

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Stanovení plasmatických hladin duálního tyrosinkinasového inhibitoru lapatinibu u nemocných s karcinomem prsu

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Adriana Polýnková
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	duben 2010

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 26. 4. 2010

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi v průběhu diplomové práce vždy ochotně poskytoval. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Magdaleně Čížkové a Mgr. Lence Radové, Ph.D. z laboratoře experimentální medicíny, při dětské klinice FN Olomouc za spolupráci na daném tématu. V neposlední řadě patří moje velké díky celému kolektivu laboratoře dědičných metabolických poruch v čele s Doc. RNDr. Tomášem Adamem, Ph.D. za vytvoření výborných podmínek při zpracování diplomové práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Adriana Polýnková
Název práce	Stanovení plasmatických hladin duálního tyrosinkinasového inhibitoru lapatinibu u nemocných s karcinomem prsu
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	FN Olomouc, Oddělení klinické biochemie, Laboratoř dědičných metabolických poruch, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
Vedoucí práce	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>Karcinom prsu je nejčastější nádorové onemocnění postihující ženskou část populace. Jedním ze sledovaných markerů při volbě vhodné terapie je množství receptoru HER2. U cca 15 – 20 % patientek s karcinomem prsu dochází k amplifikaci a/nebo k nadměrné expresi genu Her-2/neu. Stupeň amplifikace koreluje s vyšší agresivitou nádoru a horší prognosou, proto je nezbytné před zahájením terapie stanovit status genu HER2. Pro léčbu HER2 pozitivních karcinomů prsu lze po selhání léčby trastuzumabem podávat lapatinib, tyrosinkinasový inhibitor receptoru HER1 i HER2. Práce je zaměřena na vztah léčebné odpovědi patientek s karcinomem prsu ke stavu receptorů HER1 a HER2 a plasmatickým hladin lapatinibu.</p> <p>Experimentální část diplomové práce je zaměřena na vývoj, validaci a stanovení plasmatických hladin lapatinibu pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Vývoj metody spočíval v nalezení optimálních MS/MS pro detekci a kvantifikaci analytu. Vyvinutá metoda byla validovaná pro budoucí použití v klinické praxi (linearita, návratnost, nepřesnost a reprodukovatelnost). Následně byla metoda aplikována na reálné vzorky patientek léčených lapatinibem. Byla prokázána souvislost mezi pozitivitou receptoru HER2 a léčebnou odpovědí patientek. U podskupiny patientek se změnami receptoru HER1 nebyl nalezen statisticky významný vztah positivity HER1 receptoru a léčebné odpovědi na lapatinib. Nově vyvinutá metoda je vysoce účinná, časově nenáročná a po validaci použitelná v rutinní praxi.</p>
Klíčová slova	Karcinom prsu, TKI, Lapatinib, tandemová hmotnostní spektrometrie
Počet stran	68
Počet příloh	-
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and Surname	Adriana Polýnková
Title	Determination of plasma levels of the dual tyrosinkinase inhibitor lapatinib in patients with breast carcinoma
Type of thesis	diploma
Department	Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, Medical Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 6, 775 20 Olomouc
Supervisor	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	<p>Breast cancer is the most frequent tumor disorder attacking the female part of the population. One of the monitored markers for selection of the acceptable therapy is the amount of the HER2 receptor. Around 15-20 % of patients with the breast cancer amplified and/or over expressed the Her-2/neu gene. Degree of amplification correlates with higher aggressivity of the tumor and worse prognosis; therefore it is important to determine the status of the HER2 receptor before the initialization of the therapy. It is possible to indicate lapatinib, the tyrosinkinase inhibitor of the HER1 and HER2 receptor, for HER2-positive breast cancer therapy after the failure of the trastuzumab treatment. The aim of this work is to investigate the relation between the therapy response of the patients with the breast carcinoma to the HER1 and HER2 receptors situation and the plasma levels of the lapatinib.</p> <p>The aim of of the experimental part of this thesis is to the develop, validate and determinate of plasma levels of the lapatinib by using of ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. The method development consisted of finding of the optimal conditions for MS/MS detection and quantification of the analytes. The developed method was validated for next usage in clinical practice (linearity, recovery, accuracy and reproducibility). The method was applied on real samples of patients under the lapatinib therapy. The relationship between positivity of the receptor situation and the therapy response was found. In subgroup of patients with HER1 receptor changes any statistical important relation between HER1 receptor positivity and therapy response on the lapatinib was found. The newly developed method is effective, time-unconsuming and suitable for routine use after the validation.</p>
Keywords	Breast cancer, TKI, lapatinib, MS-MS
Number of pages	68
Number of appendices	-
Language	Czech
OBSAH	

CÍLE PRÁCE	8
TEORETICKÁ ČÁST	9
1. Karcinom prsu	10
1.1. Historie onemocnění	10
1.2. Epidemiologie.....	11
1.3. Etiologie, rizikové faktory.....	13
1.4. Klinické příznaky	14
1.5. Diagnosa a stadia onemocnění	14
1.6. Léčba	16
1.6.1. Chirurgická léčba (mastektomie).....	17
1.6.2. Radioterapie	18
1.6.3. Chemoterapie (chemická léčba)	19
1.6.4. Hormonální léčba	20
1.6.5. Cílená molekulární biologická léčba.....	21
1.6.6. Dispenzarizace	21
2. Biologická léčba karcinomu prsu	22
2.1. Membránový receptor HER-2/neu	23
2.1.1. Struktura a funkce receptoru.....	24
2.1.2. Receptor v tumorech	25
2.1.3. Možnosti stanovení receptoru HER-2/neu a genu <i>cerbB-2</i>	26
2.1.4. Sérový HER-2.....	26
2.2. Cílená biologická léčba v klinické praxi.....	27
2.2.1. Trastuzumab (Herceptin®; TDM1)	28
2.2.2. Bevacizumab (Avastin®)	29
2.2.3. Lapatinib (Tykerb; GW572016).....	30
3. Lapatinib	31
3.1. Mechanismus účinku	31
3.2. Farmakologické vlastnosti	33
3.3. Terapeutická účinnost – klinické studie	34
3.4. Bezpečnost a snášenlivost	37
3.5. Význam a metody stanovení plasmatických hladin TKI	37
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	39
4. Úvod	40
5. Materiál a metody	40
5.1. Biologický materiál	40
5.2. Reagencie, roztoky.....	41

5.3.	Přístrojové vybavení	41
5.4.	Příprava vzorku	42
5.5.	Metoda	42
6.	Výsledky	43
6.1.	Optimalizace metody	43
6.2.	Validace metody	48
6.3.	Stanovení plasmatických hladin dualního TKI Lapatinibu u pacientek s karcinomem prsu.....	51
6.4.	Výsledky IHC a FISH.....	54
6.5.	Klinická data.....	55
	DISKUSE	57
	ZÁVĚR	59
	LITERATURA.....	60
	INTERNETOVÉ ZDROJE.....	66
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	67

CÍLE PRÁCE

- vývoj a optimalizace metody pro stanovení plasmatických hladin lapatinibu
- validace metody
- aplikace na reálné vzorky pacientů s karcinomem prsu léčených lapatinibem
- zhodnocení odpovědi na cílenou léčbu
 - ve vztahu k získaným výsledkům
 - s ohledem na klinická data pacientek

TEORETICKÁ ČÁST

1. Karcinom prsu

Mezi současné největší zdravotní problémy populace bezpochyby patří nádorová onemocnění. Jsou jednou z nejčastějších příčin smrti, pracovní neschopnosti či invalidity. S určitou nadsázkou můžeme říci, že se s nádorovým onemocněním v průběhu svého života setkáváme všichni.

Rakovina prsu (karcinom prsu) je zhoubné onemocnění postihující ženskou část populace. U nás představuje v současnosti jeden z nejzávažnějších epidemiologických problémů a to hned ze dvou důvodů. Za prvé, jedná se o velice heterogenní skupinu nádorů, jejichž incidence neustále stoupá. Druhým důvodem je multifaktoriální etiologie, která vede k nevyzpytatelnému biologickému chování. Karcinom prsu je na rozdíl od jiných malignit schopen recidivovat i po dlouholetém období remise. (Chovanec et al., 2008)

Příznivou zprávou je pokles mortality způsobený tímto onemocněním a to díky novým diagnostickým a terapeutickým možnostem. Současná onkologická léčba vychází z konceptu cílené biologické léčby „targeted therapy“, která vyžaduje přesnou identifikaci cílené struktury molekuly. (Petruželka & Petruželková, 2008) U tohoto onemocnění dochází k narušení základních signálních drah vedoucích k maligní transformaci buňky. Přesné popsání těchto procesů umožní najít cílové struktury, a ty pak terapeuticky ovlivnit. Základní nástroje dostupné v rámci cílené molekulární léčby jsou monoklonální protilátky a nízkomolekulární inhibitory tyrosinkinasy, jako např. Lapatinib, Herceptin aj. (Chovanec & Dostálová, 2009)

1.1. Historie onemocnění

Díky narůstající incidenci se karcinom prsu řadí mezi „civilizační choroby“. Jedná se však o onemocnění, které lidstvo doprovází po celá tisíciletí. První zmínky jsou dochované již z období 3000 let před naším letopočtem, kdy na papyrech pocházejících ze starého Egypta bylo popsáno, že nádory, které jsou tvrdé, chladné, neobsahující tekutiny, nelze léčit. Ostatní kožní projevy se snažili vyléčit vypalováním zasažených tkání rozžhaveným železem. (Chovanec J., 2008)

V pozdějším období se rakovinou prsu a její léčbou zabýval Galén, který přirovnal rozšířené lymfatické a krevní cévy u pokročilého karcinomu prsu ke krabím nohám a odtud pochází název „cancer“. V této době byla rakovina prsu považována za lokální onemocnění, které se šíří lymfatickou cestou. Hlavní příčinu onemocnění viděl v nadbytku melancholie. V léčbě doporučoval speciální diety a zařikávání.

Základy chirurgického odstranění nemocného prsu (mastektomie) vyvinul až o několik století později Andreas Vesalius. Zmínky o úspěšně provedené mastektomii pocházejí ze samého počátku 18. století. Dochoval se popis případu řádové sestry z kanadského Quebecu, která se díky zákroku v roce 1700 zbavila rakoviny a prožila ještě dalších 30 let spokojeného života.

Koncem devatenáctého století byl karcinom prsu T. Beatsonem označen za hormonálně dependentní onemocnění. Prokázala to regrese metastatického procesu po oboustranné ovariectomii. Dvacáté století přineslo velký pokrok v léčbě karcinomu. Roku 1924 G. Keynes začal provádět tumorektomii pomocí inserce radiových jehel, jako počátek brachyterapie. Výsledky přežití byly srovnatelné s výsledky, kterých bylo dosaženo radikální mastektomií. O dvacet let později dr. Patey popisuje parciální mastektomii, která zachovává velký prsní sval. Mnoho srovnávacích a experimentálních studií provedených v šedesátých letech potvrdilo hypotézu třicátých let, že karcinom prsu není lokální, ale systémové onemocnění. Vývoj vysokovoltážní radioterapie a citlivých diagnostických metod umožňoval konzervativnější postupy léčby. Počátkem sedmdesátých let byl po vědeckých studiích zaveden do rutinní praxe antiestrogen tamoxifen, který je používán dodnes. (Strnad et al., 2003)

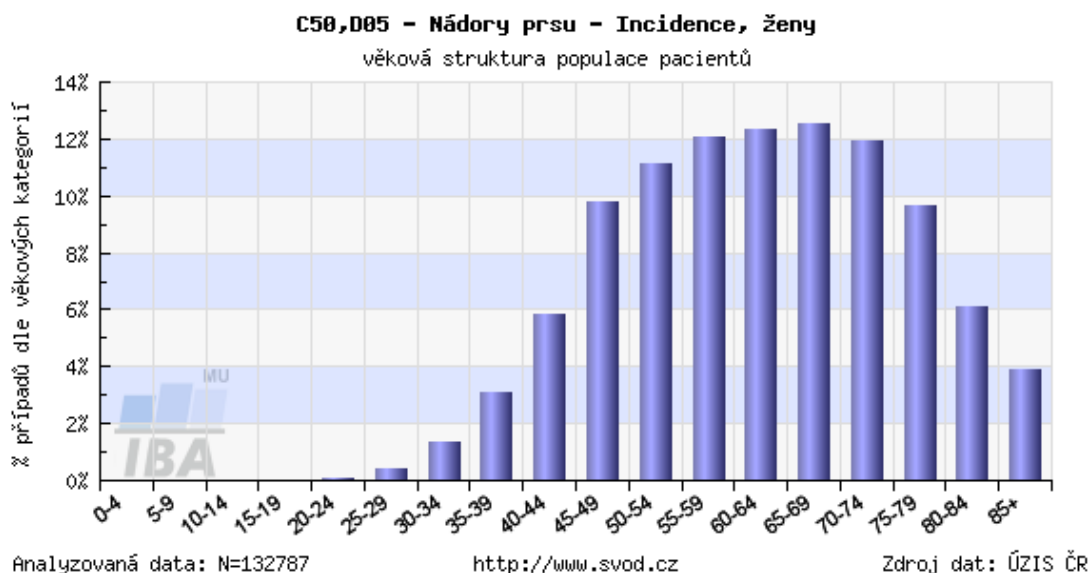
V současné době je karcinom prsu považován za genetickou aberaci somatických buněk, která je způsobena mnohačetnými mutacemi v průběhu své klonální expanze. Výsledkem je nekontrolovatelný, invazivní a metastický růst buněk. (Strnad et al., 2003; Strnad, 2004; Abrhámová et al., 2003)

1.2. Epidemiologie

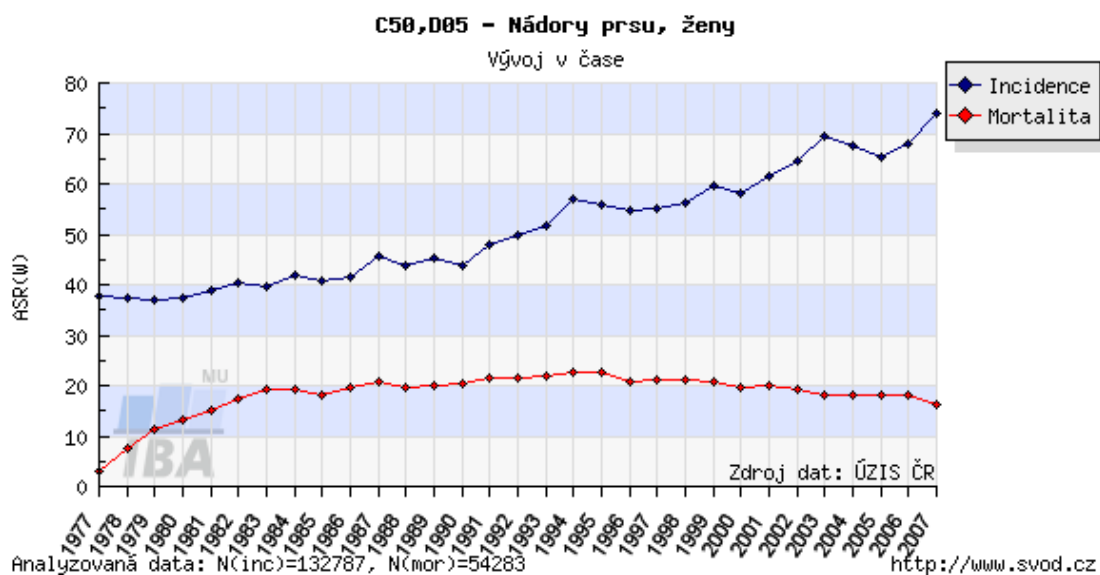
Zhoubné novotvary jsou v naší republice evidovány od konce 50. let minulého století. V roce 1976 byl založen onkologický registr, ve kterém jsou sledována hlášená onemocnění novotvary. Karcinom prsu je nejčastější zhoubný nádor, který postihuje ženy. V současné době je diagnostikován průměrně u jedné z devíti žen v průběhu jejího života a jedna žena ze třiceti na tuto chorobu zemře. (Chovanec, 2008)

Každoročně je v naší zemi diagnostikováno více než 5 500 nových případů tohoto onemocnění, což představuje asi 17 % všech nově diagnostikovaných malignit v ženské populaci. Incidence tohoto onemocnění narůstá s věkem, maximum výskytu se pohybuje kolem 55 - 69. roku života (Obr. 1). Celosvětově je nejvyšší incidence zaznamenána v USA a Dánsku, naopak nejnižší v jihozápadní Asii a Africe. Česká republika zaujímá ve srovnání s ostatními zeměmi přibližně 23. místo v počtu nově diagnostikovaných novotvarů prsu.

Co se týče mortality, od konce 90. let nepatrně klesá, přesto na následky karcinomu prsu zemře každý rok přibližně 2 000 českých žen (Obr. 2). Navzdory značnému pokroku v diagnostice a komplexní léčbě zaujímá karcinom prsu mezi příčinami úmrtí ve věkové kategorii 20 - 54 let první místo. Částečně se tento stav dá odůvodnit pozdní diagnostikou pokročilého stadia onemocnění. Jednoznačným předpokladem úspěšné léčby je včasná diagnosa. (Mužík et al., 2009; www.svod.cz)



Obr. 1: Incidence karcinomu prsu podle věku (www.svod.cz C50 – nádory prsu, ženy; zpracováno ve spolupráci s ÚZIS ČR)



Obr. 2: Časový vývoj hrubé incidence a mortality za posledních 30 let. (www.svod.cz C50 – nádory prsu, ženy; zpracováno ve spolupráci s ÚZIS ČR)

1.3. Etiologie, rizikové faktory

Přes veškeré pokroky v genetice, onkologii, molekulární biologii není příčina tohoto onemocnění jednoznačně objasněna. Jedná se o velice heterogenní onemocnění, u kterého se předpokládá, že existuje celá řada faktorů spojených se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu prsu u žen. Patří sem faktory osobní anamnézy, genetické, hormonální, reprodukční a faktory vnějšího prostředí.

Za hlavní rizikové faktory pro rozvoj rakoviny prsu jsou považovány **ženské pohlaví a věk**. Výskyt onemocnění je téměř vzácný u žen do 20 let a neobvyklý u žen do 30 let. Jak už bylo zmíněno dříve, incidence narůstá s věkem, kdy výrazných hodnot dosahuje okolo 50. roku života žen. Z hlediska etnických skupin je vyšší riziko u bělošské populace, než u asijské či černošské. (Chovanec et al., 2008)

Existuje mnoho důkazů, že ženské pohlavní hormony - **estrogeny** hrají významnou roli v etiologii karcinomu prsu. Podněcují k činnosti růstové faktory a onkogeny, jejichž produkty podporují buněčné dělení. Vše závisí na délce působení estrogenů a na endogenní hladině tohoto hormonu. Svou roli zde hraje časný nástup menstruační aktivity (před 12. rokem) a pozdní menopauza (po 55. roce), nuliparita, pozdní věk ženy v době prvního těhotenství (po 30. – 35. roce), krátkodobá laktace, abort v prvním trimestru či dlouhodobá léčba exogenními estrogeny - hormonální terapie (HRT). (Chovanec et al., 2008; Prausová, 2004)

Převážná část případů nádorů prsu se vyskytuje v menopauze sporadicky, bez dědičného základu. Zhruba 15 % nově diagnostikovaných zhoubných nádorů se vyskytuje familiárně a to buď v první (matka, dcera, sestra) nebo druhé linii (babička, teta, atd.). Na jejich vzniku se z 5 – 10 % podílí **genetická predispozice**. Jedná se především o mutace genů BRCA 1 (17. chromosom) a BRCA 2 (13. chromosom), které jsou spojeny i s jinými nádorovými onemocněními (karcinom ovaria, kolorekta). Jde o hereditární karcinomy, kdy je dědičnost autozomálně dominantní s různou mírou penetrance. U takto postižených žen je karcinom prsu často oboustranný a postihuje ženy v mladším věku (do 35-ti let). Zvláštní skupinou jsou rodiny, kde kolují různé druhy nádorů v rámci tzv. syndromů (Li-Fraumenův syndrom, Cowdenův syndrom apod.)

Významnou roli na incidenci karcinomu prsu má i **výživa a životní styl** ženy. Vysoký energetický příjem, nadbytek tuků v potravě, nízká pohybová aktivita vedoucí k obezitě, požívání alkoholu nebo kouření zvyšují riziko vzniku onemocnění.

Nepříznivou roli může sehrát i **ionizující záření** v rámci nádorové léčby, předchozí malignity či **kancerogeny** z prostředí. Užívání **hormonální antikoncepce**

rovněž zvyšuje riziko rakoviny prsu, oproti tomu snižuje riziko karcinomu dělohy. (Chovanec et al., 2008; Prausová, 2004; Kolařík, 2004; Abrhánová, 2000)

1.4. Klinické příznaky

Karcinom prsu může být dlouho bez zjevných příznaků, není bolestivý a nijak významně se neprojevuje. V pokročilejší fázi onemocnění, kdy už se projeví klinické příznaky, se jedná o pozdně stanovenou diagnosu. Proto by žádná žena neměla podceňovat prevenci. Klinické příznaky karcinomu můžeme rozdělit na celkové a lokální.

Celkové projevy (subfebrilie, bolesti v kloubech, na hrudi a páteře, nechutenství, hubnutí, únavnost) se dostávají až při výskytu vzdálených metastáz. V pokročilejším stadiu onemocnění mohou být přítomné hmatné metastatické uzliny v axile nebo nadklíčku. Generalizované formy karcinomu prsu se mohou projevit dušností a chronickým kašlem v případě plicních metastáz, elevací jaterních enzymů a hepatomegalií při metastatickém postižení jater. Mozkové metastázy se projeví neurologickým deficitem, méně obvyklé jsou paraneoplastické kožní příznaky u podkožních metastáz.

Nejčastějším lokálním projevem je nebolestivé zduření nebo rezistence s nepravidelnými okraji kdekoliv v prsu. Dále to mohou být změny na bradavkách, deformity, vpáčení, krvácení nebo sekrece z mlékovodů. Dalším příznakem může být změna charakteru kůže a jejího zbarvení (zarudnutí, vtahování kůže vzhledem připomínající pomerančovou kůru, důlkovitění, otok kůže, mokvajících a nehojících se rány), bolest prsou, hmatná bulka v prsu či podpaží. (Chovanec et al., 2008; Prausová, 2004; Abrhánová, 2000; Büchler & Kořán, 2009)

1.5. Diagnosa a stadia onemocnění

Při diagnostice karcinomu prsu, stejně jako u jakéhokoliv jiného tumoru, je důležitá podrobná rodinná i osobní anamnéza (věk pacientky, karcinom prsu u příbuzných v 1. a 2. linii, první menstruace, nástup menopauzy, těhotenství, porody, potraty, HRT, životní styl, první registrace jakýchkoliv odchylek od normálního stavu, doba prvotní návštěvy lékaře a její důvod).

Nejjednodušší metodou záchytu karcinomu prsu je **samovyšetření** prsu. Ženy by si ho měly provádět každý druhý nebo třetí den po skončení menstruace, pro ty které nemenstruují je vhodný jakýkoliv snadno zapamatovatelný den. Samovyšetření prsu je

jednoduchá a velmi propagovaná metoda detekce patologických formací v prsu. Průměrná velikost nádorů prsu, kterou si ženy samy našly je okolo 2 centimetrů. Z tohoto hlediska se tedy nejedná o metodu včasné diagnostiky. Obdobně je na tom fyzikální vyšetření prsů lékařem. Ten pohledem a pohmatem pátrá po abnormalitách.

V současné době je nejefektivnější metodou včasné detekce nádorů prsu **mamografie**. Speciální mamografické přístroje rozpoznají nádory již 1 - 3mm velké. Průměrná velikost nálezů je 9 - 10 mm, neměla by překročit 15 mm. Předpokládá se, že takto velké nádory neobsahují metastázy, není to však pravidlem. Angiogeneze nastává u nádorů nad 3 mm. Výhoda mamografie spočívá v tom, že poskytuje přehledný obraz prsu (velikost a lokalizaci nádoru) a je schopna zachytit tzv. mikrokalcifikace, které mohou být mnohdy prvotním projevem onemocnění. Samotná mamografie není nijak náročná, jedná se o rentgenologické vyšetření prsu ve dvou projekcích (z boku a shora). Prs je během vyšetření sevřen mezi podložkou a kompresní deskou, poté prosvícen slabým paprskem. Užití má dvojí a to klinické nebo screeningové. První metoda se užívá k diagnostice léze prsu u symptomatických žen po předchozím vyšetření, druhá je metodou sekundární prevence – včasného záchytu karcinomu v jeho asymptomatickém stadiu. Screeningová mamografie je součástí preventivních gynekologických prohlídek u žen ve věku 45 - 69 let, a to každé dva roky. Výjimkou jsou nosičky genů BRCA1 a 2, u nich se provádí každoročně od 30-ti let. (Chovenec, 2008; Abrahámová, 2000)

Užitečným doplňujícím vyšetřením nejasných mamografických snímků je **ultrasonografie**. Ultrazvuk umožní rozlišit cystu od solidního útvaru a pod jeho kontrolou lze provést bioptické vyšetření. Nevýhodou je omezená schopnost rozlišit rezistence menší 1 cm.

Jiné zobrazovací techniky nejsou pro rutinní diagnostiku vhodné z důvodu nedostatečné senzitivity a specifity. Při podezření na maligní lézi v prsu je nutné histologické vyšetření vzorku tkáně. Nejčastěji se využívá **punkční biopsie** samořeznou jehlou, při které je získáno několik válečků o síle jehly a velikosti okolo 2 cm. Z takto odebraného vzorku je možno provést histopatologický rozbor a různá imunohistochemická vyšetření. Po histologické verifikaci nádorů podstupuje pacientka další vyšetření, jejichž cílem je zjistit, zda se tumor nerozšířil do jiných částí těla. Provádí se **sonografie** nebo **CT** vyšetření jater a dutiny břišní, **rentgenový snímek** plic a **scintigrafie** skeletu. **Magnetická rezonance** může objasnit nejasné nálezy na skeletu a odhalit mozkové metastázy. Doplňujícím pojítkem pro stanovení klinického stadia je **rozbor krve**, zaměřený na biochemické vyšetření a na vyšetření nádorových markerů (CEA, CA 15-3). (Masopust, 2004) Pro volbu úspěšné léčebné strategie je nutné **molekulárně biologické a imunohistochemické vyšetření** – stanovení mutace

genů BRCA 1 a BRCA 2, pozitivita hormonálních receptorů (estrogenových a progesteronových) a exprese onkogenu HER-2/neu. Zvýšená exprese onkogenu HER-2/neu je negativním prognostickým faktorem pro pacientky s invazivním karcinomem prsu. (Chovanec, 2008; Abrhánová, 2000; Büchler & Kořán, 2009; Strnad, 2004; Prausová, 2004)

Stanovení stadia nádoru (staging) vychází z TNM (tumor-nodes-metastasis system) klasifikace. Kategorie T stanovuje velikost primárního nádoru v okamžiku palpačního vyšetření a mamografie. N označuje postižení lymfatických uzlin a M informuje o přítomnosti vzdálených metastáz např. v nadkličku, plicích, játrech, skeletu, mozku apod.

Karcinom prsu může být invazivní (infiltrující), schopný šířit se do lymfatických uzlin a dalších částí těla, nebo neinvazivní, tzv. *duktální karcinom in situ* (DCIS - stadium 0). *Infiltrující duktální karcinom* (IDC) vzniklý v mléčném kanálku pronikne snadno skrz jeho stěnu a postihuje i tukovou tkáň prsu. IDC je nejčastějším typem karcinomu prsu, představuje téměř 85 % případů karcinomu prsu. DCIS označovaný za nejranější stadium onemocnění, je omezen jen na mléčné kanálky. Nešíří se mimo prs a téměř 100 % žen s tímto stadiem karcinomu lze léčit.

Celkově se rozlišují čtyři klinická stadia. Stadium I a II jsou raným stadiem karcinomu prsu, bez napadení okolní tkáně. **Stadium I** se označuje malý nádor, nepřesahující 2 cm, který se nešíří mimo prs ani do lymfatických uzlin. Jako **stadium II** se považuje nádor o velikosti 2 až 5-ti centimetrů, bez postižení lymfatických uzlin. V případě postižení lymfatických uzlin nesmí být ložisko větší než dva centimetry. **Stadium III** se nazývá místní pokročilý karcinom. Lymfatické uzliny jsou zasaženy a nádor prorůstá i do tkání mimo prs, vzdálené metastázy nejsou prokázány. Poslední **stadium IV**, nádorová ložiska (metastázy) se rozšířily i do ostatních částí těla. (Büchler & Kořán, 2009; Chovanec, 2008; Vorlíček et al., 2006)

1.6. Léčba

Karcinom prsu je heterogenní onemocnění. Nejenže pacientky přicházejí k lékaři v různých stadiích vývoje onemocnění, ale tumory jsou také velmi odlišné, pokud jde o rychlost jejich růstu, schopnost metastazovat a další biologické vlastnosti. Proto byla pro karcinom prsu stanovena celá řada důležitých prognostických a prediktivních faktorů, které mají napomoci zvolit vhodnou terapii. Hlavními faktory při rozhodování jsou: klinické stadium onemocnění, velikost primárního tumoru, stav spádových lymfatických uzlin, histologický typ karcinomu, stupeň diferenciacce (grading), stav

exprese steroidních receptorů a receptoru HER-2/neu, invaze do krevních a lymfatických cév, markery proliferační aktivity, biologický a hormonální věk pacientky, hodnoty sérových markerů. Nedílnou součástí je zvážení celkového stavu pacientky, s přihlédnutím na případná souběžná onemocnění. V neposlední řadě by měla léčebná strategie respektovat rozhodnutí nemocné.

V léčbě se používají všechny léčebné postupy typické pro nádorová onemocnění, tj. chirurgický výkon, radioterapie, chemoterapie, hormonoterapie (systémová léčba) a v posledních letech i metody cílené molekulární léčby. (Cinek & Filip, 2007a; Chovanec, 2008)

1.6.1. Chirurgická léčba (mastektomie)

Základní metodou léčby časných karcinomů je operační výkon. Může jím být amputace prsu nebo jiný částečný výkon, kdy prs zůstane zachován. Rozsah výkonu záleží na více okolnostech, zejména na velikosti a umístění nádoru. Díky pokroku v léčebných postupech a technologiích dnes existuje několik léčebných možností.

Parciální mastektomie je částečné odnětí prsu s odstraněním axilárních uzlin v podpaží. Patří sem *kvadrantektomie*, při níž se odnímá příslušný prsní kvadrant s nádorem. Při *lumpektomii* je odstraněn samotný nádor s bezpečnostním nejméně centimetrovým lemlem zdravé tkáně. Prs šetřící operace jsou téměř vždy spojeny s následným lokálním ozářením prsu.

Při modifikované radikální mastektomii chirurg odstraní prsní žlázy, axilární uzliny v podpaží, blánu pokrývající hrudní svaly, ale zachová velký prsní sval. Exenterace axilárních uzlin je obligátní výkon s kurativním záměrem a může poskytnout informaci o prognose. Pro úspěšnou exenteraci je požadavkem vyjmout minimálně 10 uzlin. Ty se musí velmi pečlivě histopatologicky vyšetřit, aby se odhalily případné mikrometastázy. Pacientky, které nemají žádné základní projevy onemocnění, mohou po 2 – 5-ti letech podstoupit rekonstrukční operaci.

Prostá mastektomie s disekcí axily je indikovaná u nádorů prsu pokročilého stadia III a IV. U žen s výskytem mutace genů BRCA1 a BRCA2 je řešením bilaterální mastektomie a ovariectomie. (Prausová, 2004; Abrahámová, 2000; 2009)

1.6.2. Radioterapie

Vychází z faktu, že buňky zhoubného nádoru mají obecně vyšší citlivost vůči záření, než výchozí zdravá tkáň. Cílem radioterapie je zničit nádorové buňky a zabránit jejich růstu pomocí vysoce energetického záření. Tuto terapii podstoupí více jak 80 % pacientek. Výhodou radioterapie je, že na rozdíl od chemoterapie, působí lokálně a nepoškozuje okolní zdravou tkáň. Zdrojem záření jsou přístroje, které využívají gama záření radioizotopů uzavřených v kontejnerech nebo vysokoenergetické záření X vyráběné v lineárních urychlovačích (Obr. 3). Kromě klasického zevního ozáření se používá také ozáření intersticiální – tzv. *brachyterapie*, kdy jsou zářiče v celkové anestezii aplikovány pomocí jehel do místa původního ložiska nádoru (obr. 4).

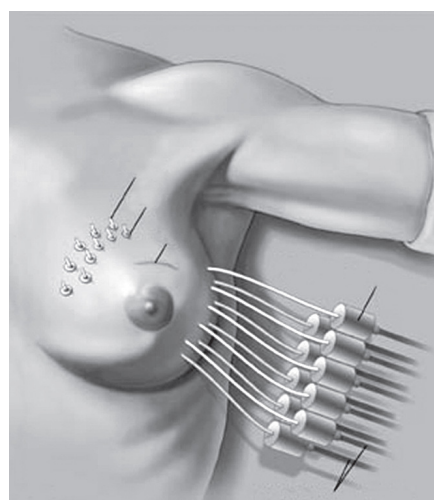
Radiační léčba je obvykle pooperační – *adjuvantní* a má za cíl zničit předpokládané zbylé nádorové buňky.

Rozsah ozařovaného objemu závisí na rozsahu onemocnění. V případě většího rozměru původního nádoru v prsu může být operační odstranění obtížné. Pak je možné provést předoperační ozáření prsu – *paliativní*, s cílem zmenšit rozsáhlý tumor. Dále je radioterapie indikována při léčbě metastáz (především do kostí, mozku, hrudní stěny) s cílem zastavit proces a odstranit bolest.

Samotné ozařování není nijak bolestivé. Ozařuje se obvykle pět dní v týdnu po dobu 4 - 6 týdnů, kdy je hlavním cílem snížit riziko recidiv, podílet se na zmenšení primárního tumoru a eventuálně tlumit obtíže, vyplývající z přítomnosti metastáz. (Prausová, 2004; Abrahámová, 2009; Chovanec, 2008)



Obr. 3: Lineární urychlovač (Prausová, 2004)



Obr. 4: Brachyterapie (Abrahámová, 2009)

1.6.3. Chemoterapie (chemická léčba)

Karcinom prsu je systémové onemocnění. V posledních letech se za nejpoužívanější a nejefektivnější léčbu karcinomu prsu považuje chemoterapie. Zatímco chirurgická a radiační léčba zasahují pouze lokálně, chemická léčba je metodou léčby systémové, kdy se používají léky (cytostatika) s prokázaným protinádorovým účinkem. Léky se užívají perorálně nebo intravenózně ve formě injekcí či infuzí, v definovaných cyklech. Jako každá jiná léčebná metoda, má i cytostatická terapie své vymezené indikace a řadu nežádoucích účinků. Cytostatika se prostřednictvím krevního oběhu dostávají do celého těla, kromě toho, že ničí nádorové buňky poškozují i všechny rychle se množící zdravé buňky v těle. Mezi nejčastější projevy patří poškození vlasových kořínek vedoucí k vypadávání vlasů, poškození sliznic a následné afty nebo časté průjmy. Účinných režimů cytostatických kombinací existuje celá řada a jsou vybírány na základě výsledků klinických studií. V systémové léčbě karcinomu prsu existují však tři základní indikační skupiny a to: adjuvantní, neoadjuvantní a paliativní. (Abrahámová, 2000; 2009)

Většinou se užívají polychemoterapeutické režimy kombinující několik cytostatik, u kterých byla prokázána dostatečná léčebná odpověď. Nejčastěji se používá kombinace antracyklinů, cyklofosfamidu, doxorubicinu a 5-fluorouracilu (5-FU). Zlepšení léčebné terapie bylo zhruba před deseti lety dosaženo zavedením nových látek – taxanů, gemcitabinu, kapecitabinu a vinorelbinu. V posledních době přicházejí na trh nová cytostatika jako larotaxel a alkaloid vinflunin. (Chovanec, 2008)

Adjuvantní chemoterapie je indikována do tří týdnů od chirurgického výkonu, u nemocných s nepříznivými prognostickými faktory a jejím cílem je likvidace zbytkové populace nádorových buněk, prodloužení beznádorového intervalu a celkové doby přežití.

Podání cytostatik před chirurgickým výkonem se označuje jako *neoadjuvantní chemoterapie*. Tento způsob podání je aplikován u žen s pokročilým, ale technicky operovatelným nádorem, s cílem zmenšit ho, usnadnit operovatelnost a umožnit provedení konzervativních chirurgických výkonů.

Nemocné s metastatickým karcinomem jsou inkurabilní a pro efektivní léčbu prozatím neexistuje žádný standardní postup. Cílem *paliativní chemoterapie*, která se užívá u VI. stadia karcinomu prsu, je i přes veškeré pokroky pouhé navození parciální remise, usnadnění a prodloužení života nemocné. (Chovanec, 2008; Abrahámová, 2009; Prausová, 2004)

1.6.4. Hormonální léčba

Hormonální léčba je stejně jako chemoterapie léčbou systémovou a poněkud rozdílnou u žen před a po menstruaci. Na rozdíl od chemoterapie má méně nežádoucích účinků, dobrou toleranci léčby a jako první přinesla znatelný efekt v paliativní terapii karcinomu prsu. Cílem hormonální terapie je ovlivnit proliferaci nádorových buněk extracelulárním podnětem. Účinek hormonů je vázán na přítomnost specifických buněčných receptorů. U karcinomu mammy se jedná o stanovení steroidních estrogenových (ER) a progesteronových (PgR) receptorů. Základním předpokladem hormonoterapie je přítomnost hormonálních receptorů v tumoru – tzv. pozitivní ER status. (Konopásek & Petruželka, 1997; Chovanec, 2008)

U žen před menopauzou se považuje za vhodnou *ablativní léčba*, která spočívá v zablokování funkce vaječnicků (ovarektomii) chirurgickou cestou (převážně laparoskopicky), radiací nebo medikamentózně pomocí analogů gonadoliberinů. U žen s pozitivními receptory je dosaženo celkové léčebné odpovědi až u 78 % případů. (Chovanec, 2008; Prausová, 2004)

V *adjuvantní léčbě* žen po menopauze, které mají ER pozitivní status, jsou lékem první linie antiestrogeny reprezentované tamoxifenem. Ten v hormonální léčbě karcinomu prsu zaujímá vedoucí postavení již několik desítek let. Účinek tamoxifenu spočívá ve vazbě na cytoplasmatický receptor buňky, čímž znemožní nitrobuněčnou vazbu estrogenů. Dále spočívá v inhibici proteinkinasy C, ve zvýšené produkci negativních růstových faktorů v útlumu pozitivních růstových faktorů a v indukci apoptosy. Léčba je kontinuální a dlouhodobá s doporučenou délkou podávání až pět let. (Chovanec, 2008; Prausová, 2004)

Ženy s vyřazenou funkcí vaječnicků mohou podstoupit *inhibiční léčbu* pomocí inhibitorů aromatas, které brzdí přeměnu androgenního testosteronu na estrogen. Používá se při paliativní léčbě v případech, kdy je vyčerpána léčba tamoxifenem a jeho další nasazení je vyloučeno. V současnosti jsou v terapii používány inhibitory jako anastrozol, letrozol (nesteroidní, reverzibilní blokátory aromatasy) a exemestan (steroidní, ireverzibilní blokátor aromatasy). K inhibiční terapii náleží také analoga gonadoliberinů (účinek spočívá v blokování sekrece FSH a LH v hypofýze a somatostatin. (Prausová, 2004; Chovanec, 2008)

1.6.5. Cílená molekulární biologická léčba

Současný výzkum se posunul na molekulární a intramolekulární úroveň a jeho cílem je identifikovat zásadní nitrobuňkové procesy, které způsobují maligní vývoj dříve normálních buněk. Principem cílené (terčové) biologické léčby je přesné popsání těchto procesů, nalezení cílových struktur a jejich následné terapeutické ovlivnění. (Petruželka, 2007; 2009) Jelikož lapatinib a řada jiných monoklonálních protilátek či tyrosinkinasových inhibitorů jsou základními nástroji biologické léčby, tak bych ji ráda ve své diplomové práci, stejně jako lapatinibu věnovala samostatnou kapitolu.

1.6.6. Dispenzarizace

Pacientky, které ukončily primární léčbu karcinomu prsu a jsou v remisi, je nutné pravidelně sledovat. Dispenzarizace patří do sféry terciární prevence, což znamená sledování nemocných s vyléčeným nádorovým onemocněním, s cílem odhalit včas recidivu onemocnění. Karcinom prsu může na rozdíl od jiných malignit recidivovat i po dlouholetém období (let a více) remise. Z těchto důvodů je velice problematické označit pacientku za „vyléčenou“. Obecná základní doporučení pro dispenzarizaci jsou:

- Pravidelná klinická vyšetření se provádějí v průběhu prvních třech let od ukončení primární léčby v čtyřměsíčních intervalech. Další tři roky v půlročních intervalech. Následně se pokračuje v ročních intervalech.
- Mamografie se provádí jednou ročně.
- Specifická vyšetření (rtg., sono, scintigrafie, apod.) jsou indikována po ukončení adjuvantní chemoterapie na základě specifické indikace. (Chovanec, 2008)

2. Biologická léčba karcinomu prsu

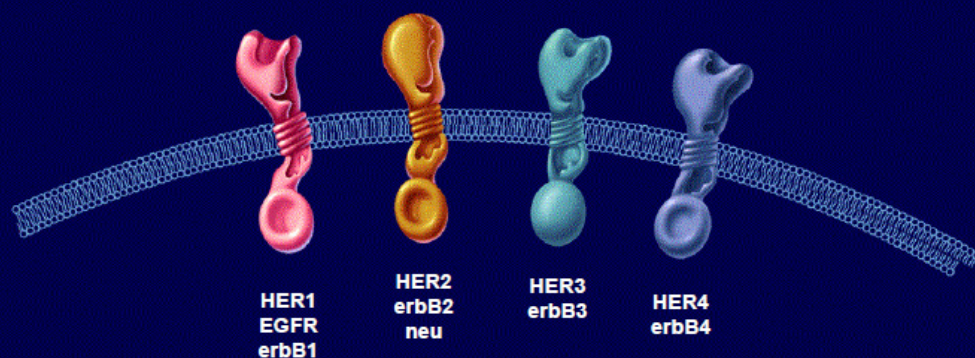
Během posledních desetiletí došlo k výraznému posunu v léčbě karcinomu prsu. Jedná se o několik na sobě nezávislých faktorů: změny v chápání biologického chování karcinomu prsu, technicky dokonalejší přístroje detekující tumor již v jeho časných stádiích, prohlubující se mezioborová spolupráce, rostoucí důraz na systémovou léčbu a rozvoj molekulární biologie. V léčbě tohoto zhoubného onemocnění se používají všechny léčebné modalities typické pro nádorová onemocnění. Poslední dobou však byly do léčebných standardů zapracovány i metody cílené biologické léčby, kdy současná onkologická léčba vychází z konceptu „léčby šité na míru“ (správná léčba pro správného pacienta na správném místě). Jak už bylo zmíněno dříve, předpokladem účinnosti je přesná identifikace terčové struktury na molekulární úrovni. Tato léčba už není jen předmětem výzkumu, ale již realitou v klinické praxi, kdy se standardně využívá preparátů na bázi nízkomolekulárních látek, jež blokují tyrosinkinasy a dále účinku monoklonálních protilátek. (Petruželka, 2007)

Přínos nově vyvinuté biologické léčby spočívá v tom, že jsou selektivně napadány tumorózní buňky, zatímco zdravé buňky jsou ušetřeny. Rozdíl je tedy v mechanismu účinku a samozřejmě i v profilu toxicity. Bioregulační léčba je ve srovnání s konvenční chemoterapií spojena s odlišným projevem nežádoucích účinků, které nelze podcenit a její aplikace patří výhradně do rukou zkušeného onkologa.

Rozvoj cílené biologické léčby navazuje na zhruba dvě desetiletí intenzivní vědecké práce zabývající se výzkumem molekulárních mechanismů nádorových buněk – jedná se především o inhibice růstových faktorů, membránových a cytoplasmatických receptorů, inhibici transdukční kaskády, zablokování angiogeneze nádorových buněk, modulaci apoptosy a potlačení mechanismů týkajících se zakládání vzdálených metastáz. (Chovanec & Dostálová, 2009; Klener, 2007)

Lidský genom obsahuje několik set kinasových genů, které ovlivňují produkci tyrosinkinasy. Ty se dělí na receptorové a nereceptorové. (Klener, 2007) Nejdůležitější signální dráha karcinomu prsu je aktivována prostřednictvím rodin receptorů pro epidermální růstové faktory (EGFR), do které patří transmembránové glykoproteinové receptory označované HER-1 až HER-4 (Obr. 5). Receptory HER náleží k tyrosinkinasovým receptorům. Prvním popsáním receptorem této skupiny byl receptor pro epidermální růstový faktor označovaný jako EGFR (HER-1, erbB-1). Dalšími receptory jsou HER-2/neu nebo erbB-2, HER-3 (erbB-3) a HER-4 (erbB-4). U karcinomu prsu má největší význam receptor HER-2. (Cosimo & Baselga, 2008; Petruželka, 2009)

Receptory skupiny HER



Na povrchu buňky je řada různých receptorů. Patří mezi ně i čtyři vzájemně „spolupracující“ receptory rodiny HER (Human Epidermal Receptor)

Obr. 5: Skupina transmembránových receptorů HER. (Cinek & Filip, 2007b)

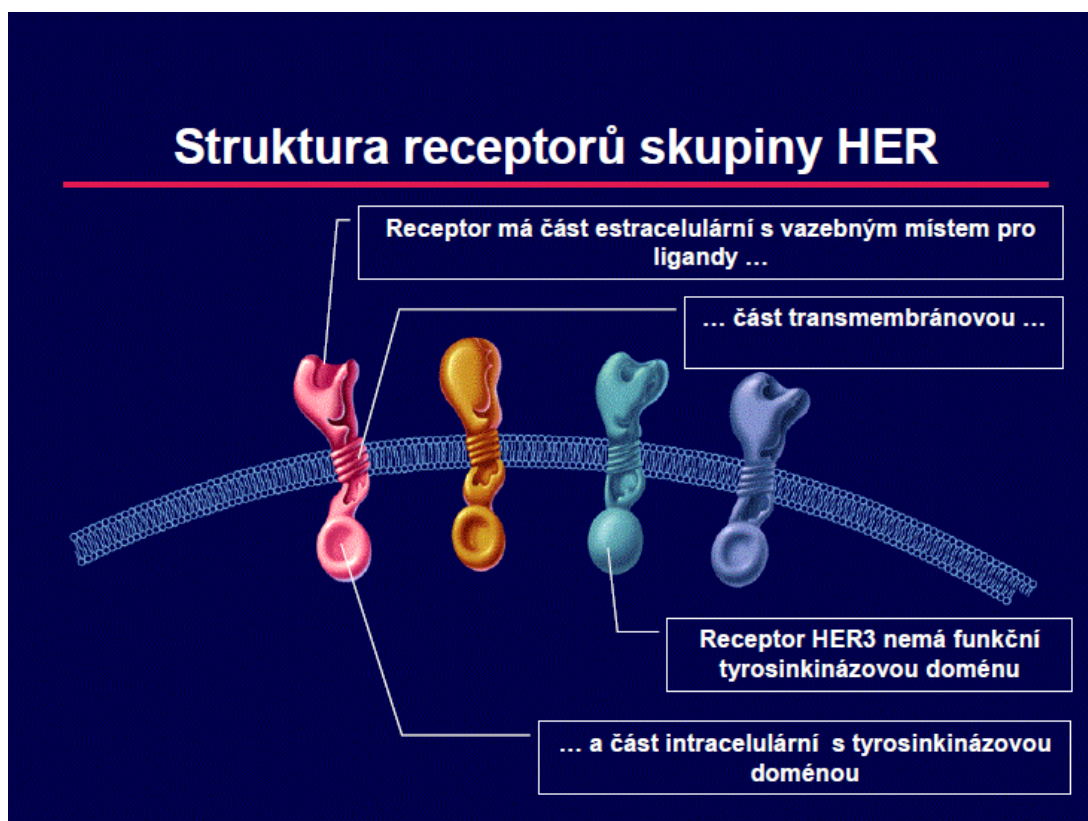
2.1. Membránový receptor HER-2/neu

Pro přenos maligního signálu má pro nádorové buňky karcinomu prsu nejdůležitější význam receptor Her-2/neu, který hraje klíčovou roli na začátku signální dráhy, kde zprostředkovává přenos extracelulárního podnětu do jádra buňky. Fyziologické pochody vedoucí k aktivaci receptoru i jeho celá signální kaskáda jsou dnes velice dobře prostudovány. (Cinek & Filip, 2007b) Před více než dvaceti lety byla popsána nadměrná exprese HER-2/neu receptoru (overexprese HER-2 proteinu či amplifikace Her-2 genu), která se vyskytuje u 15 - 25 % invazivních karcinomů prsu. (Walker & Dearing, 1999) Zvýšená Her-2/neu signalizace při nadbytku receptoru v buněčné membráně je zapojena do složitých pochodů kancerogeneze a je zodpovědná za vytvoření maligního fenotypu nádorové buňky s agresivnějším biologickým chováním a špatnou prognosou. Pacientky jsou více ohroženy časným relapsem a generalizací choroby. Přesné určení statusu tyrosinkinasového receptoru Her/2-neu a aktivity PgR, ER receptorů v buňkách invazivního karcinomu prsu je nezbytné pro stanovení prognosy pacientky a volbu vhodné terapie. (Cinek & Filip, 2007b)

2.1.1. Struktura a funkce receptoru

Receptor HER-2/neu je transmembránový glykoprotein a je produktem genu c-erb-B2. Má svoji vnitřní tyrosinkasovou aktivitu a jeho molekulární hmotnost je 185 kDa. Transmembránové HER receptory po navázání ligandu na extracelulární doménu, dimerizaci receptoru a aktivaci tyrosinkinasy spouští složitou signální kaskádu.

Her-2/neu receptor, stejně jako zbytek skupiny HER receptorů, se skládá ze tří částí: extracelulární, transmembránovou a intracelulární (Obr. 6). Extracelulární doména (na N konci) se skládá z 632 aminokyselin a jako pro jedinou z celé rodiny HER receptorů pro ni zatím nebyl identifikován známý ligand, přestože vykazuje výraznou strukturální podobu s HER-1. Hydrofóbní transmembránová část je složená z 22aminokyselin a zajišťuje ukotvení receptoru k buněčné membráně. Intracelulární doména (C-konec), tvořená 580 aminokyselinami, je zodpovědná za tyrosinkasovou aktivitu a další regulační funkce. (Rojo et al., 2008; Mass, 2004; Cinek & Filip, 2007b)



Obr. 6: Každý HER receptor má tři domény - extracelulární (váže ligand), transmembránovou (kotví receptor v buněčné membráně) a intracelulární (aktivuje enzym tyrosinkasou). (Cinek & Filip, 2007b)

Za normálního fyziologického stavu jsou receptory rodiny HER zodpovědné za plynulou obnovu epiteliální tkáně. Každý z receptorů HER1-HER4 je v zásadě inaktivním monomerem, který se stává dimerem v odpovědi na navázání ligandu, nejčastěji růstového faktoru. Pokud se jedná o receptor stejného typu (HER-1/HER-1), mluvíme o homodimerizaci. Daleko častěji však dochází k heterodimerizaci - navázání jiného receptoru (HER-1/HER-2). Teprve tento dimerizační proces má za následek aktivaci receptoru a autofosforylaci tyrosinkinasy, která poté spouští kaskádu metabolických pochodů tvořících komplexní signální dráhu přenášející extracelulární podnět do jádra buňky. Zde přenesený signál modifikuje genovou kontrolu a proteinovou transkripci, což ve svém důsledku ovlivňuje klíčové buněčné regulační procesy, jako jsou diferenciaci, adheze, růst, migrace a apoptosa. Porušená dysregulovaná receptorová funkce a změny v signálních kaskádách mohou vyústit v buněčnou transformaci a následný maligní zvrát. V intracelulárním přenosu signálu, vycházejících z HER receptorů a směřujících do jádra buňky, jsou nejčastěji zapojeny dráhy Ras/MAPK a PI3/Akt. (Cosimo & Baselga, 2008; Rojo et al., 2008; Cinek & Filip, 2007b)

2.1.2. Receptor v tumorech

Receptor HER2/neu vykazuje abnormální nebo zvýšenou expresi v mnoha typech nádorů, což svědčí o jeho zapojení v tumorigenezi. Jeho nadměrná exprese koreluje se stadiem, progresí nemoci, přežitím a odpovědí na léčbu. V nádorových buňkách byla zjištěna dysregulace signální kaskády, kde zvýšená exprese HER-2/neu (karcinom prsu) nebo HER-1 (karcinom plic) poskytuje buňkám růstovou výhodu. Bylo prokázáno, že overexprese HER-2/neu pozorovaná u karcinomu prsu a vaječnicků aktivuje PI3/Akt cestu „přežití“, čímž upřednostňuje buněčnou proliferaci inhibicí apoptosy. Signál „přežití“ je za normálního stavu spárován s aktivací další tzv. proliferační dráhy Ras/MAPK. Zvýšená exprese v nádorech proto zvyšuje a prodlužuje signalizaci prostřednictvím obou těchto drah. Tím pádem je umožněn posun od apoptosy k proliferaci a přežití, což potvrzuje spojení HER-2/neu receptoru s maligním fenotypem. (Mass, 2004; Cinek & Filip, 2007b)

2.1.3. Možnosti stanovení receptoru HER-2/neu a genu *cerbB-2*

Zvýšená exprese receptoru HER-2/neu je téměř vždy důsledkem amplifikace příslušného protoonkogenu *c-erb-B-2*. V dnešní době můžeme zcela standardními vyšetřovacími metodami identifikovat počet kopií genu *c-erb-B-2* v jádru buňky nebo množství jeho produktu - receptoru HER-2/neu v buněčné membráně (tzv. membránová pozitivita). (Cinek & Filip, 2007b)

Počet kopií genu se vyšetřuje metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) nebo méně užívanou chromogenní *in situ* hybridizací (CISH). Stanovení exprese receptoru v buněčné membráně se provádí imunohistochemicky (IHC). Každá z těchto metod má své výhody i nevýhody.

Imunohistochemie obecně využívá afinitu antigenu a specifické protilátky a detekuje jejich vzájemnou vazbu. Při imunohistochemickém vyšetření invazivních karcinomů prsu se stanovuje stupeň Her-2/neu proteinové exprese v parafínových tkáňových vzorcích použitím protilátek, jež se vážou na HER-2/neu exprimovaný na buněčných membránách. Toto vyšetření je semikvantitativní a výsledek se udává jako odstupňované skóre od 0 do 3+ pomocí metodiky DakoCytomation. Skóre 0 a 1+ znamená negativitu, skóre 2+ nejistotu (hraniční pozitivitu, je nutné doplnit metodou FISH) a skóre 3 pozitivitu.

Fluorescenční *in situ* hybridizace zahrnuje hodnocení DNA v metafázických nebo interfázických buňkách za použití značených DNA sond a počítání mikroskopických signálů. Použití různých fotoreaktivních barviv umožňuje obarvit různé zkoumané chromozomální sekvence a simultánní analýzu mnohačetných sekvencí. FISH může být použita k detekci mnoha různých typů rozmanitých chromosomálních a genových abnormalit, abnormalit počtu, translokací, delecí a přesmyků. (Cinek & Filip, 2007b; Burris et al., 2005; Rojo et al., 2008)

2.1.4. Sérový HER-2

Extracelulární doména (ECD) receptoru Her-2/neu prochází proteolytickým štěpením metaloproteasami a je odlučována do krve jako cirkulující antigen. HER-2/neu ECD je glykoprotein o hmotnosti 97-115 kDa a někdy je označena jako p105. Sérový HER-2/neu je cirkulující onkoprotein a může být detekován pomocí ELISA kitu, jak v séru zdravých, tak u lidí s různými solidními tumory.

Stanovení hladin sérového HER-2/neu poskytuje prognostické a prediktivní informace a může být využito pro monitorování pacientek s metastatickým onemocněním. (Lüftner et al., 2003; Šimčíková et al., 2005)

2.2. Cílená biologická léčba v klinické praxi

Karcinom prsu je morfologicky a geneticky velmi heterogenní onemocnění. Tradiční dělení na podskupiny podle klinicko-patologických parametrů jen částečně odráží klinickou diverzitu tohoto onemocnění. Charakteristika každého nádoru na molekulární úrovni se postupně stává základem diagnosticko-terapeutického procesu. Molekulární profil je základem pro fenotypovou charakteristiku a molekulární klasifikace nádorů umožní rozlišit nádory stejného histologického obrazu. (Petruželka, 2009)

Současná molekulární klasifikace je založena na dělení na jednotlivé podtypy podle stupně exprese estrogenových, progesteronových receptorů a exprese onkoproteinu receptoru skupiny epidermálních růstových faktorů HER-2/neu. Identifikace prognostického významu receptoru HER-2/neu je známá od druhé poloviny osmdesátých let minulého století a hormonální receptory byly objeveny ještě dříve. Pomocí tří základních molekulárních markerů (ER, PgR, HER-2) je možné definovat čtyři podtypy karcinomu prsu s rozdílnými terapeutickými přístupy:

- Hormonálně dependentní HER2-independentní (HR+/HER2-)
- Hormonálně dependentní HER2-dependentní (HR+/HER2+)
- Hormonálně independentní HER2-dependentní (ER-/PgR-/HER2+)
- Hormonálně independentní HER2-independentní (ER-/PgR-/HER2-, „triple“ negativní)

V tabulce jsou uvedeny léčebné možnosti u jednotlivých podskupin při metastazujícím onemocnění, které budou využity v blízké budoucnosti (Tab. 1). (Petruželka, 2007; 2009; Pustzai et al., 2006; Petruželka & Petruželková 2008)

Tab. 1: Perspektivy léčebných možností u jednotlivých podskupin karcinomu prsu

Podtyp	Molekulární charakteristika	Léčebné možnosti	Bioterapie
Hormonálně dependentní HER2-independentní	ER+/PgR+/HER2- ER+/PgR-/HER2- ER-/PgR+/HER2-	HT CT BIOCT, BIOHT	Bevacizumab
Hormonálně dependentní HER2-dependentní	ER+/PgR+/HER2- ER+/PgR-/HER2- ER-/PgR+/HER2-	HT CT BIOCT	Trastuzumab Lapatinib Bevacizumab
Hormonálně independentní HER2-dependentní	ER-/PgR-/HER2+	BIOCT BIO	Trastuzumab Lapatinib Bevacizumab
Hormonálně independentní HER2-independentní	ER-/PgR-/HER2- („triple negativí“)	CT BIOCT	Bevacizumab
Vysvětlivky: HT – hormonální terapie; CT – chemoterapie; BIOCT – biochemoterapie; BIO - bioterapie			

Současná éra cílené onkologické léčby byla ve své podstatě započata po objevu hormonálních receptorů a cíleného klinického využití tamoxifenu. (Petruželka, 2009) Hlubší poznání molekulárních principů buněčné komunikace a nitrobuněčného přenosu signálu přispělo k rozvoji cílené molekulární léčby využívající přímého zásahu klíčových terčových struktur nádorové buňky. První klinické použití trastuzumabu (monoklonální protilátky proti Her-2) v kombinaci s chemoterapií u metastazujícího karcinomu prsu započalo éru bioregulační nehormonální léčby u pacientek s karcinomem prsu. (Slamon et al., 2001; Petruželka & Petruželková 2008).

Cílená molekulární léčba se stala významnou součástí komplexní onkologické léčby karcinomu prsu. Trastuzumab je v současné době indikován jak pro léčbu metastazujícího onemocnění, tak pro adjuvantní léčbu HER-2 dependentních nádorů. Nově schválenými léčivými pro karcinom prsu jsou bevacizuman, monoklonální protilátka proti vaskulárnímu endotelovému faktoru (VEGF), a lapatinib, selektivní duální inhibitor tyrosinkinás. (Medina & Goodin, 2008; Chen, 2004; Petruželka, 2009)

2.2.1. Trastuzumab (Herceptin®; TDM1)

Trastuzumab je rekombinantní monoklonální protilátka, která působí přímo proti extracelulární doméně receptoru Her-2. Na trhu je tento preparát od roku 1998 a v současné době je jeho použití standardem u paliativní i adjuvantní léčby karcinomu prsu. Trastuzumab je vždy indikován u nemocných s generalizovaným HER-2 pozitivním nádorem prsu (FISH pozitivní, IHC 3+). U žen, které nevykazují zvýšenou overexpresi HER-2 receptoru, není léčba účinná. Proto je nezbytné před započítím léčby stanovit expresi Her-2 receptoru nebo amplifikaci genu c-erbB-2. (Chovanec & Dostálová, 2009; Petruželka, 2009)

Mechanismus účinku trastuzumabu spočívá ve vazbě na extracelulární doménu receptoru HER2. Tato interakce inhibuje přenos signálu příslušné dostředivé dráhy a vede k inhibici buněčné proliferace. Současně vazba protilátky na povrch buňky usnadní rozpoznání buňky imunokompetentními buňkami (makrofágy, cytotoxické NK buňky). Z těchto cytotoxických buněk se uvolňují látky stimulující indukci apoptózy (perforin a granzym). (Shepard et al., 19991; Petruželka, 2009)

Trastuzumab je používán v monoterapii nebo v kombinaci s chemoterapií, eventuálně s inhibitory aromatáz (hormonální léčba). Při monoterapii v léčbě metastazujícího onemocnění bylo dosaženo až 35% léčebné odpovědi. Při kombinované terapii byla odpověď signifikantně vyšší, okolo 50 - 70 %. Z výsledků klinických studií vyšlo najevo, že trastuzumab prodlužuje dobu přežívání pacientek až o 25 %. (Vogel et al., 2002)

Kombinovaná léčebná dávka je podávána ve 21 denních cyklech. Doporučená nasazovací (startovací) dávka je 8 mg/kg intravenózně, pokračuje se v udržovací dávce 6mg/kg. Doba léčby trvá obvykle 52 týdnů, eventuálně se ukončuje při zjištění regrese nebo nesnášenlivosti preparátu. Cena adjuvantní terapie trastuzumabem po dobu jednoho roku ve standardní dávce (6mg/kg) se v současnosti pohybuje okolo 1 000 000 korun. (Chovanec & Dostálová, 2009; Zítková, 2008)

Po stránce nežádoucích účinků je tento lék celkem dobře tolerován. Jelikož se jedná o cizorodou bílkovinu mohou se vyskytovat alergické až anafylaktické reakce. Klíčovou limitací trastuzumabu je krátkodobá až dlouhodobá kardiotoxicita, která se vyskytuje asi u 4 % pacientů léčených adjuvantně tímto léčivem. Další významou limitací je neschopnost pronikat hematoencefalickou bariérou a působit na mozkové metastáze. (Azim et al., 2009; Chovanec & Dostálová, 2009)

2.2.2. Bevacizumab (Avastin®)

Velkým přínosem v léčbě nádorových onemocnění jsou léky zaměřené nikoliv na nádorovou buňku, ale na cévní síť.

Počátkem sedmdesátých let minulého století formuloval Juda Folkman teorii nádorové angiogeneze, ve které hraje významnou roli vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Angiogeneze (novotvorba cév) je podmínkou růstu nádorů. Pokud nádor přesáhne velikost 1 mm, potřebuje ke své výživě cévní zásobení. Mnoho druhů tumorů produkuje VEGF, který podporuje proliferaci endotelových buněk a indukuje vrůstání nových cév do nádoru. Bevacizumab je rekombinovaná humanizovaná monoklonální protilátka proti VEGF. Neutralizací VEGF pomocí bevacizumabu dochází k zablokování angiogeneze a zástavě nádorového růstu. (Zítková, 2008; Chovanec & Dostálová, 2009)

Jeho základní indikací byla paliativní léčba kolorektálního karcinomu, postupně se jeho indikace rozšířila i na jiné solidní tumory (karcinom ledvin a prsu). Kombinace bevacizumabu a paclitaxelu u pacientek s metastatickým karcinomem prsu významně zvýšila léčebnou odpověď a dobu progresu onemocnění ze 6 na 12 měsíců.

Hlavními riziky u podávání bevacizumabu jsou trombotické komplikace, hypertenze, proteinurie, zhoršené hojení ran a krvácení. Pro riziko krvácení do mozku je kontraindikován u pacientů s neléčenými metastázami.

Přestože tento lék prokázal významný efekt v léčbě metastatického onemocnění prsu, není možnost ho indikovat u pacientek bez individuální žádosti u příslušné pojišťovny, prozatím není hrazen ze zdravotního pojištění. (Chen, 2004; Chovanec & Dostálová, 2009; Zítková, 2008)

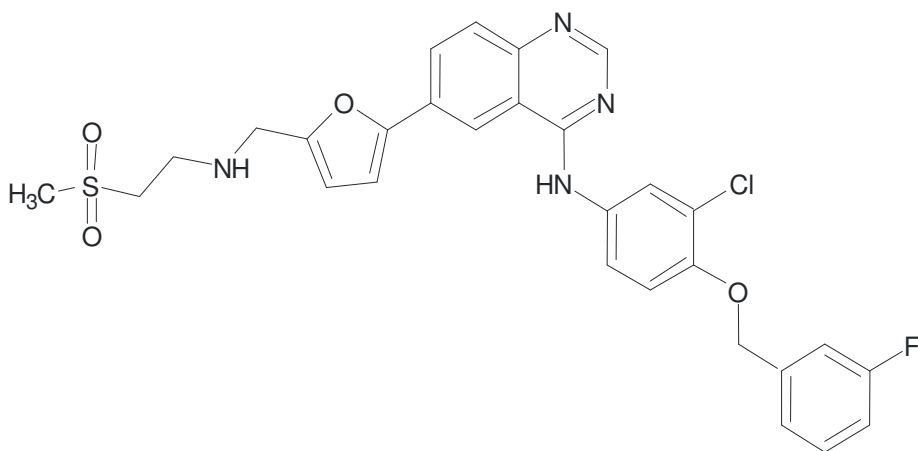
2.2.3. Lapatinib (Tykerb; GW572016)

Stanovení lapatinibu u nemocných s karcinomem prsu je hlavní náplní mé diplomové práce, proto mu bude věnována celá následující kapitola.

3. Lapatinib

Lapatinib je nízkomolekulární látka s duálním mechanismem účinku, která cíleně inhibuje receptory tyrosinkinasy ErbB-1 (EGFR) a ErbB-2 (HER2). Jedná se o perorální léčivo, zasahující na úrovni intracelulární domény receptoru. Lapatinib v klinických studiích prokázal účinnost v léčbě lokálně pokročilého nebo metastatického karcinomu prsu s overexpresí HER2 u žen, které byly předlčeny antracykliny, taxany, a trastuzumabem. V současnosti v kombinaci s kapecitabinem poskytuje nejlepší známou léčbou odpověď. Do klinické praxe byl proto zaveden v roce 2009. Ve studiích in vitro bylo potvrzeno, že lapatinib působí inhibicí nádorového růstu (až 94 %) a indukci apoptosy v buněčných liniích různých nádorů (karcinomy ORL a orofaciální oblasti, plic, prsu, žaludku a ovarií). Je zařazen mezi cytostatika (ATC kód L01XE07). (Medina & Goodin, 2008; Petruželka & Petruželková, 2008)

Lapatinib se vyskytuje se jako sůl – monohydrát ditosylátu (N-(3-chloro-4-[[3-fluorofenyl)methyl]oxy]fenyl)-6-[5-((2 (methylsulfonyl)ethyl)amino)methyl)-2-furanyl]-4chinazolinaminbis(4-methylbenzensulfonát) monohydrát, obr. 7). (Medina & Goodin, 2008) Je to pevná žlutá látka rozpustná ve vodě a v kyselině chlorovodíkové. (Petráková & Demlová, 2008)



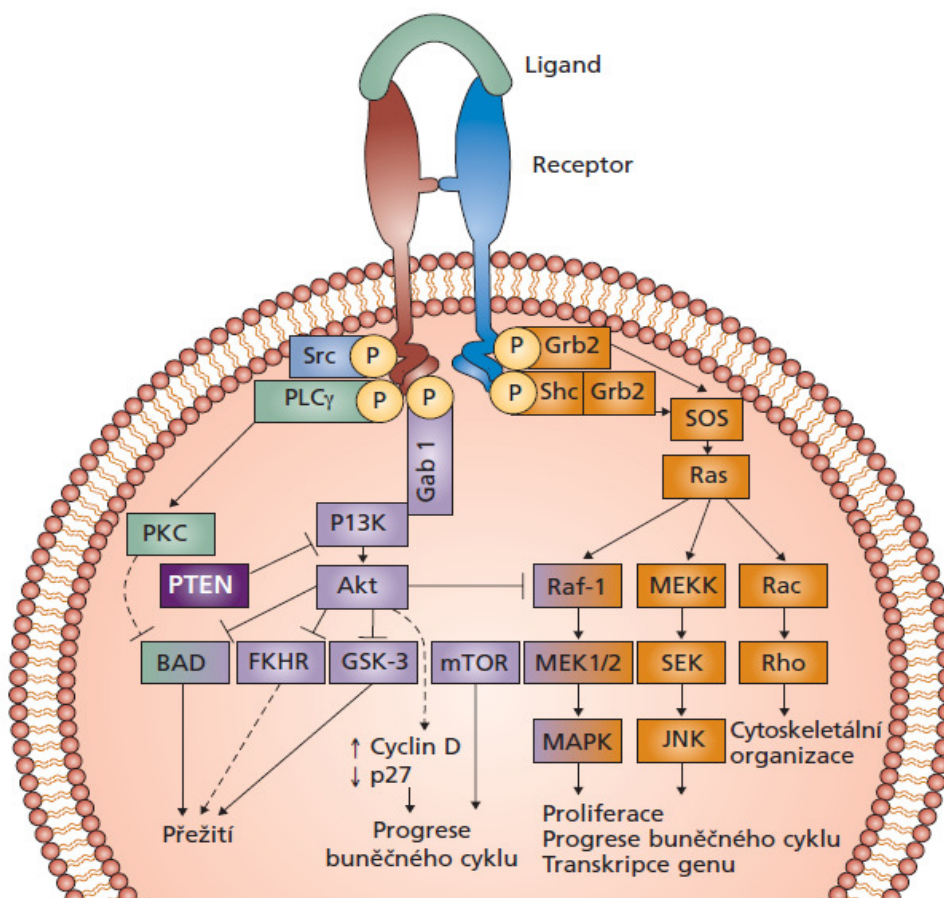
Obr. 7: Struktura lapatinib ditosylátu

3.1. Mechanismus účinku

Lapatinib patří do skupiny inhibitorů tyrosinkinasy (TKI), nízkomolekulárních látek, které zabraňují fosforylaci fyzikální interakcí s intracelulární tyrosinkinaseovou doménou. Tento způsob inhibice je v cílené biologické léčbě nejčastěji využíván. Byla připravena celá řada strukturně odlišných TKI. Velmi uspokojujivé výsledky přinesly v klinických

studiích chinazolinové deriváty - erlotinib, gefitinib a duální blokátor lapatinib. (Petruželka & Petruželková, 2008)

Tyrosinkinasový receptor se skládá z extracelulární ligand vázající domény, transmembránové a intracelulární cytoplasmatické katalytické nebo proteinové TKI domény. Receptory nejsou fixovány na jednom místě plasmatické membrány. Jak už bylo zmíněno dříve, navázáním ligandu na extracelulární doménu začíná proces dimerizace (homo nebo heterodimerizace). Poté je aktivována intracelulární cytoplasmatická TK doména a dojde k autofosforylaci. Signální protein je uvnitř buňky aktivován navázáním fosforylové skupiny a inaktivován defosforylací (obr. 8). (Rusnak, 2001; Petruželka & Petruželková, 2008)

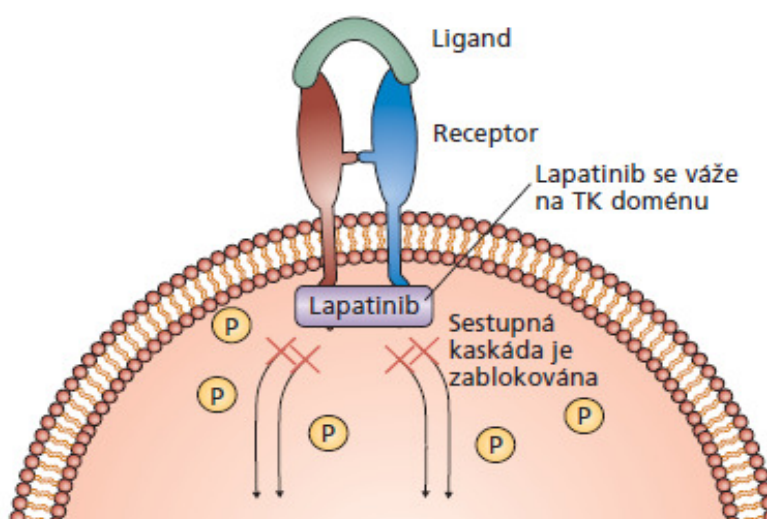


Obr. 8: EGFR signální kaskáda počínající navázáním ligandu a aktivací receptorové tyrosinkinasy. (Petruželka & Petruželková, 2008)

Lapatinib účinkuje intracelulárně přímo na TK doménu. Reverzibilně se váže na cytoplasmatické ATP-vazebné místo tyrosinkinasové domény obou receptorů. Blokuje fosforylaci a aktivaci receptoru, ovlivňuje tak dostředivý přenos signálu (zvláště simultánní aktivaci kináz závislých na extracelulární signalizaci – (ERK)-1/2 a (PI3/Akt), včetně těch signálů, které vznikají v mutovaných receptorech, jež pro vznik signálu

nepotřebují vazbu ligandu. Celá signální kaskáda za normálního stavu aktivuje genovou transkripci a vede k aktivaci buněčného cyklu. Blokádou signálních drah dojde k zástavě buněčného cyklu, apoptose, inhibici angiogeneze, nádorového růstu a metastazování (obr. 9). Terčové struktury pro lapatinib jsou receptory ErbB-1 (EGFR, HER1) a ErbB-2 (HER2) náležící do rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (EGFR). Stejně jako overexprese HER2, může být i zvýšená exprese HER1 negativním prognostickým faktorem. (Moy & Goss, 2006; Nelson & Dolder, 2006 Walker & Dearing, 1999)

Nízkomolekulární TKI mají ve srovnání s monoklonálními protilátkami řadu výhod. V případě lapatinibu: duálně inhibuje jak receptor ErbB-1, tak ErbB-2, aktivně zasahuje při výskytu mutované „zanořené“ formy receptoru ErbB-2 (p95ErbB2), který postrádá extracelulární doménu, není závislý na koncentraci ligandu a potenciálně prostupuje hematoencefalickou bariérou. (Moy & Goss, 2006; Xia et al., 2004; Abrahámová & Demlová , 2008)



Obr. 9: Vazba lapatinibu na tyrosinkinasovou doménu kompetitivně blokuje vazbu ATP s následným přerušením dostředivé signální kaskády. (Petruželka & Petruželková, 2008)

3.2. Farmakologické vlastnosti

Absolutní biologická dostupnost lapatinibu po perorálním podání není zcela známa (v klin. studiích byla stanovena v rozmezí 26 – 63 %). Absorpce po perorálním podání je inkompletní, s poměrně vysokou variabilitou a je ovlivněna příjmem potravy.

Lapatinib se váže na plasmatické bílkoviny, především na albumin a na α_1 - kyselý glykoprotein. Poté je primárně metabolizován v játrech. Zde podléhá extenzivní cestou oxidační přeměně, za účasti mikrosomálního systému cytochromu

P-450 (CYP) 3A4, 3A5, 2C19 a 2C8. Lapatinib je převážně metabolizován pomocí CYP 3A4, dále CYP 3A5 a v menším rozsahu CYP 2C19 a 2C8 za vzniku metabolitu GW690006 a dalších 8 minoritních metabolitů. GW690006 je následně glukuronidován za účasti UGTs (uridindifosfát- glukuronosyltransferázy), respektive jejími subtypy UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A8, 1A9 a 1A10, a vyloučen žlučí do střeva. Primárně je Lapatinib a jeho další metabolity vylučován do stolice, sekundárně do moče (2 %). (Koch et al., 2009; Medina & Goodin, 2008; Erp et al., 2009; Petráková & Demlová, 2008)

Plasmatické koncentrace a tkáňové distribuce lapatinibu byly zkoumány za pomoci radioaktivně značeného ¹⁴C-lapatinibu po jednorázovém i opakovaném perorálním podání. Maximálních plasmatických koncentrací bylo dosaženo za 4 hodiny (rozmezí 3 - 6 hodin) po jedné dávce (1250 mg) a byly v rozmezí 1,57 - 3,77 µg/ml. Poločas eliminace byl stanoven okolo 14-ti hodin. Při opakovaném podávání bylo ustáleného stavu dosaženo za 6 - 7 dní, z čehož lze vyvodit o něco delší biologický poločas (~ 24 hodin). Studie u zdravých dobrovolníků potvrdily, že současné podání potravy (zejména s vyšším obsahem tuků) zvyšuje absorpci lapatinibu. Maximální plasmatické koncentrace byly až o 60 % vyšší. (Medina & Goodin, 2008; Reddy et al., 2007; Erp et al., 2009; Petráková & Demlová, 2008; Koch et al., 2009)

3.3. Terapeutická účinnost – klinické studie

Lapatinib byl zaveden do klinické praxe na základě výsledků klinických studií, především mezinárodní randomizované studie fáze III, která prokázala přínos kombinované léčby lapatinibem s kapecitabinem proti kabecitabinu samotnému u HER-2 pozitivních pokročilých nádorů prsu, u kterých selhala předchozí terapie. (Geyer et al., 2008)

- **Klinické studie fáze I.**

Bezpečnost podání lapatinibu a maximální snášená dávka byly hodnoceny ve studiích I. fáze (EGF1003). U 81 silně předléčených pacientek s metastazujícím karcinomem prsu nezávislých na expresi EGFR a HER2 byla zjišťována maximální snášená dávka. Lapatinib byl podáván kontinuálně jednou (v rozmezí 175 - 1800 mg) nebo dvakrát (dávky 500, 750 a 900 mg) denně. Celkem 64 nemocných bylo hodnotitelných z hlediska nežádoucích účinků a stupně léčebné odpovědi. Při dávkování jedenkrát denně byly dobře snášeny všechny užití dávky, při dávkování dvakrát denně byly lépe snášeny nižší dávky. Z výsledků studie: nebyly pozorovány

výrazné nežádoucí účinky (stupně 4), u jedné pacientky byl dosaženo kompletní léčebné odpovědi (complete response – CR) a u 22 byla zaznamenána stabilizace onemocnění. (Pandite et al., 2004; Petruželka & Petruželková)

Ve studii EGF10004 bylo zařazeno 67 nemocných s metastazujícími solidními tumory se zvýšenou expresí HER1 a /nebo HER2. Nemocným byly indikovány dávky v rozmezí 500 - 1600 mg jedenkrát denně a byly dobře snášeny. Klinická účinnost byla pozorována při dávkování 650 - 1600 mg denně. Nejčastějšími nežádoucími účinky byly průjem (42 %) a kožní změny (31 %). Nebyla pozorována pneumonie ani projevy kardiotoxicity, u 4 nemocných se vyskytly nežádoucí účinky stupně 3 spojené s gastrointestinální komplikací. U 24 nemocných se solidními tumory byla zaznamenána stabilizace choroby, z nich 10 užívalo lapatinib po dobu nejméně 6 měsíců. U dalších 4 nemocných bylo dosaženo parciální objektivní léčebné odpovědi (partial response – PR). Při analýze dávky a koncentrace bylo zjištěno, že většina respondentů užívala dávku 1200mg denně a plasmatické koncentrace se pohybovaly v rozmezí 0,3 - 0,6 µg/ml. (Burriss et al., 2005; Petruželka & Petruželková, 2008)

- **Klinické studie II. fáze**

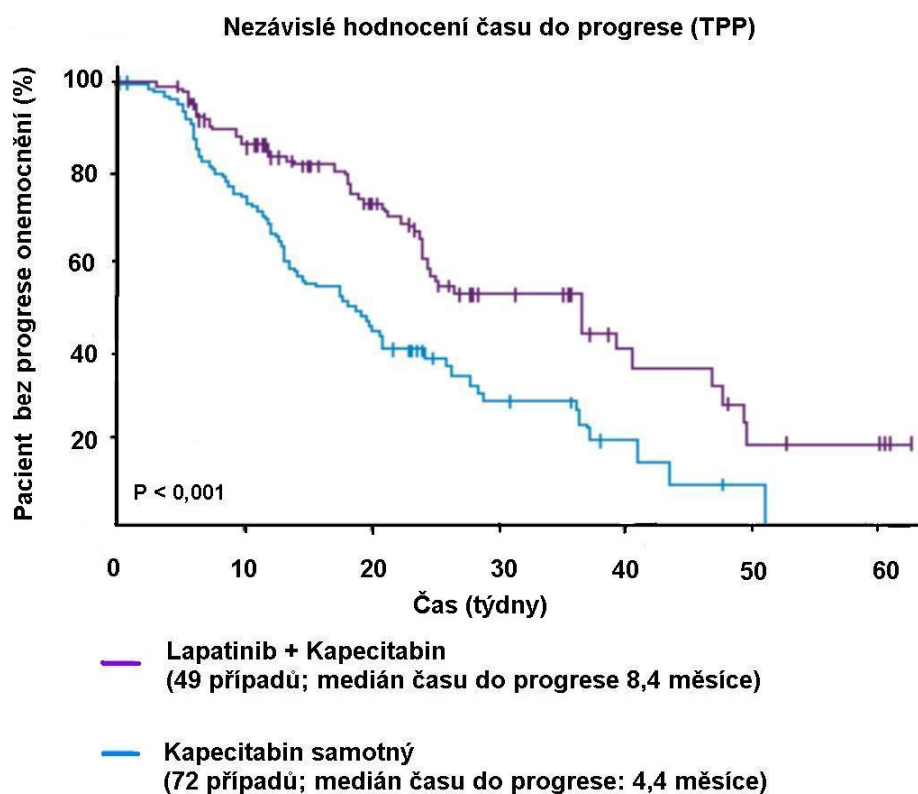
Ve dvou klinických studiích II. fáze byla hodnocena účinnost lapatinibu v dávce 1500 mg/ den u HER2-dependentních metastazujících karcinomů prsu progradujících při léčbě trastuzumabem. Do první fáze této studie bylo zařazeno 78 nemocných, u kterých bylo zaznamenáno 8 % objektivních léčebných odpovědí (ORR) a u 14 % byla dosažena stabilizace choroby. Ve druhé fázi klin. studie II bylo 140 nemocných rozděleno podle ErbB-2 pozitivty. U 9 % bylo dosaženo stabilizace choroby u 4 % ORR. U 89 nemocných s ErbB-2- negativními nádory nebyla zaznamenána žádná odpověď. (Blackwell, 2004)

Nemocné s HER2-dependetními karcinomy prsu jsou vystaveny vysokému riziku mozkových metastáz. Výhodou velikosti molekuly lapatinibu je, že prostupuje hematoencefalickou bariérou a proto je možné hodnotit jeho účinnost na postižené s metastatickým rozsahem do CNS. První výsledky studií fáze II. byly prezentovány v roce 2006. Primárním cílem bylo vyhodnocení objektivních léčebných odpovědí v CNS. V souboru 241 nemocných byl podáván lapatinib v denní dávce 1500 mg. Celkově bylo zaznamenáno 6 % ORR.(Lin et al., 2006; Petruželka & Petruželková, 2008)

- **Klinické studie III. fáze**

Účinnost a bezpečnost podání kombinované biochemoterapie u nemocných s karcinomem prsu byla předmětem klinické randomizované studie III. fáze. Do klinické

studie byly zařazeny nemocné s lokálně pokročilým nebo metastazujícím onemocněním s prokázanou HER2 - dependencí a progresí po předchozí léčbě taxany, antracykliny a trastuzumabem (n = 399). Po randomizaci do dvou skupin byly ženy léčeny kapecitabinem (2 000 mg/m²) v kombinaci s lapatinibem (1250 mg), nebo samotným kapecitabinem (2 500 mg/m²). Hlavním sledovaným ukazatelem byla doba do progresse onemocnění (time to progression – TTP). Klinická studie byla předčasně zastavena na základě výsledků plánované průběžné analýzy, v níž bylo dosaženo prodloužení doby do progresse (51 % snížení rizika progresse) ve skupině léčených kombinací lapatinibu s kapecitabinem. Z této studie byl vyvozen závěr, že lapatinib v kombinaci s kapecitabinem signifikantně prodlužuje období bez progresse ve srovnání s monoterapií kapecitabinem (Obr. 10). (Geyer, 2008; Tesařová, 2009; Petruželka & Petruželková, 2008)



Obr. 10: Lapatinib v kombinaci s kapecitabinem signifikantně prodlužuje období bez progresse ve srovnání s monoterapií kapecitabinem. (upraveno dle Petruželka & Petruželková, 2008)

3.4. Bezpečnost a snášenlivost

Jako většina léků ze skupiny malých molekul TKI je lapatinib poměrně dobře snášen. Nejčastějšími nežádoucími účinky zaznamenanými v iniciální studii I. fáze při monoterapii lapatinibem byly průjem, vyrážka, nauzea a únava. Většina nežádoucích účinků byla mírného nebo středního stupně. Pouze 5 ze 140 zaznamenaných nežádoucích účinků bylo závažných. Jednalo se o průjem s křečovitou bolestí břicha a gastroezofageální reflex. Profil nežádoucích účinků byl ve všech klinických studiích obdobný. Život ohrožující komplikace se vyskytla jen ojediněle. (Burris, 2004)

Je pravděpodobné, že TKI, které blokují aktivitu receptoru HER2 mohou způsobit kardiální dysfunkci vzhledem k tomu, že porušení signální dráhy HER2 je součástí patogeneze kardiální dysfunkce. (Chien, 1999). Základní údaje o kardiotoxicitě lapatinibu vycházejí ze společné analýzy celkem 44 klinických studií, ve kterých byly hodnoceny téměř 4000 žen. Při vstupu do studie měly všechny pacientky normální ejekční frakci levé komory (LVEF). Kardiotoxicita stupně 3 a 4 byla definována jako ventrikulární systolická dysfunkce nebo pokles LVEF o 20 % proti výchozí hodnotě. Incidence symptomatického poklesu byla 0,2 % a symptomatické redukce 1,4 %. (Azim et al., 2009; Petráková & Demlová, 2008)

3.5. Význam a metody stanovení plasmatických hladin TKI

Během posledního desetiletí bylo ustanoveno, že terapeutické užití vybraných léčiv může být optimalizováno individuálním dávkováním, na základě stanovených plasmatických hladin. Tato léčebná strategie, označovaná za cílené terapeutické monitorování léčiv (Therapeutic Drug Monitoring – TDM), je v současnosti rutinní praxí pro celou řadu léčiv. (Haouala et al., 2009) Monitorování plasmatických hladin může být pro ošetřující lékaře velkým přínosem v souvislosti s profitováním pacienta na dané léčbě, predikcí nežádoucích účinků a prodloužením délky života nemocných.

U nízkomolekulárních látek příbuzných lapatinibu byla prokázána závislost léčebné odpovědi na koncentraci léku v plasmě. Tento fakt potvrdily studie hodnotící hladinu imatinibu v plasmě u pacientů s chronickou myeloidní leukémií, kdy byla nalezena významná korelace mezi hladinou imatinibu a stupněm odpovědi (Picard et al., 2007; Frame, 2007; Larson, 2008). Stanovení optimální léčebné dávky tyrosinkinasových inhibitorů je velice problematické, bez monitorování plasmatických hladin a porovnání s molekulární odpovědí téměř nemožné. Této problematice se prozatím věnuje jen několik málo laboratoří z důvodu vysokých nároků kladených na instrumentaci a finance.

Nejčastěji užívanou separační technikou pro stanovení tyrosinkinasových inhibitorů - imatinibu, dasatinibu, nilotinibu, lapatinibu, sorafenibu a sunitinibu je kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Separace probíhají převážně na krátkých C18 kolonách s reverzní fází.

LC-MS/MS metody pro stanovení TKI jsou různě obměňovány, například IM a jeho deuterovaný interní standard mohou být po jejich extrakci kapalina-kapalina eluovány na koloně XTerra RP18 (100 mm x 2,1 mm) s gradientem pufru acetonitril – formiát amonný (c = 4 mmol/l; pH 3,2). Imatinib byl detekován tandemovou hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem. (Titier K. *et al*, 2005)

Další z metod pro stanovení TKI - nilotinibu, dasatinibu, sunitinibu, sorafenibu a lapatinibu spočívá v deproteinaci vzorku acetonitrem, separaci pomocí kolony s reverzní fází XTerraC18 (50 mm x 2,1 mm) a použití gradientu mobilní fáze skládající se z formiátu amonného, titrovaného kyselinou mravenčí (c = 20 mmol/l; pH 2,2). Tandemový hmotnostní spektrometr – trojitý kvadrupól s ionizací elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu byl použit pro detekci a kvantifikaci dat. (Haouala A. *et al*, 2009)

Pro stanovení TKI dasatinibu a lapatinibu byla vyvinuta další vysoce účinná a selektivní LC-MS/MS metoda. Po extrakci kapalina-kapalina byly vzorky eluovány na koloně Hyperclone BDS C18 (150 mm x 2,0 mm) s předkolonou SecurityGuard C18 (4 mm x 3,0 mm), s gradientem pufru acetonitril – formiát amonný (acetonitril/ 10 mmol/l formiát amonný; pH - 4; 54:46, v/v). Analyty byly detekovány hmotnostním spektrometrem - trojitý kvadrupólem s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu. (Roche *et al.*, 2009)

Sensitivní LC-MS/MS metoda pro stanovení plasmatických hladin lapatinibu založená na extrakci pevnou fází byla validována a následně aplikována v klinické studii na dětské pacientky s mozkovými metastázemi. Separace probíhala na koloně CuriSil-PFP C18 (50 mm x 2,0 mm) s předkolonou (30 mm x 2,0 mm) za použití gradientu mobilní fáze obsahující formiát amonný (5 mmol/l; pH 3), acetonitril a kyselinu mravenčí (1000:50:1 = v/v/v). Pro detekci byl použit tandemový hmotnostní spektrometr – trojitý kvadrupól s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu. (Bai *etal.*, 2006)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. Úvod

Karcinom prsu je jednou z nejčastějších malignit postihující ženskou část populace s narůstající incidencí. Současná molekulární klasifikace umožňuje rozlišit nádory stejného histologického obrazu podle stupně exprese ER, PgR a onkoproteinu receptoru HER2 (Erb-2). U cca 15 – 20 % pacientek s karcinomem prsu dochází k amplifikaci a/nebo k nadměrné expresi genu Her-2/neu. Toto znásobení je vysoce korelováno s progresivitou onemocnění, proto je důležité stanovit zvýšení počet kopií genu Her2/neu, tj. pozitivitu receptoru HER2 (c-erbB2) a zvolit vhodnou terapii. Status genu Her/neu je standardně vyšetřován metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a imunohistochemicky (IHC). Patogenetická souvislost mezi nádorovou proliferací a overexpresí receptoru HER2 dala podnět k přípravě řady monoklonálních protilátek a tyrosinkinasových inhibitorů, které jsou schopny funkci nadměrně exprimovaného receptoru blokovat (např. trastuzumab nebo lapatinib). V rutinní diagnostice se pro indikaci trastuzumabu a lapatinibu hodnotí pouze pozitivita HER2. HER1 pozitivita u karcinomu prsu je na úrovni vědeckých prací, ale ani zdaleka ne v klinické praxi.

U nízkomolekulárních látek podobných lapatinibu se prokazuje závislost léčebné odpovědi na koncentraci léku v plasmě. Tento fakt potvrdily studie hodnotící hladinu imatinib v plasmě u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (Frame, 2007; Larson, 2008). Naše práce byla zaměřena na léčebnou odpověď pacientek s karcinomem prsu na terapii lapatinibem ve vztahu ke stavu receptorů HER1 a HER2 a plasmatickým hladinám tohoto léčiva.

5. Materiál a metody

5.1. Biologický materiál:

Z biologického materiálu byla použita plná krev a vzorky nádorových tkání, které byly získány od pacientek Onkologické kliniky FN Olomouc, léčených pro karcinom prsu v pokročilém (metastazujícím) stadiu.

Krevní vzorky byly odebírány pacientkám při rutinních kontrolách na oddělení klinické biochemie do zkumavek Greiner s antikoagulačním činidlem ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA) v rozmezí 16 - 30 hodin po užití poslední dávky léčiva Tyverb. Krev byla poté centrifugována a získaná plasma byla zamražena.

Po poskytnutí biologického materiálu pro vědecké účely byla plasma přenesena do laboratoře dědičných metabolických poruch OKB FN Olomouc a následně analyzována nebo skladována při -20 °C.

V parařínu fixované vzorky nádorových tkání byly v Laboratoři experimentální medicíny FN Olomouc vyšetřeny metodou FISH pro amplifikaci genu EGFR-1, c-erb B2 a IHC pro stanovení exprese proteinu HER1 a HER2 se snahou prokázat vzájemný vztah mezi oběma receptory a potvrzení dříve prokázané pozitivita receptoru HER2. Jelikož je HER2 pozitivita hlavní kriterium pro podání Tyverbu braly se při jeho indikaci v potaz výsledky předchozích diagnostických vyšetření před podáváním Herceptinu.

5.2. Reagencie, roztoky:

Lapatinib zakoupený od firmy LC Laboratories (Woburn, MA, USA) byl rozpuštěn v LC-MS methanolu (Sigma - Aldrich, Steinheim, Německo) na výslednou koncentraci 0,5 mg/ml. Tento zásobní roztok byl použit pro přípravu všech ostatních standardů. Pro kvantifikaci analytů byl použit deuterovaný imatinib (Novartis, Curych, Švýcarsko) rozpuštěn v LC-MS methanolu na koncentraci 50 ng/ml.

Na přípravu mobilní fáze A byla použita kyselina mravenčí, rozpuštěna v deonizované vodě (18,3 MΩ/cm) na koncentraci 4 mmol/l, titrována hydroxidem amonným na pH 3,2. Mobilní fáze B se skládala z čistého acetonitrilu. Všechny výše uvedené reagencie byly zakoupeny od firmy Sigma – Aldrich (Steinheim, Německo).

5.3. Přístrojové vybavení:

- UHPLC Dionex Ultimate 3000 RS (Sunnyvale, CA, USA)
- Tandemový hmotnostní spektrometr API 4000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Analytické váhy SI-203 (Denver Instrumentu, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Kraintek 12 (Kraintek s. r. o., Slovensko)
- Vortex (IKA WORKS, USA)
- Termostatovaná míchačka (Biosan, ČR)
- Centrifuga Micro 120 (Hettlich, Německo)
- pH metr (Orion Research, USA)
- Magnetická míchačka RCT Basic (IKA labortechnik, Staufen, Německo)
- Přípravna deionizované vody (Werner Reinstwassersystemu, Německo).

5.4. Příprava vzorku:

Plasma (20 µl) byla deproteinována methanolem (180 µl) s přidavkem interního deuterovaného standardu imatinibu (D8-IMA). Vzorek byl dále 30 s sonifikován, vortexován a následně 5 minut třepán na termostatované míchačce. Poté byl umístěn na 30 minut do mrazícího boxu (-20 °C), centrifugován při 14 000 RPM, 5 minut. Supernatant byl převeden do vialek s inzerty a analyzován pomocí techniky UHPLC-MS/MS nebo uchován při -20 °C pro pozdější analýzu.

5.5. Metoda:

Veškeré analýzy byly prováděny na přístroji Dionex Ultima 3000 RS ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem API 4000. Nejprve byla metoda optimalizována pro stanovení hladiny imatinibu v plasmě. Po její validaci a aplikaci na reálné vzorky byla s drobnými úpravami separačních podmínek použita i pro stanovení ostatních TKI: lapatinibu, nilotinibu, dasatinibu.

Separční podmínky byly převzaty z publikace Karin Titier – „Quantification of imatinib in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.“ Studované analyty byly separovány na koloně s reverzní fází Aquity UHPLC@BEH C18 1,7 µm (2,1 x 50 mm; Waters). Mobilní fáze se skládaly z formiátu amonného - A (4 mmol/l, pH 3,2) a čistého acetonitrilu - B. První minutu analýzy bylo složení mobilní fáze 17 % (B), v čase 1-2 min byl gradient acetonitrilu navýšen ze 17 % na 50 % a držen po dobu 0,1 min. V čase 2,1 - 2,2 byl systém navrácen do iniciálních podmínek. Před každým měřením byla kolona ekvilibrována, 5 min 17 % mobilní fází B při průtokové rychlosti 0,5 ml/min a bylo zapnuto vyhřívání kolony na 40 °C. Množství nastříkovaného vzorku bylo 2 µl a celková doba analýzy trvala včetně proplachu 3,2 min.

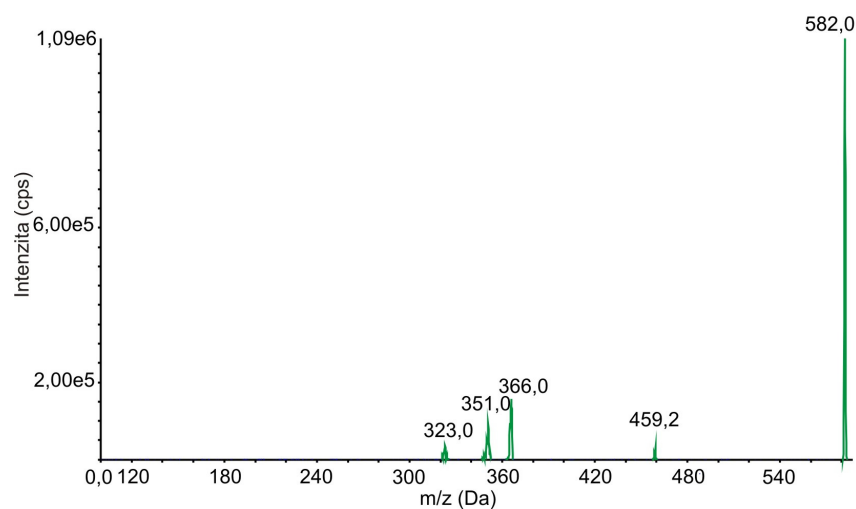
Tandemový hmotnostní spektrometr – trojitý kvadrupól (API 4000) s ionizací elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu byl použit pro detekci a kvantifikaci dat. Přístroj pracoval v MRM (multiple-reaction monitoring). Podmínky sběru dat budou popsány dále – viz. Optimalizace metody.

Kvantifikace analátu byla provedena pomocí ISTD imatinibu (D8-IM), jelikož interní standard lapatinibu nebyl v době optimalizace metody dostupný pro vědecké účely. Výsledná koncentrace analytu byla vypočtena pomocí softwaru Analyst 1.5.

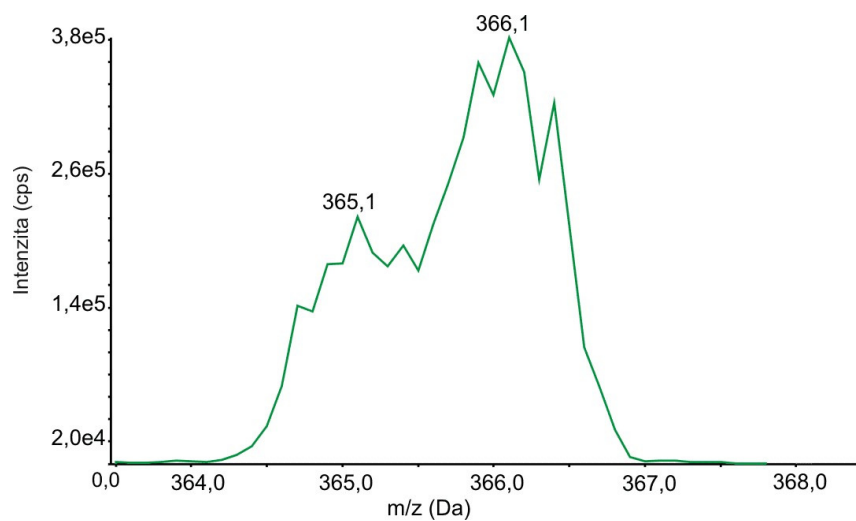
6. Výsledky

6.1. Optimalizace metody

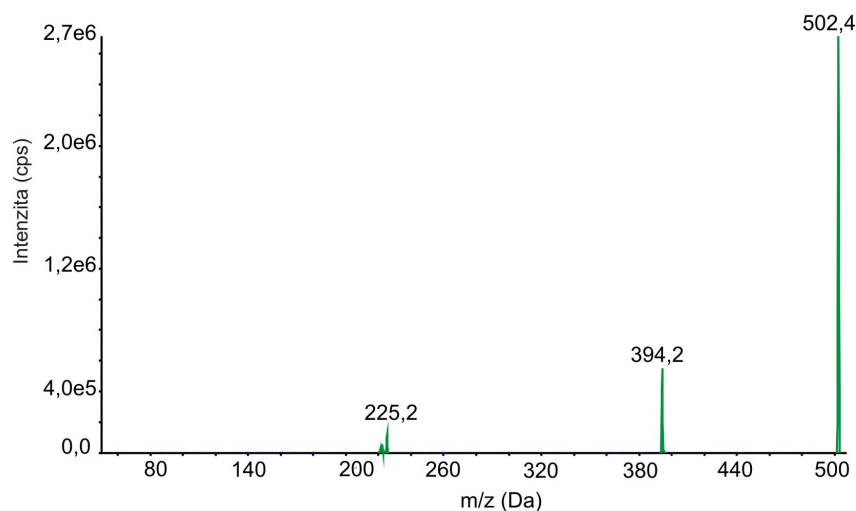
Iniciální část experimentu byla zaměřena na optimalizaci MS/MS podmínek pro dané analyty. Za účelem nalezení optimálních MRM přechodů byla změřena hmotnostní a fragmentační spektra lapatinibu (obr. 11, 12) a ISTD imatinibu (D8-IM) (obr. 13, 14). Z full-scanu v pozitivním módu byly vybrány hodnoty nejintenzivnějších píků. MRM přechod pro lapatinib byl zvolen 582→366 a pro ISTD imatinib 502→394.



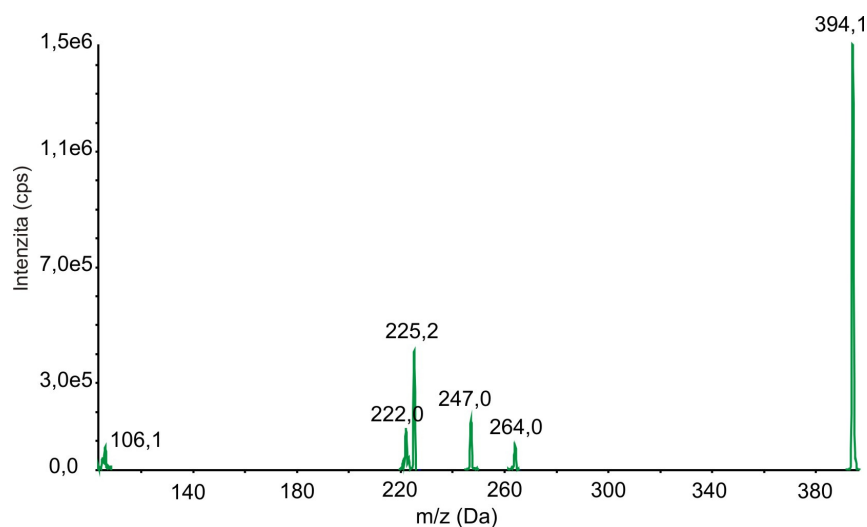
Obr. 11: Hmotnostní spektrum lapatinibu.



Obr. 12: Fragmentační spektrum lapatinibu.

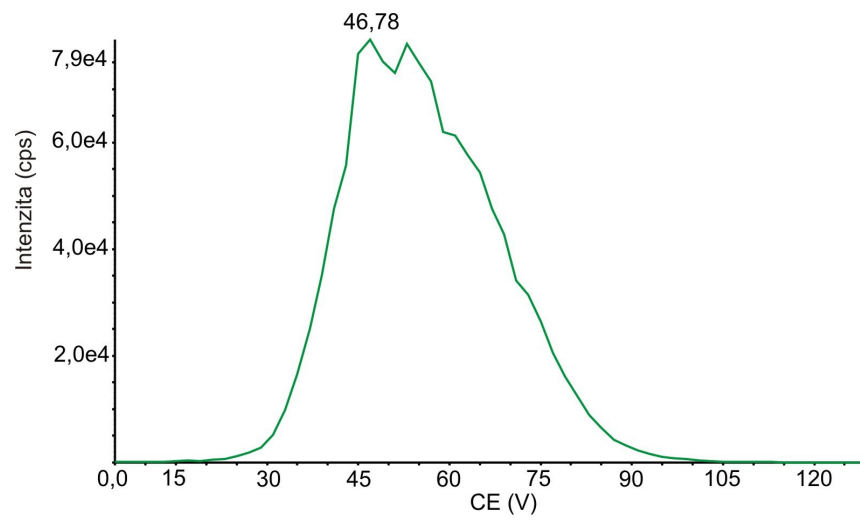


Obr. 13: Hmotnostní spektrum ISTD Imatinibu (D8-IM).



Obr. 14: Fragmentační spektrum ISTD imatinibu (D8-IM).

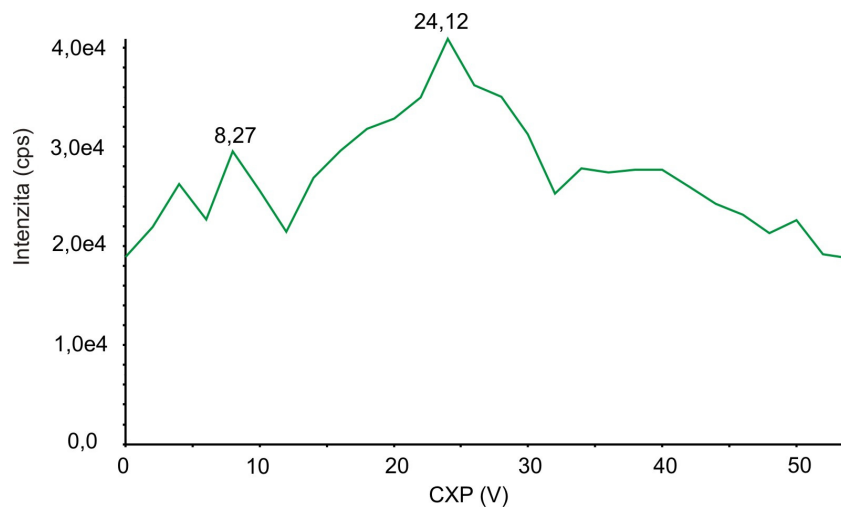
Současně s výběrem vhodných MRM přechodů byly přístrojem automaticky optimalizovány další podmínky MS/MS a to především hodnoty kolizní energie (CE obr. 15, 18) deklasteračního potenciálu (DP obr. 16, 19) a výstupního potenciálu kolizní cely (CXP obr. 17, 20). Dále hodnoty tlaku kolizního plynu (CAD), zmlžujícího (GS1) a sušícího plynu (GS2), napětí na kapiláře v iontovém zdroji (IS), vstupního potenciálu (EP), teploty zmlžujícího plynu (TEM) a curtain gas (CUR). Veškeré výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 1.



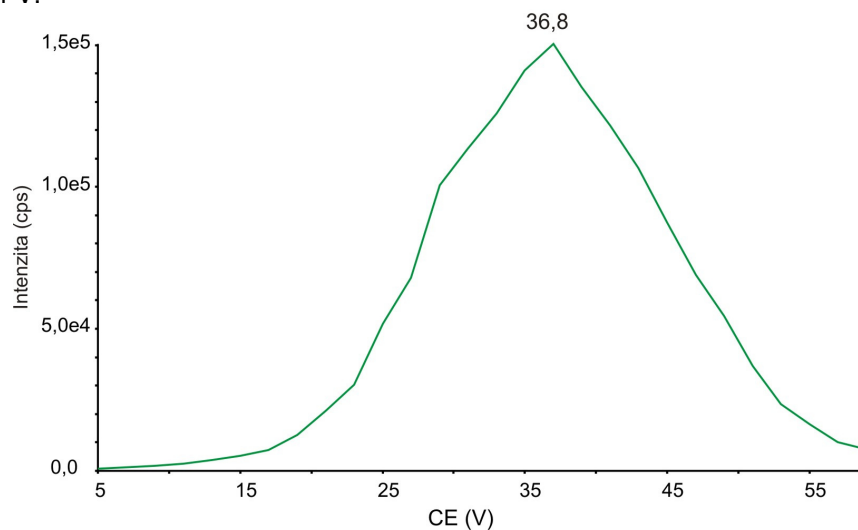
Obr. 15: Optimalizace CE pro LAP v rozmezí 5 – 125 V, nejlepší výsledek byl dosažen při hodnotě 47 V.



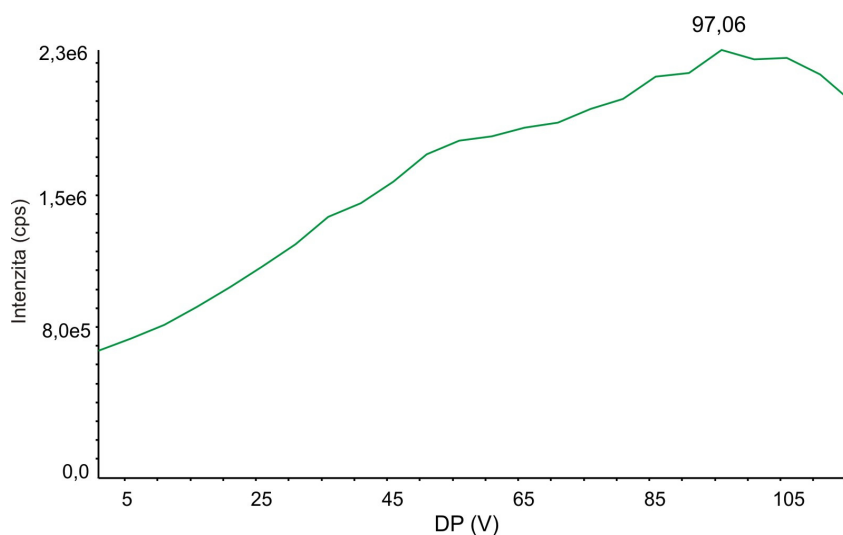
Obr. 16: DP pro LAP byl měřen v rozmezí 0 – 400 V, optimální hodnota byla zvolena 111 V.



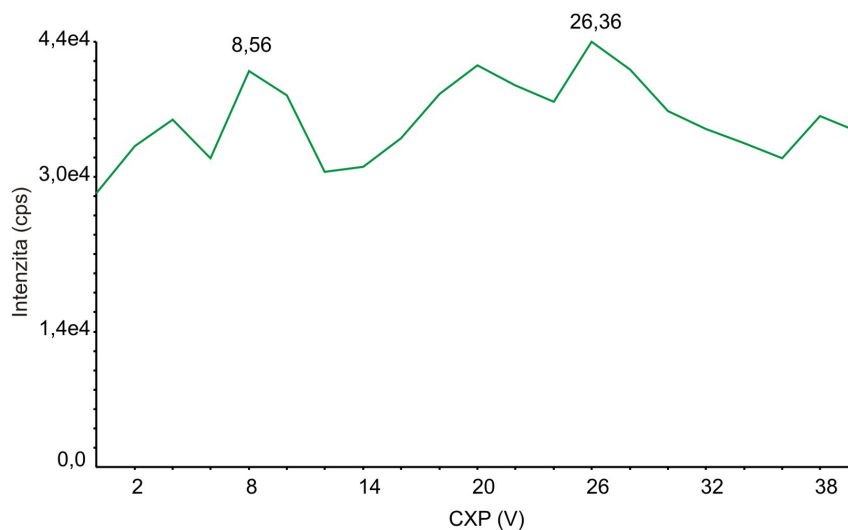
Obr. 17: Optimalizace CXP pro LAP v rozmezí 0 – 55 V, nejlepší výsledek byl dosažen při hodnotě 24 V.



Obr. 18: Optimalizace CE pro D8-IM v rozmezí 5 – 60 V, nejlepší výsledek byl dosažen při hodnotě 37 V.



Obr. 19: DP pro D8-IM byl měřen v rozmezí 0 – 120 V, jako optimální hodnota byla zvolena 97V.



Obr. 20: Optimalizace CXP pro D8-IM v rozmezí 0 – 40 V, nejlepší výsledek byl dosažen při hodnotě 26 V.

Tab. 1: Optimalizace MS/MS

Analyt	MRM přechod	CE (V)	DP(V)	CXP (V)	CAD (psi)	6,00
LAP	582→366	47,00	11,00	24,00	GS1 (psi)	50,00
					GS2 (psi)	50,00
					EP (V)	10,00
D8-IM	502→394	37,00	97,00	26,00	IS (V)	5500,00
					TEM (oC)	500,00
					CUR (psi)	20,00

6.2. Validace metody

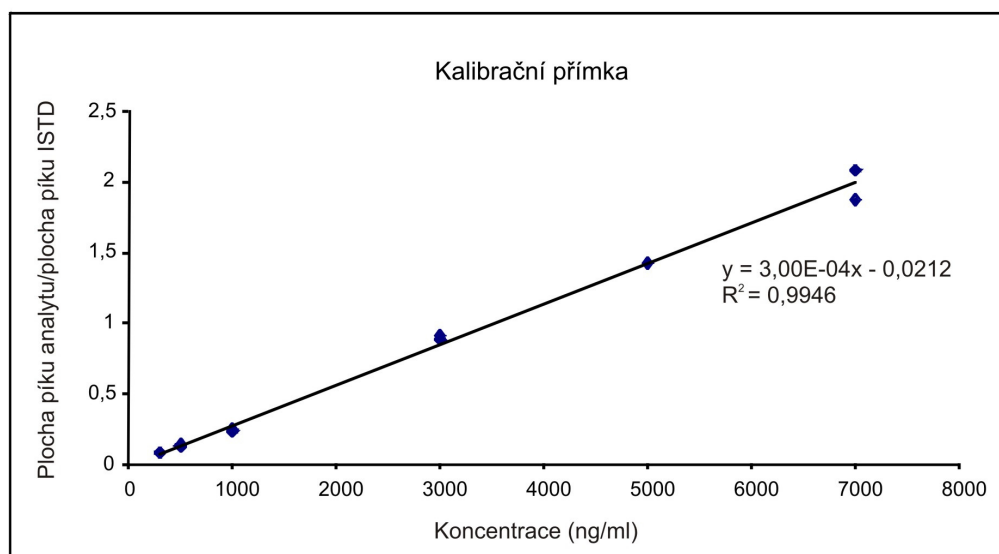
Před zavedením nové analytické metody do rutinního laboratorního provozu je třeba prověřit, že její charakteristiky splňují požadavky na ni kladené a validovat ji.

Validaci můžeme definovat jako proces, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu vybrané analytické metody ustanovením adekvátních kritérií pro parametry, jako je přesnost, správnost, mez detekce, apod. Při validaci posuzujeme, zda jsou parametry metody srovnatelné s požadavky na výsledky.

Linearita

Linearita je chápána jako přímo úměrná závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem – v našem případě poměrem ploch píků analytu ku ISTD) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné lineární závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (R). Čím více se při závislosti absolutní hodnotě, tím těsnější je závislost obou proměnných. Lineární závislost dvou náhodných proměnných je matematicky vyjádřena obecným vztahem $y = ax + b$, kde parametr **a** je směrnice kalibrační přímky a parametr **b** je úsek (posunutí). Při výpočtu koeficientů **a**, **b** se vychází z platnosti modelu regresní závislosti, který předpokládá konstantní rozptyl pro všechny hodnoty závislé proměnné – použitím metody nejmenších čtverců.

Linearita metody byla stanovena pomocí plasmy zdravého jedince adované přídávkem standardu lapatinibu na výslednou koncentraci v rozmezí 500 – 7000 ng/ml (500, 100, 3000, 5000 a 7000 ng/ml). Každá koncentrace byla připravena v triplikátu. Byla získána rovnice kalibrační přímky $y = 3,00E-04x - 0,0212$; $R^2 = 0,9946$ (obr. 21).



Obr.21: Kalibrační závislost pro koncentrace 500, 100, 3000, 5000 a 7000ng/ml

Návratnost (recovery)

Recovery neboli výtěžnost udává poměr množství analytu stanoveného danou analytickou metodou k přijatelné referenční hodnotě. Hodnota návratnosti se může vyjadřovat jako desetinný zlomek nebo v procentech. Stanovuje se na vzorku biologické matrice s přidáním standardu minimálně na dvou koncentračních hladinách.

Návratnost jsme v našem případě stanovili užitím dvou plasem od zdravých dárců adovaných standardem lapatinibu na finální koncentraci 1000 a 5000 ng/ml. Pro každou koncentraci jsme připravili 6 vzorků. Návratnost v spikované plasmě byla 102,54 a 107,97 pro koncentrace 1000 a 5000 ng/ml (Tab. 2).

Tab. 2: Návratnost (recovery) pro spikovanou plasmu o koncentraci 1000 a 5000 ng/ml.

* - hodnota nebyla zahrnuta do výpočtu.

koncentrace analytu (ng/ml)	vzorek č.	vypočtená koncentrace (ng/ml)	návratnost (%)
1000	1	1203,33	120,33
	2	936,20	93,62
	3	1088,33	108,83
	4	1086,00	108,60
	5	1128,60	112,86
	6	888,00	88,80
průměr			102,54
5000	1	4953,30	99,07
	2	4732,00	94,64
	3	5860,00	117,20
	4	5748,30	114,97
	5	5700,00	114,00
	6*	*3635,00	*72,70
průměr			107,97

Nepřesnost

Nepřesnost se měří v sériích a to buď během jednoho dne (intra-assay) nebo mezi dny (interassay). Při měření v rámci jednoho dne pracuje jeden pracovník s analyty při jedné kalibraci, stejnou metodou, na daném přístroji v jedné laboratoři, v krátkém časovém intervalu. Při měření nepřesnosti mezilehlé preciznosti (inter-assay) se analýzy provádí opět stejnou metodou, na stejném přístroji v dané laboratoři. S analyty může pracovat stejný, ale i jiný pracovník a v potaz jsou brány případné změny kalibrace.

Nepřesnost během jednoho a mezi šesti dny byla stanovena pomocí plasmy zdravých jedinců s přidavkem standardu lapatinibu na finální koncentraci 1000 a 5000 ng/ml. V rámci jednoho dne byla nepřesnost ($n = 6$) 4,54 % a 3,95 %, mezi jednotlivými dny byla 8,01 a 8,56 % (Tab. 3).

Tab. 3: Srovnání nepřesnosti u jednotlivých analýz mezi dny a v průběhu jednoho dne.

* - hodnota nebyla zahrnuta do výpočtu.

Nepřesnost mezi dny			Nepřesnost v průběhu jednoho dne		
analýza	1000 (ng/ml)	5000 (ng/ml)	analýza	1000 (ng/ml)	5000 (ng/ml)
č.			č.	RSD (%)	RSD(%)
1	1203,33	4953,30	1	3,79	2,93
2	936,20	4732,00	2	1,57	4,48
3	1088,33	5860,00	3	2,57	3,46
4	1086,00	5748,30	4	6,20	5,38
5	1128,60	5700,00	5	7,77	3,45
6	*888,00	*3635,00	6	5,36	4,02
průměr	1088,49	5398,72	průměr	4,54	3,95
RSD	8,56	8,01			

Mez detekce (LoD) a mez stanovitelnosti (LoQ)

Mez detekce (Limit of detection) daného analytického postupu je dána nejmenším množstvím analytu (v našem případě lapatinibu) ve vzorku, které může být detekováno, ale které není být stanovitelné jako exaktní hodnota.

Mez stanovitelnosti metody (Limit of quantification) je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty.

Mez detekce pro naši metodu $LoD = 5,45$ ng/ml byla stanovena z analýz ($c_{LAP} = 1000$ ng/ml) jako trojnásobek šumu ($S/N = 3$) a mez stanovitelnosti $LoQ = 18,18$ ng/ml jako desetinásobek šumu ($S/N = 10$).

6.3. Stanovení plasmatických hladin dualního TKI Lapatinibu u pacientek s karcinomem prsu

Po optimalizaci a validaci byla námi vyvinutá metoda aplikována na reálné vzorky 21 pacientek léčených pro pokročilý (metastazující) karcinom prsu. Lapatinib (tyverb) je indikován vždy v kombinaci s kapecitabinem u pacientů s pokročilým karcinomem prsu, jejichž nádory ve zvýšené míře exprimují Erb-B2 (HER2) a u kterých došlo k progresi onemocnění po předchozí léčbě antracykliny, taxany a trastuzumabem (herceptinem). Pacientky jedenkrát denně, perorálně, vždy ráno užívaly 1250 mg (tj. pět tablet) lapatinibu v kombinaci s kapecitabinem. Doporučená dávka kapecitabinu byla $2000 \text{ mg/m}^2/\text{den}$, ve 2 dávkách po 12 hodinách ve dnech 1 – 14 v průběhu 21 denního cyklu.

Koncentrace lapatinibu v plasmě byla měřena celkově na 78 vzorcích jednotlivých pacientek v průběhu jejich léčby a pohybovala se v rozmezí 0,11 – 21,5 $\mu\text{g/ml}$ (Tab. 4, obr. 22). Množství odběrů se odvíjelo od doby terapie lapatinibem s kapecitabinem.

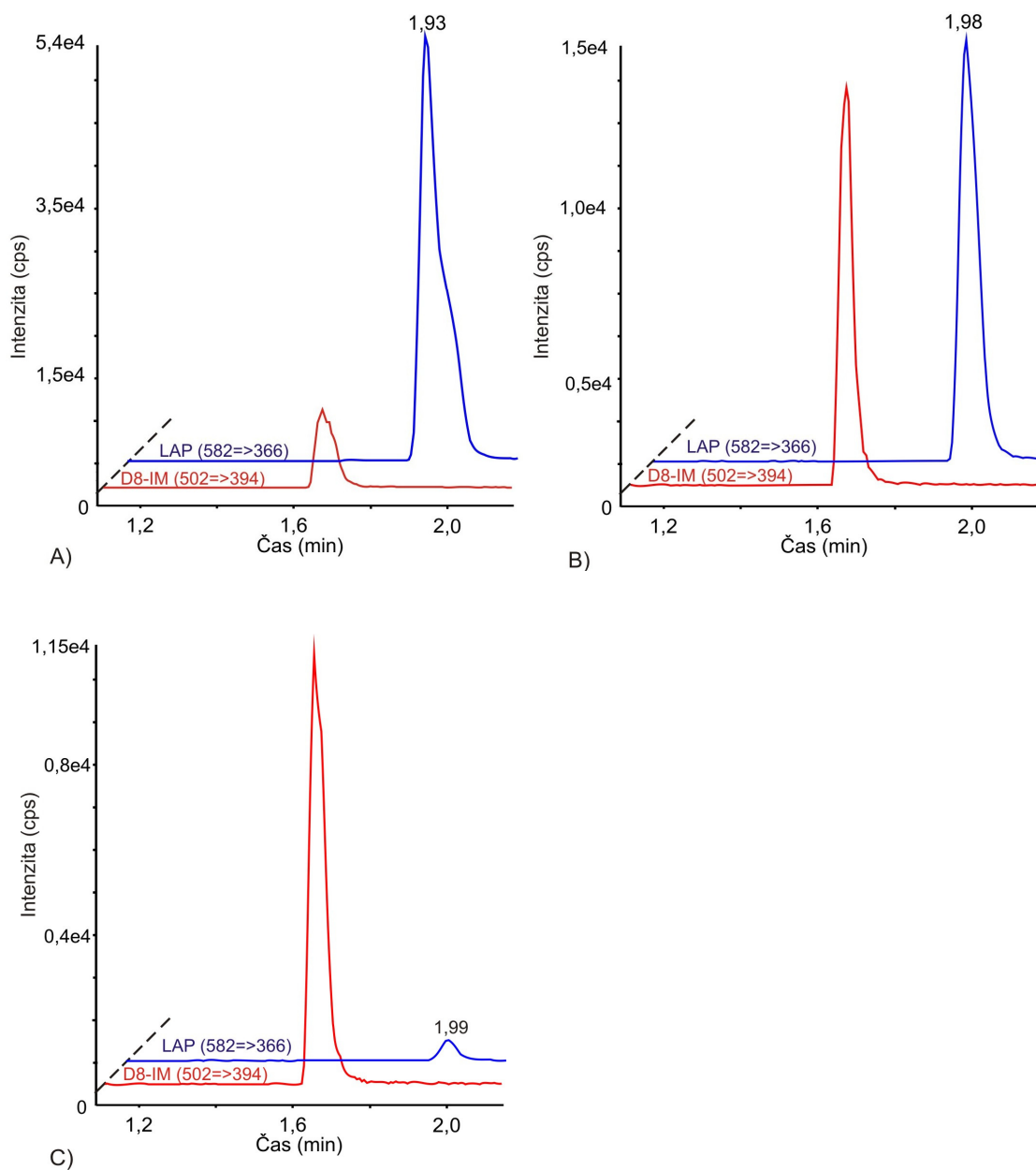
Zeleně označená data (pacientky č. 1, 3, 4, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20) reprezentují velice nízké koncentrace lapatinibu v plasmě a to hned z několika důvodů. U pacientek č. 10, 11, 13, 14, 16 byl odběr proveden ve velice krátkém časovém úseku od zahájení terapie. U těchto pacientek nebyla ještě navozena stabilní hladina lapatinibu v plasmě. Nízké koncentrace pacientek č. 4, 14, 18 jsou zapříčiněny přerušением léčby z důvodu zhoršení klinického stavu. U pacientek č. 1, 3, 8, 19, 20 byla koncentrace lapatinibu v plasmě měřena po ukončení terapie z důvodu progresse onemocnění.

Modře označená data jsou u pacientky č. 15, která vykazovala až dvojnásobně vyšší hladiny lapatinibu v plasmě (medián 11,25 $\mu\text{g/ml}$). Později byla tato skutečnost objasněna. Vysoké hladiny byly důsledkem jaterní toxicity a neschopností metabolizovat dané léčivo.

Jelikož nám nebyla známa přesná doba odběru od užití poslední dávky (rozmezí 15 – 30 hodin) a ostatní parametry jednotlivých pacientek (věk, váha,...), nemůžeme celek těchto dat zcela objektivně hodnotit. Vyjma barevně označených dat bylo v souboru pacientek dosaženo vyrovnaných a srovnatelných hladin lapatinibu v plasmě (medián 5,09 $\mu\text{g/ml}$).

Tab. 4: Koncentrace plasmatických hladin jednotlivých pacientek.

pacientky	plasmatická koncentrace (ng/mL)					
	1. odběr	2.	3.	4.	5.	6.
1	6300	5930	5860	5300	118	
2	5410	10700				
3	6480	5280	4710	3610	111	
4	6010	270	7670			
5	5950	1120	2960	2790	3530	
6	7130					
7	3340	2560				
8	1750	940	155			
9	1750	2230	2540			
10	153	5960	7160	5730		
11	193	3960	4410			
12	2930	2420	4540	3750		
13	132	4160	12800	7410		
14	142	274	3040	1280	1010	
15	10300	7820	9430	12400	12200	21500
16	126	8980				
17	3020	4900	7600	4200	5780	4830
18	7360	194	819	387		
19	2480	5780	188			
20	5330	6490	158			
21	4290	7730	11000	7950	7250	



Obr. 22: Analýza reálných vzorků pacientek léčených lapatinibem; pacientka A) s vysokou hladinou lapatinibu v plasmě, zapříčiněnou jaterní toxicitou; pacientka B) se střední hladinou a pacientka C) s nízkou hladinou po přerušení terapie z důvodu progresse onemocnění.

6.4. Výsledky IHC a FISH

V níže uvedené tabulce jsou výsledky FISH a IHC vyšetření obou receptorů u jednotlivých pacientek (Tab. 5).

Kritéria pro hodnocení FISH jsou následující: hodnoty poměru genu ku chromosomu nižší než 1,6 jsou negativní, rozmezí 1,6 – 2,2 je hraniční a hodnoty vyšší než 2,2 jsou pozitivní. Ze souboru pacientek byla HER2 pozitivita potvrzena u všech kromě pacientky č. 3, HER-1 pozitivita jen u šesti pacientek, ostatní byly negativní.

Kritéria IHC hodnocení byla uvedena již dříve, ve stručnosti: skóre 0 a 1+ znamená negativitu, skóre 2+ hraniční pozitivitu, je nutné doplnit metodou FISH a skóre 3+ pozitivitu. IHC vyšetření receptoru HER2 bylo pozitivní ve většině případů, tři pacientky byly hraniční. Z toho dvě po srovnání s FISH vyšetřením byly pozitivní a u pacientky č.3 byla potvrzena negativita. Té byl indikován lapatinib, přestože nebyla schopna odpovídat na danou léčbu a později došlo k progresi onemocnění. HER1 pozitivita nebyla prokázána ani u jedné pacientky.

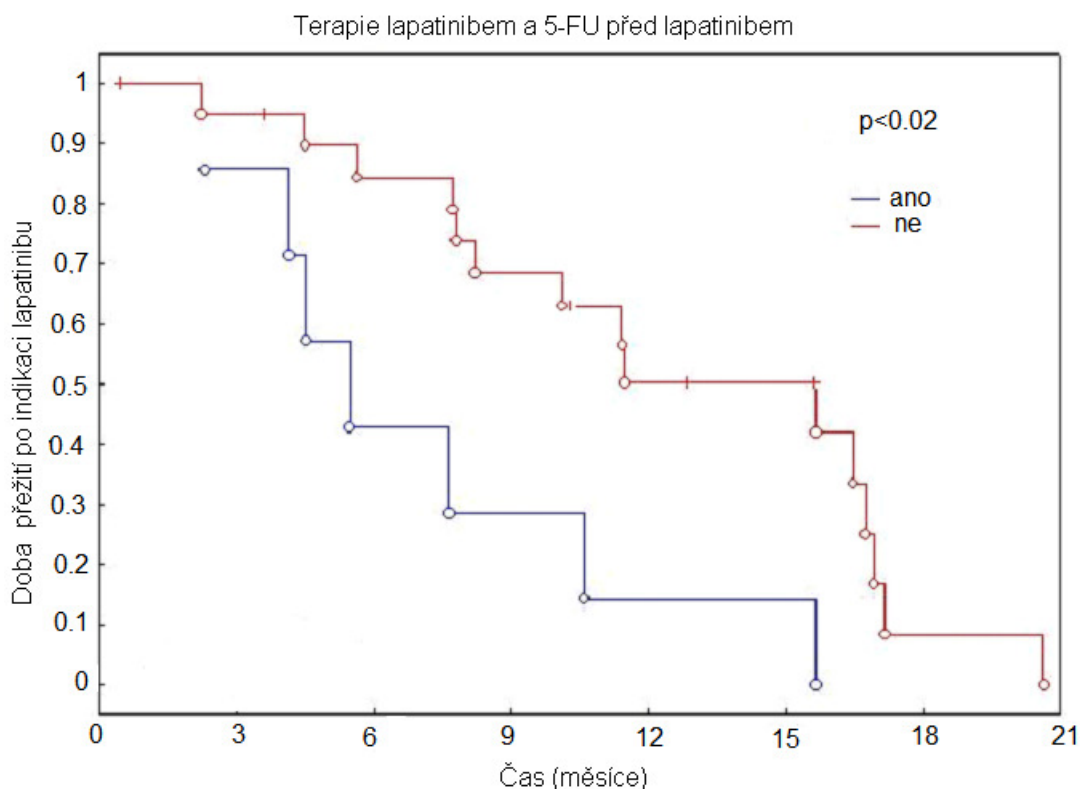
Mezi oběma receptory nebyl prokázán vzájemný vztah.

Tab. 5: Přehled FISH a IHC vyšetření obou receptorů.

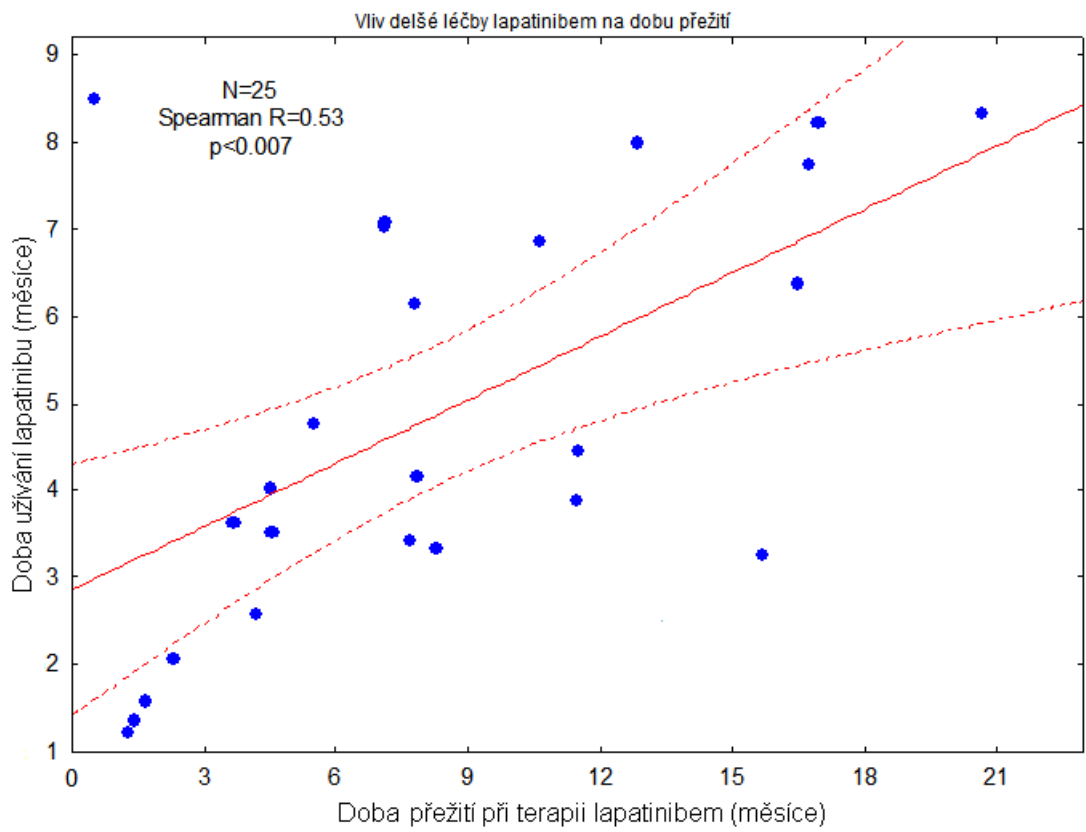
pacientka	FISH (HER2)	IHC (HER2)	FISH (HER1)	IHC (HER1)
1	9,18	3+	2,20	0
2	5,04	3+	2,13	1 až 2+
3	1,71	2+		0
4	5,62	2 až 3+	2,15	0
5	6,86	3+		0
6	8,34	3+	2,26	0
7	9,43	3+	5,49	0
8	7,49	3+	1,93	0
9	13,67	3+	3,58	1 až 2+
10	7,02	3+	1,94	1+
11	9,17	3+	2,03	1+
12	9,13	3+	1,83	0
13	9,14	3+		0
14	10	3+		
15	2,3	2+	2,00	0
16	9,95	3+	2,19	0
17	9,09	3+	3,93	
18	4	3+	2,68	0
19	8,97	3+	2,01	
20	9,62	3+		
21	4,22	3+	2,12	0

6.5. Klinická data

V závěru této pilotní studie byla statisticky zhodnocena klinická data pacientek. U všech pacientek byl diagnostikován rozsáhlý metastazující karcinom prsu (stadia 4), invazivní duktální karcinom v 82 %, ER/PR pozitivní ve 43 %. U většiny pacientek bylo diagnostikováno metastazování i do jiných částí těla, zejména do CNS. Věkové rozhraní při stanovení diagnózy se pohybovalo v rozmezí 24 – 65 let (medián - 49,7 let). Doba celkového přežití od stanovení diagnózy byla v rozmezí 18 – 156 měsíců (medián - 47,6 měsíců), kdy léčba lapatinibem trvala v rozmezí 1,2 – 15,6 měsíců (medián - 4,5 měsíce). Byl prokázán negativní vliv léčby 5-FU nebo kapecitabinem před zahájením terapie lapatinibem (Obr. 23). Statistické vyhodnocení doložilo, že doba užívání lapatinibu může příznivě ovlivnit délku života pacientek s pozitivním HER2 receptorem léčených pro karcinom prsu (Obr. 24). Odstup mezi terapií trastuzumabem a lapatinibem byl v rozmezí 0,5 – 23,5 měsíců (medián – 3,6 měsíce). Z celkového souboru pacientek přetrvávají na léčbě kapecitabinem v kombinaci lapatinibem dvě pacientky. V devatenácti případech byla léčba ukončena a to v patnácti případech z důvodu progresu onemocnění, ve 3 případech došlo k celkové toxicitě organismu, u jedné pacientky nebyla objasněna příčina úmrtí a u jedné pacientky došlo ke klinickému zhoršení po radioterapii.



Obr. 23: Negativní vliv kapecitabinu a 5-fluoruracilu před zahájením léčby lapatinibu v kombinaci s kapecitabinem



Obr. 24: Vliv delší léčby lapatinibem na dobu přežití

DISKUSE

U nízkomolekulárních látek podobných lapatinibu se prokazuje závislost léčebné odpovědi na koncentraci léku v plasmě. Tento fakt potvrdily studie hodnotící hladinu imatinib v plasmě u pacientů s chronickou myeloidní leukémií (Frame, 2007; Larson, 2008). Naše práce byla zaměřena na léčebnou odpověď pacientek s karcinomem prsu na terapii lapatinibem ve vztahu ke stavu receptorů HER1 a HER2 a plasmatickým hladinám tohoto léčiva. Monitorování plasmatických hladin může být pro ošetřující lékaře velkým přínosem v souvislosti s účinností dané léčby, profitování pacienta, predikcí nežádoucích účinků, dosažení účinných hladin a prodloužení délky života nemocných.

Cílem diplomové práce bylo vyvinout novou, vhodnou metodu pro stanovení LAP v krevní plasmě pacientek léčených pro karcinom prsu pomocí techniky ultra účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií a následně tuto metodu validovat a aplikovat ji na reálné vzorky.

Byla modifikována metoda Karin Titier (2005), která je zaměřena na stanovení příbuzného tyrosinkinasového inhibitoru Imatinibu. Metoda byla optimalizovaná UHPLC-MS/MS a doba analýzy byla zkrácena na 3,2 min. Vývoj metody spočíval v nalezení optimálních podmínek pro detekci a kvantifikaci analytu pomocí MS/MS. Za účelem nalezení optimálních MRM přechodů byla změřena hmotnostní a fragmentační spektra lapatinibu a ISTD imatinibu. Současně s výběrem vhodných MRM přechodů byly přístrojem automaticky optimalizovány další podmínky a to především hodnoty kolizní energie, deklasteračního potenciálu a výstupního potenciálu kolizní cely; hodnoty tlaku kolizního plynu, zmlžujícího a sušícího plynu, napětí na kapiláře v iontovém zdroji, vstupního potenciálu, teploty zmlžujícího plynu a „curtain gas“.

Metoda pro stanovení plasmatických hladin lapatinibu byla validována (linearita, návratnost, nepřesnost, reprodukovatelnost, mez detekce a stanovitelnosti) pomocí plasmy zdravých jedinců s přídatkem interního standardu imatinibu (D8-IM).

Vyvinutá metoda byla aplikována na reálné vzorky 21 pacientek léčených pro karcinom prsu lapatinibem. Byla zaznamenána horší léčebná odpověď na lapatinib v kombinaci s kapecitabinem u pacientek předléčených samotným kapecitabinem nebo 5-fluorouracilem. U pacientky s vysokými hladinami lapatinibu v plasmě byla později diagnostikována jaterní toxicita a léčba byla přerušena. Naopak nízké hladiny korespondují s přerušáním nebo ukončením terapie jednotlivých pacientek.

Stanovené hladiny byly zhodnoceny ve vztahu k receptorům HER1 a HER2. Mezi oběma receptory nebyl prokázán žádný vzájemný vztah. Statisticky byla podložena souvislost mezi pozitivitou receptoru HER2 a léčbou lapatinibem, kdy léčba lapatinibem HER2 pozitivních pacientek může příznivě prodloužit délku života. U podskupiny pacientek se změnami receptoru HER1 nebyl nalezen statisticky významný vztah positivity HER1 receptoru a léčebné odpovědi na lapatinib.

Nově vyvinutá metoda by měla být zavedena rutinní praxe, kdy napomůže předcházet následným projevům toxicity organismu snížením léčebným dávek a dosažením účinných hladin. Následně tak může dojít ke zlepšení kvality a prodloužení života pacientů.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyvinout vhodnou metodu pro stanovení LAP v krevní plasmě pacientek léčených pro karcinom prsu pomocí techniky ultra účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií a následně tuto metodu validovat a aplikovat ji na reálné vzorky.

V teoretické části byla vypracována literární rešerše na téma *Stanovení plasmatických hladin duálního tyrosinkinasového inhibitoru lapatinibu u nemocných s karcinomem prsu*. Pozornost byla věnována především problematice karcinomu prsu - jeho historii, epidemiologii, rizikovým faktorům, průběhu, diagnostice a léčbě tohoto onemocnění. V souvislosti s léčbou byla podrobně popsána cílená biologická léčba, vycházející z charakteristiky konkrétního tumoru a jeho následného terapeutického ovlivnění. Další kapitola je zaměřena na Lapatinib - selektivní inhibitor tyrosinkinas.

V rámci praktické části byl popsán vývoj, validace a aplikace metody na reálné vzorky pacientek léčených pro karcinom prsu lapatinibem v kombinaci s kapecitabinem. Nově vyvinutá, validovaná metoda je rychlá, vysoce účinná a vhodná pro zavedení do klinické praxe.

LITERATURA

- ❖ Abrahámová J. (2000) Rakovina prsu, pp. 9-28, nakladatelství Triton, Praha, ČR
- ❖ Abrahámová J. (2009) Co by jste měli vědět o rakovině prsu, pp. 77-95, vydavatelství Grada Publishing, Praha, ČR
- ❖ Abrahámová J., Dušek L. (2003) Možnosti včasného záchytu rakoviny prsu. Nakladatelství Grada Publishing a.s., Praha, ČR
- ❖ Azim H., Azim H.A., Escudier B. (2009) Trastuzumab versus lapatinib: The cardiac side of the story. *Cancer Threatment* 35, 633-638
- ❖ Bai F., Freeman B.B., Fraga Ch.H., Fouladi M., Stewart C.F. (2006) Determination of lapatinib (GW572016) in human plasma by liquid chromatography electrospary tandem mass spektrometry (LC-ESI-MS/MS). *Journal of Chromatography B* 861, 169-175
- ❖ Barek J. (2000) Metrologická terminologie v chemii. *Chem. Listy* 94, 39-44
- ❖ Blackwell K.L., Kaplan E.H., Franco S.X., Marcom P.K., Malesko J.E., Sorensen M.J., Berger M.S. (2004) A phase II, open-label, multicenter study of GW572016 in patients with trastuzumab-refractory metastatic breast cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 196
- ❖ Büchler T., Kořán M. (2009) Karcinom prsu, Průvodce pro pacienty – diagnosa a léčba, pp. 8-12, Vydala aliance žen s rakovinou prsu o.p.s., Praha, ČR
- ❖ Burris H.A. III., Hurwitz H.I., Dees E.C., Dowlati A., Blackwll K.L., O`Neil B., Marcom P.K., Ellis M.J., Overmozer B., Jones S.S., Harris J.L., Smith D.A., Koch K.M., Stead A., Mangum S., Spector N.L. (2005) Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical aktivty study of Lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients with metastatic carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 23(10), 5303-5313

- ❖ Burris H.A. III. (2004) Dual kinase inhibitor in the treatment of breast cancer: Initial experience with the EGFR/ErbB-2 inhibitor lapatinib. *The Oncologist* 9, 5-10
- ❖ Cinek P., Filip S. (2007a) Prediktivní a prognostické faktory invazivního karcinomu prsu v praxi. *Vojenské zdravotnické listy* 06/07, 205-210
- ❖ Cinek P., Filip S. (2007b) Membránový receptor HER-2/neu – struktura a funkce. *Vojenské zdravotnické listy* 6, 211-215
- ❖ Cosimo S. D., Baselga J. (2008) Targeted therapies in breast cancer: Where are now. *European Journal of Cancer* 44, 2781-2790
- ❖ Frame D. (2007) New strategies in controlling drug resistance. *J Manag Care Pharm.* 13, 13-17
- ❖ Geyer Ch.E., Forster J., Lindquist D., Chan S., Romineu C.G., Pienkowski T., Jagiello-Gruszfeld A., Crown J., Chan A., Kaufman B., Skarlos D., Campone M., Davidson N., Berger M., Oliva C., Rubin S.D., Stein S., Cameron D. (2008) Lapatinib plus capecitabin for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 355, 2733-2743
- ❖ Chen X.H. (2004) Expanding the clinical development bevacizumab. *The Oncologist* 9, 25-34
- ❖ Chien K. (1999) Stress pathway and heart failure. *The Cell* 98, 555-558
- ❖ Chovanec J., Dostálová Z. (2009) Biologická léčba karcinomu prsu. *Praktická gynekologie* 13, 228-231
- ❖ Chovanec J., Dostálová Z., Navrátilová J. (2008) Karcinom prsu – aktuální problém. *Interní. Med.* 10, 84-8
- ❖ Klener P. (2007) Cílená terapie v onkologii. *Post-grad Med* 9, 128-134

- ❖ Koch K.M., Reddy N.J, Cohen R.B., Lewis N.L., Whitehead B., Mackay K., Stead A., Beelen A.P., Lewis L.D. (2009) Effect of food on the relative bioavailability of lapatinib in cancer patients. *Journal of clinical oncology* 27, 1191-1206
- ❖ Kolařík D. (2004) Hormonální substituce a karcinom prsu. *Moderní Gynekologie a porodnictví* 13, 397-403
- ❖ Konopásek B., Petruželka L. (1997) Karcinom prsu, pp. 8-125 nakladatelství Galén, Praha ČR
- ❖ Larson R.A., Druker B.J., Guilhot F., O'Brien S.G., Riviere G.L., Krahnke T. (2008) Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 111, 4022-4028
- ❖ Lin N.U., Carey L.A., Liu M.C. (2006) Phase II trial of lapatinib for brain metastases in patients with HER2+ breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 24, Abstract 503
- ❖ Lüftner D., Lüke C., Possinger K. (2003) Serum HER-2(neu in the management of breast cancer patients. *Clin. Biochem.* 36, 233-240
- ❖ Masopust J. (2004) Nádorové markery. *Labor Aktuell* 03/07, 7-9
- ❖ Mass R.D. (2004) The HER receptor family: a rich target for therapeutic development. *Int. J. Radiation Oncology Biol. PHYS.* 58, 932-940
- ❖ Medina P.J., Goodin S. (2008) Lapatinib : a dual inhibitor of human epidermal growth factor receptor tyrosine kinases. *Clinical Therapeutics* 30(8), 1426-1447
- ❖ Moy B., Goss P.E. (2006) Lapatinib: current status and future directions in breast cancer. *The Oncologist* 11, 1047-1057
- ❖ Mužík J., Dušek L., Abrahámová J., Koptíková J. (2009) Stručný přehled epidemiologie zhoubného novotvaru prsu v České republice. *Onkologie* 3, 7-11

- ❖ Nelson M.H., Dolder C.R. (2006) Lapatinib: a novel dual tyrosine kinase inhibitor with activity in solid tumors. *Ann Pharmacother* 40, 261 -269
- ❖ Nielsen D.L., Andersson M., Kamby C. (2009) HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treatment reviews* 35, 121-136
- ❖ Erp N.P., Gelderblom H., Guchelaar H.J. (2009) Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treatment Reviews* 35, 692-706
- ❖ Pandite L., Buris H.A., Jones S. (2004) Phase I safety, pharmacokinetics, and clinical activity study of lapatinib (GW572016), a reversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinases, in heavily pretreated patients. *J. Clin. Oncol.* 23, 5305-5313
- ❖ Petráková K., Demlová R. (2008) Lapatinib. *Remedia* 18, 13-1
- ❖ Petruželka L. (2007) Současné možnosti a nové perspektivy systémové léčby karcinomu prsu. *Klinická farmakologie a farmacie* 21(3-4), 103-113
- ❖ Petruželka L. (2009) Biologická léčba karcinomu prsu. *Onkologie* 3(1), 19-27
- ❖ Petruželka L., Petruželková L. (2008) Lapatinib. *Farmakoterapie* 5, 483-497
- ❖ Picard S., Titier K., Etienne G., Teihelt E., Ducint D., Bernard M.A., Lasalle R., Marit G., Reiffers J., Begaud B., Moore N., Molimard M., Mahon F.X. (2007) Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 109; 3496-3499
- ❖ Prausová J. (2004) Nádory prsu. *Vesmír – onkologie* 83, 495-501
- ❖ Pustzai L., Mazouni C., Anderson K. et al (2006) Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *The Oncologist* 11, 868-877

- ❖ Reddy N., Cohen R., Whitehead B. (2007) A phase I, openlabel, free period, randomized crossover study to evaluate the effect of food on the pharmacokinetics of lapatinib in cancer patients. *Clin. Pharmacol Ther.* 81, 16-17
- ❖ Roche S., McMahon G., Clynes M., O'Connor R. (2009) Development of high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric method for the determination of cellular levels of tyrosine kinase inhibitors lapatinib and dasatinib. *Journal of Chromatography B* 877, 3982-3990
- ❖ Rojo F., Albanell J., Rovira A., Corominas J., Manzarbeitia F. (2008) Targeted therapies in breast cancer. *Seminars in Diagnostic Pathology* 25, 245-261
- ❖ Rusnak D.W., Lackey K., Affleck K., Wood E.R., Alligood K.J., Rhodes N., Keith B.R., Murray D.M., Glennon K., Knight W.B., Mullin R.J., Gilmer T.M. (2001) The effect of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human and tumor-derived cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 85-94
- ❖ Slamon D.J., Leyland-Jones B., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eirmann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783-92
- ❖ Shephard H.M., Lewis G.D., Sarup J.C. et al (1991) Monoclonal antibody therapy of human cancer: taking the HER-2 protooncogene to the clinic. *J. Clin. Immunol.* 11, 117
- ❖ Strnad P. (2004) Historie léčby karcinomu prsu. *Moderní Gynekologie a porodnictví* 13, 361-365
- ❖ Strnad P. (2004) Poznámky k diagnostice karcinomu prsu. *Moderní gynekologie a porodnictví* 13, 477-480
- ❖ Strnad P., Rob L., Křížková H., Zuntová A. (2003) Nové trendy chirurgické léčby karcinomu prsu. *Praktická gynekologie* 6/03, 18-21

- ❖ Šimková M. (2005) Prediktivní význam sérového HER-2/neu u nemocných s karcinomem prsu léčených Herceptinem. *Klin. Onkol.* 18, 23-26

- ❖ Tesařová P. (2009) Lapatinib u generalizovaného karcinomu prsu. *Farmakoterapie* 5, 175-178

- ❖ Titier K., Picard S., Ducint D., Teihet E., Moore N. Berhaud P., Mahon F-X., Molimard M. (2005) Quantification of imatinib in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther. Drug. Monit.* 27, 634-340

- ❖ Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D. Gutheil J.C., Hartus L.N., Fehrenbacher L., Slamon D.J., Murény M., Novotny W.F., Buchmore M., Shak S., Stewart S.J., Press M. (2002) Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line threatment of HER2 overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 20, 719-726

- ❖ Vorlíček J., Abrahámová J., Vorlíčková H. (2006) *Klinická onkologie pro sestry*, pp.256, vydavatelství Grada Publishing, Praha, ČR

- ❖ Walker R.A., Dearing S.J. (1999) Expression of epidermal growth factor receptor m RNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 53, 167-176

- ❖ Xia W., Liu L.H., Ho P. (2004) Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB-2) is regulated by heregulin through heterodimer formativ with ErbB-3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* 23, 646-653

- ❖ Zítková K. (2008) Naše zkušenosti s biologickou léčbou karcinomu prsu. *Onkologická péče* 02/08, 11-15

INTERNETOVÉ ZDROJE

www.swod.cz - systém pro vizualizaci onkologických dat

www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/ana/validace.pdf - validační program pro statické zpracování analytických dat

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
BRCA 1	tumor supresorový gen (breast cancer 1)
BRCA 2	tumor supresorový gen (breast cancer 2)
CAD	tlak kolizního plynu (collision gass pressure)
CA 15 – 3	nádorové markery
CE	kolizní energie (collision energy)
CEA	karcinom embryonální antigen, nádorový marker
CISH	chromogenní in situ hybridizace
CR	kompletní léčebná odpověď (complete response)
CT	počítačová tomografie
CUR	curtain gass
CXP	výstupní potenciál kolizní cely (collision cell exit potential)
CYP	cytochrom P-450
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DCIS	duktální karcinom in situ
D8-IM	deuterovaný standard imatinibu
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ECD	extracelulární doména
EGFR	epidermální růstový faktor (epidrmal grow factor)
ELISA	imunologická metoda sloužící k detekci protilátek (enzyme – linked immunosorbent assay)
EP	vstupní potenciál (entrance potential)
ER	estrogenový receptor
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
5-FU	5-fluorouracil
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FSH	folikulostimulační hormon
GS1	zmlžující plyn
GS2	sušící plyn
Her-2/neu	receptor lidského epidermálního růstového faktoru - protoonkogen (human epidermal grow factor)
HPLC	vysoce účinná kapalinová hromatografie (hight performance liquid chromatograpy)
HRT	hormonální terapie

IDC	infiltrující duktální karcinom
IS	napětí na kapiláře (ion spray voltage)
ISTD	interní standard
LAP	lapatinib
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LH	luteinizační hormon
LoD	mez detekce (limit of detection)
LoQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
MRM	multiple reaction monitoring
ORR	objektivní léčebná odpověď (overall response survival)
PgR	progesteronový receptor
PR	parciální léčebná odpověď (partial response)
R	korelační koeficient
RPM	úhlová rychlost – otáčky za minutu (revolutions per minute)
TDM	therapeutic drug monitoring
TEM	teplota zmlžujícího plynu
TNM	tumor-nodes-metastasis system
TKI	tyrosinkinasový inhibitor
TK doména	tyrosinkinasová doména
TPP	doba do progresu onemocnění (time to progression)
SVOD	system pro vizualizaci onkologických dat
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie (ultra high performance liquid chromatography)
UGTs	uridinfosfát-glukuronosyltransferasa
ÚZIS	ústav zdravotnických informací a statistiky
VEGF	vaskulární endotelový faktor (vascular endothelial growth factor)