zbytečným vyšetřením PR. Ve shodě s jinými autory je jejich údaj, že jiný důsledek IHC (imunohistochemického) vyšetření receptorového stavu je u pacientek se „slabě pozitivními“ výsledky ER za použití kvantitativních metod. Kvantitativními metodami autoři mají na mysli vyšetření suspenze z nádorů biochemickými metodami – na rozdíl od imunohistochemických výsledků (IHC) – spíše jen kvalitativních nebo „semikvantitativních“ (kvantifikovatelných spíše jen odhadem).

Uvádějí například toto: Část těchto pacientek (slabě nebo sporně pozitivních při použití kvantitativních metod) může být považována za spolehlivě pozitivní na IHC

a může jim být poskytnuta adjuvantní hormonální léčba. Čistý přínos takové terapie je pravděpodobně malý a může se blížit výsledkům, které byly pozorovány u podskupin se „slabým ER“, v porovnání s podskupinami s „ER pozitivními“, z údajů o skupině pacientek z klinické studie časných karcinomů prsu. Pravděpodobně je tím míněno časně stádium (staging). Při posuzování potenciálního přínosu z hlediska obrany proti nežádoucím účinkům (léčby) by podle nich bylo rozumné zvolit nízký práh k přerušení hormonální léčby u pacientek se slabě ER+ nádory, u nichž měla tato léčba značné toxické účinky (*Olivotto I.A. a spol. – 2004*). Z tohoto způsobu uvažování je nutno chápat také jejich pohled na problematiku PR.

Olivotto a spol. (2005) se ve své práci zamýšlí nad názory mnoha jiných odborníků. Např. Fuqua a spol. popsali množství zajímavých předběžných dat týkajících se významu vyšetřování progesteronových receptorů (PR) u pacientek s nádorem prsu pozitivním na estrogenové receptory (ER) určenými pomocí biochemických metod. Smyslem studie Olivotto a spol. (2005) bylo poukázat na chybění dodatečného významu testování PR u pacientek s ER negativním onemocněním kvantifikovaným pomocí imunohistochemie (IHC).

Uvedli dále též argumenty, které důležitost vyšetření PR nepodporovaly: Ačkoli staré zprávy ukazují, že ER-/PR+ onemocnění tvořilo 3 % až 5 % nádorů prsu, jejich studie se 192 ER negativními pacientkami objevila, že méně než 1 % (ze 192) byly PR pozitivní případy, což naznačuje, že v době IHC testování hormonálního receptoru, vyšetřování PR přináší do této podskupiny pacientek malou informaci (zřejmě jde o finanční limitaci – neboť nepředpokládáme, že by autory osud 1 % pacientek nezajímal).

Dále autoři zkoumali práci kde podobně Bardou a spol. (2003) upozorňovali, že stav PR přináší omezenou prognostickou informaci u pacientek s neléčenou rakovinou prsu. V jejich studii nebyly – jak časový interval bezchorobového přežití, tak celkové přežití významně odlišné u neléčených pacientek s ER+/PR+ nádory ve srovnání s pacientkami s ER+/PR- nádory.

Otázka, zda stav PR by mohl ovlivnit výběr adjuvantně podávaného hormonu, je však zajímavá z hlediska různých druhů léčby. Bardou a spol. (2003) zjistili, že u pacientek léčených endokrinními terapiemi, ER+/PR+ nádory byly spojeny s lepší prognózou ve srovnání s ER+/PR- nádory. Jestliže je však posuzován význam vyšetření

PR u ER+ nádorů, lze upozornit, že pacientky s ER pozitivními nádory, měly o 30 % až 40 % snížené relativní riziko úmrtnosti s endokrinní terapií, i když byly PR negativní. (Nelze to porovnat s následujícím grafem, neboť v něm neléčené pacientky nejsou.)

To chápeme tak, že pro rozhodnutí, zda endokrinní terapii použít, nebo naopak nepoužít, není nutno znát výsledek vyšetření PR a stačí znát výsledek ER – což je totéž, co uvádí Olivotto a spol. (2005) na začátku této kapitoly. Respektive – lze dále přesně Olivotta a spol. (2005) citovat: Všechny ER pozitivní pacientky by tedy mohly být brány v úvahu pro adjuvantní endokrinní terapii. Kromě toho meziskupinová studie adjuvantně podávaného exemestanu ukázala, že přínos výměny léčby na exemestanovou po dvou až třech letech léčby tamoxifenem byl stejný pro pacientky s PR pozitivními nebo PR negativními nádory.

Olivotto a spol. (2005) souhlasí s vyjádřením v práci Fuqua a spol., že role vyšetřování PR pro individualizaci výběru endokrinní terapie vyžaduje testování v budoucích klinických zkouškách. Role PR k určení, které pacientky by mohly dostávat endokrinní léčbu samotnou nebo kombinovanou chemoendokrinní léčbu je třeba také v budoucnu prostudovat. Nicméně vyslovili se takto: Zatímco vyšetřování PR může být zajímavou a plodnou oblastí klinického výzkumu, v současné době neexistují dostatečné údaje pro jeho užití ke změně výběru léků pro ženy s ER pozitivní rakovinou prsu. Praktikujeme medicínu založenou na důkazech a v současnosti výsledky PR nemění naše klinické rozhodování. Běžné vyšetřování PR pomocí IHC v současné době není nutné, pokud nejde o souvislost klinických zkoušek zkoumajících jeho užitek (tedy o výzkum) (*Olivotto a spol. – 2005*).

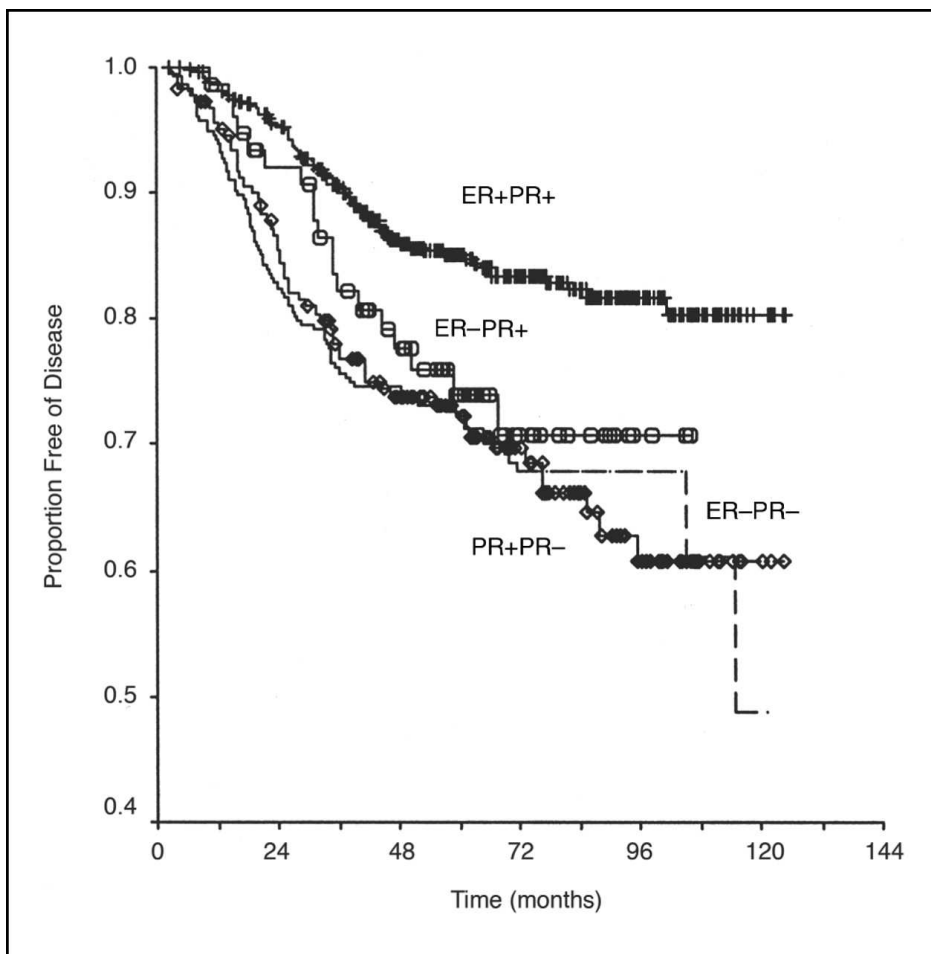
5.1.2. Názory, že vyšetření PR je výhodné až nezbytné

5.1.2.1. Přímá kritika názorů Olivotta a spol.

U pacientek s metastázami autoři Colomer a spol. (2005) provedli analýzu přínosu získaného z adjuvantní léčby pomocí tamoxifenu v sériích jejich pacientek podle podskupin hormonálního receptoru.

Ve srovnání s ER-/PR- podskupinou je zajímavé, že ER-/PR+ podskupina pacientek měla, přinejmenším během prvních roků léčby, prospěch z tamoxifenu. Počet pacientek s tříletým intervalem bez projevu nemoci byl u pacientek ER+/PR+ 90 %, ER-/PR+ 82 %, ER+/PR- 77 % a ER-/PR- 76 %. Analogické bezchorobové přežití po šesti letech bez vzniku metastáz bylo u pacientek ER+/PR+ 85 % , ER-/PR+ 74 % , ER+/PR- 72 % a ER-/PR- 72 %.

Autoři uzavírají, že se zdá být nevhodné zastavit vyšetřování progesteronových receptorů, protože testování PR pomáhá v identifikaci nezanedbatelné podskupiny pacientek s rakovinou prsu, která bude mít s největší pravděpodobností přínos z adjuvantní hormonální léčby. Zda by vyšetřování PR mohlo být rezervováno pro ER(-) - nádory nebo by mohlo být prováděno ve všech případech, může být zajímavou otázkou pro další výzkumy (Colomer a spol. – 2005). Níže je uveden jejich graf – ve kterém je u křivek hodnota PR vždy na druhém místě – a tak místo omylem napsaného PR+/PR- má být ER+/PR-.



Další autoři prozkoumali několik zdrojů a kritizují názor autorů Olivotta a spol. (2004): „nádory prsu, které jsou ER negativní jsou tak často PR negativní, že vyšetřování PR není děle užitečné v klinickém rozhodování“. Rovněž kritizují jejich další názor: „Historicky, základním důvodem pro provádění vyšetřování PR bylo identifikování ER negativních pacientek, které mohou reagovat na hormonální léčbu.

Tyto výpovědi, dle názoru autorů, představují nepochopení příčin měření PR(-). PR nejsou měřeny jen pro rozlišení ER negativních nádorů, a přestože ER-/PR+ pacientky představují pouze 3 % až 5 % pacientek, je to stále důležitá skupina k identifikaci.

Navíc uvádějí, že PR jsou primárně měřeny spíše proto, aby se rozlišili dvě podskupiny ER pozitivních nádorů s podskupinou ER+PR-, u níž je mnohem méně pravděpodobné, že nádory budou reagovat na hormonální léčbu, zejména tamoxifenovou, než nádory ER+/PR+ (Fuqua a spol. – 2005). To znamená ve výše uvedeném Colomerově grafu rozdíl mezi nejvyšší a téměř nejnižší křivkou – s tím, že místo PR+/PR- tam má být ER+/PR- (jak jsme již výše uvedli).

Olivotto a spol. (2004) také tvrdí, že vyšetřování PR kromě toho neovlivňuje rozhodování o léčbě ER pozitivních pacientek - tedy rozhodování, založené na výsledcích klinické studie u časného karcinomu prsu. Dvě nedávné studie zpochybňují toto tvrzení. Za prvé – když bylo prováděno přesné měření, PR stav byl označen jako nezávislý prediktivní faktor pro přínos z adjuvantní endokrinní léčby tamoxifenem. V této studii přibližně 30 % pacientek bylo biochemicky ER+/PR- a nedokonale odpovědělo na tamoxifen. Toto není podle autorů bezvýznamné procento pacientek v souvislosti s náklady. Ačkoli molekulární mechanismy u pacientek s rezistentním fenotypem ER+/PR- musí být ještě vysvětleny, byla navrhována úvaha, že nízké PR by mohlo odrážet zvýšenou signalizaci růstového faktoru a zvýšenou nádorovou agresivitu, což je hypotéza, která může být snadno otestována (Fuqua a spol. – 2005).

Druhým argumentem z práce Fuqua a spol. (2005), který zpochybňuje tvrzení Olivotta a spol. (2004), jsou nedávné provokativní výsledky ze studie s Arimidexem nebo samotným tamoxifenem nebo v kombinované studii (ATAC) ukazující pouze mírnou přednost anastrozolu ve srovnání s tamoxifenem ve skupině ER+/PR+, zatímco u podskupiny ER+/PR- měl značnou užitečnost anastrozol. Ačkoli tato studie je

nepochybně předběžná a čeká ji schvalování, zahrnovala stovky pacientek a podporuje data z práce Bardou a spol. (2003).

Na závěr, z pohledu nedávných klinických zkoušek dokazujících významné výhody pro sekvenci tamoxifenu následované inhibítorem aromatázy, zvláštní možností je, že PR stav by mohl být využit k výběru počáteční léčby. ER a PR pozitivní nádory by mohly být nejlépe léčeny tamoxifenem a následně inhibítorem aromatázy, zatímco ER+/PR- nádory by mohly přijmout počáteční léčbu s inhibítorem aromatázy, vzhledem k jejich relativní rezistenci k tamoxifenu. Tyto hypotézy by měly být testovány nepřetržitými klinickými výzkumy (*Fuqua a spol. – 2005*).

K problematice slabé positivity PR Fuqua a spol. (2005) ještě uvádějí, že žádné velké retrospektivní studie nepotvrdily klinický význam stanovení PR pomocí imunohistochemie (IHC). Důležitá studie definovala dolní limit positivity ER v nádorech prsu jako 1 % až 10 % slabě pozitivních buněk (založeno na univariální „cut point“ analýze všech možných hladin IHC a nevytvoření metastáz do konce sledovacího období několika let po operaci u pacientek dostávajících adjuvantní tamoxifenovou léčbu). Tato studie rozhodujícím způsobem demonstrovala, že kalibrace receptorové positivity byla optimální (což je nutné čas od času opakovaně provádět ke zlepšeným výsledkům léčby).

Na základě těchto dat je proto neoprávněné „používat pro rozhodování nízký práh k přerušení hormonální léčby u pacientek se slabou ER pozitivitou nádorů...“ jak předkládají Olivotto a spol. (2004). Dosud není takový standard pro určení PR IHC stavu a bohužel na klinické scéně bývají využity odlišné metodologie a nestejná rozhraní pro určení positivity a negativity. Když určujeme PR stav pomocí IHC, a použijeme jej při rozhodování, je oprávněná obezřetnější cesta (*Fuqua a spol. – 2005*).

Na závěr, je také potřeba brát v úvahu současnou pilotní studii zkoumající roli dvou různých isoform PR jako prediktivních biomarkerů. Pacientky s vysokou pozitivitou nádorů na PR a vysokou expresí isoformy PR-A byly podstatně náchylnější k tomu, aby znovu onemocněly po tamoxifenové terapii. Tato data podporují další práce, které poukazovaly, že PR-A bohaté nádory mají zvýšenou agresivitu a že abnormální přebytek PR-A se nachází ve zdravých prsech žen s mutacemi BRCA1/2.

Citovaní autoři uvádějí: Když jsme začali individualizovat léčebná rozhodnutí na podkladě klasifikace na podtřídy nádoru prsu podle jejich mnoha klinických

a molekulárních entit, nemůžeme přehlédnout význam některých měření ani u malých populací pacientek. Je neoprávněné vzdát se nyní PR při klinickém rozhodování, zvláště ve světle nedávných vzrušujících studií, vyvolávajících nový zájem a pochopení jeho klinické prospěšnosti (*Fuqua a spol. – 2005*).

5.1.2.2. Komplexnější úvahy

V jedné studii, kterou popisují další autoři, pacientky zemřely nejčastěji za 30 měsíců po prvním opětovném výskytu metastázy. Na základě analýzy o více proměnných byly určeny čtyři faktory, které nejvíce předpovídaly přežití po prvním opětovném výskytu: délka intervalu bez pozorovatelných metastáz, místo vzniku metastázy, stav progesteronových receptorů (PR) a cévní zásobení (*Takeuchi H. a spol. – 2005*).

Práce Dowsetta a spol. (2006) podává přesvědčující důkaz důležitosti stavu PR z hlediska ovlivnění klinického výsledku pacientek s počátečním stádiem rakoviny prsu, které absolvovaly hormonální léčbu. Autoři také předpokládali, že by větší přínos anastrozolu než léčba tamoxifenem u nádorů s ER(+)/PR(-) mohl, alespoň z části, být objasněn pomocí větší exprese receptorů růstového faktoru typu 1 v této skupině.

Ponzzone a spol. (2006) přezkoumali jejich skupinu 972 pacientek s rakovinou prsu, které podstoupily následující adjuvantní hormonální léčbu: tamoxifen (n=725), tamoxifen s analogy releasing hormonu pro luteinizační hormon (n=127) a inhibitory aromatázy (n=120). Zjistili, že nádory ER+/PR- proti nádorům ER+/PR+ byly charakterizovány větším rozměrem (průměr ≥ 2 cm: 57,1 % versus 42,6 %), postižením lymfatických uzlin (≥ 1 pozitivní lymfatická uzlina: 51,8 % versus 45,0 %), větším stupně nádoru (stupně 2-3: 88,2 % versus 79,0 %; P = 0,008), vyšší expresi Ki-67 (≥ 20 %: 42,9 % versus 28,7 %) a nižší expresi ER (průměrné procento zbarvených buněk: 54,9 % versus 70,3 %; P = 0,000). Nádory ER+/PR- měly také větší sklon nadměrně exprimovat HER-2 než nádory ER+/PR+ (2-3+: 36,5 % versus 17,9 %; průměrné procento zbarvených buněk: 21,5 % v 9,2 %).

Univarietní rozbor přežití, nedostatku exprese PR a nadměrné expresi HER-2, jakož i stavu uzlin, průměru nádoru a histologického stupně nádoru ukázaly statisticky

významný vztah s kratším „bezmetastázovým“ přežitím (DFS). Jejich studie potvrzuje, že nedostatek exprese PR u ER+ rakoviny prsu je spojen s agresivními znaky nádoru a s nadměrnou expresí HER-2. Nicméně, v jejich skupinách pacientek dostávajících 5 let tamoxifen jako převažující adjuvantní léčbu, pouze stav PR (a ne stav HER-2) byl nezávislou indicií rizika opětovného výskytu metastáz. Předpovědní hodnota exprese PR v celých skupinách byla silnější a nezávislá na expresi HER-2 (*Ponzzone R. a spol. – 2006*).

5.1.2.3. České práce o využití poměru ER/PR

Jak již bylo výše uvedeno, někteří autoři zastávají ale názor, že z kvalitativního poměru ER:PR (např. ER+/PR+, v kontrastu s ER+/PR-) lze určovat prognózu pacientek, což je důležité pro výběr některých léčebných postupů. Na základě údajů jiných autorů lze např. odvodit, že i v rámci ER+/PR+ skupiny může kvantitativní poměr cytosolových koncentrací estrogenových receptorů ku progesteronovým receptorům (ER/PR) pomoci při diagnóze nadměrné tvorby estrogenů, nebo naopak snížené funkce ER nebo příliš malé exprese genu pro PR (*Hochmann – 2007*).

Strnad a kol. (1998) se zabýval významem hormonálních receptorů u benigních nemocí prsu. Ve své práci doslova uvedl: Koncentrace hormonálních receptorů ve tkáni prsu korelovala s proliferační aktivitou nezhoubné léze. Prevalence ER nebo trend ER k prevalenci nad PR je závažným markerem hrozící kancerogeneze. Na základě prevalence hormonálních receptorů je možno zvolit vhodnou hormonální léčbu k potlačení proliferačního potenciálu prsní léze. Vysoký obsah ER v benigních formacích prsu je možno považovat za projev zvýšené senzitivity této cílové tkáně vůči cirkulujícím estrogenům (Strnad a kol.-1998) (*Marešková – 2006*).

5.1.2.4. Příbuzná problematika karcinomů dělohy

Důležitost vyšetřování PR zaznamenala ve své bakalařské práci i Marešková – ovšem pro karcinomy dělohy.

Hodnota vyšetření ER a PR v predikci senzitivity nádoru endometria na progestinovou terapii je klinicky zajímavá. Při identifikaci odpovídajících responderek (= těch, které reagovaly na progestinovou terapii) progestinové terapie se pozitivní výsledky PR jeví tak, že dávají preciznější informaci než pozitivní ER. Použití kombinace stanovení ER a PR jako prognostického indikátoru nebo předpovědního faktoru citlivosti na progestinovou terapii nezvyšuje statisticky významně informace, které byly získány vyšetřením PR samotného. Z tohoto důvodu, ať byly použity ligandové biochemické vazebné techniky nebo imunohistochemické, stanovení PR se zdá být doporučitelné pro klinické cíle (Kauppila – 1993) (*Marešková - 2006*).

5.2. Genová terapie

Podle některých autorů lze genovou terapii pokročilé rakoviny prsu rozdělit do čtyř skupin: (1) suprese onkogenů nebo přenos tumor-supresorových genů; (2) posílení imunologické odpovědi; (3) přenos sebevražedných genů; (4) ochrana kostní dřeně pomocí genů rezistentních proti lékům (cytostatikům) (*Takahashi a spol. – 2006*).

Podle jiných autorů lze přístupy genové terapie rakoviny rozdělit do šesti obecných kategorií:

- (1) mutační kompenzace
- (2) molekulární chemoterapie
- (3) proapoptotická genová terapie
- (4) antiangiogenní genová terapie
- (5) genetická imunopotenciacce
- (6) genetická modulace rezistence/senzitivity.

Tato problematika je již natolik rozvinutá, že pro zjištění bezpečnosti, toxicity a účinnosti byly započaty klinické pokusy na nádoru prsu u pacientek. Slibné výsledky ukázala kombinovaná forma léčby s genovou terapií a chemoterapií nebo ozařováním. Očekává se, že tím, jak jsou identifikovány nové terapeutické cíle a přístupy, a když jsou realizovány pokroky v typu vektoru, bude genová terapie hrát stále důležitější roli v klinické léčbě rakoviny prsu (*Stoff-Khalili a spol. -2006*).

Dalším slibným terapeutickým postupem při léčbě rakoviny prsu je také viroterapie. Ve viroterapii je usmrcení nádorových buněk založeno na onkolýze – usmrcení buněk indukované virovou replikací – nikoliv např. toxicitou vloženého (např. sebevražedného genu. Tuto terapii rozvíjí ve své práci Stoff-Khalili a spol. (2005).

Jelikož např. vlivem molekulární chemoterapie může docházet k apoptóze, dochází při výše uvedených způsobech třídění k tomu, že jedna metodika by mohla být zařazena do dvou nebo více podskupin. Proto jsme se pokusili třídit metody spíše podle genu, který byl do buněk přenesen, než podle výsledku. V dalším vývoji našeho třídění by bylo možno rozdělit existující kapitoly na podkapitoly podle komplexity. Např. v rámci proapoptotické skupiny by bylo možno rozdělit tuto kapitolu na podkapitolu o vlivu samotného genu a podkapitolu o kombinaci léčby tímto genem např. s cytostatiky. Proto již alespoň řadíme metody uvnitř těchto podkapitol od jednoduchých ke

kombinovaným (když např. jsou v kapitole jenom dva abstrakty, tak je nemá smysl dělit na podkapitoly).

5.2.1. Mutační kompenzace diferenciačních genů

Vzhledem k tomu, že např. náhrada mutovaného genu pro p53 může usnadnit vstup buněk do apoptózy (čímž takováto mutační kompenzace může být zařazena zároveň do „proapoptotické léčby“), domníváme se, že podkapitola „Mutační kompenzace“ v užším slova smyslu by měla být chápána především jako – umožnění diferenciace. To by mělo nádorové buňky vést k odklonu od proliferace. Proto na prvním místě upozorňujeme též na odkaz Mareškové (2008) na vložení genu pro PR. Netýká se sice prsu, ale dělohy, ale uvádíme zde tento údaj, neboť byl před 2 lety vyhledán naší diplomantkou a inspiroval nás v této práci.

5.2.1.1. Přenos genu pro PR do karcinomu dělohy

Potlačující regulace PR nebo odchylka exprese izoformy A nebo B progesteronového receptoru byly sdruženy s vývojem špatně diferencované (= nebezpečnější) rakoviny endometria, která nebyla růstově inhibována (normálním) progestinem. Ve špatně diferencovaných buňkách rakoviny endometria, které jsou rezistentní na progestinovou terapii, byla adenovirem indukována exprese PRA a B a tím obnovena progestinová kontrola proliferujících buněk rakoviny endometria (Dai a spol. - 2001) (Marešková – 2008).

5.2.1.2. Vnesení genu pro estrogenový receptor (ER) do nádorových buněk

Mnohé nádory prsu nejsou citlivé nebo se v nich nakonec rozvíjí rezistence k endokrinní terapii. Jednou ze současných cest vývoje efektivního léčebného způsobu de novo rezistentních nádorů prsu je podle citovaných autorů znovu zřízení hormonální vnímavosti. Znovuzřízení ztracené syntézy a funkce ER navíc vytvoří primární léčebný cíl pro nádory s takto zpětně získanou rezistencí.

V poslední době citovaní autoři vytvořili transregulační proteiny, které byly specificky zaměřeny a silně regulovaly geny citlivé k estrogenu nezávisle na ligandu, na ER-podtypu a na buněčné souvislosti. Cílená regulace sítí genu citlivého na estrogen těmito transregulátory by mohla poskytnout základ pro vývoj nových cest pro experimentální biologii a medicínu (*Huang a spol. – 2005*).

5.2.1.3. Inhibice mitogenních signálů vložením diferenciačních genů pro specifickou inhibiční RNA

Aby bylo dosaženo maximální účinnosti, terapie nádoru musí být zaměřena jak proti klidovým kmenovým buňkám, tak proti proliferujícím nádorovým buňkám. Populace jak normálních buněk, tak buněk nádorové tkáně se skládají jednak z klidových kmenových buněk, proliferujících průběžně se amplifikujících buněk a jednak terminálně diferencovaných buněk a umírajících (apoptotických) buněk. Rozdíl mezi obnovením normální tkáně a růstem nádorů je ten, že některé z průběžně se množících buněk v nádorové populaci nedozrávají do terminálně diferencovaných buněk, ale místo toho pokračují proliferací a nezahynou (maturační blokáda). Vzhledem k tomu, počet nádorových buněk vzrůstá, kdežto buněčná populace normálních tkání zůstává relativně konstantní.

Tradiční léčba ozařováním a chemoterapie zabíjí aktivně proliferující průběžně se množící buňky nádoru. Avšak i když jsou proliferující nádorové buňky kompletně inhibovány nebo eliminovány, kmenové nádorové buňky mohou obnovit průběžně se množící populaci, takže klinický ústup choroby (remise) je obvykle dočasný.

Diferenciační terapie používá specifické cílené inhibitory aktivace (různé v různých nádorech prsu) a efektivně indukuje diferenciaci proliferujících (- průběžně se množících) nádorových buněk.

Hypotéza uvedená v této publikaci je ta, že úspěšná nádorová terapie musí být zaměřena jak proti klidovým kmenovým buňkám, tak proti proliferujícím nádorovým buňkám. Toto by bylo možné, jestliže by byly specifické signály kmenových buněk inhibovány použitím genové terapie, zatímco ve stejném čase by byly atakovány proliferující buňky běžnou léčbou ozařováním nebo chemoterapií. Za pomoci pokroků v přístupech, které užívají specifickou inhibiční RNA, takováto kombinovaná terapie by nyní byla možná. Ale musí být ještě vyřešeny zásadní problémy v dodávání inhibičního účinku konkrétně do kmenových buněk nádoru (*Sell – 2006*).

5.2.1.4. Apoptóza a inhibice růstu vlivem melanomového genu pro diferenciaci

Adenovirem zprostředkovaný přenos melanomového genu-7 (MDA-7) spojeného s diferenciací vyvolá inhibici růstu a apoptózu různých typů nádoru. Zde autoři vyhodnotili účinky Ad-MDA-7 samotného a v kombinaci s jinými terapiemi proti skupině devíti linií buněk nádoru prsu a jejich normálním protějškům. Zjistili selektivní Ad-MDA-7 genem zprostředkovanou a na p53-nezávislou inhibici růstu, blokádu G2/M fáze buněčného cyklu a apoptózu. Také in vivo Ad-MDA-7 indukoval p53-nezávislou inhibici růstu nádoru v četných modelech xenoimplantátů.

Poté vyhodnotili kombinaci Ad-MDA-7 s léčebnými prostředky, používanými při rakovině prsu: ozařování (XRT), tamoxifen, taxotere, adriamycin a herceptin. Tyto léčebné prostředky vykazovaly různé způsoby účinku, které zahrnují tvorbu adduktů, inhibici replikace DNA (adriamycin, XRT), poškození mikrotubulů (taxotere), nesteroidní antagonisty estrogenu (tamoxifen) nebo blokádu Her2/neu receptoru (herceptin). Když byly MDA-7 exprimující buňky ovlivněny tradičními protinádorovými léčivy nebo ozařováním, vykazovaly additivní nebo synergickou cytotoxicitu a apoptózu, která korelovala se sníženou expresí BCL-2 a regulací směrem vzhůru u genu BAX. In vivo, u zvířat, která přijmala Ad-MDA-7 a XRT, došlo k statisticky signifikantní redukci růstu nádoru (*Chada a spol. – 2006*).

5.2.2. Vložení genu regulujícího apoptózu

Při zařazování metod do „proapoptotické“ skupiny je nutno správně posoudit, zda byl do genomu nádorových buněk vnesen gen, který je fyziologickým induktorem či členem apoptotické kaskády, nebo naopak, zda jde pouze o toxický gen. Je nutno mít na paměti, že vlivem jakékoliv toxicity buňka může nejen podlehnout nekróze, ale také nastoupit cestu apoptózy (pokud ji stihne provést, když nekrotické pochody nejsou tak prudké). Z těchto důvodů je tedy nutno řadit toxické geny do jiné kapitoly a nikoliv k „proapoptotické“ terapii, přestože apoptóza byla v takovém případě prokázána.

5.2.2.1. Léčba pacientek přenosem zdravého genu p53

Intratumorální podání nereplikujícího se adenovirového vektoru (Ad5), který obsahuje lidský divoký typ p53, AdCMV-p53, v kombinaci s chemoterapií, by mohlo zvýšit účinnost primární systémové terapie, což by mohlo být sledováno pomocí patologické kompletní odpovědi. V prospektivní otevřené studii II. fáze zkoušení (léků) bylo 13 pacientek s LABC (lokální rozvinutá rakovina prsu) léčeno šesti tří týdenními cykly primární systémové terapie, která se skládala z intratumorálních injekcí Ad5CMV-p53 podávaných dva po sobě následující dny, a z docetaxelové a doxorubicinové léčby následované chirurgickým zákrokem (*Cristofanilli a spol. – 2006*).

Doxorubicin patří mezi antracyklinová antibiotika. Má schopnost interkalace, tj. schopnost vmezeřovat se mezi páry bází DNA a blokovat funkci zejména topoizomerázy II. Důsledkem je inhibice replikace a transkripce DNA a RNA (*Martínková a spol. – 2007*).

Docetaxel je jedno z nejsilnějších cytostatik. Byl izolován z určitého druhu tisů (*Martínková a spol. – 2007*). Zabraňuje destrukci mikrotubulů, jeho působením vznikají atypické mikrotubuly a inhibuje tak opětovné využití tubulinů. Inhibuje mitózu inhibicí rozpadu dělicího vřeténka (*Lüllmann a spol. – 2007*).

Za základ pro dávkování jmenovaného geneticky modifikovaného adenoviru byl zvolen stav p53 a byl stanoven hned po první injekci (nejvýše po 48 hodinách). Klinická odpověď byla posuzována pomocí klinických a radiologických metod.

Pokus byl brzy ukončen (rozuměno – další pacientky nebyly takto předoperačně geneticky modifikovány), protože žádná pacientka nedosáhla patologické kompletní odpovědi (rozuměno – při vyšetření chirurgicky odebraných nádorů). Průměrný věk byl 56 let (v rozmezí 39-71 let) a střední velikost nádoru byla 8 cm (v rozmezí 5-11 cm). Chirurgické vzorky odhalily v histologickém obrazu rozptýlené, roztroušené nádorové buňky s extenzivním nádorovým infiltrátem leukocytů (převážně T-lymfocytů).

Sériové biopsie ukázaly zvýšení p53 mediátorové RNA (mRNA) a p21 (WAF1/Cip1) mRNA. Osm pacientek (73 %) mělo mutaci p53. Přesto nejenom 8, ale všech 12 hodnocených pacientek dosáhlo objektivní klinické odpovědi (rozuměno – nikoliv okamžité – histologicky prokazatelné v chirurgických excizích – ale dlouhodobé odpovědi). V následujícím pozorování, které průměrně trvalo 37 měsíců (v rozmezí 30-41 měsíců), u 4 pacientek (30 %) se vyvinul opětovný systémový návrat rakoviny a 2 pacientky zemřely. Odhad nádorově specifického přežití po třech letech byl 84 %. Nedošlo ke zvýšení systémové toxicity (tedy ke vzniku vedlejších účinků).

Autoři vyslovili následující závěr: Ad5CMV-p53 kombinovaný s primární systémovou terapií je bezpečný aktivní a propojený s lokálními imunomodulačními účinky (*Cristofanilli a spol. – 2006*).

Tento způsob genové terapie by mohl být řazen k apoptózu regulující mutačně kompenzační terapii, neboť p53 je strážce buněčného genomu, který zastavuje množení buněk do doby, než se zreparují mutace DNA. Při extrémní mutagenezi může stimulovat apoptózu (Nečas a spol. - 2000), ale to by zřejmě mohlo být dosaženo v příštích pokusech. V tomto bodě byl pokus na pacientkách úspěšný – ale ne ve všech ohledech, neboť nápadně častější apoptóza v této práci nebyla popsána a autoři popsali jako výsledný efekt imunomodulační účinky.

5.2.2.2. Proapoptický vliv genu BCL-2 antisense a jeho spojení s cytostatickou terapií

Basma a spol. (2005) charakterizovali účinky kombinované terapie genem BCL-2 antisense a cisplatinou na dvou lidských isogenních buněčných kulturách p53(+)MCF-7 a p53(-)MCF-7/E6 rakoviny prsu. Transferinem usnadněná lipofekční strategie, kterou autoři vyvinuli, přinášela stejnou účinnost transfekce v obou druzích buněk.

BCL-2 antisense gen dodaný touto strategií významně indukoval buněčnou smrt, apoptózu a uvolnění cytochromu C v MCF-7/E6 (tedy p53(-)) buňkách více než u MCF-7 (tedy p53(+)) buněk, ale neovlivnil hladinu Fas v obou druzích buněk a aktivoval rovněž kaspázu-8. (Z časových důvodů se nám nepodařilo zrevidovat, zda tento gen BCL-2 antisense je skutečně členem či patofyziologickým induktorem apoptotické kaskády nebo zda jde jen o „toxický“ gen. Autoři ho však popisují jako apoptotický.)

Fas je receptorem pro FasL (ligand) a je jedním ze členů rodiny receptorů pro TNF. Jeho funkcí je přenášet signál pro apoptózu. Vztah mezi FasL a Fas je tedy podobný jako vztah mezi TNF (tumor necrosis factor) a receptorem pro TNF (*Matsuno a spol. – 2001*).

Nekróza je překotná smrt buňky a jsou při ní poškozovány i buňky sousední. Apoptóza je programovaná buněčná smrt realizovaná proteolytickou kaskádou. Buňky procházející apoptózou hynou uspořádaně bez poškození svých sousedů. Buňka se zmenšuje a kondenzuje. Cytoskelet je odbouráván, jaderný obal se rozkládá a jaderná DNA je fragmentována na malé úseky (uvolnění cytochromu z mitochondrií je jednou z prvních známek apoptózy) (*Alberts a spol. – 1998*).

Cisplatinou měla stejné účinky na buněčnou viabilitu (životaschopnost) a apoptózu u obou typů buněk, ale uvolnila menší množství cytochromu C, zatímco více aktivovala kaspázu-8 v MCF-7/E6 tedy p53(-) buňkách. Kombinovaná léčba (tedy genem BCL-2 antisense a cisplatinou) přinesla větší účinky na buněčnou viabilitu, apoptózu, uvolnění cytochromu C a na aktivaci kaspázy-8 než ovlivňování pomocí nekombinovaného přístupu (jen transfekcí nebo jen cisplatinou) u obou buněčných druhů, avšak buňky p53(-) byly citlivější.

Zesílená aktivace kaspázy-8 v kombinované léčbě naznačovala, že kaspázou-8 zprostředkovaná (avšak na cytochromu C nezávislá) apoptotická cesta je hlavním činitelem, který přispívá k častější buněčné smrti. Tedy gen BCL-2 antisense dodaný pomocí transferinem facilitované lipofekce může dosáhnout efektivitu pro zabíjení buněk nádoru prsu a pro zvýšení jejich citlivosti k chemoterapii. Kombinovaná terapie BCL-2 antisense genem a cisplatinou je potenciálně prospěšnou léčebnou strategií pro rakovinu prsu bez ohledu na stav p53 (*Basma a spol. - 2005*).

V některých pracích přenesený gen pouze zvyšuje toxicitu např. cytostatika nebo dokonce způsobí, že netoxická látka je pro nádorové buňky toxická. V této práci je toxický jak samotný gen, tak podaná látka.

5.2.2.3. Usmrcování nádorových buněk vlivem siRNA, která potlačuje expresi survivinu – inhibitoru apoptózy

Zvýšená rezistence vůči apoptóze je známkou mnoha nádorových buněk. Survivin, člen IAP rodiny proteinů, je exprimován v mnoha lidských nádorech a hraje důležitou roli v chránění buněk před apoptózou.

Zde autoři poukazují na to, že na vektoru “založené“ malé interferující RNA (siRNA) trvale eliminují expresi survivinu v několika liniích nádorových buněk, což vede ke zvýšení míry apoptózy jako reakce na různé proapoptotické podněty, jako jsou doxorubicin a TNF-alfa .

Apoptotická citlivost byla závislá na různých stupních exprese survivinu. Stabilní přenašeče („vektory“ pro siRNA) vykazaly účinek, charakterizovaný abnormální morfologií, potlačeným růstem buňky, zvýšenou spontánní apoptózou a přerušením buněčného cyklu. Kromě toho buňky exprimující siRNA cílenou na survivin vykazovaly sníženou tvorbu nádorů a sníženou angiogenezi. Toto bylo zjištěno v xenoimplantátech survivin pozitivních nádorů – implantovaných do „bezsrstých“ myši (= myši, u nichž je genetický defekt ve tvorbě chlupů, ale hlavně se u nich nevyvíjí brzlík a tím protitransplantátová imunita – což je výhodné pro transplantování nádorů).

Výsledky těchto studií jsou následující: (1) poskytují přímý důkaz toho, že intracelulární utlumení survivinu pomocí siRNA zvyšuje citlivost lidských nádorových

buněk k apoptóze; (2) definují survivin jako slibný molekulární cíl pro terapii nádoru a (3) naznačují potenciální použitelnost na survivin cílené siRNA pro léčení lidských nádorů pravděpodobně v kombinaci s chemoterapií (*Li, Zhao a spol. – 2006*).

Tato práce je z části mimo hranice „klasického pojetí“ genové terapie, neboť pravděpodobně nešlo o vložení genu, ale o dodání RNA do buněk. Ale jako důsledek tohoto zásahu tito autoři popisují trvalou genetickou změnu. Navíc, s genovou terapií souvisí i použité vektory.

Vysvětlení, co to je siRNA, souvisí s fenoménem RNA interference, původně popsáným u rostlin, mušky *Drosophila* a červíka *Caenorhabditis elegans*. Jde o posttranskripční útlum exprese genu jestliže se v buňce objeví dvouvláknová RNA homologní s daným genem. Mechanismus RNA interference je následující:

Nejprve je dvouvláknová RNA štěpena RNázou nazvanou Dicer na krátké štěpy dvouvláknové RNA 21-23 bp, s 2-3 bázemi přečnávajícími na 3' koncích. Tyto štěpy, nazvané small interfering RNA (siRNA), následně interagují s velkým (cca 500 kDa) multiproteinovým komplexem zvaným RNA-inducing silencing complex (RISC). Helikázová aktivita RISC komplexu rozplete dvoušroubovici siRNA a jen jedno z vláken zůstane asociováno s komplexem. Toto vlákno siRNA pak navede celý komplex na mRNA vůči kterému je komplementární, nukleázová aktivita RISC komplexu tuto mRNA rozštěpí a tak zahájí její degradaci buněčnými RNázami. Výsledkem je degradace určité specifické mRNA (*Pláteník – 2002*).

5.2.2.4. „Mylně proapoptická“ skupina – apoptóza vlivem jiných než apoptotických genů

Expresi genů apoptotických kaskád může být vyvolána i jinak než vnesením apoptotických genů. Jde např. o diferenciační gen a jiné. Průkaz apoptotického procesu např. imunochemickou detekcí kaspáz tedy ovšem neznámá, že vnesený gen byl apoptotický. Proto následující krátké zmínky hovoří o pracích (pouze některé příklady), které jsou zařazeny a detailněji popsány v jiných podkapitolách.

Např. Chada a spol. (2006) uvádí, že adenovirem zprostředkovaný přenos melanového genu-7 (MDA-7) spojeného s diferenciací vyvolá inhibici růstu a apoptózu

různých typů nádoru. Expresi apoptotických proteinů detekovali nejen po samotném vnesení uvedeného diferenciačního (nikoliv apoptotického) genu, ale i po následném ovlivňování různými protinádorovými léky.

Autoři Shibata a spol. (2007) zaměřují výzkum na terapii pomocí endostatínu (pEndo) a sebevražedného genu (pHSVtk = gen pro tymidin-kinázu virus herpes simplex). Tento gen (ačkoliv není apoptotický, ale nekrotický – resp. toxický) způsobuje buněčnou apoptózu, proto je potřeba citovat tuto studii i v této podkapitole.

5.2.3. Vložení genu způsobujícího nekrózu nebo inhibici růstu buňky v netoxických podmínkách

5.2.3.1. Vložení genu, který spotřebovává methionin a blokuje růst na methioninu závislých nádorů

Citovaní autoři již dříve informovali, že vytvořili nový fúzní protein složený z fragmentu z aminokyselinového konce urokinázy (který se váže na urokinázový receptor) a z L-methioninázy, která spotřebovává methionin a blokuje růst na methioninu závislých nádorů. Tento protein inhiboval MCF-7 buňky nádoru prsu in vitro. Pomocí rekombinantních metod autoři vyprodukovali gen pro tento fúzní (= vytvořený spojením dvou genů) protein a navíc v nové studii použili gen pro L-methioninázu samotnou a gen pro mutovaný fúzní protein bez aktivity L-methioninázy.

Po jejich přenosu do buněk tMCF-7 byly in vitro v kulturu „zraňujícím“ testu (v testu na poškození tkáňové kultury) měřeny růst a pohyb buněk. Fúzní protein byl významně účinnější než L-methionináza jak v in vitro, tak v in vivo testech. Vazebné vyšetření prokázalo, že nezmutovaný a zmutovaný fúzní protein se vázal na buňky, ale L-methionináza nikoliv (domníváme se, že je tím míněna vazba především na buňky, které ho vytvořily a že tato vazba je způsobena receptorovou částí tohoto proteinu, neboť receptory mají afinitu k membráně). Výsledky, které autoři předložili naznačují,

že tento syntetický fúzní protein má potenciál terapeutického agens při léčbě nádorů (*Zang a spol. – 2006*).

5.2.3.2. Vnesení bakteriofágového genu pro lýzu buněk indukovanou tetracyklinem

Pokud funkce genu je dodanou chemickou sloučeninou jenom aktivována, - a není to tak, že by se tato chemická sloučenina strukturálně změnila na buněčný jed, zařadili jsme tyto metody do skupiny s toxickým genem samotným. Je známo, že protein bakteriofága Lambda ((lambda)-holin protein) vytváří poškození v cytoplazmatické membráně *E.coli*, čímž spouští lýzu bakteriální buňky. Byly vytvořeny stabilně transfekované linie lidských buněk mající tetracyklinem (Tet) indukovatelný systém pro kontrolovanou expresi lambda-holin genu.

V této práci byl gen kódující lambda holin protein inducibilně exprimován v eukaryotických buňkách *in vitro*. Exprese vedla ke značné redukci buněčné životaschopnosti o více než 98 %. Na myších modelech vykazovaly xenoimplantáty lambda-holin exprimujících nádorových buněk karcinomu prsu zpomalení růstu značného stupně ve srovnání s xenoimplantáty neexprimujících gen lambda-holin.

Lambda-holin protein je cytotoxický pro eukaryotické buňky *in vitro* a způsobuje inhibici růstu nádoru *in vivo*, což naznačuje eventuální terapeutické využití pro genovou terapii rakoviny (*Agu a spol. – 2006*).

5.2.4. Vložení genu zvyšujícího citlivost na podané chemikálie

5.2.4.1. Biochemická aktivace antivirotik - thymidinkinázové principy

Thymidinkináza – v pojetí genové terapie je enzym kódovaný virem, který způsobuje lýzu hostitelské buňky. V této problematice je nutno rozlišovat mezi thymidinkinázou virovou a hostitelskou. Eukaryotická thymidinkináza (TK) katalyzuje fosforylaci thymidinu za přítomnosti adenosintrifosfátu na thymidinmonofosfát, který je transformován na trifosfát a inkorporován do DNA. Je označován za enzym “záchranné cesty“ syntézy DNA. Sérové hodnoty TK jsou považovány za parametr buněčné proliferace. U pacientů s ne Hodgkinskými lymfomy (NHL) patří k markerům sledovaným vzhledem k relapsu choroby i posouzení efektu terapie (Nekulová – 2004).

Avšak jinou thymidinkinázu popisuje Vonka (2004). Jde o virovou fosfokinázu, která je schopna fosforylovat některé (uměle dodané) analogy nukleosidů a tím zabíjet hostitelskou buňku.

HSVtk je gen pro thymidinkinázu z virus herpes simplex. Jeho produkt se liší od buněčných kináz svou schopností fosforylovat některé analogy nukleosidů, včetně těch, které jsou běžně používány k léčbě nemocí vyvolaných herpetickými viry – cytomegaloviry (CMV). Jako příklady mohou sloužit acyklovir (ACV), ganciklovir (GCV). Dostanou-li se takové substance do buňky, která tvoří HSVtk, jsou fosforylovány na příslušný monofosfát, který je dále dotvořen buněčnými kinázami v trifosfát. Ten je pro buňku vysoce toxický, protože blokuje syntézu DNA (Vonka – 2004).

5.2.4.1.1. Vnesení genu HSVtk (rAAV-2/HSVtk/Tet-On systém) transformujícího toxický ganciklovir za indukce doxycyklinem

Kromě doxycyklinu (širokospektrého tetracyklinového antibiotika) se při ní využívá ganciklovir, což je sloučenina inhibující replikaci virů – tedy účinkující uvnitř eukaryotických buněk. Ganciklovir samotný působí proti zkoumaným nádorovým buňkám a doxycyklinem je tento účinek potencován. Genová terapie pomocí HSTVtk/gancikloviru (GCV) je založena především na expresi genu HSVtk. Na podkladě tohoto genu byl zkonstruován rekombinantní adenovirus-2(rAAV), který má vztah ke žlázám a byl transdukován do linie MCF-7 buněk.

Ovlivnění těchto (rAAV infikovaných) buněk MCF-7 pomocí gancikloviru (GCV) bylo provedeno v MTT testu za indukce doxycyklinem (Dox) nebo bez indukce doxycyklinem.

Tak lze ve tkáňové kultuře provést vložení genu pomocí virového vektoru a v tomtéž prostředí pak sledovat i vliv podaných látek. Avšak autoři šli dále a sledované nádorové buňky implantovali do holých myší (zvláštní rasa „bezsrstých“ myší, charakterizovaná tím, že nemají brzlík, a proto se u nich nevyvine protitransplantátová imunita). Pak (když se vytvořily nádory) teprve provedli vložení genů do těchto buněk – injekcí vektorových virů do těchto nádorů – mezi buňky.

Začátek chemoterapie byl shodný se začátkem vložení genu do buněk: Virus byl tedy podán intratumorálně „holým“ myším, které také dostaly intraperitoneálně GCV.

GCV léčba infikovaných MCF-7 buněk za indukce doxycyklinem měla větší inhibiční efekt než léčba bez indukce doxycyklinem. V nádorech byly (kromě běžných nádorových buněk) také sledovány infiltrující (= metastázující) buňky za indukce doxycyklinem následované GCV léčbou a došlo k výraznému poškození těchto buněk.

Exprese genu HSVtk v MCF-7 buňkách a v BALB/C nádorech bezsrstých myší byla vlivem Tet-On systému indukovaného doxycyklinem regulována směrem vzhůru, což bylo dokumentováno analýzou pomocí reverzní transkripce-PCR (RT-PCR) (*Li, Zeng a spol. – 2006*).

Tet-on systém je genový systém v „transplantované“ DNA, který obsahuje specifické mutace, které vedou ke zvýšení senzitivity k doxycyklinu za nepřítomnosti

indukce a eliminují jeho rtTA (reverzní transaktivátor) na TRE (Tet response element – jako „elementy“ bývají označovány úseky DNA). Navíc je Tet-On systém optimalizován pro lidské kodóny, čímž v kombinaci s využitím 3 minimálních VP16 transkripčních aktivačních domén umožňuje zvýšenou expresi rtTA transaktivátoru (*Urlinger – 2000*).

MTT test je kolorimetrická, neradioaktivní metoda k průkazu viability buněk a cytotoxicity testovaných látek. Princip je založen na štěpení tetrazoliové soli MTT a na vytvoření ve vodě nerozpustného produktu formazánu (*Ehrmann – 2001*).

5.2.4.1.2. Modifikace protiproudové nepřekládané oblasti pro tkáňovou specifitu ganciklovirové terapie

Ve vývoji efektivních genových terapií rakoviny jsou dvě technické překážky - přenos genu a cílová specifika. Aby se obešel problém s nádorovou specifikou, sebevražedný gen HSV-1, thymidinkináza (HSV-Tk) byl modifikován na komplexní 5' protiproudové nepřekládané oblasti (5'-UTR), která omezuje účinnou translaci v buňkách, které exprimují vysoké hladiny translačního iniciačního faktoru, eIF4E. (Rozuměno – touto modifikací toto omezení přestane existovat – avšak tuto informaci bude nutno zrevidovat, až bude na školicím pracovišti k dispozici plné znění této práce – nejen Souhrn.)

Protože většina nádorových buněk exprimuje zvýšenou hladinu eIF4E, nádorově specifické dodání genu bylo optimalizováno pomocí inkorporace právě tohoto 5'-UTR modifikovaného sebevražedného genu (HSV-UTk) do adenovirového vektoru (Ad-CMV-UTk). (Rozuměno – aby právě nádorové buňky, jejichž proliferační podstata jim umožňuje tlumit expresi tohoto sebevražedného genu ji nemohly tlumit).

Účinnost tohoto nového přístupu exprese cíleného sebevražedného genu a limitující cytotoxicity pomocí (výše popsané) translační restriktce byla testována in vitro s použitím linií lidských nádorových buněk (MCF-7, MDA-MB435 a ZR-75-1). Např. MCF-7 buňky jsou citovány jinými autory (výše) jako buňky nádoru prsu. Jako kontroly byly použity normální buněčné linie MCF10A, HMEC a HMSC, které exprimují relativně malou hladinu eIF4E.

Tato data ukazují zvýšenou expresi specifického genu nádorovými buňkami a sníženou expresi genu normální tkáně pro Ad-HSV-UTk ve srovnání s Ad-CMV-Tk, což vede ke zvýšené nádorové buněčně zesílené cytotoxicitě GCV (gancikloviru). Tyto výsledky ukazují, že translační nasměrování exprese sebevražedného genu v nádorových buňkách in vitro a in vivo je účinné a může poskytnout základ pro zvýšenou specifitu nádorové genové terapie (*Mathis a spol. – 2006*).

5.2.4.1.3. Terapie suicidním genem – vzájemné porovnání thymidinkinázy dvou virů a čtyř antivirotik

Jedna z nejčastěji studovaných léčebných strategií v oblasti genové terapie sebevražedným genem je založena na expresi genu thymidinkinázy viru Herpes simplex (HSVtk) v nádorových buňkách následované léčbou ganciklovirem (GCV).

Aby autoři prozkoumali potenciál jiných enzym/profarmakových strategií, sledovali in vitro a in vivo schopnost genu thymidinkinázy z viru Varicella zoster (VZVtk) účinkovat jako sebevražedný gen a zabíjet netransdukované okolní buňky. Tento vliv jejich systému na okolní buňky zde zdůrazňujeme, neboť ostatní námi citované podobné práce o antiviroticích tento vliv neuvádějí (na rozdíl od další kapitoly o cytostaticích, kde poškození okolních buněk lze „logičtěji“ předpokládat).

Jako „profarmaka“ byly testovány čtyři různé antivirové sloučeniny. Srovnávací studie ukazuje nadřazenost systému HSVtk/GCV ve skupině různých testovaných kombinací a zdůrazňuje důležitost jak typů nádorových buněk tak „profarmaka“ v úspěchu „profarmakově“/sebevražedné genové strategie (*Grignet-Debrus a spol. – 2005*).

5.2.4.1.4. Zvýšení cytotoxicity RIP-TK/GCV (ganciklovirové) terapie vložím genu pro transkripční faktor (PDX-1)

Transkripční faktor PDX-1 je exprimován v lidském nádoru pankreatu a prsu. Ačkoli cytotoxicita PDX-1 řízené RIP-TK/GCV (ganciklovirové) genové terapie buněk nádoru pankreatu byla již prokázána, účinnost této léčby na buňky nádoru prsu je

neznámá. Cílem této studie bylo vymezit expresi PDX-1 a její účinek na aktivaci RIP ve dvou liniích lidských buněk nádoru prsu, AU565 a T47D. Kromě těchto analytických cílů byla zkoumána také účinnost RIP-TK/GCV genové terapie a testováno, zda by exogenní PDX-1 mohl zvýšit její cytotoxický efekt. (RIP-TK/GCV = rat insulin promoter directed thymidine kinase/ganciclovir therapy).

K určení exprese PDX-1 byla použita RT-PCR. Pro přechodnou transfekci a expresi LacZ byly použity uměle zkonstruované genové výrobky RSVLacZ a RIPLacZ. T47D buňky byly transfekovány pomocí RIP-TK a pro každou buněčnou linii byla stanovena suboptimální úroveň GCV. Po ovlivnění pomocí GCV byla měřena cytotoxicita pomocí MTS testu. Byl zjištěn účinek exogenního PDX-1 na expresi LacZ a cytotoxicitu RIP-TK.

Autoři došli k závěru, že RIP-TK/GCV terapie je toxická k buňkám lidského nádoru prsu a exogenní PDX-1 zvyšuje cytotoxicitu (*Levy a spol. – 2006*).

5.2.4.1.5. Ganciklovir aktivující genová terapie v kombinaci s antiangienním endostatinem

Shibata a spol. (2007) aplikovali do metastazujících nádorů prsu injekci plazmidového vektoru obsahující endostatin v kombinaci se sebevražedným genem (HSVtk)/ganciklovirem (GCV).

Po 8 týdenní terapii došlo k významnému zmenšení objemu nádoru. Dále bylo také dosaženo snížení četnosti plicních metastáz a došlo k redukci počtu dilatovaných lymfatických cév (*Shibata a spol. – 2007*).

5.2.4.2. Biochemická aktivace cytostatik

5.2.4.2.1. Přenos genu pro oxidační aktivaci cytostatik v kombinaci s replikativním šířením viru

Genová terapie využívající „profarmakum“ aktivující enzym P450 2B6 se jevila slibná v preklinických a počátečních klinických studiích s „profarmaky“ cyklofosfamidem a ifosfamidem, které souvisí s aktivací vlivem P450 (P450 – je jaterní mikrosomální oxido-redukční enzym, který aktivuje z 80-90 % cyklofosfamid na alkylovací metabolit 4-hydroxycyklofosfamid (*Wsól a spol. - 2005*)).

Byla snaha optimalizovat tuto terapii pomocí psího P450 enzymu 2B11, který aktivuje cyklofosfamid a ifosfamid při K_m 80 až 160 mikromolů na litr, asi 10 až 20 násobně nižší než K_m P450 2B6 (K_m je Michaelisova konstanta, která udává koncentraci substrátu, při níž enzymová reakce probíhá rychlostí poloviční než je V_{max} (maximální rychlost) (*Murray a spol. – 2002*)).

Retrovirus kódující expresní kazetu vnitřní ribozomové reduktázy (vstupního signálu), založené na (psím) genu P450 2B11 indukoval markantní cytotoxicitu cyklofosfamidu a ifosfamidu vůči buňkám 9L gliosarkomu a vykazoval velmi značný usmrcující účinek na buňky v sousedství té, která je transfekovaná a tedy schopná aktivovat profarmakum v mikromolárních koncentracích „profarmaka“, u nichž P450 2B6 vykazoval nízkou aktivitu.

Adeno-2B11 (což je adenovirus defektní v replikaci, který má delecí v oblasti E1/E3), modifikovaný tak, aby způsoboval koexpresi P450 2B11 (psího) a P450 reduktázy, dramaticky zvýšil nádorovými buňkami katalyzovanou hydroxylaci cyklofosfamidu v poloze 4 a dramaticky zvýšil také cytotoxicitu ve srovnání s Adeno-2B6 a způsobil silné lokální usmrcení okolních buněk při nízkých koncentracích cyklofosfamidu (20 mikromolů na litr).

Další pokroky v cyklofosfamidové cytotoxicitě byly získány v případě několika lidských nádorových buněčných linií, včetně 4-hydroperoxy-cyklofosfamid rezistentní buněčné linie z nádoru prsu MCF-7, kdy Adeno-2B11 byl zkombinován s Onyx-017, což je adenovirus s delecí genu E1b-55-kDa, který se replikuje v nádorových buňkách

a který pomáhá rozmnožovat a usnadňuje šíření adenoviru Adeno-2B11 v nádorových buňkách.

Ke zhodnocení terapeutického účinku exprese (psího) P450 2B11 in vivo byly použity gliosarkomové buňky 9L (gliosarkomové – nikoliv prsní) transdukované pomocí P450-exprimujícího retroviru, které rostly jako solidní podkožní nádory v imunodeficientních myších. Léčba cyklofosfamidem, která se opakovala 6 dní, vedla k úplné regresi 9L/2B11 nádorů, ale ne k regresi P450-deficitních kontrolních nádorů a beznádorová perioda přetrvávala asi 100 dní. U nádorů 9L/2B6 (gliosarkom s vložením původního P450) docházelo k regresi pomalu a beznádorové období trvalo pouze 21 až 39 dní.

Je tedy možno říci, že genově řízená (pomocí genu P450) léčba „profarmakem“, může být značně zdokonalena užitím enzymu 2B11 s nízkým Km P450, který katalyzuje intratumorální aktivaci cyklofosfamidu a ifosfamidu ve farmakologicky významných koncentracích léčiva (*Jounaidi a spol. – 2006*).

5.2.4.2.2. Cytosindeaminázová tvorba 5-fluoruracilu v kombinaci s ozářením

Léčebný potenciál cytosin deaminázové (CD) genové terapie v kombinaci s ozařovací léčbou byl v práci Goblirsch a spol. (2006) hodnocen in vitro a in vivo za použití 4T1 myšího modelu karcinomu prsu. 4T1 karcinomové buňky byly transdukovány za použití fúzního (spojeného) genu, kódujícího extracelulární a transmembránové domény lidského receptoru nervového růstového faktoru a cytoplasmatické části CD genu kvasinek (NGFR-CD(y)).

Cytosin deamináza je přítomná v některých houbách a bakteriích, kde přeměňuje cytosin na uracil. Organismy, které obsahují cytosindeaminázu, jsou extrémně efektivní v přeměně 5-fluorocytosinu na toxický 5-fluorouracil, který je běžně užíván v chemoterapii. Takto je gen cytosindeaminázy z *E. coli* používán jako suicidiální gen, který geneticky modifikuje buňky k přeměně 5-fluorocytosinu na 5-fluorouracil (*Havlík a spol.*).

5-fluorouracil, který je analogem thyminu, inhibicí thymidyláthyntetasy blokuje metylaci deoxyuridilové kyseliny na kyselinu thymidylovou. Brzdí tedy syntézu DNA. Dále je inkorporován do příslušných nukleotidů RNA, brání vestavění uracilu, a tím je také inhibitorem biosyntézy RNA (*Hartl a spol. – 2006*).

Takto transdukováné – tedy CD exprimující nádorové buňky (4TCD(y)) byly vysoce citlivé k léčbě 5-fluorocytozinovým „profarmakem“. Proto 5-fluorocytozinové ovlivnění buněk 4TCD(y), ale ne 4T1, zvýšilo efekt ozáření in vitro. Ovlivnění 5-fluorocytozinovým „profarmakem“ také zvýšilo léčebný potenciál ozáření in vivo. Myši s 4TCD(y) intrafemorálními nádory vykazovaly zvýšenou účinnost záření založenou na zlepšené redukci velikosti nádoru, redukci karcinogenní osteolýzy a snížení kosterních zlomenin (*Goblirsch a spol. – 2006*).

5.2.5. Antiangiogenní genová terapie

5.2.5.1. Antiangiogenní endostatinová genová terapie v kombinaci s ganciklovirem

Geneticky shodné metastazující nádory prsu vnesené do pokusného zvířete dostaly přímou intratumorální injekci plazmidového vektoru, který obsahoval buď protein (nutno chápat jako gen pro protein) inhibující angiogenezi – endostatin (pEndo) se sebevražedným genem (pHSVtk), nebo bez něho, nebo dostaly jen sebevražedný gen pHSVtk nebo kontrolní vektor jedenkrát za týden po osm týdnů. Autoři použili elektrogenní přenos do nádoru po každé injekci a podali ganciklovir (GCV) do pHSVtk transfekovaných myší za použití osmotické minipumpy.

Protinádorová účinnost byla monitorována za použití různých parametrů, jmenovitě objem nádoru, intratumorální mikrocévní hustota a syntéza DNA, počet myší s metastázemi a počet metastáz na myš.

Objem nádoru byl podstatně nižší u všech terapeutických skupin s nejúčinnějším potlačením růstu u skupiny pEndo+pHSVtk/GCV. Metastázy do lymfatických uzlin byly významně méně časté u všech léčebných skupin, zatímco četnost metastáz plicních

byla nižší pouze u skupin pEndo a pEndo+pHSVtk/GCV. Všechny terapeutické skupiny vykazovaly podstatně nižší intratumorální kapilární hustotu a syntézu DNA. Skupiny pEndo a pEndo+pHSTVtk/GCV vykazovaly také redukci v počtu dilatovaných lymfatických cév obsahujících intraluminální nádorové buňky.

Autoři uvádějí, že jejich endostatinová elektrogenní terapie samotná nebo v kombinaci s pHSTVtk/GCV terapií sebevražděným genem je prospěšnější než samostatná terapie sebevražděným genem. Pozorovaná antimetastatická aktivita endostatinu může mít vysoký klinický význam při léčbě metastazující rakoviny prsu (*Shibata a spol. – 2007*).

Vzhledem k vložení sebevražděného genu jsou tito autoři citováni zároveň i v podkapitole o aktivaci gancikloviru.

5.2.5.2. Kombinace integrinové siRNA a ozařování při antiangiogenní léčbě rakoviny prsu

O regulačním zvýšení tvorby integrinu alfa(v)beta(3) bylo prokázáno, že hraje klíčovou roli v nádorové angiogenezi a metastázování.

Pro určení léčebných účinků integrinové siRNA, ozařování nebo kombinace obou Cao a spol. (2006) provedli na MDA-MB-435 buňkách (integrin alfa(v)beta(3)-pozitivních) následující vyšetření a testy: test na schopnost přežívání založený na tvorbě kolonií, buněčná proliferace, apoptóza a analýza buněčného cyklu.

MCF-7 buňky negativní na integrin alfa(v)beta(3) projevují více radiosenzitivity než MDA-MB-435 buňky. Ozařování reguluje směrem vzhůru expresi integrinu alfa(v)beta(3) v buňkách MDA-MB-435 a integrin alfa(v) siRNA může efektivně redukovat jak expresi integrinu alfa(v) tak i alfa(v)beta(3), což vede ke zvýšení radiosenzitivity. Integrin alfa(v) siRNA také podporuje ozařováním indukovanou apoptózu a zvyšuje ozařováním indukovanou blokádu postupu G2/M fáze buněčného cyklu (*Cao a spol. -2006*).

V posuzovaném souhrnu není uvedeno, zda a jak často by mělo být opakováno podávání siRNA v genové terapii. Ale pokud by bylo smyslem ovlivnění genů zlepšit

pouze účinek současného ozáření, bylo by dostačující, kdyby bylo podání siRNA jednorázové.

5.2.6. Genetická imunopotencionace

Práce s vložením genu pro imunopotenciaci jsme v případě karcinomu prsu zatím nenašli. Alespoň z hlediska důsledku lze do genetické modulace rezistence zahrnout také studii Cristofanilliho a spol. (2006), kde se zaměřili na léčbu složenou z intratumorálních injekcí Ad5CMV-p53 podávaných dva po sobě následující dny, a z docetaxelové a doxorubicinové léčby následované chirurgickým zákrokem. Je rozvedena v podkapitole o regulaci apoptózy, ale autoři nakonec u ní popsali jako výsledný efekt imunomodulační účinky.

5.2.7. Ochrana kostní dřeně transplantací geneticky modifikovaných buněk

5.2.7.1. Vnesení genů mnohalékové rezistence

V práci Takahashi a spol. (2006) začali klinickou studii genové terapie mnohalékové rezistence (MDR1). Pacientky s pokročilou rakovinou prsu byly vystaveny vysokým dávkám chemoterapie a prošly transplantací svých vlastních hematopoetických buněk kostní dřeně (PBSCT) transdukovaných pomocí MDR1 a poté jim byl podán docetaxel.

Dvě pacientky byly léčeny až do nynějška a in vivo bylo pozorováno obohacení MDR1-transdukovaných buněk doxetaxelovou léčbou. Obě pacientky jsou v úplné remisi a neměly žádné zjevné nepříznivé účinky způsobené přenosem MDR1 genu (*Takahashi a spol. – 2006*).

5.2.8. Zabezpečování tkáňové specifičnosti s nedořešením terapeutického mechanismu nebo s použitím pro viroterapii

5.2.8.1. Vylepšování obalu virových vektorů transmembránovými zakotvovacími strukturami

Aby Makela a spol. (2006) dosáhli nádorově specifického genového přenosu, tropismus baculoviru byl upraven pomocí modifikace virového obalu, která využívá baculovirové „displayové“ technologie. V případě viru vezikulární stomatitidy in vivo byly screeningem fágových displayových knihoven identifikovány kontaktní peptidy LyP-1, F3 a CGKRRK, které byly zaměřeny na transmembránové zakotvovací struktury G proteinu. Tyto fúzovací proteiny byly úspěšně vpraveny do tvořících se virionů, což vykazuje dvou až pětinasobné zlepšení vazby k buňkám lidského nádoru prsu (MDA-MB-435) a k buňkám hepatokarcinomu (HepG2) (*Makela a spol. – 2006*).

5.2.8.2. Tumor-specifická exprese pomocí promotoru heparinázy

Strategie k omezení transgenní exprese zprostředkované adenovirem jsou důležité pro to, aby bylo možno se vyhnout genovému přenosu do normálních buněk. Heparináza (HPR) je nadměrně exprimována v nádoru prsu, ale regulována směrem dolů v diferenciované normální tkáni. Exprese HPR genu byla posuzována na buňkách nádoru prsu. Biodistribuce a vztah k játrům byly hodnoceny na myších.

HPR promotor si udržel svou přesnost v adenovirovém kontextu a byl aktivován v buňkách nádoru prsu, ale vykazoval nízkou aktivitu v normálních buňkách prsu a v játrech myší. Usuzuje se, že HPR cesta je slibným cílem pro vývoj strategií genové terapie zaměřené na rakovinu prsu (*Breidenbach a spol. – 2006*).

5.2.8.3. Tkáňově specifické promotory pro glykoprotein, cyklooxygenázu a pro receptor chemokinů využité k zabezpečení tkáňové specifity přenosu genů nebo viroterapie

Adenovirovým vektorem zprostředkované strategie v genové terapii a viroterapii rakoviny prsu jsou podle Stoff-Khalili (2005) slibné nové terapeutické programy pro léčbu rakoviny prsu. Avšak hlavním problémem je promiskuitní tropismus adenovirů (infekčnost pro různé orgány). Ve viroterapii je usmrcení nádorových buněk založeno na onkolýze – usmrcení buněk indukované virovou replikací.

Využití tkáňově specifických promotorů (TSPs), které jsou potřebné k omezení transgenní exprese nebo virové replikace (v necílových buňkách), je efektivní cesta ke zvýšení specifity k tkáni nádorů a k redukci nepříznivých účinků v necílové tkáni jako jsou játra. V tomto ohledu kandidáti tkáňově specifických promotorů rakoviny prsu obsahují promotory genů pro epiteliální glykoprotein 2 (EGP-2), cyklooxygenázu-2 (Cox-2), pro receptor alfa-chemokinů SDF-1 (faktor odvozený od stromálních buněk, CXCR4), pro inhibitor sekreční leukoproteázy a také pro survivin.

Autoři použili adenovirus s delecí v E1, který exprimuje reportérový gen luciferázu za kontroly sledovanými promotory. Tato data napovídají, že promotor CXCR4 má ideální profil s účinkem na rakovinu prsu (a bez vlivu na játra) a mohl by být proto mocným nástrojem v genové terapii založené na Ad vektoru nebo ve viroterapii nádoru prsu (*Stoff-Khalili a spol. – 2005*).

5.2.8.4. Použití liposomů pro genovou terapii a jinou léčbu nádorů prsu

Na lipozomech založené systémy dodávky léčiva poskytují možnost zvýšení terapeutického indexu protinádorových činitelů buď pomocí zvýšení koncentrace léčiva v nádorových buňkách nebo pomocí snížení expozice v normálních tkáních, což využívá zvýšené permeability a fenoménu retenčního účinku a využití cílených strategií.

Toto přehledné sdělení diskutuje o současných trendech na lipozomu založeného systému dodávky látek jak pro diagnózu, tak pro léčbu rakoviny prsu (*Sharma a spol. – 2006*).

Z názvu jejich publikace vyplývá, že se v této práci jedná o popis schémat pro genovou terapii – konkrétně u prsu.

6. Diskuze

6.1. Estrogenové a progesteronové receptory

6.1.1. Důležitost vyšetření PR

Při posuzování této problematiky jsme se zaměřili převážně na zahraniční zdroje. Jeví se nám, že nezbytnost (viz většina autorů) nebo naopak nedůležitost vyšetření PR (viz především Olivotto a spol. 2004 a 2005) je pravděpodobně nutno vztahovat k finanční situaci jednotlivých zdravotnických zařízení – a takto hodnotit názory zahraničních autorů – např. z chudých regionů. Pokud takováto pracoviště počítají u svých pacientek např. pouze s nejlacinější medikamentózní hormonální léčbou (nebo dokonce jen s terapeutickou kastrací nebo ani to ne), je pochopitelné, že uvažují i o finančních úsporách zrušením vyšetření PR. Je nutno brát v úvahu, že zastánci zrušení analýzy PR uvažují v tom směru, že histologické parafínové bločky každé pacientky jsou archivovány po mnoho let a dodatečně lze vyšetření PR dodělat v případě potřeby a tedy – pouze u ojedinělých dobře zdůvodněných klinických případů.

Naopak, lépe zabezpečená pracoviště posuzují přínos vyšetření PR z hlediska důslednější hormonální – především tamoxifenové léčby (např. Fuqua a spol. 2005 nebo graf z práce Colomer a spol. 2005) nebo z hlediska většího počtu terapeutických kúr nebo z hlediska jiného komplexnějšího přístupu (např. Ponzzone a spol. 2006). Při posuzování tohoto sporu různých autorů je třeba brát též v úvahu, zda jde o nádor ve vysokém klinickém stádiu nebo o velmi staré pacientky, které by již větší počet terapeutických kúr nedokázaly snášet.

Z hlediska našeho zaměření na kontrolu přesnosti receptorových výsledků – z hlediska např. grafu jejich závislosti na věku (nebo jejich závislosti na klinickém stádiu) se přikláníme k vyšetření PR i ve zdánlivě zbytečných případech, aby bylo možno provést celoskupinové posouzení výsledků (Hochmann 2007), vhodné nejen pro výzkum, ale i pro praxi. Uvažujeme také v tom směru, že, pokud např. je falešná

negativita ER vyvolána nadměrnou hladinou estrogenů, může to být odhaleno pomocí relativně nadměrné pozitivivity PR.

Není nutné, aby tato kapitola byla z hlediska důležitosti vyšetření PR bohatá, neboť již uvedené práce citovaných autorů byly ve formě prodiskutování sporů mezi jednotlivými autory.

6.2. Genová terapie

V části věnované genovému inženýrství naší diplomové práce jsme použili výhradně publikace, u kterých byly ovlivňovány buňky karcinomu prsu.

Rozdělení metod genové terapie, které použili citovaní autoři je málo detailní a tím nesrozumitelné pro běžného čtenáře. Některé citované podskupiny genové terapie bylo nesnadné jednoduše a při tom vyčerpávajícím způsobem definovat. Některé metody se nám nepodařilo jednoznačně zařadit do třídění převzatého z literatury a některé z metod lze zařadit do několika podskupin genové terapie současně. Vedlo nás to k vytvoření nových podkapitol. Navíc jsme z toho důvodu třídili metody nikoliv podle konečného účinku, ale podle povahy vloženého genu.

Druhým důvodem bylo, že jsme našli více druhů třídění a že autoři třídili metody spíše podle toho, se kterými metodami byli dobře obeznámeni a se kterými nikoliv – nebo podle toho, jaké třídění převzali ze starší – možná nedokonalé literatury. Některé skupiny metod bylo nutno rozdělit. To se týkalo především molekulární chemoterapie a proapoptotické terapie.

Výjimečně některá z navrhovaných schémat genové terapie se nám jevila tak, že si navzájem poněkud odporují nebo že odporují některým principům klasické léčby nádorů prsu.

Tak například přenos genu pro tvorbu zdravého p53 do nádorových buněk (Cristofanilli a spol. – 2006) je ochránce buněčného genomu a není tedy divu, že v dotyčné práci nezpůsobil nekrózu nebo apoptózu buněk, neboť tomu „dokázal předejít“ zastavením buněčného cyklu. V jiné z citovaných prací bylo dokonce prezentováno, že buňky defektní v p53 hůře odolávaly cisplatině (Basma a spol. – 2005).

Jiným příkladem je přenos genu pro ER (Huang a spol. – 2005). Pokud neuvažujeme velmi kriticky a zjednodušeně, že autoři vnašeli onkogen (regulační gen do nesprávné lokalizace), aby ho pak mohli léčit pomocí antiestrogenů, lze uvést například toto: Některé nádory tento receptor sice nemají – což jim brání v diferenciaci a tím v odklonu od proliferačního automatizmu, ale je nutno zároveň upozornit, že estrogenová signální dráha vede buňky k proliferaci.

Je možné, že autoři mají mnohem větší zkušenosti s genovými manipulacemi než se znalostmi, které ze signálních drah pro proliferaci jsou u karcinomu prsu postiženy nečastěji. Nebo se jim podařilo technicky zrealizovat svůj geneticko-inženýrský záměr až v době, kdy jeho princip se již ukázal být zastaralým. Je ovšem možné, že u výjimečných přesně geneticky (respektive genově) diagnostikovaných pacientek by jejich přístup byl účinný. Avšak perspektivnější jsou ty z citovaných prací, které jsou v souladu s proliferační signální dráhou, která je postižena u většiny pacientek nebo s jiným „locus minoris resistentiae“ většiny karcinomů prsu.

Důležitost genu (PR) jsme prokázali též v části o nutnosti vyšetřovat PR. Z hlediska genové terapie je nutno připomenout, že např. u metod využívajících sebevražedný gen je nebezpečí, že i buňky zdravých orgánů přijmou tento gen a vznikne tím nebezpečí pro pacientku. Naopak v případě genu pro PR by přijmutí genu jinými orgány nemělo představovat sebevražednou hrozbu pro zdravé buňky – což by mohla být přednost diferenciační genové terapie.

Vnesení i jiných genů než apoptotických (např. diferenciačních) může mít za následek nekrózu nebo apoptózu. To bylo také příčinou obtíží při našem třídění metod genové terapie. Přehledná sdělení, ze kterých jsme čerpali, používala totiž dělení podle důsledků místo podle příčiny. To může mít sice příznivý význam pro rozhodování o praktickém použití, ale velmi to znesnadňuje pochopení problematiky.

6.2.1. Pokusy prováděné na lidech

V prospektivní otevřené studii Cristofanilliho a spol. (2006) bylo 13 pacientek s LABC (lokální rozvinutá rakovina prsu) léčeno šesti tří týdenními cykly primární systémové terapie, která se skládala z intratumorálních injekcí Ad5CMV-p53

podávaných dva po sobě následující dny, a z docetaxelové a doxorubicinové léčby následované chirurgickým zákrokem.

V práci Takahashi a spol. (2006) začali klinickou studií genové terapie mnohalékové rezistence (MDR1). Pacientky s pokročilou rakovinou prsu byly vystaveny vysokým dávkám chemoterapie a prošly transplantací svých vlastních hematopoetických buněk kostní dřeně (PBSCT) transdukovaných pomocí MDR1 a poté jim byl podán docetaxel.

6.2.2. Pokusy prováděné na zvířatech

Agu a spol. (2006) vnašeli bakteriofágový gen pro lýzu buňky indukovanou tetracyklinem, do myších modelů.

Autoři Li, Zeng a spol. (2006) implantovali nádorové buňky MCF-7 do „bezsrstých“ myší, které nemají brzlík a nevyvíjí se u nich tudíž protitransplantátová aktivita.

V práci Shibaty a spol. (2007) uvádějí, že vnašeli geneticky shodné nádory prsu do pokusného zvířete, ale už toto zvíře v abstraktu blíže nespecifikovali.

Léčebný potenciál cytosin deaminázové (CD) genové terapie v kombinaci s ozařovací léčbou byl v práci Goblirsch a spol. (2006) hodnocen in vitro a in vivo za použití 4T1 myšího modelu karcinomu prsu.

Chada a spol. (2006) vyhodnocovali účinky Ad-MDA-7 na xenoimplantátech vložených do pokusných zvířat.

V práci Zang a spol. (2006) autoři uvádějí, že vkládali gen , který spotřebovává methionin a blokuje růst na methioninu závislých nádorů do linie MCF-7 buněk nádoru prsu in vitro. Zmiňují se dále také o in vivo testu, který ale v abstraktu blíže nespecifikovali.

Grignet-Debrus a spol. (2005) píší, že pracovali in vitro i in vivo, ale neuvádí na čem in vivo pokusy prováděli. Stejný problém je v práci Zanga a spol. (2006).

Li, Zhao a spol. (2006). pracovali s buněčnými liniemi – pravděpodobně lidskými, které jako xeniomplantáty vložili opět do „bezsrstých myší.

V práci Breidenbacha a spol. (2006) prováděli pokusy s nádorem in vitro a na myších hodnotili biodistribuci „neléčebného“ genu vloženého pouze za účelem kontroly kvality vyvíjeného vektoru.

6.2.3. Pokusy prováděné na tkáňových kulturách

Ze všech ostatních prací je v podstatě možno odvodit, že pokusy byly prováděny pouze na tkáňových kulturách. Z velké části se jednalo o lidské buňky. Při tom se jednalo o buněčné linie – nikoliv o buněčné kmeny nebo dokonce primokultury. Použité buněčné kultury však měly svůj původ ze žlázoové tkáně prsu. Pokud by nebyly vykultivovány přímo z karcinomu, tak stejně dlouhodobou kultivací in vitro by získaly nádorový (maligní) charakter. Každá buněčná linie – když je implantována do pokusného zvířete, vytvoří maligní nádor. Aby při tom nebyly problémy s imunitní transplantační reakcí, lze použít bezbrzlíkové – „holé“ myši.

6.2.4. Zastoupení metod genové terapie z hlediska nejpoužívanějších principů

Pokud se zamyslíme nad tím, která z daných metod genové terapie je autory nejvíce preferována, na prvních místech by jistě skončila kapitola o vyvolání nekrózy buněk a z ní především metody založené na antiviroticích (5 podkapitol). Za ní by následovala mutační kompenzace a proapoptotická léčba. Na tyto dva principy se autoři zaměřují nejvíce. Méně často se pak zaměřují na způsob terapie, při které dochází pouze k inhibici růstu. Stejně je na tom i problematika antiangiogenní terapie.

To však je posouzení z hlediska vloženého genu. Naopak, z hlediska výsledného účinku by byly nejčastější metody vyvolávající apoptózu. Zvláštní skupinu zahrnuje metoda modulace rezistence/senzitivity. Zdá se, že je tato kapitola nejobsáhlejší, ale také velmi různorodá, a proto ji bylo potřeba dále rozčlenit. Pokud se však zamyslíme nad konečnými důsledky této metody, zjistíme, že by bylo možné jednotlivé abstrakty citovat i ve výše zmíněných metodách. Metody vložení genu mohou léčit i při

samostatném použití, ale další nadstavbou je použití těchto metod v kombinaci – např. s ozářením.

Je nutno ještě znovu upozornit na to, že z různých principů genové terapie převažují metody, které usmrcují nádorové buňky nad metodami, které jen zpomalují jejich růst jako například vnesení genu pro diferenciaci včetně genů pro ER a PR, jejichž posouzení bylo naším původním cílem.

6.2.5. Ovlivnění genové terapie výsledkem vyšetření ER a PR

Jak už jsme dříve uvedli, někteří autoři zastávají názor, že z poměru ER:PR lze určovat prognózu pacientek, což je důležité pro výběr některých léčebných postupů. Na základě údajů jiných autorů lze např. odvodit, že poměr cytosolových koncentrací estrogenových receptorů ku progesteronovým receptorům (ER/PR) může pomoci při diagnóze nadměrné tvorby estrogenů, nebo naopak snížené funkce ER nebo příliš malé exprese genu pro PR (*Hochmann – 2007*).

U příbuzné problematiky rakoviny endometria Marešková zjistila, že při identifikaci odpovídajících responderek (= těch, které reagovaly na progestinovou terapii) progestinové terapie se pozitivní výsledky PR jevily tak, že dávají preciznější informaci než pozitivní ER. Dokonce naše diplomantka Marešková našla práci o vložení genu pro PR do buněk karcinomu dělohy.

Genová terapie karcinomu prsu se na tento problém zatím nesoustřeďuje – pouze někteří autoři zkusili „transplantovat“ gen pro ER, aby bylo možno použít léčbu látkami zaměřenými na tento receptor. Ale zrovna tyto jejich pokusy se nám nejeví jako perspektivní – a nenašli jsme o nich více prací.

Nicméně – z hlediska zohlednění výsledku vyšetření ER a PR v genové terapii karcinomu prsu (nebo alespoň dělohy) lze říci, že jsme takové práce našli, ale byly v menšině proti pracím např. o přenosu toxických genů.

6.2.6. Genová terapie ve výuce

Poté co jsme diplomovou práci byli nuceni zaměřit také na genovou terapii, nabízí se nám otázka, zda by některé námi nalezené poznatky z genové terapie mohly být zařazeny do výuky obecné biologie na naší fakultě. Alespoň by bylo možné seznámit studenty s námi zjištěným dělením, které je hned v úvodu kapitoly o genové terapii. Zdá se nám z pedagogického hlediska takto konkretizované genové inženýrství zapamatovatelnější a mohlo by mít vliv i na lepší motivaci studentů k této problematice. Podařilo se nám od studentů naší fakulty zjistit, že genové inženýrství u studentů není příliš v oblibě, jelikož tato problematika je dosti složitá a jak už jsme výše zmínili, mohla by tato konkretizace u studentů vést k snazšímu zapojení se do problematiky a k celkovému zatraktivnění výuky.

7. Závěr

Důležitost vyšetřování ER u hormonálně závislých nádorů je nedílnou součástí diagnostiky a léčby rakoviny prsu. Avšak vyšetřování PR je do dnešní doby opomíjeno. V pracích, které se zaměřují na spor o klinickém využití progesteronových receptorů, jsme zaznamenali názory, že vyšetřování PR je zbytečné, ale převažovaly práce, které hovoří o nezbytnosti vyšetření PR.

Pravděpodobně nejdůležitějším argumentem proti zrušení požadavku na vyšetření PR je, že některé pacientky ER-negativní pacientky – takové, které jsou zároveň PR-pozitivní – by mohly být ochuzeny o hormonální terapii, protože by jim vyšetření PR nebylo provedeno. A navíc by jim byla přednostně podána jiná v tomto případě méně efektivní léčba. Vyšetření PR je důležité také proto, aby se rozlišila skupina ER-pozitivních nádorů s negativním PR, u níž je malá pravděpodobnost, že nádory budou reagovat na hormonální léčbu (na rozdíl od ER+/PR+).

Naopak v problematice genové terapie jsme našli a mohli prostudovat pouze jednu práci o PR a ta se netýkala prsu, ale dělohy. Z hlediska ER jsme našli jednu práci o mutační kompenzaci ER v karcinomech prsu. V genové terapii tohoto onemocnění v naprosté většině převažují práce, které nevyužívají hormonálně terapeutický přístup. Ale i přesto jsme zaznamenali velký rozmach prací o genové terapii rakoviny prsu.

Genovou terapii lze rozdělit do několika skupin:

- (1) mutační kompenzace
- (2) molekulární chemoterapie
- (3) proapoptotická genová terapie
- (4) antiangiogenní genová terapie
- (5) genetická imunopotenciaci
- (6) genetická modulace rezistence/senzitivity

Toto třídění jsme pro naše zpřehlednění upravili podle funkce vneseného genu. Takto se nám podařilo prostudovat asi dvacet článků a souhrnů prací z mezinárodní časopisové literatury. Některé z těchto studovaných dokumentů pojednávají o výsledcích klinického testování těchto postupů genové terapie. Toto třídění jsme však pro potřeby této diplomové práce, byli nuceni modifikovat.

8. Seznam zkratek

Ab	protilátka
ACC	adenoidně cystický karcinom
ACV	acyklovir
ADA	absence adenosin deaminázy
Ad	adenovir
AIC	apokrinní karcinom
BCL-2	protein – přispívá k tumorigenezi blokováním apoptózy
CD	cytosin deamináza
CMV	cytomegaloviry
Cox-2	cyklooxygenáza-2
DCIS	duktální carcinoma in situ
DIC	invazivní ductální karcinom
Dox	doxycyklin
EGP-2	epiteliální glykoprotein ě
eIF4E	translační iniciační faktor
Endo	endostatin
ER	estrogenový receptor
Fas	člen rodiny receptorů pro TNF
FSH	folikulostimulační hormon
GCV	ganciklovir
GIC	mucinózní invazivní karcinom
Hep G2	buňky hepatokarcinomu
HER-2	receptor lidského epidermálního růstového faktoru 2
HLA	tranplantační antigen cizí osoby
HPR	heparináza
HR	hormonální receptor
HSVtk	gen pro thymidinkinázu virus herpes simplex
IA	inhibitor aromatáz
IHC	imunohistochemie
IR	ozářování
Km	Km je Michaelisova konstanta, která udává substrátovou koncentraci substrátu, při níž enzymová reakce probíhá rychlostí poloviční než je V_{\max}

LABC	lokální rozvinutá rakovina prsu
LCIS	lobulární carcinoma in situ
LH	luteinizační hormon
LIC	invazivní lobulární karcinom
MC	medulární karcinom
MDA-7	melanový gen-7
MDR1	genová terapie mnohalékové rezistence
MIC	karcinom s metaplazií
MTT	je metoda k průkazu viability buněk a cytotoxicity testovaných látek
NHL	nehodgkinský lymfom
PDX-1	transkripční faktor
PR	progesteronový receptor
p450	je jaterní mikrosomální oxido-redukční enzym
p53	protein zastavující buněčný cyklus a tím poskytuje buňce čas na opravu DNA
rAAV	rekombinantní adenovirus-2
RICS	RNA-inducing silencing complex
RIP-TK	rat insulin promoter directed thymidine kinase
rtTA	reverzní transaktivátor
SDF-1	receptor alfa-chemokinu
SERD	selektivní degradátory estrogenních receptorů
SERM	selektivní modulátory estrogenních receptorů
siRNA	small interfering RNA
SJC	sekreční karcinom
TDLU	terminální duktulární lobulární jednotka
Tet	tetracyklin
TIC	tubulární karcinom
TK	thymidinkináza
TNF	tumor necrosis factor
TRE	Tet response element
TSPs	tkáňové specifické promotory
VZVtk	thymidinkináza z viru Varicella Zoster
WHO	Světová zdravotnická organizace
XRT	ozařování

9. Seznam literatury

ABRAHÁMOVÁ J., MECHL Z., Onkologické oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha; Oddělení klinické onkologie a radioterapie, FN u sv. Anny, Brno: Adjuvantní endokrinní léčba časného karcinomu prsu u premenopauzálních žen. Farmakoterapie 4/2006, 439-452

ABRAHÁMOVÁ J.,MECHL Z., Onkologické oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha; Oddělení klinické onkologie a radioterapie Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno: Adjuvantní hormonální léčba časného karcinomu prsu u postmenopauzálních žen. Farmakoterapie supplementum1, 69-79

ABRAHÁMOVÁ J., Exemestan v léčbě karcinomu prsu. Farmakoterapie 4/2007, 369-372

AGU CA, KLEIN R, SCHWAB S, KONIG-SCHUSTER M, KODAJOVA P, Ausserlechner M, Binishofer B, Blasi U, Salmons B, Gunzburg WH, Hohenadl C.: The cytotoxic activity of the bacteriophage lambda-holin protein reduces tumour growth rates in mammary cancer cell xenograft models. The Journal of Gene Medicine. 2006 Feb;8(2):229-41.

ALBERTS B., BRAY D.,JOHNSON A.,LEWIS J.,RAFF M.,ROBERTS K.,WALTER P.: Základy buněčné biologie. Espero Publishing 1998;586-587

BASMA H, EL-REFAEY H, SGAGIAS MK, COWAN KH, LUO X, CHENG PW: BCL-2 antisense and cisplatin combination treatment of MCF-7 breast cancer cells with or without functional p53. Journal of Biomedical Science. 2005 Dec;12(6):999-1011. Epub 2005 Oct 14.

BREIDENBACH M, REIN DT, SCHONDORF T, KHAN KN, HERRMANN I, SCHMIDT T, REYNOLDS PN, VLODAVSKY I, HAVIV YS, CURIEL DT: A new targeting approach for breast cancer gene therapy using the heparinase promoter. Cancer Letters. 2006 Aug 18;240(1):114-22. Epub 2005 Nov 3

CAO Q, CAI W, LI T, YANG Y, CHEN K, XING L, CHEN X.: Combination of integrin siRNA and irradiation for breast cancer therapy. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006 Dec 22;351(3):726-32. Epub 2006 Oct 30

CELBOVÁ L.: Vzájemná souvislost markerů nádoru prsu. Katedra biologických a lékařských věd (školitel Hochmann J.), Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. UK v Praze, 2007.

COLOMER R, BELTRAN M, DORCAS J, CORTES-FUNES H, HORNEDO J, VALENTIN V, VARGAS C, MENDIOLA C, CIRUELOS E.: It is not time to stop progesterone receptor testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005 Jun 1;23(16):3868-9; author reply 3869-70.

CRISTOFANILLI M, KRISHNAMURTHY S, GUERRA L, BROGLIO K, ARUN B, BOOSER DJ, MENANDER K, VAN WART HOOD J, VALERO V, HORTOBAGYI GN: A nonreplicating adenoviral vector that contains the wild-type p53 transgene combined with chemotherapy for primary breast cancer: safety, efficacy, and biologic activity of a novel gene-therapy approach. *Cancer*. 2006 Sep 1;107(5):935-44

ČERVINKA M.: Úvod do genového inženýrství, Praha, 1993: 23, 33-34, 36.

DAI D., KUMAR N. S., WOLF D. M., LESLIE K. K.: Molecular tools to reestablish progestin control of endometrial cancer cell proliferation. *American journal of obstetrics and gynecology* 2001, volume 184, issue 5, pages 790-797

DVOŘÁKOVÁ E.: Hormonální receptory v nádorech prsu. Katedra biologických a biochemických věd (školitel Hochmann J.), Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, 2007.

EHRMANN J. Jr.: Význam exprese genů regulujících buněčný cyklus apoptózu u astroglálních nádorů – disertační práce. Lékařská fakulta Palackého University, Olomouc, 2001: 74.

http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF/Veda_vyzkum_LF/hp-ehrmann/Dizertace.doc

FUQUA SA, CUI Y, LEE AV, OSBORNE CK, HORWITZ KB.: Insights into the role of progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005 Feb 1;23(4):931-2; author reply 932-3

GOBLIRSCH M, ZWOLAK P, RAMNARAIN ML, PAN W, LYNCH C, ALAEI P, CLOHISY DR: Novel cytosine deaminase fusion gene enhances the effect of radiation on breast cancer in bone by reducing tumor burden, osteolysis, and skeletal fracture. *Clinical Cancer Research*. 2006 May 15;12(10):3168-76.

GRIGNET-DEBRUS C, NOEL A, FOIDART JM, CALBERG-BACQ CM.: Identification of factors important for the success of suicide gene therapy after a comparative study of Varicella zoster and Herpes simplex viral thymidine kinases efficacy on breast cancer cells. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*. 2005 Sep 2;51(1):37-48.

HARTL J., DOLEŽAL M., MILETÍN M., OPLETALOVÁ V., ZIMČÍK P.:
Farmaceutická chemie IV., Karolinum, Praha, 2006: 140

HAVLÍK R., NEORAL Č., KRÁL V.: Možnosti ovlivnění jaterních metastáz metodami genové léčby. I. chirurgická klinika FN a LF UP v Olomouci, 2008.
<http://www.hpb.cz/cz/akce/loket/index.html>

HOCHMANN J.: Ratio of concentrations of estrogen receptors to progesterone receptors (ER/PR) in the cytosol of breast cancers (stratification by forming of groups differing in PR). *Neoplasma*. 2007;54(4): 290-6.

HUANG J, LI X, HILF R, BAMBARA RA, MUYAN M.: Molecular basis of therapeutic strategies for breast cancer. *Current Drug Targets. Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*. 2005 Dec;5(4):379-96.

CHADA S, MHASHILKAR AM, LIU Y, NISHIKAWA T, BOCANGEL D, ZHENG M, VORBURGER SA, PATAER A, SWISHER SG, RAMESH R, KAWASE K, MEYN RE, HUNT KK.: mda-7 gene transfer sensitizes breast carcinoma cells to chemotherapy, biologic therapies and radiotherapy: correlation with expression of bcl-2 family members. *Cancer Gene Therapy*. 2006 May;13(5):490-502.

JOUNAIDI Y, CHEN CS, VEAL GJ, WAXMAN DJ: Enhanced antitumor activity of P450 prodrug-based gene therapy using the low Km cyclophosphamide 4-hydroxylase P450 2B11. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006 Mar;5(3):541-55.

LEVY S, ZHOU B, BALLIAN N, LI Z, LIU SH, FEANNY M, WANG XP, BLANCHARD DK, BRUNICARDI FC: Cytotoxic gene therapy for human breast cancer in vitro. *Journal of Surgical Research*. 2006 Nov;136(1):154-60. Epub 2006 Sep 27

LI QX, ZHAO J, LIU JY, JIA LT, HUANG HY, XU YM, ZHANG Y, ZHANG R, WANG CJ, YAO LB, CHEN SY, YANG AG.: Survivin stable knockdown by siRNA inhibits tumor cell growth and angiogenesis in breast and cervical cancers. *Cancer Biology and Therapy*. 2006 Jul;5(7):860-6. Epub 2006 Jul 9

LI ZB, ZENG ZJ, CHEN Q, LUO SQ, HU WX.: Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer. *BMC Cancer*. 2006 Mar 16;6:66.

LÜLLMANN H., MOHR K., HEIN L.: Barevný atlas farmakologie. Grada Publishing, 2007: 300.

MAKELA AR, MATILAINEN H, WHITE DJ, RUOSLAHTI E, OKER-BLOM C: Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides. *Journal of Virology*. 2006 Jul;80(13):6603-11

MAREŠKOVÁ B.: Estrogenové a progesteronové receptory v nádorech dělohy ve vztahu k terapii. Katedra biologických a lékařských věd (školitel Hochmann J.), Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 2006.

MAREŠKOVÁ B.: Vztah výsledků vyšetření estrogenových a progesteronových receptorů v nádorech dělohy s ohledem na vliv okolních faktorů. Diplomová práce, Katedra biologických a lékařských věd (školitel Hochmann J.), Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, UK v Praze, 2008.

MARTÍNKOVÁ J., CHLÁDEK J., MIČUDA S., CHLÁDKOVÁ J.: Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů. Grada Publishing, 2007: 338.

MATHIS JM, WILLIAMS BJ, SIBLEY DA, CARROLL JL, LI J, ODAKA Y, BARLOW S, NATHAN CO, LI BD, DeBenedetti A.: Cancer-specific targeting of an adenovirus-delivered herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene using translational kontrol. *Journal of Gene Medicine*. 2006 Sep;8(9):1105-20.

MATSUNO H., YUDOH K., WATANABE Y. a ost.: Stromelysin-1 (MMP-3) in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis has potential to cleave membrane bound Fas ligand./ *J.Rheum.*, 28, 2001, č. 1, s. 22-28.

MURRAY R.K., GRANNER D.K., MAYES P.A., RODWELL V.W.: Harperova biochemie. H&H 2002: 821.

NEČAS O., SVOBODA A., HEJTMÁNEK M., JANISCH R., ČERVINKA M., LENHART K., KOLÁŘ Z.: Obecná biologie pro lékařské fakulty, H&H, Jinočany, 2007: 295, 420, 436, 918.

NEKULOVÁ M., NĚMEC J., ŠIMÍČKOVÁ M., PECEN L., BEDNAŘÍK O., KOVÁŘOVÁ M.: Hodnoty sérové thymidinkinázy u nemocných s ne Hodgkinskými lymfomy, 2004. http://www.linkos.cz/vzdelavani/4_99/serum.php

OLIVOTTO IA, TRUONG PT, SPEERS CH, BERNSTEIN V, ALLAN SJ, KELLY SJ, LESPERANCE ML.: Time to stop progesterone receptor testing in breast cancer management. *Journal of Clinical Oncology*. 2004 May 1;22(9):1769-70.

OLIVOTTO IA, BERNSTEIN V, TRUONG PT: *Journal of Clinical Oncology*, Vol 23, No 4 (February 1), 2005: pp. 932-933.

PEREY L, PARIDAENS R, HAWLE H, et al. Clinical benefit of fulvestrant in postmenopausal women with advanced breast cancer and primary or acquired resistance to aromatase inhibitors: final results of phase II Swiss Group for Clinical Cancer Research Trial (SAKK 21/00). *Annals of Oncology* 2007;18:64–9.

PLÁTENÍK J.: Co je SiRNA. Ústav lékařské biochemie 1. lékařské fakulty UK, 2002. <http://che1.lf1.cuni.cz/html/SiRNA.html>

PONZONE R, MAGGIOROTTO F, ROBBA C, FUSO L, SISMONDI P.: Progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 status: an independent influence on the efficacy of endocrine therapy in breast cancer? *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Mar 20;24(9):1481-2; author reply 1482.

POSTLETHWAIT JH, HOPSON JL: *The nature of life*, Mc. Graw-Hill, Inc, 1992: 238-239.

SELL S.: Potential gene therapy strategies for cancer stem cells. *Current Gene Therapy*. 2006 Oct;6(5):579-91.

SHARMA G, ANABOUSI S, EHRHARDT C, RAVI KUMAR MN: Liposomes as targeted drug delivery systems in the treatment of breast cancer. *Journal of Drug Targeting*. 2006 Jun;14(5):301-10.

SHIBATA MA, MORIMOTO J, DOI H, MORISHIMA S, NAKA M, OTSUKI Y: Electrogenic therapy using endostatin, with or without suicide gene therapy, suppresses murine mammary tumor growth and metastasis. *Cancer Gene Therapy*. 2007 Mar;14(3):268-78. Epub 2006 Nov 10.

STOFF-KHALILI MA, STOFF A, RIVERA AA, BANERJEE NS, EVERTS M, YOUNG S, SIEGAL GP, RICHTER DF, WANG M, DALL P, MATHIS JM, ZHU ZB, CURIEL DT.: Preclinical evaluation of transcriptional targeting strategies for carcinoma of the breast in a tissue slice model system. *Breast Cancer Research*. 2005;7(6):R1141-52. Epub 2005 Nov 16.

STOFF-KHALILI MA, DALL P, CURIEL DT.: Gene therapy for carcinoma of the breast. *Cancer Gene Therapy*. 2006 Jul;13(7):633-47. Epub 2006 Jan 6.

TAKAHASHI S, ITO Y, HATAKE K, SUGIMOTO Y.: Gene therapy for breast cancer. --Review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in Cancer Institute Hospital. *Breast Cancer*. 2006;13(1):8-15.

TAKEUCHI H, UEO H, TSUJI K, TOKUNAGA E, BABA H, MAEHARA Y.:
Prediction of survival from first recurrence of breast carcinoma in Japanese women.
Breast. 2006 Apr;15(2):226-31. Epub 2005 Jul 7.

URLINGER, S., et al.: Proceedings of the National Academy of science of the USA .
2000;97(14):7963–7968.

VONKA V.: Národní program výzkumu a vývoje. Ústav hematologie a krevní
transfúze, Praha, květen 2002. http://www.biotrin.cz/czpages/p_g_t.htm

VONKA V.: Genová terapie v onkologii. 2004;36:32.

WSÓL V. – vedoucí katedry: Obecná biochemie – přednášky. Katedra biochemických
věd. Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, 2005.

ZANG XP, PALWAI NR, LERNER MR, BRACKETT DJ, PENTO JT, HARRISON
RG: Targeting a methioninase-containing fusion protein to breast cancer urokinase
receptors inhibits growth and migration. Anticancer Research. 2006 May-
Jun;26(3A):1745-51.