



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Katedra: Onkologická klinika dětí a dospělých

Pavel Pochop

**Sledování farmakokinetiky cytostatik ve
sklivcovém prostoru králičího bulbu po
subkonjunktivální a transkorneální aplikaci.**

Disertační práce

Praha 2012

Doktorské studijní programy v biomedicín

Univerzita Karlova v Praze a Akademie v d České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště : Ústav histologie a embryologie 2. lékařské fakulty

Autor: MUDr. Pavel Pochop

Školitel: doc. MVDr. Luděk Vajner, CSc.

Grantová podpora:

Práce vznikla za finanční podpory grant IGA MZ ČR . 9532-3/2007.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Souhlasím s tím, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vdeckých informací 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Zároveň prohlašuji, že každý, kdo tuto práci použije pro svou odbornou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zveřejněním elektronické verze mé práce v Digitálním repozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zveřejněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze

Souhlasím – Nesouhlasím

V Praze, 16.03.2012

Jméno – Příjmení (hříčným písmem)

Podpis

Podkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. MVDr. Lukovi Vajnerovi, CSc., za jeho laskavé odborné vedení, pomoc a veškeré rady, kterých se mi dostalo během postgraduálního studia, zejména při práci s laboratorními zvířaty, která by bez jeho zkušeností nepochybně uhynula. Za cenné připomínky děkuji též paní prof. MUDr. Dagmar Doležalové, CSc., dále děkuji MUDr. Jiřímu Uhlíkovi, Ph.D., MUDr. Denise Darsové, MUDr. Josefu Mališovi, Ing. Jiřímu Kukačkovi, Ph.D., Ing. Evě Klapkové, Ph.D., MUDr. Hundie Tesfayemu, Ph.D., Ing. Soně Křížkové, Ph.D., a MUDr. Jáně Lešákové, CSc., bez jejichž spolupráce by tato práce nemohla vzniknout. Rovněž bych chtěla poděkovat celé své rodině za to, že mě během celého studia podporovala.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod..... | 7 |
| 1.1. Historické poznámky..... | 7 |
| 1.2. Epidemiologie..... | 7 |
| 1.3. Klinické projevy retinoblastomu..... | 8 |
| 1.4. Genetika..... | 13 |
| 1.5. Vyšetřovací metody..... | 14 |
| 1.5.1. Anamnéza..... | 14 |
| 1.5.2. Vyšetření předního segmentu oka..... | 15 |
| 1.5.3. Nepřímá oftalmoskopie..... | 15 |
| 1.5.4. Fotodokumentace..... | 16 |
| 1.5.5. Fluorescenční angiografie..... | 16 |
| 1.5.6. Ultrasonografie..... | 16 |
| 1.5.7. Počítačová tomografie..... | 18 |
| 1.5.8. Magnetická rezonance..... | 18 |
| 1.5.9. Jehlová biopsie..... | 19 |
| 1.6. Klasifikace retinoblastomu..... | 19 |
| 1.7. Terapie retinoblastomu..... | 24 |
| 1.7.1. Enukleace..... | 24 |
| 1.7.2. Frakcionovaná zevní radioterapie..... | 25 |
| 1.7.3. Brachyterapie | 26 |
| 1.7.4. Kryoterapie..... | 28 |
| 1.7.5. Laserová terapie..... | 29 |
| 1.7.6. Chemoterapie..... | 31 |
| 1.7.7. Kombinovaná terapie a další terapeutické možnosti..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 2. Hypotézy a cíle práce..... | 36 |
| 3. Popis použitých experimentálních metod..... | 37 |
| 3.1. Použitá laboratorní zvířata..... | 37 |
| 3.2. Karboplatina..... | 38 |
| 3.2.1. Uspořádání pokusu..... | 38 |
| 3.2.2. Aplikace karboplatiny a odběr vzorků..... | 39 |
| 3.2.3. Měření koncentrace karboplatiny..... | 40 |
| 3.2.4. Hodnocení vedlejších účinků..... | 42 |
| 3.2.5. Metalothionein..... | 42 |
| 3.3. Sledování vedlejších účinků po opakované intravitreální transkorneální aplikaci karboplatiny..... | 43 |
| 3.4. Etoposid..... | 46 |
| 4. Výsledky..... | 47 |
| 4.1. Karboplatina..... | 47 |
| 4.2. Sledování vedlejších účinků po opakované intravitreální aplikaci..... | 52 |
| 4.3. Etoposid..... | 55 |
| 5. Diskuse metodických postupů a výsledků..... | 58 |
| 6. Závěry a zhodnocení cíle práce..... | 63 |
| 7. Souhrn..... | 65 |
| 8. Seznam zkratk..... | 66 |
| 9. Seznam použité literatury..... | 68 |

1. Úvod

1.1. Historické poznámky

Retinoblastom představuje vysoce maligní neurogení nádor, který vyžaduje včasnou diagnostiku a neodkladnou léčbu (Bedford et al., 1971). Do poloviny 19. století se jednalo o onemocnění fatální. Retinoblastom byl poprvé popsán již roku 1597 Petrasem Pavíem v Amsterdamu, ale o povahu tohoto nádoru se v dlo v dalších dvou stech letech velmi málo (Albert, 1987). Ještě v roce 1864 byl retinoblastom pokládán za gliom (Virchow, 1864). Vztah nádoru k sítnici byl díky objevu Flexnerových-Wintersteinerových rozet zjevný až od roku 1891 (Flexner, 1891, Wintersteiner, 1897). Později se ustálil název retinoblastom, který byl v roce 1926 přijat americkou oftalmologickou společností (Johnson, 1926).

1.2. Epidemiologie

Retinoblastom se vyskytuje nejen u dětí, ale i u některých zvířat (Fugaro et al., 2005, Jensen et al., 2003 a Knottenbelt et al., 2007). Incidence činí 1 na 15000 – 20000 nově narozených dětí a je poměrně konstantní u všech ras a v různých oblastech. Bilaterální nádor vyskytuje ve 25 – 35 % případů (Shields a Shields, 1992). V případě bilaterálního výskytu bývá nádor často mnohočetný (obr. 1). Onemocnění je nejčastěji diagnostikováno v 18. měsíci života dítěte. Pokud se jedná o bilaterální výskyt, diagnostikuje se onemocnění zpravidla dříve – průměrně ve 12. měsíci, v případě jednostranného výskytu ve 23. měsíci (Bishop a Madsen, 1975). Věkové rozmezí je ovšem značně široké. Zaznamenali jsme i v případě předčasně narozeného dítěte, u kterého byl diagnostikován retinoblastom krátce po narození díky vyšetření očního pozadí pro podezření na ROP (retinopathy of prematurity). Nejraritnější je záchyt retinoblastomu v dospělosti (Shields J.A. et al., 1976a).



Obr. 1 – Mnohočetný retinoblastom při bilaterálním postižení.

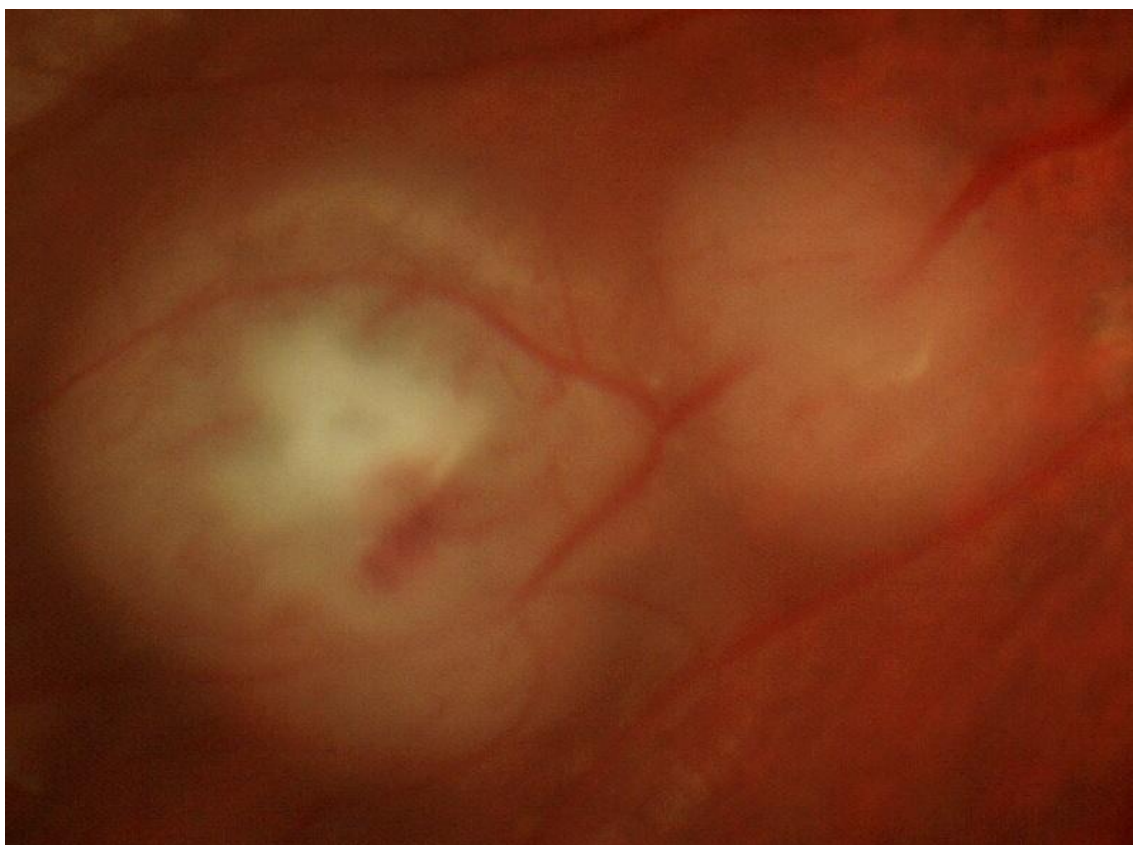
1.3. Klinické projevy retinoblastomu

Retinoblastom je někdy diagnostikován dříve, než se klinicky projeví. Může se to přihodit například díky vyšetření pacienta v rámci screeningu kongenitální katarakty již krátce po narození nebo v rámci vyšetření očního pozadí z neurologické a jiné indikace. V těchto případech se často podaří zachytit časné stádium retinoblastomu – drobné, více či méně ohraničené, šedavé nebo bílé, často jen lehce prominující léze na sítnici, a to i při mnohočetném postižení. Již v tomto časném stadiu jsou někdy v nádoru přítomny kalcifikace (obr. 2).

Pokud tumor roste v makulární krajině, může se i v relativně časném stádiu projevit náhle

vzniklým šilháním (esotropií i exotropií). Je tedy důležité v případě náhle vzniklého šilhání v raném dětství vyšetřit oční pozadí.

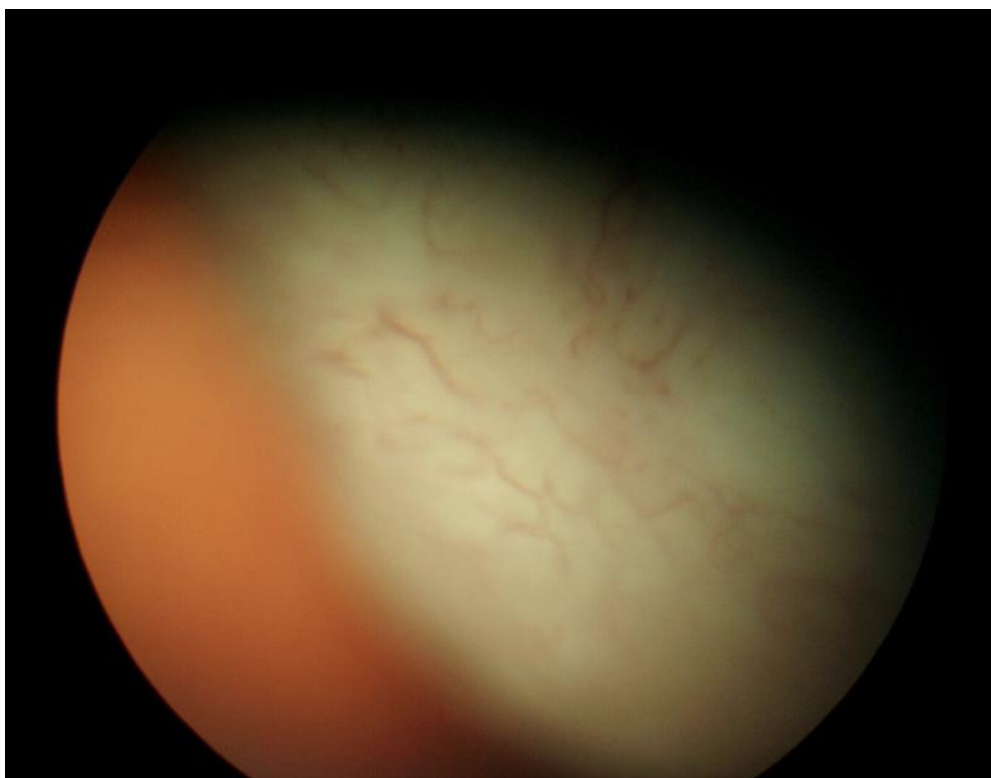
Jindy si mohou povšimnout rodiče dítěte bledého odrazu světla blesku od očního pozadí na digitální fotografii. Odraz světelného záblesku od normálního očního pozadí je na digitální fotografii zpravidla červený a rozdílný vzhled odrazu od oka obsahujícího nádor může upoutat pozornost. Díky tomu je často v těchto případech retinoblastom diagnostikován v časných stádiích.



Obr. 2 – Malé nádory s drobnými kalcifikacemi při mnohočetném postižení.

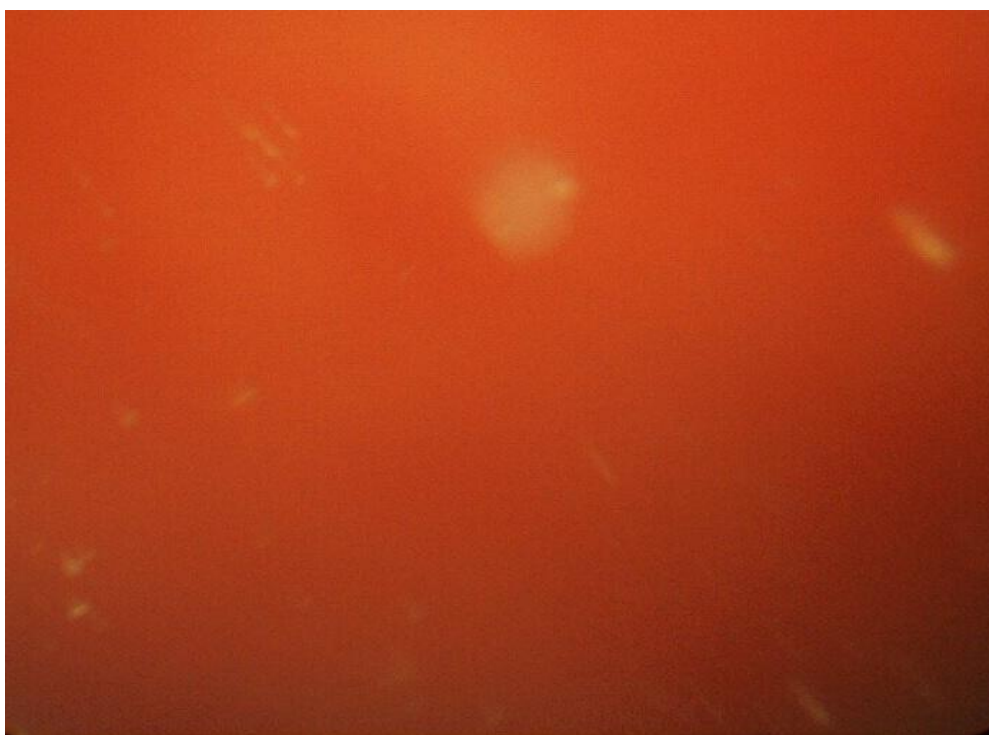


Obr.3 – Zcela odchlípená sítnice p i exofytickém r stu retinoblatomu .



Obr.4 – Rozsáhlý, vysoce prominující endofyticky rostoucí retinoblastom .

Naopak velmi pozdním příznakem je bílý odlesk v zornici za normálního osvětlení (leukokorie). Tento příznak je v případě exofytického růstu (šíření nádoru zevně, pod sítnicí) příznakem totální exudativní amoce (obr. 3) a v případě endofytického růstu (prorůstání nádoru do sklivce) známkou značně prominente tumoru (obr. 4). V případě pokročilého endofytického růstu se zpravidla setkáváme se sklivcovými metastázami (seedingem). Sklivcové metastázy jsou v pozdějším případě lokalizované v blízkosti tumoru, někdy ale zasahují až do přední části sklivcového prostoru (obr. 5). Méně často se setkáváme s kombinovaným endofyticko-exofytickým růstem nádoru (obr. 6) nebo, vzácně, se může jednat o růst infiltrativní, kde nádor prorůstá sítnicí a někdy imituje zánětlivé onemocnění (Schofield, 1960; Morgan, 1971; Shields et al., 1988)).



Obr. 5 – Metastatické postižení sklivce při endofytickém růstu (seeding) .

P evážn ě pozdním projevem retinoblastomu jsou novotvo ené cévy duhovky (rubeosis iridis), které se vyskytují u pokro ilých nález ů až v 50 % p ípad ů (Shields a Shields, 1992). Díky zna né fragilit ě t chto cév mohou pacienti spontánn ě krvácet do p ední komory oka, což vede ke vzniku hyphaemy. Sekundární glaukom bývá pravidlem. U rubeosy se ěasto setkáváme i s heterochromií. Pseudohypopyon, které se vzácn ě vyskytu je u pokro ilých endofyticky nebo infiltrativn ě rostoucích tumor ů, m ůže n kdý imitovat nitroo ní zán ět (Shields et al., 1988).



Obr. 6 – Endofyticko-exofytický r ůst retinoblastomu.

Vzácn ě se m ůže nekrotizující retinoblastom prezentovat jako preseptální celulitis, a vzbuzovat tak podez ení na extrabulbární propagaci nádoru (Shields et al, 1991).

Retinoblastom však m ůže být p ítomen i soub ůžn ě s jiným onemocn ěním, nap íklad s persistujícím primárním sklivcem (Liang et al., 1985) nebo s kongenitální kataraktou (Friendly a Parks, 1970), a m ůlo by na tuto možnost být vŹdy pamatováno.

V našich podmínkách se téměř nesetkáváme s extrabulbární propagací tumoru. Jednou z možností je šíření retinoblastomu přes lamina cribrosa a dále podél pochev optiku, jinou extrasklerální šíření (nejčastěji podél optického nervu) do orbity nebo subkonjunktiválně. Vzdálené metastázy nacházíme u generalizovaných onemocnění intrakraniálně, v kostní dřeně, lymfatických uzlinách i viscerálně (Shields a Shields, 1992). V případě nálezu intrakraniálního zhoubného nádoru se nemusí jednat o metastázu, ale o pinealoblastom. Tehdy hovoříme o tzv. „trilaterálním retinoblastomu“ (Dukel et al., 2010).

Existuje ovšem i benigní varianta retinoblastomu označovaná jako retinocytom (Margo et al., 1983). Není zcela jasné, zda se jedná o primární benigní nádor, nebo o retinoblastom se spontánně zastaveným růstem, případně o tzv. „spící“ retinoblastom, který se později může aktivovat (Eagle et al., 1989). Popsána byla i spontánní regrese retinoblastomu. Není jisté, zda se jedná o sekundární regresi v důsledku ischemie, nebo zda hraje roli komplexnější imunopatologický mechanismus. Není ani jisté, zda se u nádoru ohraničeného chorioretinální atrofií jedná o retinocytom nebo o spontánně regredující retinoblastom, což se jeví jako pravděpodobnější. (Sanborn et al., 1982).

1.4. Genetika

Do druhé poloviny 19. století se prakticky žádný pacient nedožil reprodukčního věku a z tohoto důvodu nebylo o dědičnosti retinoblastomu nic známo. Teprve po ústíkem 20. století začalo být zřejmé, že děti některých rodin léčených enukleací, trpí tímto onemocněním ve značném procentu. Zejména bylo nápadné, že u takových pacientů se zpravidla – asi v 65 % – jednalo o retinoblastom bilaterální (Sorsby, 1972). Nyní rozlišujeme dva typy retinoblastomu – sporadický a hereditární. V případě familiárního retinoblastomu se přenos děje autosomálně dominantním způsobem, takže pro potomky postiženého jedince je riziko přenosu genu 50%.

Asi 10 % nositel tohoto genu neonemocní, jedná se tedy o nekompletní penetraci. Statistickou analýzou se podařilo prokázat, že k vytvoření nádoru je nezbytná ještě jedna dodatečná mutace (Knudson, 1971). Mapováním 13. chromosomu byl objeven lokus q14 odpovídající za predispozici ke vzniku retinoblastomu a byly zde objeveny delece u některých pacientů trpících retinoblastomem (Lele, 1963). V tomto lokusu byl supresorový RB1 gen izolován nezávisle na několika skupinami (Fung et al., 1987, Lee et al., 1987). V současné době máme k dispozici genetické sondy pro screening a poradenství (Onadim et al., 1991).

1.5. Vyšetřovací metody

V diferenciální diagnostice je nezbytné odlišit retinoblastom od všech lézí, které se také mohou manifestovat leukokorií a náhle vzniklým strabismem. Stejně tak je nezbytné odlišit i veškeré bilaterální útvary na očním pozadí a stav, při nichž je primární i sekundární odchlípení sítnice dítěte školního věku.

1.5.1. Anamnéza

Odebrat podrobnou anamnézu od rodičů dítěte s podezřením na retinoblastom je nezbytné i v případě retinoblastomu, a to dříve, než zahájíme podrobné, nebo dokonce invazivní, vyšetření. Zajímá nás především historie, informace o případných infekcích v jeho příběhu, kontakt dítěte se zvířaty, výskyt dědičných onemocnění v rodině atd. Dále nás zajímá doba vzniku leukokorie, zejména byla-li přítomna již při porodu. Tyto údaje jsou zásadní v diferenciální diagnostice, zejména k vyloučení kongenitální katarakty, perzistujícího primárního sklivce, retinopatie nezralých dětí, toxokarózy a dalších lézí, které mohou imitovat

retinoblastom. Informace o ztrátě oka n kterého z p říbuzných v raném d tství naopak naše podez ení na p řítomnost retinoblastomu zvýší.

1.5.2. Vyšet ení p edního segmentu oka

Patologické zm ny na p edním segmentu oka postiženého retinoblastomem, s výjimkou leukokorie, bývají vcelku vzácné. Velmi vzácn m že být p řítomna i kongenitální katarakta (Friendly a Parks, 1970). Dalším nálezem, sdruženým s retinoblastomem, je získaná heterochromie, která ásto provází neovaskularizace na duhovce (rubeózu). Neovaskularizace m žeme pozorovat p i vyšet ení št rbinovou lampou nebo opera ním mikroskopem. S rubeózou m že byt spojena i spontánní hyphaema, která jinak bývá obvykle spojena s xantogranulomem (Zimmermann, 1965). Optická média bývají zpravidla írá, ale vzácn m žeme pozorovat bu ky v p ední komo e, tyndalizaci i pseudohypopy on, které je neklamnou známkou invaze retinoblastomu do p ední komory. P i vyšet ení št rbinovou lampou nebo opera ním mikroskope m m žeme n kdy pozorovat také voln se pohybující áste ky retinoblastomu v p ední ásti sklivcového prostoru v p řípad endofytického r stu nebo konvexní, non-rhegmatogenní odchlípení sítnice v p řípad r stu exofytického.

1.5.3. Nep ímá oftalmoskopie

Nep ímá oftalmoskopie p edstavuje nejvýznamn ější vyšet ovací metodu pro stanovení diagnózy. Pomocí sklerální imprese je v pr b hu nep ímé oftalmoskopie možné odhalit i drobné léze lokalizované oráln . Obraz onemocn ní bývá v tšinou charakteristický jak p i exofytickém tak i endofytickém r stu. Nej ást ějším nálezem jsou b lavé útvary na sítnici, zpravidla ost e ohrani ené, prominující do sklivcového prostoru oka. Typická bývá

přítomnost kalcifikací, které mohou být v nich kterých případech dobře patrné. Většinou se neseťkáme s jizvením a vitreoretinálními trakcemi, jak to vidíme zpravidla u jiných onemocnění.

1.5.4. Fotodokumentace

Kvalitní fotodokumentace nálezu pořízená při prvním vyšetření je nezbytná pro možnost posouzení dalšího vývoje onemocnění v průběhu léčby, ale i z forenzních důvodů.

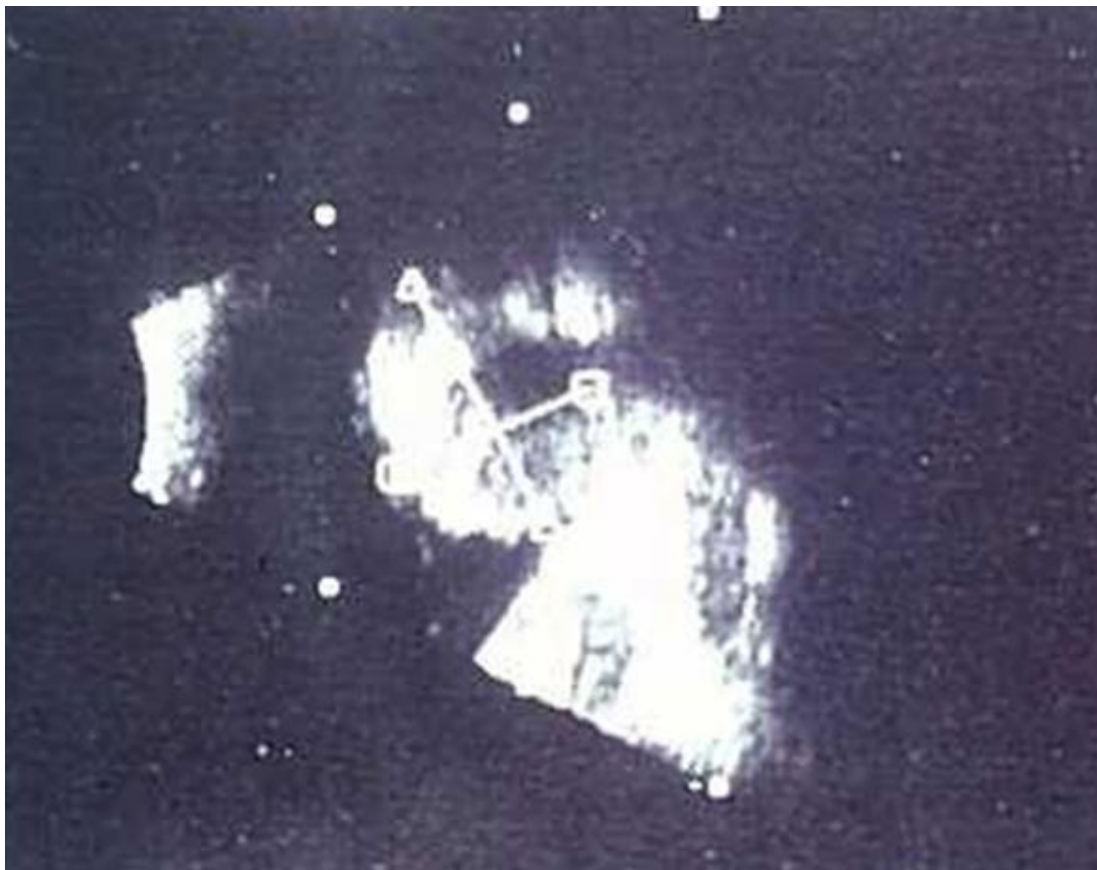
Fotodokumentaci provádíme pomocí ruční kamery pro supinovanou polohu pacienta při vyšetření v celkové anestezii, kde snímáme obraz oční pozadí pod úhlem 50°. Další možností je speciální kontaktní kamera, která při použití imerze fotografuje oční pozadí pod úhlem 130°. Můžeme tak získat lepší pohled o prostorových poměrech. Fotodokumentace je zásadní pro průběžné posuzování úspěšnosti léčby a pro hodnocení dalšího vývoje onemocnění.

1.5.5. Fluorescenční angiografie

Fluorescenční angiografie je indikována například u malých, semitransparentních, oftalmoskopicky obtížně zachytitelných retinoblastomů. V těchto případech je diagnostickým příznakem akumulace fluoresceinu v nádoru a jeho pozdní fluorescence. Fluorescenční angiografie má význam i pro diagnostiku spontánně regredujících nádorů, kde pozorujeme pouze autofluorescenci kalcifikací a transmisí choroidální fluorescence. Podobný náález pozorujeme i po úspěšné radioterapii retinoblastomu.

1.5.6. Ultrasonografie

Ultrasonografický nález je pro retinoblastom natolik charakteristický, že v těsné blízkosti lze snadno odlišit od „pseudoretinoblastomu“ (Shields et al. 1976b). Pro retinoblastom jsou typické četné, vysoce reflektivní intralesionální echogenity na B-scanu stejně jako ultrasonografický stín za patologickou intravitreální echogenitou, který se promítá dále do oční niche a je vyvolán totální reflexí ultrasonografického signálu kalcifikacemi obsaženými v retinoblastomu (obr. 7). Dokumentace iniciačního nálezu pomocí ultrasonografického

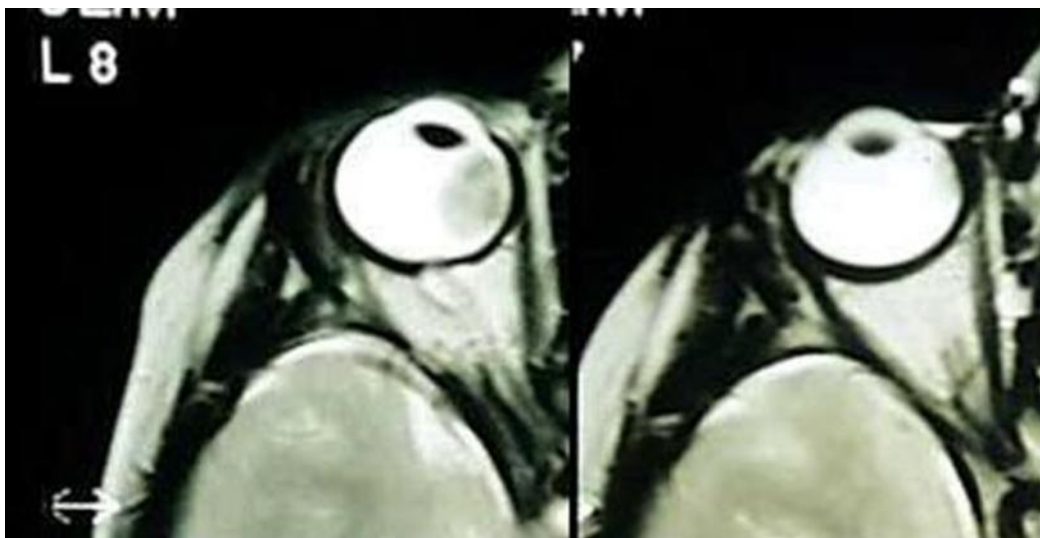


Obr. 7 – Kalcifikovaný retinoblastom, kalcifikace způsobují úplný odraz signálu a vyvolávají stín v oční niche.

vyšetření je dle ležitá i pro posouzení dalšího vývoje onemocnění. Ze stejného důvodu může být užitečné i třídídimenzionální (3D) ultrasonografické vyšetření.

1.5.7. Pořízovací tomografie

Intraokulární kalcifikace, které jsou v případě retinoblastomu pravidlem, jsou dobře detekovatelné pořízovací tomografií. Kalcifikace jsou patrné i při ultrasonografickém vyšetření, nicméně pořízovací tomografie může ukázat i případné extraokulární šíření nádoru. Extraokulární léze ovšem zpravidla kalcifikace neobsahují (Katz a kol., 1984). V rámci tohoto vyšetření je možné diagnostikovat i případný pinealoblastom (trilaterální retinoblastom).



Obr. 8 – Zobrazení retinoblastomu magnetickou rezonancí před léčbou (levá část obrázku) a po léčbě (pravá část obrázku). Je patrný úbytek vitální nádorové tkáně.

1.5.8. Magnetická rezonance

Zobrazení retinoblastomu magnetickou rezonancí nahradilo v posledních deseti letech ve většině případů vyšetření počítačovou tomografií. Vitální tkáň tumoru je dobře patrná, stejně jako přidružená sekundární elevace sítnice, nicméně kalcifikace se nezobrazí tak dobře jako počítačovou tomografií (obr. 8). Vzhledem k běžně dostupnému ultrasonografickému vyšetření, nepředstavuje horší zobrazení kalcifikací zásadní problém. Případná extrabulbární propagace nádoru stejně jako pinealoblastom se zobrazí lépe než při použití počítačové tomografie.

1.5.9. Jehlová biopsie

Pro stanovení diagnózy retinoblastomu je zpravidla zcela postačující neinvazivní klinické vyšetření. Nicméně jsou určité situace, kde je indikovaná. Jedná se například o situaci, kde v blízkosti astrocytomu je přítomen seeding a nález proto velmi imponuje jako retinoblastom (Karcioglu, 2002) nebo v případě raritního infiltrativního typu retinoblastomu. Vzhledem k riziku diseminace nádoru do oční (Karcioglu et al., 1985) se pro jehlovou biopsii doporučuje složitější transkorneální cesta (viz níže).

1.6. Klasifikace retinoblastomu

Zrakové funkce postiženého oka po ukončení léčby jsou v některých případech prakticky normální, jindy se podaří zachránit oko pouze anatomicky, avšak s nulovými zrakovými funkcemi. Snaha stanovit prognózu s ohledem na zachování zrakových funkcí (quo ad visum) postiženého oka podle nálezů před zahájením léčby vedla k vytvoření klasifikací. Klasifikace se postupně měnily tak, jak se vyvíjely terapeutické možnosti. První takovou klasifikací (Ellsworth, 1977, Reese, 1976) byla

klasifikace podle Reeseho-Ellswortha (tab. 1). Postupem času se ukázalo, že jejich klasifikace nebyla zcela vyhovující a některé formy onemocnění měly mnohem lepší prognózu pro zachování dobrých zrakových funkcí, než jakou klasifikace stanovovala. Zejména malé nádory před ekvátorem oka měly díky kryoterapii mnohem lepší prognózu, než jakou určovala klasifikace, a stejně tak léčba malých nádorů, vykazujících endofytický růst s ohraničeným seedingem v blízkosti nádoru, docílovala často mnohem lepších funkčních výsledků, než jaké se očekávaly.

| | | |
|--------------------------------------|---|--|
| Stupeň I – velmi dobrá prognóza | a | Solitární tumor o průměru menším než 4 DD za ekvátorem |
| | b | Několik tumorů menších než 4 DD, všechny za ekvátorem |
| Stupeň II – vcelku dobrá prognóza | a | Solitární tumor, 4 – 10 DD v průměru, za ekvátorem |
| | b | Několik tumorů, 4 – 10 DD v průměru, za ekvátorem |
| Stupeň III – nejistá prognóza | a | Jakákoli léze před ekvátorem |
| | b | Solitární tumor větší než 10 DD za ekvátorem |
| Stupeň IV – nepříznivá prognóza | a | Mnohočetný, který tumor větší než 10 DD |
| | b | Jakákoli léze před ora serrata |
| Stupeň V – velmi nepříznivá prognóza | a | Masivní nádor postihující více než polovinu sítnice |
| | b | Sklivcové metastázy (seeding) |

Tab. 1 – Klasifikace retinoblastomu pro zachovnou léčbu podle Reeseho-Ellswortha.

Z tohoto důvodu byla navržena nová klasifikace, tzv. Essenská (tab. 2), která brala v úvahu i nové terapeutické možnosti své doby (de Sutter, 1987).

Vývoj terapeutických možností v posledních deseti letech vedl k nutnosti vytvořit takovou klasifikaci, která by nové možnosti zohlednila. Touto klasifikací (tab. 3) je současná mezinárodní klasifikace retinoblastomu (Shields a Shields, 1999) – International Classification of Retinoblastoma (ICRB). Podle lokalizace nádoru, jejich velikosti a

diseminace je vyto eno p t stup (A – E). Tyto stupn ur ují prognózu quoad visum za p edpokladu, že pracovišt disponuje všemi v sou asné dob pro lé bu retinoblastomu akceptovanými terapeutickými možnostmi.

| Klasifikace | Charakteristika | Terapeutické možnosti |
|---|--|--|
| Stupe I – velmi p íznivá prognóza | Tumory do 4 DD v pr m ru a do 4 D prominence s výjimkou nádor v blízkosti makuly ter e zrakového nervu | Samostatná fotokoagulace nebo kryoterpie |
| Stupe II – p íznivá prognóza | Tumory st ední velikosti 4 – 10 DD v pr m ru, pokud nespádají do vyšších skupin z jiných d vod | Zevní frakcionovaná radioterapie do 40 Gy nebo brachyterapie kombinovaná s fotokoagulací nebo kryoterapií Lé ba je individuální a závisí na konkrétní situaci u jednotlivých p ípad . |
| Stupe III – nejistá prognóza z d vodu nep íznivé lokalizace nádoru | Tumor v blízkosti makuly, by malý Tumor v t sné blízkosti ter e zrakového nervu, by malý St edn velké tumory s ohrani eným seedingem Malé, vysoce prominující tumory p esahující ora serrata Tumory s odchlípením sítnice Všechny tyto tumory, pokud z jiných d vodu nespádají do vyššího stupn | |
| Stupe IV – nep íznivá prognóza (nezbytná intenzívní lé ba s etnými vedlejšími ú inky) | Rozsáhlý tumor s p ítomností seedingu i bez nebo s odchlípenám sítnice Velký nádor p ekrývající ter zrakového nervu | Zevní radioterapie až do 60 Gy eventueln kombinovaná s chemoterapií. Kryoterapie, fotokoagulace, brachyterapie podle konkrétního nálezu |
| Stupe V – velmi nep íznivá, ale nikoli beznad jná prognóza | Rozsáhlý tumor p es polovinu sítnice eventueln s p ítomností seedingu Totální odchlípení sítnice | Na prvním míst je zvažována enukleace (s p íhlédnutím k vedlejším ú inkum lé by a malé nad ji na zachování užite ných funkcí) Druhá volba – zevní radioterapie kombinovaná s intenzívní chemoterpií Kombinace dvou p edchozích možností – zevní radioterapie do 40 Gy, pokud by byla bez dramatické odpov di, pak, enukleace |

Tab. 2 – Essenská klasifikace pro záchovnou lé bu retinoblastomu

| Stupe | Charakterisika nádor v jednotlivých skupinách |
|--------------|--|
| A | <p>Malý tumor – o průměru 3 mm a menší</p> <p>Velký tumor – větší než 3 mm v průměru</p> |
| B | <p>Makulární lokalizace – ve vzdálenosti 3 mm od foveoly a menší</p> <p>Juxtapapilární lokalizace – ve vzdálenosti 3 mm od papily a menší</p> <p>Seeding v těsné blízkosti tumoru</p> |
| C | <p>Subretinální seeding ve vzdálenosti 3 mm od tumoru a mén</p> <p>Vitreální seeding ve vzdálenosti 3 mm od tumoru a mén</p> <p>Vitreální i sklivcový seeding do 3 mm od nádoru</p> |
| D | <p>Subretinální seeding ve větší vzdálenosti než 3 mm od nádoru</p> <p>Vitreální seeding ve větší vzdálenosti než 3 mm od nádoru</p> <p>Difúzní seeding</p> |
| E | <p>Extenzivní retinoblastom postihující více než 50 % sítnice, sekundární glaukom, krvácení do přední komory, do sklivce nebo subretinálního prostoru</p> |

Tab. 3 - International Classification of Retinoblastoma (ICRB)

Klasifikace TNM (Tumour, Node, Metastasis) určuje nikoli prognózu quoad visum, ale prognózu k přežití (quoad vitam) a tradičně byla využívána pouze pro rozšíření nádoru mimo bulbus. Systém obsahuje dvě složky – klinickou cTNM a patologickou pTNM. Revidovaná klasifikace TNM z roku 2010 inkorporovala ve velké míře pro cT1 a – cT3b výše zmiňovanou

| Stupe postižení | | Rozsah onemocnění | |
|-----------------|------|--|---|
| cTX | | Rozsah primárního tumoru nebyl stanoven | |
| cT0 | | Žádné známky primárního tumoru | |
| cT1 | cT1a | Objem tumor nepřesahuje 2/3 objemu bulbu, není pítomen seeding | Tumory menší než 3 mm, nejsou blíže než 1,5 mm od foveoly a optiku |
| | cT1b | | Aspo jeden tumor je v tšší než 3 mm nebo je blíže než 1,5 mm od foveoly nebo papily |
| | cT1c | | Jako cT1b + je přítomné ohraničené odchlípení sítnice |
| cT2 | cT2a | Objem tumor nepřesahuje 2/3 bulbu, seeding vitreální nebo subretinální | Diskrétní fokální sklivcový nebo subretinální seeding |
| | cT2b | | Masivní subretinální nebo sklivcový seeding, velké sklivcové metastázy charakteru „snhových koulí“ |
| cT3 | cT3a | Masivní postižení oka | Tumor vyplňuje více než 2/3 oka |
| | cT3b | | Tumor je asociován s: rubeózou, krvácením, glaukomem, invází tumoru do přední komory nebo preseptální celulitidou |
| cT4 | cT4a | Je zjevné extraokulární rozšíření tumoru | Invaze do optického nervu |
| | cT4b | | Invaze do orbity |
| | cT4c | | Intrakraniální rozšíření nepřesahující chiasma |
| | cT4d | | Intrakraniální rozšíření přesahující chiasma |

Tab. 4 – klasifikace retinoblastomu podle TNM systému

mezinárodní klasifikace pro retinoblastom ICRB (Tab. 4). Proti jiným nádorům je v TNM klasifikaci retinoblastomu ještě uváděno písmeno „m“ – například T1b3m, které specifikuje počet nádorových ložisek v bulbu, písmeno „f“ určuje zda se jedná o onemocnění familiárního typu či nikoli, a písmeno „d“, které specifikuje infiltrativní šíření nádoru v sítnici. Další část systému (cN, cM) se již od klasifikace jiných nádorových onemocnění příliš neliší.

1.7. Terapie retinoblastomu

Diagnostika a léčba retinoblastomu doznala v posledních desetiletích významných změn. Osmdesátá a devadesátá léta 20. století přinesla možnost kombinací účinných cytostatik, na které se uplatnily i v léčbě retinoblastomu. Díky tomu se zúžily indikace k enukleaci ve prospěch zachovné terapie. Také je již v menší míře využívána frakcionovaná radioterapie. Chemoterapie dokáže redukovat velikost nádorové tkáně v oku, čímž případně mikrometastázy a zabrání tak diseminaci nádorového procesu (Shields et al., 2002). Ve vhodném okamžiku se aplikuje lokální chirurgická léčba, jejíž způsob je dán povodním rozsahem onemocnění, odpovídá léčbu, lokalizací nádoru nebo nádorů a potom nádorových ložisek. Z lokálně destruktivních metod uplatňovaných v souvislosti můžeme jmenovat kryoterapii, transpupilární termoterapii a brachyterapii (Shields et al., 2001). Zejména transpupilární termoterapie v kombinaci s brachyterapií dovoluje díky novým typům infračervených laserů s velkou aperturou destruovat poměrně velký objem nádorové tkáně. Souborně lze hovořit o lokální agresivní terapii. Nicméně prakticky všechny terapeutické metody zavedené od 19. století do léčebné praxe zůstávají v různých modifikacích aktuální.

1.7.1. Enukleace

Odstranění oka obsahujícího retinoblastom – enukleace, bylo doporučováno jako život zachraňující již počátkem 19. století (Wardrop, 1809). Enukleace je v některých případech indikována i v souvislosti. Jedná se zejména o sporadický, velmi pokročilý retinoblastom (stupeň E podle ICRB nebo cT3 podle TNM systému), kde riziko generalizace onemocnění a vedlejší účinky léčby výrazně převažují nad eventuelním benefitem při úspěchu anatomicky

záchovné terapie. V případě bilaterálního postižení je ve většině případů výhodnější
případnou enukleaci odložit a počkat na výsledek chemoredukce.

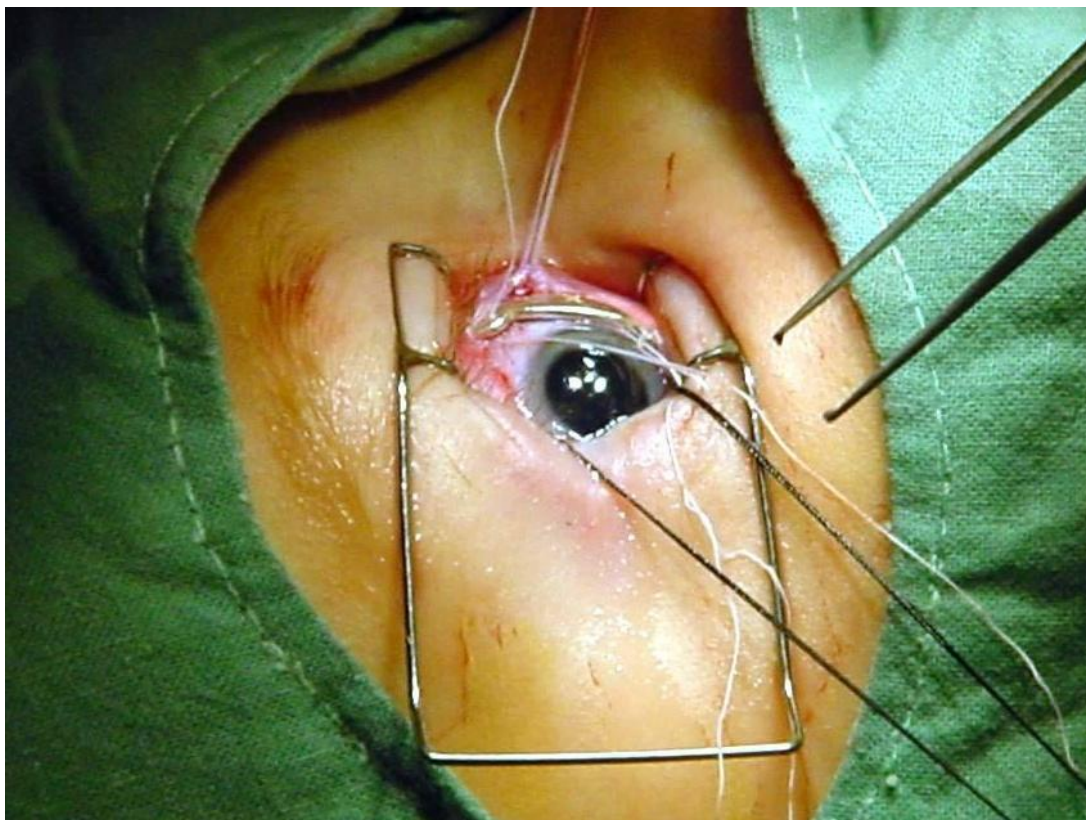
Technika enukleace je poněkud odlišná od techniky enukleace prováděné z jiných příčin. Liší
se jednak manipulací s bulbem, která musí být velmi jemná, nebo retinoblastom je velmi
fragilní a riziko diseminace při velkých změnách nitroočního tlaku během výkonu je velké.
Nedoporučuje se ani zakládání trakčních sklerálních stehů, které představuje určité riziko
diseminace nádorového procesu. (Shields a Shields, 1992). Trakce je prováděna hemostatem
nebo peánem fixovaným na delší pahýl vnitřního přímého okohybného svalu. Další odlišností
je absence komprese optiku peánem před jeho resekcí. Komprese je nevhodná jednak pro
zhmoždění tkáně, které komplikuje následné histopatologické vyšetření resekovaného optiku,
jednak nemá význam z hlediska hemostázy, nebo se vždy snažíme o odstranění optiku
v maximální možné délce. Používají se proto dlouhé enukleační nůžky s mírným zakřivením.
Bulbus po enukleaci není fixován ve formolu, ale je odeslán k vyšetření v nativním stavu,
protože analýza DNA vyžaduje čerstvou nádorovou tkáň.

1.7.2. Frakcionovaná zevní radioterapie

Již na počátku 20. století byla do léčebné praxe zavedena zevní frakcionovaná radioterapie
retinoblastomu (Hilgartner, 1903). Její značná terapeutická úspěšnost byla daná jeho vysokou
radiosenzitivitou. Avšak vzhledem ke známému riziku vzniku sekundárních nádorů (Lennox
et al., 1975) je patrný určitý odklon od této, dříve velmi frekventované léčebné metody.

V současné době je zevní frakcionovaná terapie využívána pro léčbu bilaterálního velmi
pokročilých tumorů pokrývajících terakrového nervu s významným vitreálním nebo
subretinálním seedingem a běžně používaná celková dávka činí 35 – 40 Gy. Léčba je ovšem
spojena s určitými riziky v krátkodobém i dlouhodobém výhledu. Jedná se především o

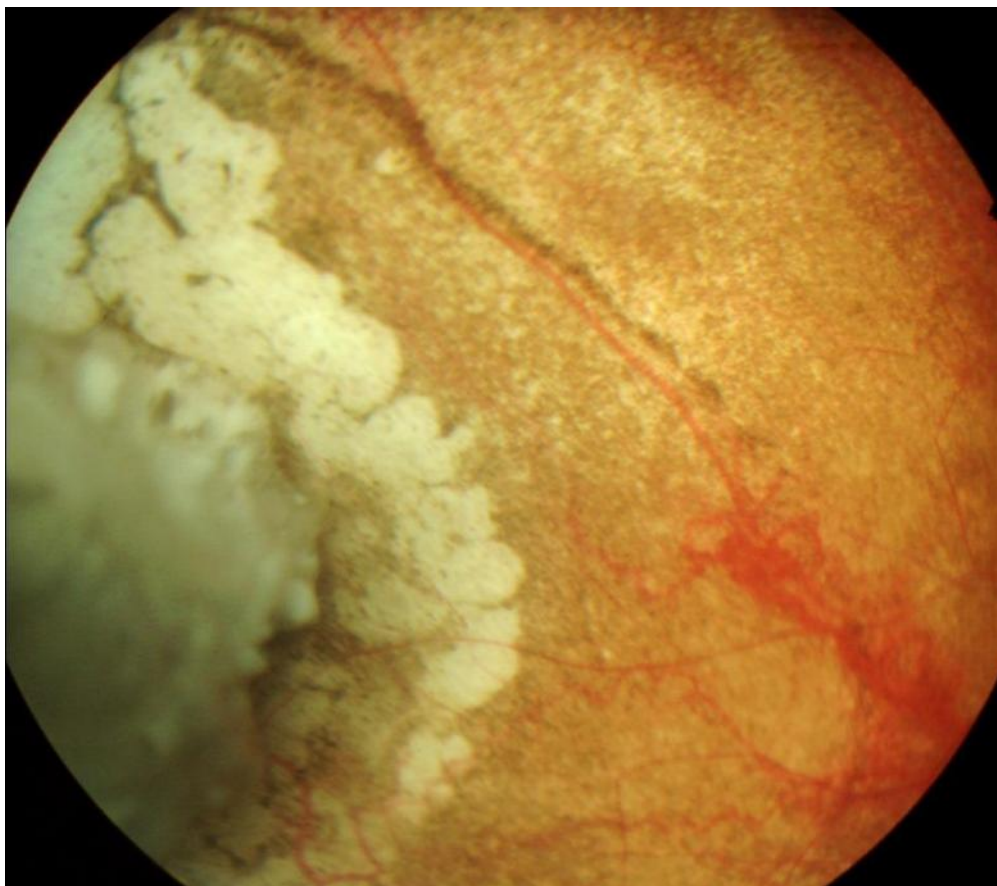
kataraktu, radia ní retinopatii a radia ní optickou neuropatii. V dlouhodobém výhledu je to p edevším riziko vzniku radiací indukovaných orbitálních sarkom , ale i meninge om , leukemie a lymfom . Je t eba konstatovat, že po snížení celkových dávek z d íve aplikovaných 80 Gy na 40 Gy množství t chto komplikací výrazn pokleslo (Sagerman, et al., 1969). V n kterých p ípadech má zevní frakcionovaná radioterapie i kosmetický do pad. Jedná se jednak o poradia ní kožní zm ny, patologickou vaskularizaci spojivky nebo atrofii o nice.



Obr. 9 – URZ je fixován p edem založenými intrasklerálními stehy do místa, v n mž je lokalizován nitroo ní nádor.

1.7.3. Brachyterapie

Radioterapii radonem, který byl v podobě platinového zrna aplikován přímo do nádoru, zahájil poátkem roku 1929 (Moore, 1930) u pacienta trpícího choroidálním melanomem. Ještě v téže roce byla zlatá radonová zrna transsklerálně aplikována do několika retinoblastomů u pacientů, jejichž rodiče odmítli povolit bilaterální enukleaci (Moore, 1931). V léčbě brachyterapií pokračoval Stallard, později však používal ^{60}Co , který ve formě uzavřeného zářivky fixoval na skleru pacienta (Stallard, 1966).



Obr. 10 – Periferně lokalizovaná chorioretinální atrofická jizva, v jejím centru prominující kalcifikace. Stav po aplikaci URZ. Ohraničený seeding v blízkosti tumoru vymizel.

V souasně dob v indikovaných p ípadech, zejména u pacient s ohrani eným seedingem v blízkosti nádoru, používáme pro brachyterapii uzav ený radionuklidový zdroj (URZ) (obr. 9) obsahující jako zdroj beta zá ení ^{106}Ru (Pochop et al., 2005). Aplikovaná dávka iní 40 Gy na apex tumoru nebo do oblasti seedingu. Doba aplikace je ur ena jednoduchým program em a závisí na stá í URZ (aktuálním p íkonu) a prominenci tumoru. Výsledným efektem lé by bývá zpravidla reziduální kalcifikace a chorioretinální atrofická jiz va v místech, kde se p ed lé bou nacházela vitální nádorová tká (obr. 10).

V n kterých p ípadech komplikace lé by, jako nap íklad poradia ní retinopatie, neovaskulární glaukom nebo trak ní odchlípení sítnice, vedou k enukleaci i p es docílenou remisi. Obdobné výsledky i komplikace lé by byly publikovány i jinými pracovišti (Shields et al., 1989).

Brachyterapie byla ve v tšin p ípad využita v kombinaci s dalšími terapeutickými metodami. Porovnáme-li tuto metodu se zevní frakcionovanou radioterapií, je radia ní zatížení o nice menší, a je proto možné o ekávat pokles výskytu radiací indukovaných sekundárních nádor .

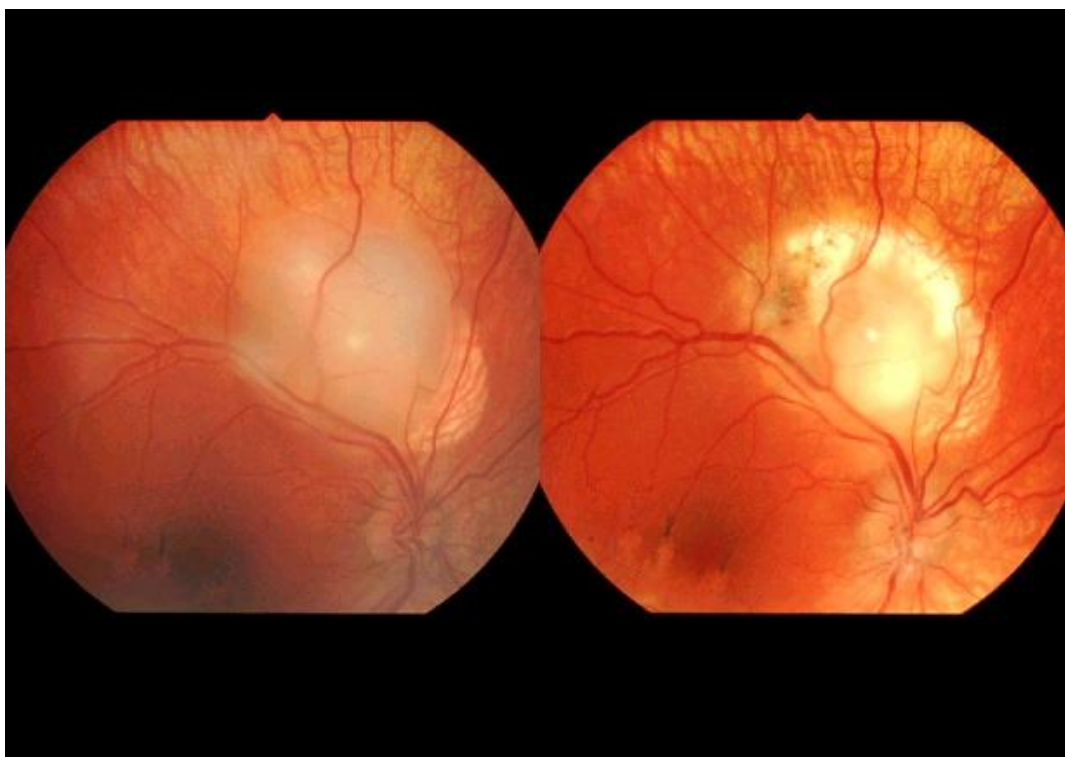
1.7.4. Kryoterapie

Kryoterapie se indikuje jako primární lé ba v p ípad malých, perifern lokalizovaných nádor , ale v tšinou se používá v kombinaci s dalšími lé ebnými metodami (Shields et al., 1989, Pochop et al., 2004). Pro kryoterapii retinoblastomu je používána zvláštní technika trojnásobného mražení, p i které se nádor v celé tlouš ce promrazí až do okamžiku, kdy se ve sklivci na povrchu nádoru objeví drobné krystalky. Mražení trvá asi 5 – 15 vte in a pak následuje pomalé rozmražení tumoru. Stejný proces se ještě dvakrát opakuje. Komplikace lé by nebývají závažné, ob as je kryoterapie provázena p echodn ým exudativním odchlípením sítnice a drobným krvácením. Kryoterapie m že potencovat i další terapeutické

metody. Zejména může usnadnit průnik chemoterapeutik do sklivcového prostoru (Wilson et al., 1996), a proto je vhodné kryoterapii zahájit již v průběhu chemoredukce (viz níže). Výhodná je i kombinace s laserovou terapií, která devitalizuje především apikální část nádoru, zatímco kryoterapie postihuje periferní lokalizované bazální struktury v blízkosti skléry.

1.7.5. Laserová terapie

Předchůdcem laserové terapie byla fotokoagulace xenonovým obloukem (Meyer-Schwickerath a Helferich, 1958), kterou nahradila později laserová fotokoagulace argonovým laserem (Masuyama et al., 1984). Touto metodou bylo možné



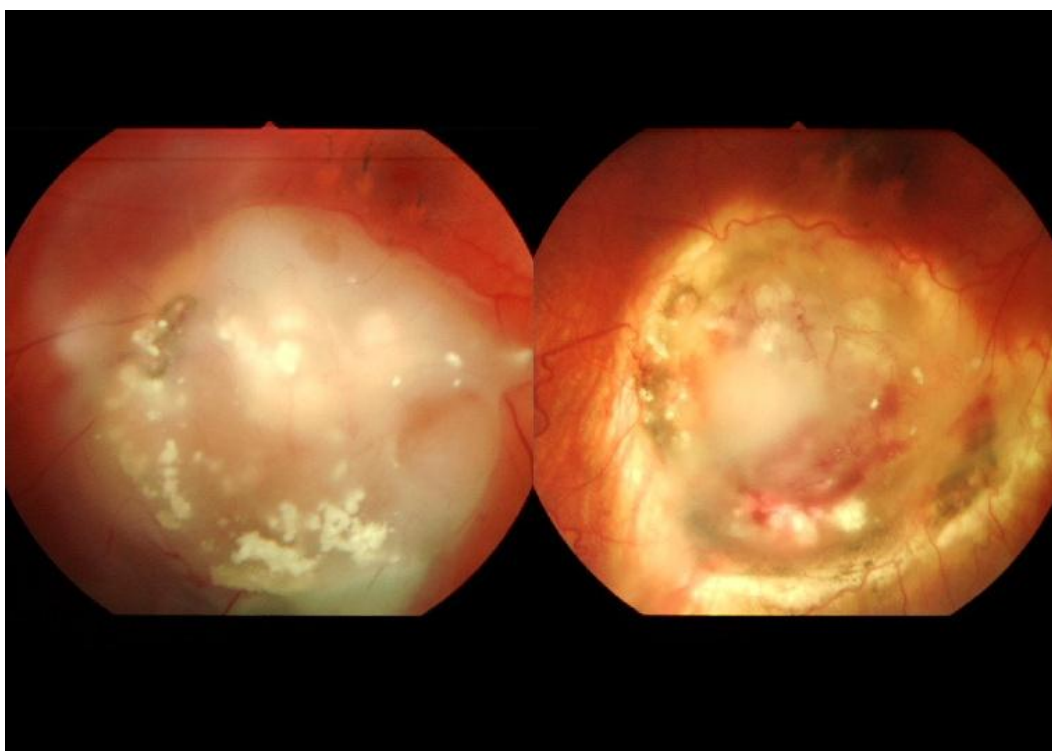
Obr. 11 – Vlevo retinoblastom po chemoredukci s malým lemem chorioretinální atrofie, vpravo drobné reziduum tumoru po transpupilární termoterapii, obklopené částí pigmentovanou atrofickou chorioretinální jizvou.

destruovat pouze malé retinoblastomy s prominencí do 2 mm a sloužila v tšinou jako dopln k jiné lé by.

Zavedením diodových infra červených laser do praxe (Abramson a Scheffler, 2004) se stala laserová terapie mnohem ú inn jší. Metoda je nazývána transpupilární termoterapie (TTT).

Liší se od klasické laserové fotokoagulace velikostí stopy, která m že být zv tšena optikou až na 6 mm, minutovou délkou expozice a dosahovanou teplotou v cílovém objemu. Cílem TTT je zah átí velkého objemu tkán na teplotu mezi 50 – 60° C, a tím tká devitalizovat.

Signálem, že bylo dosaženo pot ebné teploty v zah ívaném ložisku, je lehké zešednutí tkán na konci expozice. Touto technikou je možné dosáhnout devitalizace i



Obr. 12 – vlevo rozsáhlejší retinoblastom po chemoredukci, vlevo tentýž nádor po transpupilární termoterapii, v centru zbytek vitální nádorové tkán a kalcifikace, na povrchu drobné extravazáty, cirkulárn áste n pigmentovaná chorioretinální atrofická jizva.

pomrní velkého a prominujícího ložiska. Po dokončení léčby je v místech, kde se nacházel tumor, pigmentovaná chorioretinální atrofická jizva, někdy s centrální kalcifikací (obr. 11). Při experimentech bylo dosaženo nekrózy tkáně až do hloubky 4 mm (Journée-de Korver et al., 1992).

Komplikace léčby nebyvají velké; kapilární krvácení a puchodný edém nádorové tkáně jsou obličejní a nepovažujeme je za komplikaci (obr. 12). Metodu je možné s výhodou kombinovat s další léčbou (viz dále).

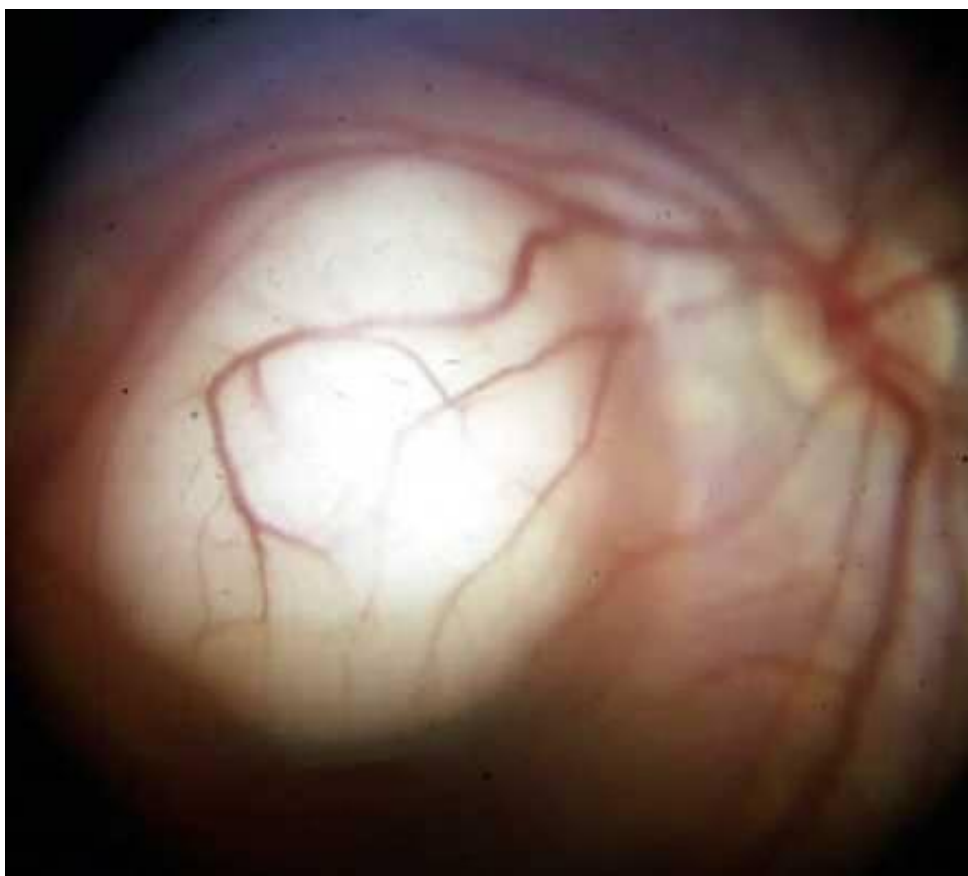
1.7.6. Chemoterapie

Chemoterapie byla u pacientů trpících retinoblastomem zpočátku využívána v případech generalizace onemocnění společně s radioterapií (Stannard et al., 1975). Později byla chemoterapie zvažována jako adjuvantní u pokročilých případech s extrabulbárním šířením tumoru (Freeman et al., 1980). Používal se především cyklofosfamid, který dokázal docílit kompletní remise i v případě generalizace onemocnění. Relapsy byly nicméně časté a proto byla zavedena kombinace chemoterapeutik (White, 1983). Kombinace karboplatiny a etoposidu ve vysokých dávkách se ukázala být velmi efektivní při léčbě generalizovaných forem onemocnění a začala se používat i jako adjuvantní terapie po enukleaci. Dále byla indikována jako neo-adjuvantní terapie u intraokulárních retinoblastomů (Doz et al., 1995). Pro chemoterapii, která měla za cíl zmenšení nádorových ložisek před zahájením další léčby (a byla použita jako iniciální terapeutická metoda) byl zaveden termín chemoredukce (Shields et al., 1996).

V současné době se pro chemoredukci používá kombinace chemoterapeutik – karboplatina, etoposid a vinkristin (VEC). Terapie se podává v šesti cyklech, vždy po druhém a čtvrtém cyklu probíhá vyšetření pacienta v celkové anestezii a posuzuje se efekt léčby. V případě vhodný

okamžik následuje u pokročilejších případů lokální agresivní terapie – sequential aggressive local therapy (SALT). Je tak možné úspěšně léčit i retinoblastom stupně C podle mezinárodní klasifikace ICRB a vyhnout se zevní frakcionované radioterapii. Úspěšnost léčby negativně ovlivňuje masivní subretinální nebo vitreální seeding (Murphree et al., 1996).

Chemoredukce má význam nejen u pokročilých případů, ale i tam, kde je nevelké ložisko (obr. 13) lokalizované v blízkosti foveoly. V těchto případech je možné při zmenšení ložiska (obr. 14) docílit lepších výsledků následně lokální léčby a zlepšit se vyhlídky pro dobré zrakové funkce pacienta.



Obr. 13 – retinoblastom o rozměrech cca 4x4 PD zasahující do foveoly před zahájením chemoredukce

Nyní je tedy možné charakterizovat tři odlišné chemoterapeutické postupy :

- 1) chemoredukci, jejímž cílem je zmenšit nádory před zahájením lokální léčby
- 2) adjuvantní chemoterapii po enukleaci bulby pro pokročilé onemocnění v indikovaných případech (například při invazi nádoru do choroidey, při angioinvazi nebo pro stání retinoblastomu do optického nervu)
- 3) intenzivní chemoterapii (megaterapii) u generalizovaného onemocnění



Obr.14 – stejný nádor po chemoredukci – foveola je nyní prostá nádorem

Mnoho pacientů se může díky moderním chemoterapeutikům vyléčit a mnohdy zachránit i dobré zrakové funkce. Problémem však zůstává léčba intravitreálních ložisek, která jsou nedostupná pro celkovou chemoterapii a těžko ovlivnitelná lokální léčbou. Díky

hematookulární bariéry jsou dosahované koncentrace celkově podávaných chemoterapeutik ve sklivci nedostatečné. Rovněž nepříznivé vedlejší účinky chemoterapeutik (Benz et al., 2000) vedou k tomu, že se stále hledají nové cesty, jak terapeuticky ovlivnit případy pokročilých onemocnění s metastatickým postižením sklivce při relativně minimálním zatížení pacienta. Podle některých prací se zdá, že by koncentraci cytostatik ve sklivcovém prostoru mohla zvýšit kryoterapie provedená den před zahájením chemoterapie (Wilson et al., 1996) a tím docílit jejich většího efektu, další práce však toto zjištění nepodporují (Murray et al., 1997). Dalším možným způsobem, jak intravitreální metastázy ovlivnit, je subkonjunktivální aplikace chemoterapeutik (Harbour et al., 1996 a Hayden et al., 2004), případně i v depotní formě ve fibrinovém koagulu (Van Quill et al., 2005), nebo i jejich intravitreální podání (Kaneko a Suzuki, 2003, Velez et al., 2003). Tyto postupy se zatím prováděly pouze experimentálně a chybí dostatečné informace o tom, jaké koncentrace při tomto způsobu aplikace budou účinné a zároveň netoxické. Pro zavedení této metody do klinické praxe je nezbytné znát farmakokinetické vlastnosti cytostatik, zejména rychlost poklesu jejich koncentrace ve sklivcovém prostoru a případné toxické účinky, a to jak celkové, tak lokální.

Další možností zkoušenou v poslední době je superselektivní intraarteriální aplikace chemoterapeutik (melfalanu) katétrem do ophthalmica (Yamane et al., 2004), která však, i podle našich zkušeností, není prosta vedlejších účinků (Wilson et al., 2011). Největším rizikem je intrakraniální krvácení a ložisková ischemie (mozkový infarkt – encefalomalacie).

1.7.7. Kombinovaná terapie a další terapeutické možnosti

Jak bylo dříve uvedeno, u některých pacientů je možné léčit pouze jednou terapeutickou metodou.

Například jednostranný, velmi pokročilý retinoblastom, kde nádor postihuje více než 2/3

sítnice a po provedené enukleaci neprokážeme angioinvasi, invazi nádoru do choroidey nebo optického nervu, nevyžaduje žádnou další léčbu. Ve většině případů ovšem s jednou terapeutickou metodou nevystačíme. Kombinace celkové léčby chemoterapií a lokální terapie umožnila anatomicky zachovat až 50 % bulbů a v menším procentu dokonce i uspokojivými zrakovými funkcemi. Některé terapeutické metody se dokonce vzájemně potencují – kryoterapie patrně zlepšuje pronik chemoterapeutik do sklivcového prostoru a podobný efekt má i tzv. chemotermoterapie. Jedná se o aplikaci karboplatiny v dávce 560 mg/m², po které je v krátké době pacient léčen transpupilární termoterapií (Lumbroso et al., 2002). Kombinace transpupilární termoterapie s destrukcí apikální části tumoru umožní snížit kalkulované dávky pro brachyterapii.

Některé terapeutické metody mají spíše experimentální charakter a nejsou dosud široce využívány. Jedná se například o fotodynamickou terapii (Aerts et al., 2010). Využívá se fototoxicity látek na bázi porfyrinů, které jsou po intravenózní aplikaci aktivované laserem určité vlnové délky (Stephan et al., 2008). Efekt ovšem nebyl vždy přesvědčivý (White et al., 1988). Další terapeutickou metodou, zkoušenou experimentálně i v klinické praxi, je genová terapie (Hurwitz et al., 1999). V principu se jedná o využití adenovirového vektoru nesoucího gen thymidinkinázy viru Herpes simplex. Následuje léčba pro-gancyklovirem. Léčba byla úspěšná u zvířecího modelu za použití buněčné linie retinoblastomu Y79. Publikované výsledky genoterapie provedené analogickým postupem u osmi očí s intravitreálním seedingem uvádí vymizení sklivcových metastáz v sedmi z nich (Chávez-Barrios et al., 2005)

2. Hypotézy a cíle práce

Lokální aplikace cytostik by u pacientů trpících retinoblastomem mohla být přínosná

provedením z následujících důvodů :

- 1) dosažená hladina ve sklivcovém prostoru by mohla být vyšší než při celkové aplikaci
- 2) účinná koncentrace by mohla být v cílovém orgánu udržena po delší dobu
- 3) mohl by se snížit dopad celkových vedlejších účinků podávaných cytostatiků při srovnání s jejich intravenózní aplikací (Benz et al., 2000)
- 4) klesl by počet pacientů indikovaných k frakcionované radioterapii
- 5) snížil by se pravděpodobně počet enukleovaných bulbů .

Dalším faktorem, který ovlivňuje účinnost léků by karboplatinou, je hladina metalothioneinu (MT). Tento malý protein se významně podílí na vzniku rezistence vůči cytostatikům, zejména cisplatině (cisPT). MT váže cisPT (Kizek a kol., 2004, Prusa a kol., 2005), čímž vzniká komplex MT-cisPT, a ten je pak dále detoxikován zejména v ledvinách.

Cílem práce je tedy :

- a) zjistit koncentraci cytostatik (karboplatiny, etoposidu) ve sklivci králičího bulbu po periokulární a intravitreální aplikaci,
- b) stanovit změny koncentrací cytostatik v závislosti na dávce (AUC viz dále),
- c) stanovit hladinu MT ve sklivci a v plazmě králíka před a po aplikaci karboplatiny,
- d) klasifikovat vedlejší lokální a celkové účinky cytostatik v závislosti na použitých dávkách a koncentracích,
- e) Stanovit anatomické změny králičího bulbu při dlouhodobém průběžném sledování oftalmoskopicky a následně histopatologicky po ukončení experimentu

- f) porovnat výchozí záznamy ERG před podáním cytostatik a po poslední aplikaci cytostatika

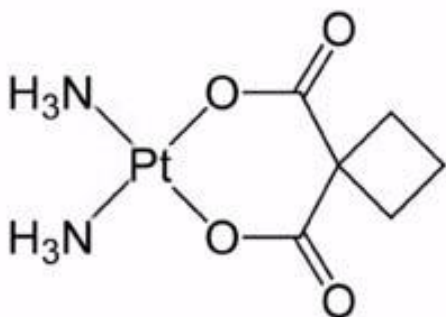
3. Popis použitých experimentálních metod

3.1. Použitá laboratorní zvířata

Pro všechny experimenty jsme používali laboratorní novozélandské bílé králíky samého pohlaví prosté specifických patogen (Anlab, Praha, Česká republika). Celkem jsme v experimentu použili 8 skupin laboratorních zvířat, v každé skupině $n=6$. Laboratorní zvířata jsme používali k pokusům v souladu s vyhláškou č. 207/2004 ministerstva zemědělství České republiky a veškeré pokusy byly prováděny na základě protokolu schváleného odbornou komisí pro ochranu zvířat 2. lékařské fakulty Karlovy University. Teplota v laboratoři se pohybovala mezi 22°C a 25°C, relativní vlhkost prostředí pak mezi 55% a 65%. Aplikaci i následné odběry sklivce a krve jsme prováděli v celkové disociativní anestezii. Používali jsme intramuskulární injekce – 50 mg/kg ketamin hydrochloridu (Narketan 10 inj. a.u.v., Vétoquinol, Lure Cedex, Francie) ve směsi s xylazinem – 5mg/kg (Rometa 2% inj. a.u.v., Spofa, Praha, Česká Republika). Poloviční dávka anestetik byla aplikována každých 10 minut, pokud to bylo nezbytné. Po ukončení experimentu byla laboratorní zvířata usmrcena exsanguinací protím karotid v celkové disociativní anestezii. Bulby a adnexa jsme fixovali ve formolu a následně provedli jejich histopatologické vyšetření.

3.2. Karboplatina

Sloučeniny obsahující platinový ion patří k nejdéle používaným cytostatikům. V případě karboplatiny se jedná o cis-diaminocyklobutyldikarboxylát-platnatý komplex (obr. 15), který vzniká substitucí dvou odstupujících atomů chlóru v molekule cisplatiny za cyklobutyldikarboxylátovou skupinu. Do klinické praxe byla zavedena v roce 1986 (Harrap, 1985).



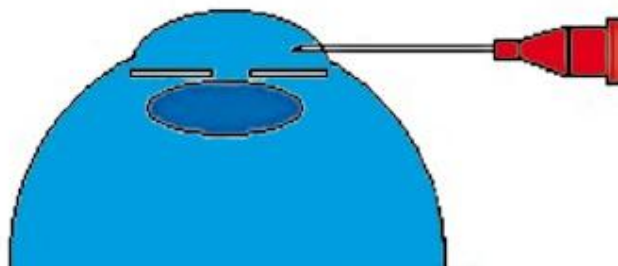
Obr. 15 – strukturní vzorec karboplatiny

3.2.1. Úspøádání pokusu

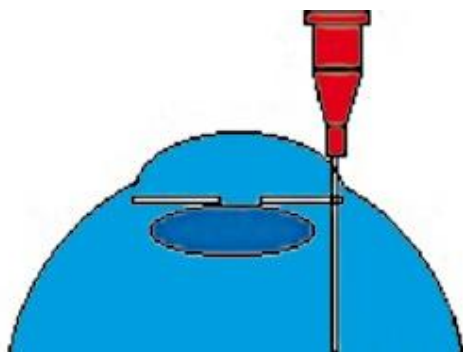
Karboplatinu jsme aplikovali periokulárnø ve dvou různých koncentracích. První skupin (n=6) králíkø jsme aplikovali 15 mg karboplatiny (skupina I), další 30 mg karboplatiny (skupina III). Jiné skupin (skupina II) králíkø (n=6) jsme aplikovali karboplatinu intravitreálnø, a to v množství 0,05 mg. Vzorky sklivce a žilní krve z ušních cøv jsme odebírali po 1, 2, 6, 24, 48, 168 a 336 resp. 480 (skupina II) hodinách po aplikaci karboplatiny.

3.2.2. Aplikace karboplatiny a odběr vzork

Před aplikací karboplatiny a odběry sklivce jsme používali lokální anestezii (oxybuprocain 0,4%) a spojivkový vak byl desinfikován 1% roztokem providon -iodinu (Betadine 10%, EGIS Pharmaceuticals Ltd., Budapest). Karboplatinu jsme aplikovali do temporální části peribulbárního prostoru, a to pouze do pravého oka, u skupiny I a III ve stejném objemu 1,5 ml sterilní vody pro injekce. Stejný objem sterilní vody pro injekce jsme aplikovali do temporální části peribulbárního prostoru kontrolního levého oka. Používali jsme jehly 25G a injekční stříkačky o objemu 2 ml. Pro aplikaci karboplatiny do sklivce a odběr vzork jsme volili transkorneální cestu. Používali jsme injekční stříkačky pro aplikaci inzulínu o objemu 1 ml opatřené jehlou 29G. Korneu jsme penetrovali tangenciálně v těsné blízkosti limbu a po



Obr. 16 – schématické znázornění transkorneální intravitreální aplikace - vstup do přední komory králičího oka



Obr. 17 – schématické znázornění transkorneální intravitreální aplikace – průnik do sklivcového prostoru kolem ekvatoru očí

rotaci jehly o 90 stupňů jsme pronikali přes kořen duhovky kolem ekvátoru očky do sklivcového prostoru (obr. 16., 17., 18. a 19.).

Stejná cesta byla dříve volena pro odběr vzorků tkáně u suspektního retinoblastomu z důvodu prevence jeho případného extrabulbárního rozšíření (Cohen et al., 2008).

Intravitreálně jsme karboplatinu injikovali v objemu 0,1 ml. Stejný objem sterilní vody jsme aplikovali intravitreálně do kontrolního levého oka. Objem odebraného sklivce ve vzorcích činil 0,2 – 0,4 ml.

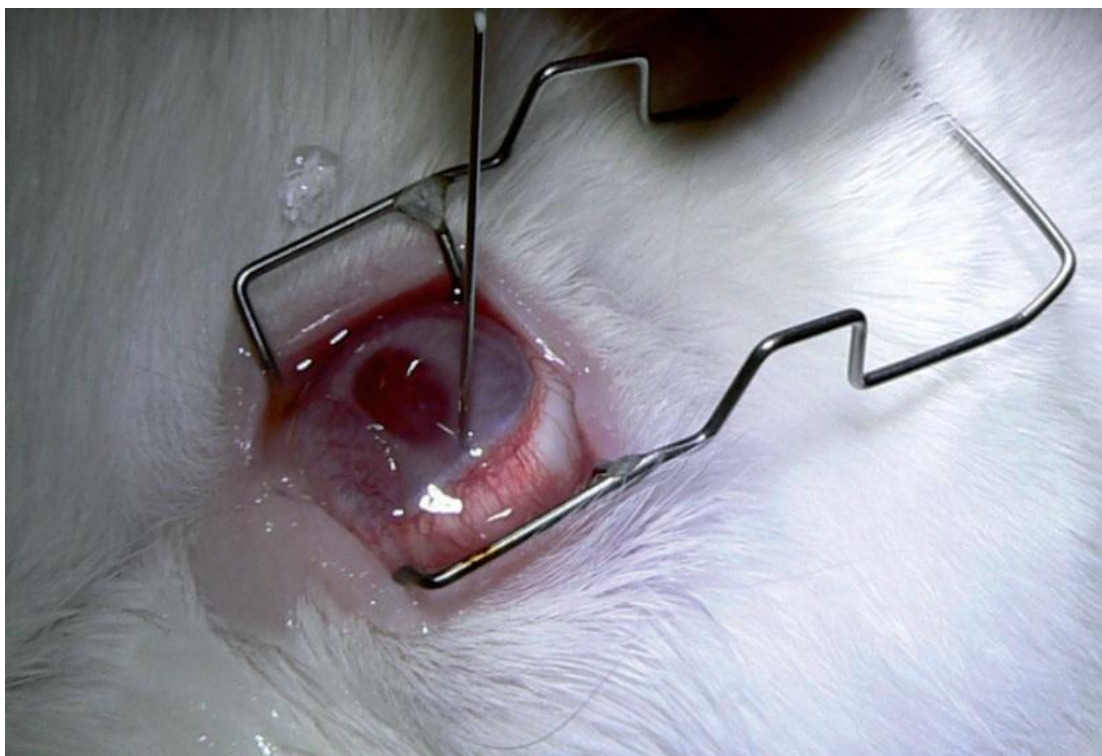
3.2.3. Měření koncentrace karboplatiny

Dosažené koncentrace karboplatiny ve sklivci a v krvi jsme určovali atomickou absorpční spektrální analýzou se Zeemanovou vzájemnou korekcí atomovým absorpčním spektrometrem (Varian 220 Z, Austrálie) (Kukacka et al., 2008). Homogenizovaný sklivec nebo plazmu jsme edili 1:14 vodným roztokem obsahujícím Triton X-100 (0.2 obj. %), antifoam A (0.2 obj. %) a neionizovanou vodu. Takto upravené vzorky byly analyzovány v Zeemanově grafitové peci. Koncentrace karboplatiny byla počítána na základě změřené koncentrace platiny a molekulové hmotnosti karboplatiny.

Hodnoty AUC (Area-under-the-concentration-versus-time-curve) jsme počítali standardní trapezoidální metodou. Takto spočítané výsledky byly verifikovány programem pro AUC kalkulaci (MW/PHARM verze 3.60 Mediware NL).



Obr. 18 – penetrace korney v blízkosti limbu



Obr. 19 – rotace jehly a penetrace do sklivcového prostoru

3.2.4. Hodnocení vedlejších účinků

Klinické a histologické známky toxicity byly rozděleny do čtyř stupňů podle anatomické stavby oka.

Stupeň 1 – periokulární změny (adnexa)

Stupeň 2 – sklerální a korneální změny

Stupeň 3 – intraokulární změny

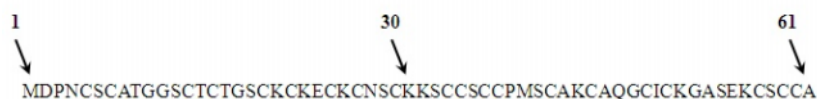
Stupeň 4 – systémové změny

3.2.5. Metalothionein

V případě MT se jedná o malý termostabilní protein s velikostí 6 – 10 kDa objevený v roce 1957 v ledvinné kůře u koní (Margoshes a Vallee, 1957). Protein se vyskytuje v několika variantách u různých zvířecích druhů i u člověka, je bohatý na cysteiny, neobsahuje však žádné aromatické aminokyseliny (obr. 20). Varianty metalothionenu se dělí do tříd podle živočišného druhu a primární struktury (tab. 5). MT vytváří s ionty kovů komplexy a je schopen vázat až 7 dvojmocných a 12 jednomocných iontů. Pro stanovení MT byla použita diferenční pulsní voltametrie (visící rtuťová elektroda) ve spojení s Brdicovou reakcí (AdTS DPV Brdicova reaction) (Kizek et al., 2004). V principu je Brdicova reakce založena na interakci mezi hexaaminokobalt-chloridovým komplexem a -SH skupinami. Výška posledního signálu voltamogramu u konkrétního vzorku závisí na koncentraci metalothioneinu v tomto vzorku (Adam et al., 2008). Pro větší počet vzorků byla použita automatická elektroanalytická metoda pro MT (Fabrik et al., 2008). Automatická elektroanalytická detekce MT byla použita i pro detekci MT ve vzorcích sklivce po intravitreální aplikaci karboplatiny.

Tab. 5 – Pohled vybraných metalothioneinů z I. třídy. (Kizek et al., 2004)

| Organismus | Označení proteinu | Počet aminokyselin | Molekulová hmotnost (Da) | Počet cystein |
|---------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|---------------|
| <i>Homo sapiens</i> | <i>MT-1A</i> | 61 | 6133 | 20 |
| | <i>MT-2</i> | 61 | 6042 | 20 |
| | <i>MT-3</i> | 68 | 6927 | 20 |
| | <i>MT-4</i> | 62 | 6419 | 20 |



Obr. 20 – aminokyselinová sekvence MT (Kizek et al., 2004)

3.3. Sledování vedlejších účinků po opakované transkorneální intravitreální aplikaci karboplatiny

V další fázi experimentu jsme aplikovali intravitreálně transkorneálně karboplatinu do sklivcového prostoru opakovaně – čtyřikrát ve dvou týdenním intervalu a to

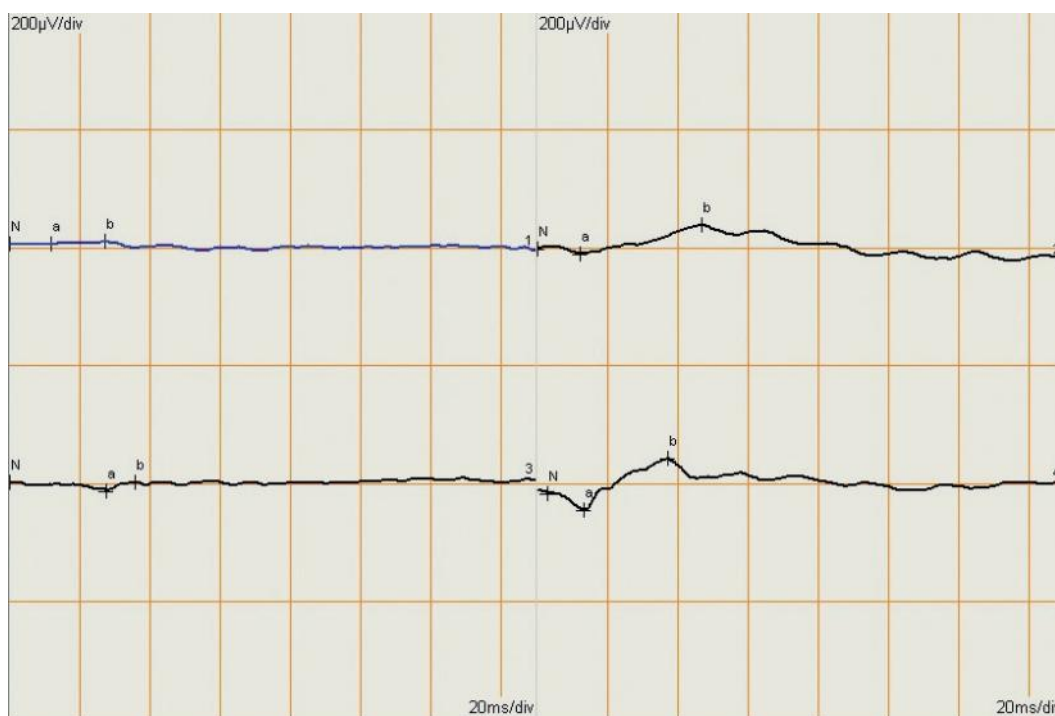
- 1) 0,05 mg karboplatiny v objemu 0,1 ml (skupina IV)
- 2) 0,008 mg karboplatiny v objemu 0,08 ml (skupina V)

Každá skupina čítala (n=6) laboratorních novozélandských bílých králíků samčího pohlaví (viz výše). Anestetika jsme používali ve stejných dávkách a za stejných podmínek jako v případě jednorázové aplikace. Karboplatinu jsme aplikovali do sklivcového prostoru pravých očí. Způsob aplikace byl stejný jako v případě jednorázových intravitreálních aplikací karboplatiny. Do levých očí jsme aplikovali sterilní vodu pro injekce ve shodném objemu. Vzorky sklivce jsme odebírali jednu hodinu po první aplikaci a kontrolovali dosažené

koncentrace atomickou absorpční spektrální analýzou se Zeemanovou zpětnou korekcí.

Bez hem aplikace i po každé aplikaci jsme kontrolovali oftalmoskopický náález a po izovali fotodokumentaci. Před první aplikací a dva týdny po čtvrté aplikaci byl proveden fotopický a skotopický ERG záznam u obou bulb (obr. 21).

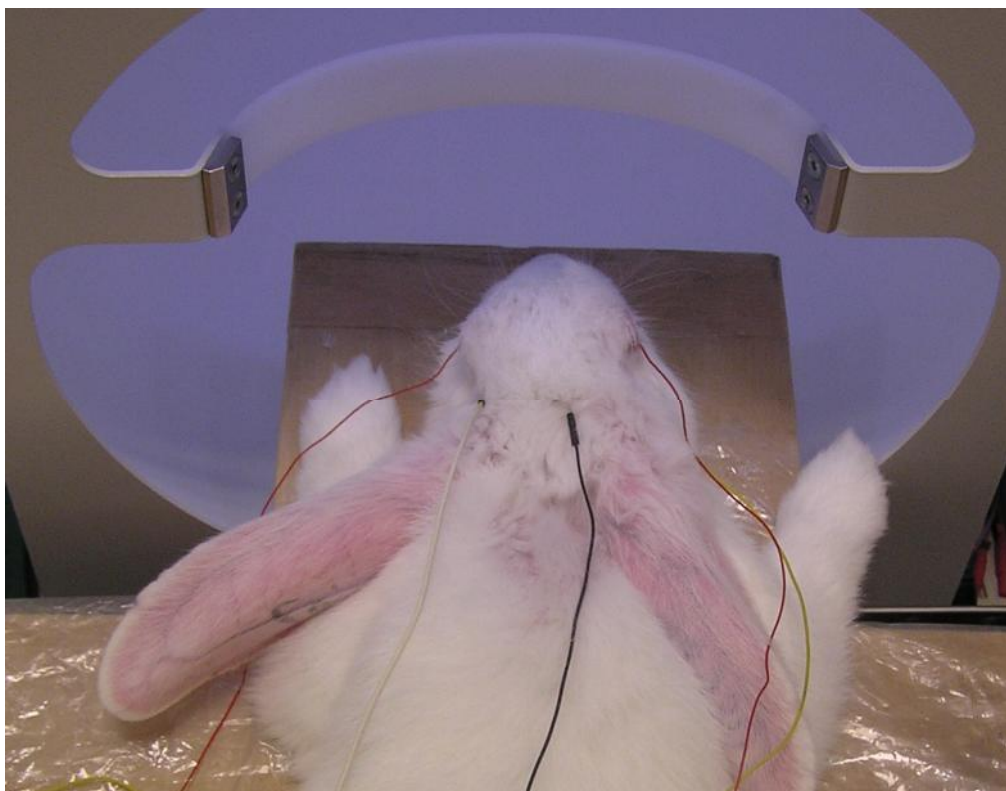
Vyšetření elektrických změn napětí sítnice probíhalo podle standardního protokolu International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (ISCEV).



Obr. 21 – ERG záznam po aplikaci 0,05 mg karboplatiny do pravého oka

Po navození umělé mydriázy (0,5 % tropicamid – Mydrum Chauvin Ankerpharm GmbH) a 30 minutové adaptaci na tmě se napětí snímalo pomocí ERG-Jet elektrodou proti kožní elektrodě, která byla umístěna na 1 cm horizontálně od zevního koutku (obr. 22). Zemnicí kožní elektroda byla umístěna v týlu uprostřed. Po skotopickém vyšetření (maximální skotopická odpověď – m.s.o.) následovala 5 minutová adaptace na světlo a změny odpovědi

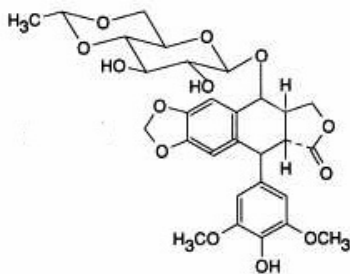
ípk . Vše bylo realizováno na elektrofyziologickém přístroji Roland Consult (SRN).
Statistickou analýzu výsledků jsme prováděli pomocí softwaru Statistica 9.1 WAN (StatSoft, Tulsa, USA). Data byla porovnáвана t-testem, kde za statisticky významný rozdíl bylo považováno $P < 0.05$.
Po ukončení experimentu byla laboratorní zvířata usmrcena exsanguinací protím karotid v celkové disociativní anestezii stejně jako v případě jednorázové aplikace. Bulby a adnexa jsme fixovali ve formolu a následně provedli jejich histopatologické vyšetření.



Obr. 22 – rozmístění elektrod v průběhu ERG vyšetření

3.4. Etoposid

Etoposid se pro léčbu pacientů trpících retinoblastomem používá v kombinaci s dalšími cytostatiky. Jedná se o semisyntetický derivát podofylotoxinu (obr. 23). Účinnou látkou



Obr. 23 – Strukturní vzorec etoposidu.

jsou i n které jeho metabolity. K experimentu jsme použili op t laboratorní novozélandské albinotické králíky sam ího pohlaví (viz výše). Jedné skupin ě byla aplikována jedna dávka 2,5 mg etoposidu periokulárn ě (skupina VI, n=6). Intravitreální skupina (skupina VII, n=6) obdržela jednu dávku 0,5 mg etoposidu transkorneáln ě intravitreáln ě. Experiment probíhal na pravých králi ěích bulbech. Levé bulby byly u všech králík ů ponechány bez aplikace etoposidu jako bulby kontrolní, aplikovali jsme pouze stejný objem sterilní vody pro injekce. Vzorky sklivce a periferní krve byly odebírány v ěasech: 1., 2., 6. hodinu, 1., 2. a 7. den a 3 týdny po aplikaci cytostatik. Poslední skupin ě (skupina VIII) byla aplikována periokulárn ě dávka 2,5 mg opakovan ě, a to v nultou a znovu pak druhou hodinu po zahájení experimentu. P ěi intravitreální aplikaci a odb ěru vzork ů jsme používali injek ní st ěíka ky pro aplikaci inzulinu o objemu 1 ml opat ěné jehlou 29G a pro periokulární aplikace injek ní st ěíka ky o objemu 2 ml a jehly 25G. Ke stanovení koncentrace etoposidu byla použita metoda vysokou ěinn ě kapalinové chromatografie (HPLC). Celkem byl y analyzovány 103 vzorky sklivce a 90 vzork ů periferní krve. Pro stanovení jeho koncentrace ve zko umaných vzorcích byla vyvinuta specifická metoda HPLC s UV detekcí (Agilent 1200). 200 μ l plazmy nebo sklivce bylo

extrahováno 5 ml dichlormetanu po dobu 10 minut a následně zcentrifugováno při 3500 ot/min po dobu 5 minut. Jako vnitřní standard byl použit difenylhydantoin (DPH). Po extrakci byla organická vrstva vysušena pod proudem dusíku při 30° C. Odparek byl rozpuštěn ve 100 µl mobilní fáze, která se skládala ze směsi metanol, destilovaná voda, acetonitril (55:42:3). Analýza byla prováděna při 229 nm, teplota kolony byla udržována na 40° C a průtok mobilní fáze byl 1,2 ml/min. Kalibrační křivka pro plazmu i pro sklivce byla lineární v celém rozsahu testovaných koncentrací s korelačním koeficientem $r^2 > 0.999$ pro oba dva materiály. Metoda byla validována a bylo dosaženo těchto validačních parametrů: opakovatelnost při stanovení v plazmě a ve sklivci byla 7,3 % a 6,3 %, reprodukovatelnost při stanovení v plazmě a ve sklivci byla 2,7 % a 4,4 %, bias 1,2 % a 6,5 %.

4. Výsledky

4.1. Karboplatina

Dosažené koncentrace karboplatiny při intravitreální a periokulární aplikaci karboplatiny jsou shrnuty v tabulkách 6 – 10. Dosažené koncentrace ve sklivci po periokulární aplikaci zpravidla nepřesahovaly 1mg/l (tab. 6 a 8). Relativně vysoké koncentrace karboplatiny jsme po periokulární aplikaci zjistili v krvi (tab. 7 a 9). V první skupině se nám z technických důvodů nepodařilo získat vzorky krve ve 2. hodině po aplikaci od všech laboratorních zvířat, tabulka 7 je z tohoto důvodu nekompletní. Dosažené koncentrace ve sklivci po intravitreální aplikaci odpovídaly maximálním koncentracím vypočítaným na základě dávky a vypočteného objemu sklivcového prostoru (tab. 11). Pro mramř bulbu jsme zjišťovali ultrasonografií.

| as (h) | 1 | 2 | 6 | 24 | 48 | 168 | 336 |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Králík 1 | 248 | 371 | 320 | 144 | 80 | 15 | 1 |
| Králík 2 | 30 | 146 | 80 | 54 | 32 | 11 | 7 |
| Králík 3 | 200 | 871 | 823 | 511 | 174 | 3 | 1 |
| Králík 4 | 141 | 300 | 133 | 80 | 48 | 7 | 8 |
| Králík 5 | 286 | 737 | 642 | 361 | 97 | 29 | 15 |
| Králík 6 | 110 | 812 | 762 | 408 | 159 | 24 | 6 |

Tab. 6 – Koncentrace karboplatiny ($\mu\text{g/l}$) ve sklivci po aplikaci 15 mg periokulárn

| as(h) | 1 | 2 | 6 | 48 | 168 | 336 |
|----------|------|------|------|-----|-----|-----|
| Králík 1 | 2331 | 1161 | 249 | 173 | 39 | 5 |
| Králík 2 | 2607 | 1180 | 246 | 81 | 15 | 2 |
| Králík 3 | 3493 | 2453 | 519 | 111 | 38 | 12 |
| Králík 4 | 4300 | - | 255 | 140 | 44 | 6 |
| Králík 5 | 6708 | - | 1192 | 289 | 100 | 19 |
| Králík 6 | 2591 | - | 229 | 87 | 14 | 2 |

Tab. 7 – Koncentrace karboplatiny ($\mu\text{g/l}$) v krvi po aplikaci 15 mg periokulárn

| as (h) | 1 | 2 | 6 | 24 | 48 | 168 | 480 |
|-----------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Králík 13 | 525 | 3150 | 719 | 289 | 85 | 14 | 0 |
| Králík 14 | 70 | 370 | 447 | 235 | 112 | 0 | 0 |
| Králík 15 | 103 | 125 | 166 | 109 | 43 | 0 | 0 |
| Králík 16 | 28 | 60 | 165 | 97 | 10 | 0 | 0 |
| Králík 17 | 110 | 163 | 212 | 89 | 27 | 0 | 0 |
| Králík 18 | 722 | 503 | 501 | 334 | 148 | 12 | 0 |

Tab. 8 – Koncentrace karboplatiny ($\mu\text{g/l}$) ve sklivci po aplikaci 30 mg karboplatiny periokulárn

| as (h) | 1 | 2 | 6 | 24 | 48 | 168 | 480 |
|-----------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| Králík 13 | 6131 | 4180 | 1314 | 618 | 382 | 300 | 260 |
| Králík 14 | 7327 | 5706 | 2909 | 589 | 276 | 149 | 130 |
| Králík 15 | 3732 | 2536 | 944 | 214 | 234 | 235 | 58 |
| Králík 16 | 5148 | 2817 | 968 | 408 | 129 | 235 | 83 |
| Králík 17 | 6800 | 5136 | 2094 | 789 | 585 | 313 | 126 |
| Králík 18 | 5862 | 4117 | 1770 | 866 | 594 | 445 | 217 |

Tab. 9 – Koncentrace karboplatiny ($\mu\text{g/l}$) v krvi po aplikaci 30 mg karboplatiny periokulárn

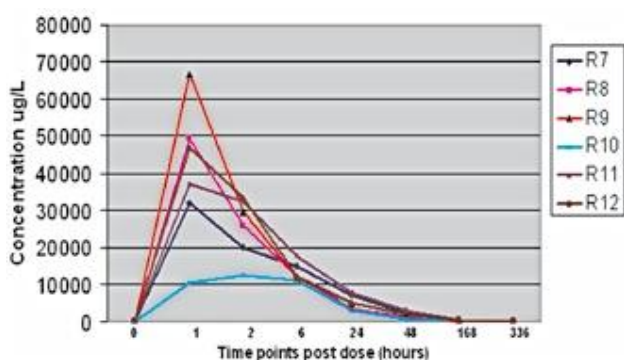
| as(h) | 1 | 2 | 6 | 24 | 48 | 168 | 336 |
|-----------|-------|-------|-------|------|------|-----|-----|
| Králík 7 | 31785 | 19835 | 14927 | 7044 | 2378 | 385 | 84 |
| Králík 8 | 49122 | 26041 | 11854 | 3393 | 1557 | 339 | 91 |
| Králík 9 | 66759 | 29593 | 11573 | 4711 | 1891 | 136 | 0 |
| Králík 10 | 10285 | 12513 | 11230 | 2862 | 533 | 201 | 0 |
| Králík 11 | 37104 | 32084 | 17740 | 7697 | 3160 | 201 | 0 |
| Králík 12 | 46657 | 33235 | 11851 | 4895 | 2061 | 327 | 112 |

Tab. 10 – Koncentrace karboplatiny ($\mu\text{g/l}$) ve sklivci po aplikaci 0,05 mg karboplatiny intravitreáln .

| | Objem sklivcového prostoru (ml) | Maximální možná koncentrace ($\mu\text{g/L}$) |
|-----------|---------------------------------|---|
| Králík 7 | 1.028 | 48,638 |
| Králík 8 | 1.337 | 37,397 |
| Králík 9 | 1.180 | 42,372 |
| Králík 10 | 1.164 | 42,955 |
| Králík 11 | 1.303 | 38,373 |
| Králík 12 | 1.215 | 41,152 |

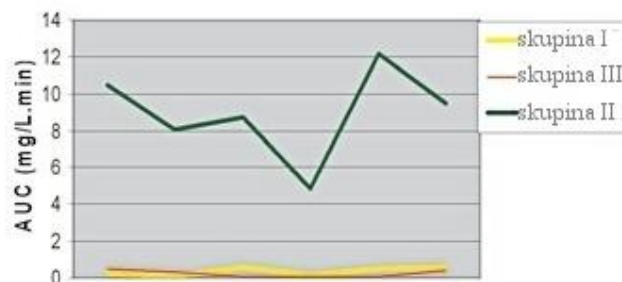
Tab. 11 – Maximální dosažitelné koncentrace vypo tené na základ dávky a objemu bulbu.

Grafické vyjád ení dosažených intravitreálních koncentrací u pravých bulb po intravitreál ní aplikace v závislosti na ase je na obrázku 24



Obr. 24 – Dosažené koncentrace karboplatiny ve sklivci po intravitreální aplikaci v závislosti na ase.

Na základ zjišt ných koncentrací uvedených v tabulkách jsme po ítali plochu pod k ivkou koncentrace proti ásu (area under concentration versus time curve – AUC).

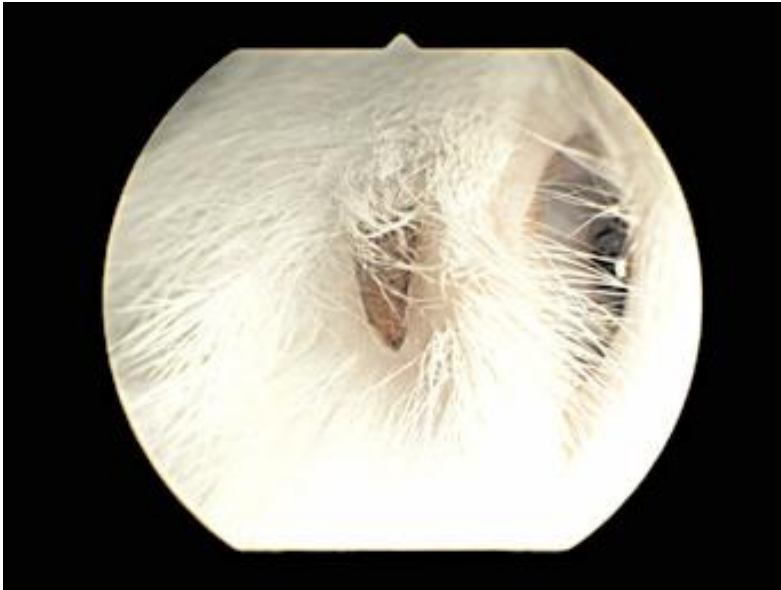


Obr. 25 – porovnání AUC karboplatiny ve sklivci po intravitreální aplikaci (skupina II) s AUC po periokulární aplikaci (skupina I a III)

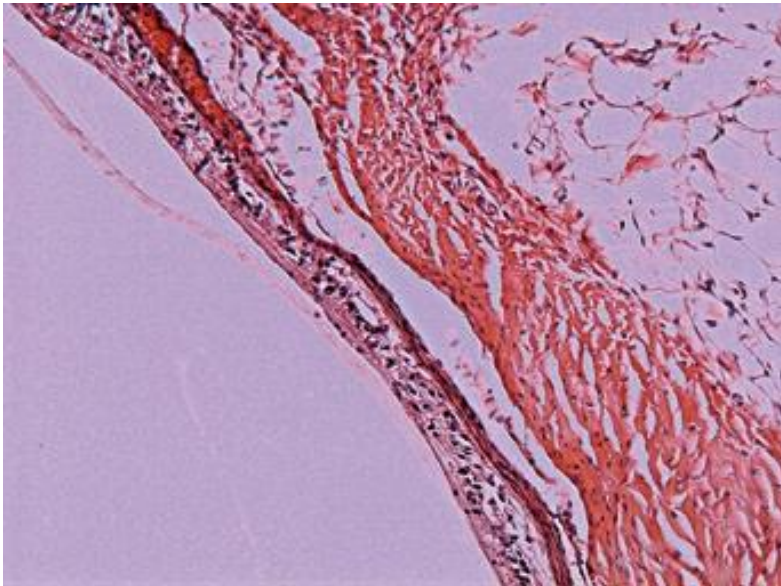
Relativn vysoké hladiny karboplatiny jsme zjistili i ve 24. hodin (2.862–7.697 mg/l) a 48. hodin (0.535–2.378 mg/l).po aplikaci. Pr m rná hodnota AUC (mg/L/min) byla u skupiny I (0.255±0.193)a III (0.245±0.227) signifikantn nižší (obr. 25) p í porovnání se skupinou II (8.955±2.464). Odchylka byla statisticky významná (p=0,0001)

Po periokulární aplikaci jsme pozorovali v prvních dvou dnech chemózu spojivky, p í odb rech vzork sklivce došlo n kolikrát k nevýznamnému krvácení do p ední komory nebo do sklivce. T etí týden po periokulární aplikaci 30 mg karboplatiny jsme pozorovali 1. stupe toxicity ve t ech p ípadech (králík 14,15 a 18). Jednalo se o vypadávání chlup z horního ví ka a ve dvou p ípadech (králík 14 a 15) dokonce nekrózu horního ví ka a (obr. 26).

Fokální chorioretinální atrofie – 3. stupe toxicity (obr. 27) byla zjišt na p í histopatologickém vyšet ení bulb ve skupin II (po intravitreální aplikaci karboplatiny).



Obr. 26 – nekróza horního víčka t i týdny po periokulární aplikaci 30 mg karboplatiny

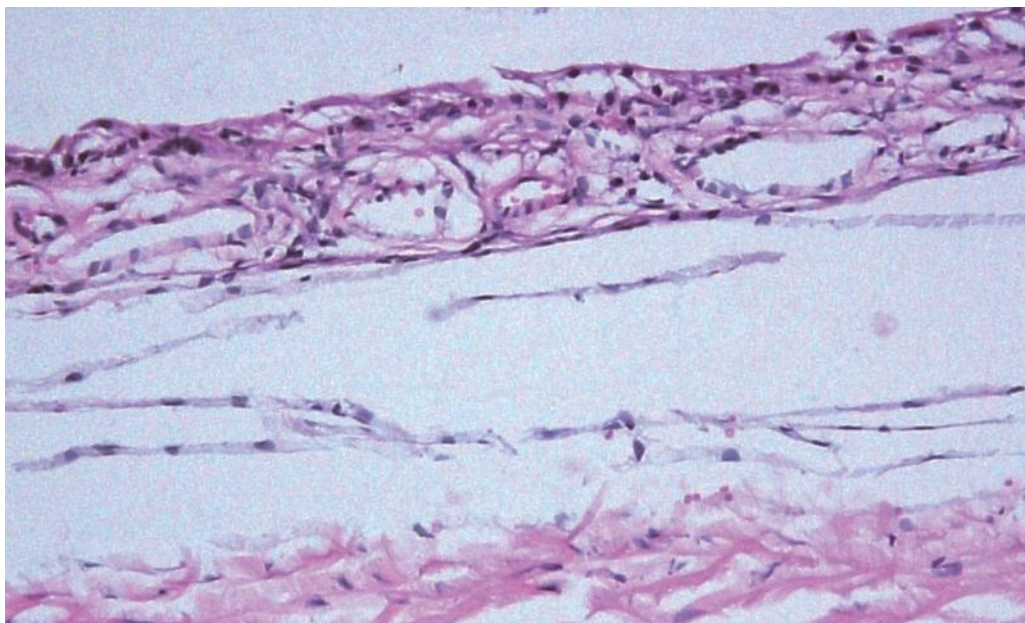


Obr. 27 – chorioretinální atrofie po aplikaci 0,05 mg karboplatiny intravitreáln .

Hladina metalothioneinu před aplikací karboplatiny činila v průměru 3.5 μM. V průběhu 7 dnů po aplikaci narostla hladina až na průměrně 5 μM a po uplynutí této doby následoval pozvolný pokles.

4.2. Sledování vedlejších účinků po opakované transkorneální intravitreální aplikaci karboplatiny

Změny ERG po opakované intravitreální aplikaci 0,05 mg karboplatiny byly významné (tab. 12). Redukce byla zaznamenána jak ve fotopickém, tak skotopickém (maximální skotopická odpověď – m.s.o.) ERG v pěti případech, jedno zvíře uhynulo během celkové anestezie. Při histopatologickém vyšetření pravých bulbů byla patrná fokální chorioretinální atrofie (obr. 28). Po opakované aplikaci 0,0008 mg karboplatiny jsme pozorovali i změny ERG obdobného charakteru jako při opakované aplikaci vyšších dávek. Jedno zvíře uhynulo v průběhu experimentu během celkové anestezie. Pitva obou uhynulých zvířat byla provedena a



Obr. 28 – chorioretinální atrofie po opakované aplikaci 0,05 mg karboplatiny

**Tab. 12 – elektroretinografie p ed a po opakované aplikaci
0,05 mg karboplatiny do sklivce**

p ed//po aplikaci (uV)

| Králík | oko | ty inky (vlna b) | | m. s. o. (vlna a/b) | |
|------------------|------------|-------------------------|------|----------------------------|-----------|
| Králík 19 | pravé | 58,2 | 42,4 | 55/130 | 15,4/17,4 |
| | levé | 81 | 72 | 91/148 | 86,1/138 |
| Králík 20 | pravé | 83,7 | | 81/147 | |
| | levé | 79,6 | | 76,5/139 | |
| Králík 21 | pravé | 80,2 | 4,82 | 91/141 | 13,6/14,5 |
| | levé | 131 | 49,6 | 126/221 | 29/87,2 |
| Králík 22 | pravé | 126 | 12,2 | 125/227 | 8,5/20,3 |
| | levé | 155 | 39,5 | 50/101 | 22/82 |
| Králík 23 | pravé | 56,6 | 6,3 | 40/129 | 57/70 |
| | levé | 66,1 | 73 | 36,6/121 | 76/139 |
| Králík 24 | pravé | 128 | 23,5 | 96,5/188 | 10/35,9 |
| | levé | 93,8 | 61 | 77,4/158 | 58/96 |

| Králík | ot - b (μV) | mso - a (μV) | mso - b (μV) | oc - a (μV) | oc - b (μV) | kategorie |
|--------|-------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-----------|
| 25 | 132 | 108 | 230 | 5 | 87 | vpravo b |
| 26 | 91 | 105 | 114 | 2,8 | 81,2 | vpravo b |
| 27 | 132 | 139 | 233 | 5,8 | 59 | vpravo b |
| 28 | 52,7 | 87 | 145 | 0,8 | 25,2 | vpravo b |
| 29 | 94 | 84,5 | 212 | 1,4 | 48,5 | vpravo b |
| 25 | 29,8 | 68,2 | 32,6 | 20 | 23,4 | vpravo a |
| 26 | 6,79 | 93,8 | 30,5 | 29,8 | 9,7 | vpravo a |
| 27 | 3,32 | 117 | 88,7 | 32 | 18,8 | vpravo a |
| 28 | 9,42 | 69,8 | 25,8 | 30,8 | 2,32 | vpravo a |
| 29 | 1 | 62 | 33,2 | 11,8 | 13 | vpravo a |
| 25 | 99 | 85 | 199 | 1 | 76 | vlevo b |
| 26 | 73 | 73,5 | 96 | 5,2 | 65,7 | vlevo b |
| 27 | 72,6 | 90 | 140 | 4,68 | 64 | vlevo b |
| 28 | 69 | 78 | 158 | 3,34 | 46,5 | vlevo b |
| 29 | 72 | 40 | 130 | 0,9 | 46,6 | vlevo b |
| 25 | 64,6 | 50,2 | 103 | 13,1 | 44,8 | vlevo a |
| 26 | 34,1 | 24,3 | 52,5 | 2,79 | 27,5 | vlevo a |
| 27 | 35,2 | 30,5 | 70,1 | 2,7 | 39,9 | vlevo a |
| 28 | 29,5 | 72,3 | 81,3 | 6,51 | 34,2 | vlevo a |
| 29 | 23,7 | 21,5 | 47,5 | 6,77 | 37,1 | vlevo a |

Tab.13 – ERG před a po aplikaci 0,008 mg karboplatiny

Legenda:

ot - b = odpověď tylné, vlna b
mso = maximální skotopická odpověď
oc = odpověď ípk
vpravo b = pravé oko před aplikací
vpravo a = pravé oko po aplikaci
vlevo b = levé oko před aplikací
vlevo a = levé oko po aplikaci

OP před aplikací X OP po aplikaci

| | průměr OP před | průměr OP po | SD OP před | SD OP po | p |
|------------|----------------|--------------|------------|----------|----------|
| OT vlna b | 100,3400 | 9,90600 | 33,17270 | 11,14920 | 0,000415 |
| MSO vlna a | 104,7000 | 82,16000 | 21,84491 | 22,93138 | 0,150185 |
| MSO vlna b | 186,8000 | 42,16000 | 54,04350 | 26,17848 | 0,000657 |
| OC vlna a | 3,1600 | 24,88000 | 2,18815 | 8,72995 | 0,000649 |
| OC vlna b | 60,1800 | 13,44400 | 25,11259 | 8,15118 | 0,004188 |

Tab. 14 – pravé oko před a po aplikaci 0,008 mg karboplatiny

ervená = $p < 0,01$
modře = $p < 0,05$
šedě = bez statistické významnosti

OL před aplikací X OL po aplikaci

| | průměr OL před | průměr OL po | SD OL před | SD OL po | p |
|------------|----------------|--------------|------------|----------|----------|
| OT vlna b | 77,1200 | 37,30000 | 12,33175 | 15,59920 | 0,002062 |
| MSO vlna a | 73,3000 | 39,76000 | 19,66469 | 21,36605 | 0,032478 |
| MSO vlna b | 144,6000 | 70,88000 | 37,86555 | 22,50182 | 0,005685 |
| OC vlna a | 3,0240 | 6,37400 | 2,01154 | 4,23550 | 0,148806 |
| OC vlna b | 59,7600 | 36,70000 | 12,90360 | 6,45949 | 0,007258 |

Tab. 15 – levé oko před a po aplikaci 0,008 mg karboplatiny

Tab.16 – pravé o í X levé o í po aplikaci 0,008 mg karboplatiny

| | p |
|---------|----------|
| ot - b | 0,012713 |
| mso - a | 0,016436 |
| mso - b | 0,099876 |
| oc - a | 0,002744 |
| oc - b | 0,001053 |

neukázala žádné chorobné změny. Získané hodnoty z ERG vyšetření jsou shrnuty v tabulce 13. Statisticky významné (tab. 14) bylo u pravých očí po aplikaci karboplatiny nejen snížení b vlny (ot – b) a maximální skotopické odpovědi (mso – b), ale také změna odpovědi ípk – elevace vlny a (oc – a). Menší, nicméně také statisticky významné změny jsme zjistili i na ERG kontrolních levých očí (tab. 15).

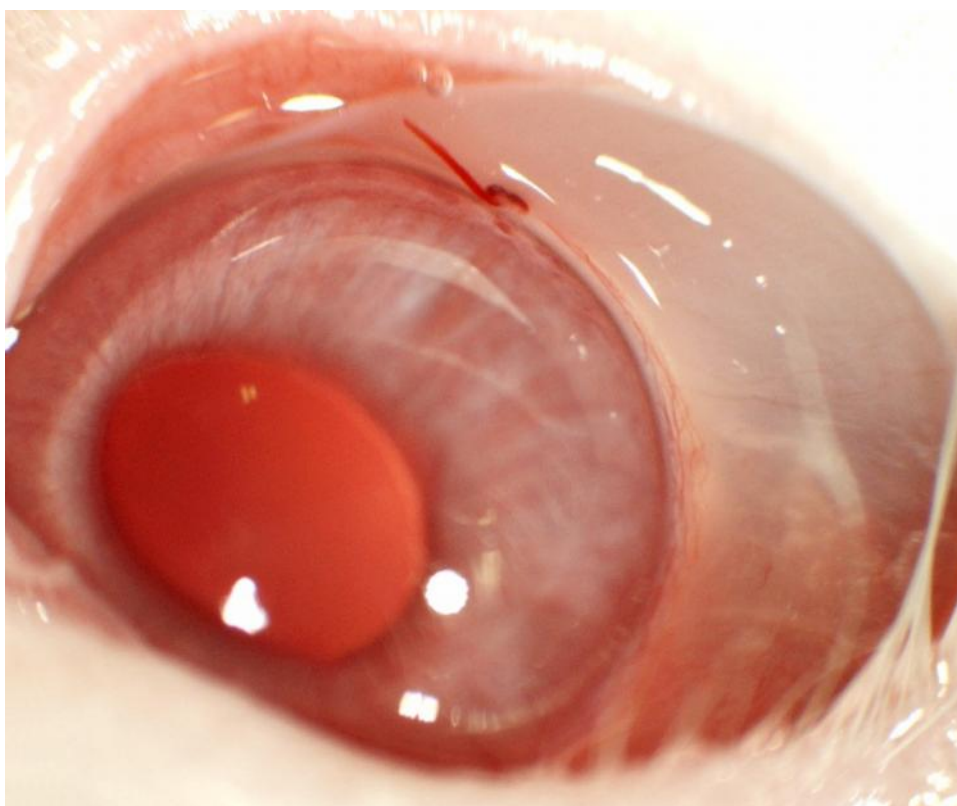
Porovnání statistické významnosti změny po aplikaci 0.008 mg karboplatiny do pravého oka a 0,08 ml sterilní vody pro injekce do levého oka je v tabulce 16. Při histopatologickém vyšetření pravých i levých bulb jsme nezaznamenali žádné strukturální změny. Průměrná změna koncentrace karboplatiny v první hodině po aplikaci činila 1349 µg/l. Maximální dosažitelná koncentrace, kterou jsme vypočetali na základě aplikované dávky a objemu bulb, byla 8422 µg/l.

4.3. Etoposid

Při periokulární aplikaci etoposidu nebyla detekována žádná koncentrace etoposidu ve vzorcích sklivce a velmi nízká v plazmě 1,9 – 7,7 µg/ml, a to v obou skupinách. Při intravitreální aplikaci se koncentrace ve vzorcích sklivce 1 hodinu po aplikaci pohybovala v rozsahu 87 – 251 µg/ml. Po 24 hodinách již byla koncentrace ve sklivci téměř nulová.

Koncentrace etoposidu v plazmě při intravitreální aplikaci byla také velmi nízká podobně jako u periokulární aplikace a to v rozsahu 1,9 – 3,2 µg/ml.

Vedlejší účinky jsme pozorovali po periokulární i intravitreální aplikaci. Po periokulární aplikaci pokračoval několik dní periokulární edém (chemóza) u většiny zvířat (obr. 29). Druhý stupeň toxicity – vaskularizace rohovky (obr. 30) jsme 2. týden po aplikaci pozorovali ve většině případů. K celkovým příznakům (třetí stupeň toxicity) vedla opakovaná aplikace etoposidu. Jednalo se o parestezie, které vyústily v automutilaci (obr. 31) v určitém rozsahu u



Obr. 29 – chemotická spojivka 2. den po periokulární aplikaci 2,5 mg etoposidu



Obr. 30 – vaskularizace rohovky 2. týden po periokulární aplikaci 2.5 mg etoposidu



Obr. 31 – ukousnutý prst na zadní tlapce – automutilace po opakované periokulární aplikaci 2,5 mg etoposidu.

tech laboratorních zvířat. Krvácení malého rozsahu do přední komory a sklivce při odběru vzorků jsme pozorovali po periokulární i intravitreální aplikaci. Chorioretinální atrofie byla při histopatologickém vyšetření zjištěna u všech pravých bulbů po intravitreální aplikaci etoposidu.

5. Diskuse metodických postupů a výsledků

Úspěchy v léčbě retinoblastomu za posledních 20 let jsou výrazné a procento oči léčených zachovnou terpií se postupně zvyšuje (Shields, Shields a Sivalingam, 1989). Je to dáno jednak včasnějším zachytením pacientů, jednak značným množstvím nových terapeutických metod, které dovolují stanovit individuální léčebný režim u každého pacienta trpícího retinoblastomem v závislosti na rozsahu a charakteru onemocnění. Přesto končí toto onemocnění dosud ve značném procentu v závislosti na pokročilosti nálezu enukleací. Jedním z nejčastějších důvodů bývá nedostatečné terapeutické ovlivnění sklivcových metastáz vzhledem k docilování nízkých koncentrací cytostatik ve sklivcovém prostoru. Při celkové aplikaci cytostatik nelze zpravidla, vzhledem k jejich toxicitě a hematookulární bariéře, uspokojivé terapeutické hladiny ve sklivci docílit.

Myšlenka lokální aplikace cytostatik se rozvíjí již od konce minulého století. Několik experimentů s lokální aplikací karboplatiny, na které jsme navázali, bylo již provedeno, jednalo se však převážně o aplikaci subkonjunktivální nebo periokulární. (Hayden et al., 2004, Mendelsohn, et al., 1998). Intravitreální aplikace různých léků, zejména antibiotik (Sorsby a Ungar, 1948) se ovšem začala rozvíjet krátce po skončení 2. světové války a bylo prokázáno, že je bezpečná z hlediska případného rhegmatogenního nebo trakčního odchlípení sítnice. Transsklerální přístup byl v minulosti zvolen také pro aplikaci dexametazonu, metotrexátu a fluorouracilu (Velez et al., 2001). Intravitrealní aplikace cytostatik není dosud

bylo známo a to zejména díky obavám z možné generalizace nádorového onemocnění. Riziko zavlečení nádoru při jehlové biopsii do místa, kterým pronikala jehla do bulvy, reálně existuje (Karcioglu, 1985) a transkorneální cesta byla popsána (Karcioglu, 2002). Pro intravitreální aplikaci jsme také volili tuto složitější cestu přes limbus corneae, přední komoru oka a koňku duhovky do přední části sklivcového prostoru. Tento způsob aplikace cytostatik dosud nebyl popsán. Cesta byla volena zatím pouze pro jehlovou biopsii, jak je popsáno výše.

Předpokládáme, že transkorneální aplikaci cytostatik by bylo možné využít i v budoucnu v klinické praxi, protože je z hlediska rizika diseminace nádoru bezpečnější, než aplikace transsklerální (přes pars plana retineae). Při aplikaci cytostatik přes rohovku totiž existuje určitě minimální riziko zavlečení nádoru do přední komory oka, ale nikoli extraokulárně. Vzhledem k tomu, že v přední komoře oka bude docilováno stejných vysokých koncentrací cytostatik jako ve sklivci, předpokládáme, že i případné zavlečení nádorových buněk do přední komory oka nebude představovat zásadní komplikaci pro tuto nemoc.

Karboplatinu jsme pro experiment volili především z toho důvodu, že se k terapii retinoblastomu běžně používá, zejména pro chemoredukci (Shields et al., 2004) v kombinaci s dalšími chemoterapeutiky (vinkristin 0,05 mg/kg, etoposid 5mg/kg, karboplatina 18,6 mg/kg). Dávku jsme určovali podle dříve provedených experimentů (Hayden B.H., et al., 2000) a na základě klinických zkušeností.

Pro stanovení koncentrace karboplatiny jsme využívali atomickou absorpční spektrální analýzu se Zeemanovou způsobnou korekcí (Meerum Terwogt et al., 2000), která byla zavedena pro stanovení platiny v plazmě. Minimální koncentrace platiny v plazmě detekovatelná touto metodou byla 1,25 μmol/l. Pro stanovení koncentrace platiny ve sklivci jsme absorpční spektální analýzu použili nově. Metoda stanovení karboplatiny pomocí HPLC (Zufia et al., 2001), která vykazuje vyšší selektivitu (dovoluje odlišit aplikovanou látku od dalších metabolitů) pro nás nebyla dostupná. Vzhledem k tomu, že naším cílem bylo stanovit

koncentraci platiny ve sklivcovém prostoru v závislosti na ose, bylo využito spektrální analýzy se Zeemanovou způsobilou korekcí adekvátní.

Při periokulární aplikaci karboplatiny byla v jedné dřívější práci zjištěna 10-krát vyšší koncentrace karboplatiny ve sklivci králičího bulbu a dokonce nižší koncentrace (nicméně stále dvacetkrát vyšší než v našem experimentu) v plazmě (Hayden et al., 2004). Tento rozdíl neumíme vysvětlit. Naopak prakticky stejné hodnoty zjistil Mendelsohn a spol. při experimentu na makaku jávském (Mendelsohn et al., 1998), nicméně zaznamenal značné rozdíly v dosažených koncentracích u jednotlivých zvířat. Toto kolísání může být způsobeno celou řadou faktorů, například kontaminací vzorků krví. Dosažené koncentrace nicméně byly v průměru velmi nízké.

Terapeutických koncentrací jsme docílili při intravitreální aplikaci. Dosažené koncentrace 10-krát odpovídaly maximálním možným koncentracím vypočteným na základě aplikované dávky a objemu sklivcového prostoru, vysoké hladiny platiny trvaly 24 hodin. Na které jsme měřili, hodnoty byly vyšší než vypočtené. Vysvětlujeme si to gelovou konzistencí sklivce, kde rovnoměrná distribuce chemoterapeutika z místa aplikace může trvat delší dobu než jednu hodinu. Pokud byl vzorek za první hodinu odebrán blízko místa aplikace karboplatiny, byla pak změněná koncentrace ve vzorku vyšší, než by odpovídala koncentraci karboplatiny při její rovnoměrné distribuci v celém sklivcovém prostoru.

Po periokulární aplikaci 15 mg karboplatiny jsme nepozorovali fokální ani celkové toxické účinky s výjimkou pýchodného edému spojivky. Významné lokální vedlejší účinky – nekrózu horního víčka – jsme viděli po aplikaci vyšší koncentrace – 30 mg karboplatiny. Fokální chorioretinální atrofii jsme zaznamenali při intravitreální aplikaci. Podobné změny pozoroval Harbour po aplikaci vyšších dávek karboplatiny (Harbour et al., 1996).

V odebraných vzorcích sklivce jsme také sledovali hladinu metalothioneinu. Pro kvantitativní stanovení metalothioneinu byla v minulosti použita sada biochemických metod

(Ryvolova et al., 2011) - imunochemické metody: enzymatická imunosorbentní esej (ELISA), radioimunoanalýza (RIA) a fluorescenční imunoanalýza (FIA); z bioanalytických separačních metod můžeme jmenovat gelovou elektroforézu v různých modifikacích, kapilární elektroforézu a chromatografii. Brdicova reakce využitá v našem případě, patří k elektrochemickým detekčním technikám. Shodné výsledky při využití imunoanalytických a elektrochemických metod ukazují na oprávněnost využití Brdicovy reakce pro stanovení nízkých koncentrací metalothioneinu ve vzorcích (Krizkova et al., 2009). Po výrazném vzestupu koncentrací metalothioneinu v prvních sedmi dnech po jednorázové intravitreální aplikaci následoval jeho pozvolný pokles. Z těchto zjištění vyplývá, že aplikace karboplatiny indukuje rýchlou hladinu metalothioneinu, což by mohlo vést ke vzniku rezistence na léčbu, jak je tomu i u jiných nádorových onemocněních (Endo et al., 2004).

Při opakované intravitreální aplikaci karboplatiny v další fázi experimentu jsme sledovali případné vedlejší účinky karboplatiny. Funkční změny jsme sledovali pomocí fotopické a skotopické zábleskové ERG, strukturální pak po ukončení experimentu histopatologickým vyšetřením bulby. Aplikovaná dávka 0,05 mg vedla k závažným funkčním i strukturálním změnám.

Méně závažné změny na ERG jsme pozorovali i na kontrolních bulbech. Při itáme je podobnému zvýšení nitroočního tlaku při aplikaci stejného objemu fyziologického roztoku (Kremmer, 1995). Změny na ERG byly pozorovány již dříve při experimentálním krátkodobém zvýšení nitroočního tlaku (Zhao et al., 2009).

Po opakované aplikaci dávky 0,008 mg karboplatiny jsme nezjistili žádné strukturální změny, nicméně signifikantní změny ERG byly přítomné. Podobné změny byly zjištěny již dříve (Harbour et al., 1996) po jednorázové aplikaci vyšších dávek karboplatiny (více než 10 µg). Zvýšení vlny a v odpovídání je patrnou známkou jejich zvýšené aktivity. Je to zřejmě jejich odpověď na toxické působení karboplatiny. Podobná reakce byla pozorována například

přítomnosti toxického působení olova (Rothenberg et al., 2002). Předpokládáme, že jsou tyto změny reverzibilní, ale k restituci funkcí je nezbytná delší doba. Dokladem této schopnosti sítnice může být například makulární translokace, kde bylo pozorováno postupné zlepšování funkcí až do tří let po zákroku (Polito et al., 2010).

Etoposid se stejně jako karboplatina a vinkristin používá v trojkombinaci k chemoredukci. Vinkristin jsme do experimentu nezahrnuli především z důvodu jeho lokální toxicity (Thakur et al., 2008). Lokální toxicitu je sice možné významně snížit, pokud je účinná látka uložena v lipozómech (Boman et al., 1996), nicméně v této lékové formě není vinkristin běžně dostupný. Dalším důvodem byl fakt, že pro nás nebyl a dostupná metoda stanovení vinkristinu. Pro stanovení etoposidu bylo vyvinuto několik imunochemických metod. Jednou z nichž byla ELISA, metoda schopná měřit dosažené koncentrace od 40 pg/l, potřebný minimální objem vzorku však činil 10 ml (Saita et al., 1990), a stejně tak i kombinovaná metoda kapalinové chromatografie a spektrometrie vyžadovala vzorek o objemu minimálně 8 - 10 ml (Danigel et al., 1985). Vzhledem k tomu, že objem sklivce v králičím bulbu činí cca 1 ml, nejevila se žádná z těchto metod jako vhodná. Metoda HPLC použitá pro stanovení glukokortikoidů (Fujitaka et al., 1997) dovoluje stanovení etoposidu s minimální koncentrací 50 ng/ml ve vzorku o objemu 0,2 ml, což představuje téměř maximální odebratelné množství sklivce. Stanovení etoposidu metodou HPLC s UV detekcí bylo zavedeno pro sklivce nově, dosud byla metoda využívána pouze pro stanovení etoposidu v plazmě (Kato et al., 2003). Farmakokinetika etoposidu byla obdobná jako farmakokinetika karboplatiny, nicméně plazmatické koncentrace byly velmi nízké i po periokulární aplikaci, což připomíná jeho vazbu na bílkoviny. Vazba na bílkoviny byla prokázána u řady cytostatik se složitou organickou strukturou – doxorubicinu, vinkristinu, mitoxantronu, amsacrinu, paklitaxelu a stejně tak i etoposidu (Finlay a Baguley, 2000).

Parestezie, které vedly k automutilaci tří laboratorních zvířat, byly nejzávažnějším vedlejším

ú inkem p i periokulární opakované aplikaci 2,5 mg etoposidu . Vzhledem k tomu, že lé eny jsou i d ti krátce po narození s váhou srovnatelnou s použitými laboratorními zví aty, bylo by možné i u nich p edpokládat podobné závažné vedlejší ú inky.

6. Záv ry a zhodnocení cíl práce

V ešeném projektu jsme sledovali následující cíle:

- A) zjišt ní dosažených hladin cytostatik (karboplatiny, etoposidu) ve sklivci králi ího bulbu po periokulární a intravitreální aplikaci.

Z výsledk je patrné, že intravitreální koncentrace karboplatiny jsou i po periokulární aplikaci vyšší, než po aplikaci intravenózní, jak vyplývá z d íve již publikovaných výsledk . Tyto koncentrace nicmén nedosahují koncentrací terapeutických. Naopak po intravitreální aplikaci terapeutických koncentrací dosahují. V p ípad etoposidu jsou koncentrace p i periokulární aplikaci ve sklivci nem ítelné a v plazm velmi nízké. Po aplikaci intravitreální jsou hodnoty výrazn vyšší, a dosahují terapeutických koncentrací.

- B) stanovit zm ny koncentrací cytostatik v závislosti na ase (AUC)

V p ípad karboplatiny je možné terapeutické koncentrace pozorovat i n kolik desítek hodin po aplikaci. To vyplývá i z vypo ítaných hodnot AUC. Koncentrace etoposidu klesá rychleji, terapeutické koncentrace ve sklivci p etrvávají maximáln 24 hodin.

C) Stanovení změny hladiny MT ve sklivci a v plazmě laboratorních zvířat po aplikaci karboplatiny.

V řešeném projektu jsme pozorovali zvýšení hladiny metalothioneinu po jednorázové aplikaci karboplatiny ze 3,5 μM až na 5 μM v průběhu prvního týdne po aplikaci karboplatiny, pak jsme pozorovali pomalý pokles. Zvýšení hladiny metalothioneinu by mohlo mít vliv na vznik rezistence tumoru na léčbu karboplatinou.

D) Klasifikace vedlejších účinků cytostatik v závislosti na použitých dávkách a koncentracích cytostatik

Z hlediska vedlejších účinků je zřejmé, že použité dávky karboplatiny 0,05 mg pro jednorázovou intravitreální aplikaci v našem experimentu jsou příliš vysoké. Také po intravitreální aplikaci etoposidu jsme zaznamenali ložiskové změny v sítnici a tolerované terapeutické koncentrace jsou tedy patrně nižší. Periokulární opakovaná aplikace 2,5 mg etoposidu vedla projevům celkové toxicity (4. stupeň) a byla by nebezpečná zejména pro léčbu retinoblastomu u malých dětí.

E) Stanovit anatomické změny králičího bulbu při dlouhodobém průběžném sledování oftalmoskopicky a následně histopatologicky po ukončení experimentu

Opakovaná aplikace 0,05 mg karboplatiny do sklivce vedla k závažným strukturálním změnám. Při opakované aplikaci 0,008 mg karboplatiny nebyly strukturální změny pozorovány.

F) porovnat záznamy ERG před podáním cytostatik a po poslední aplikaci

Po opakovaném podání karboplatiny do sklivce v dávce 0,05 mg došlo k výraznému snížení amplitud ERG. Signifikantně menší změny ERG jsme pozorovali při intravitreálních aplikacích 0,08 mg a koncentrace karboplatiny ve sklivci se v tomto případě tedy patrně blíží maximální tolerované terapeutické. Ke změně nám ERG patrně přispělo i přechodné zvýšení nitroočního tlaku při aplikacích. Svědčí pro to mírné změny ERG na kontrolních levých bulbech. Podle dlouhodobého sledování jsou bezpečné koncentrace karboplatiny, které lze použít pro terapeutické účely ve sklivci, kolem 1000 µg/l. Při této koncentraci nebyly pozorovány žádné histopatologické změny sítnice.

Experimenty tedy prokázaly, že terapeutických AUC ve sklivci lze docílit pomocí aplikací chemoterapeutik do sklivce. Nelze ovšem s jistotou předpokládat jejich vedlejší účinky, nebo tkáň v lidském oku mohou na léčbu odpovídat jinak než tkáň králíka. Vzhledem k tomu, že v případě infiltrace sklivce nádorem bývá alternativou zevní radioterapie se zvýšeným rizikem vzniku sekundárních nádorů nebo enukleace, je toto riziko patrně tolerovatelné a tato léčebná metoda by po schválení etickou komisí mohla být u vybraných případů zavedena do léčebné praxe, zejména po verifikaci účinků cytostatik na nádorové buňky v dalších experimentech.

7. Souhrn

Na základě provedených experimentů jsme dospěli k závěru, že terapeutické koncentrace karboplatiny a etoposidu ve sklivcovém prostoru lze docílit intravitreální aplikací. Při parabolárních aplikacích i při vysokých lokálně toxických dávkách jsme terapeutických koncentrací nedocílili.

Aplikace karboplatiny vede ke zvyšování hladiny metalothioneinu což vede ke snížení účinnosti léčby.

Pro opakovanou aplikaci karboplatiny je maximální tolerovaná dávka 0.008 mg, která vede ke změnám ERG, patrně neprechodným. Vyšší dávky vedly k vymizení ERG a ke strukturálním změnám.

Způsob intravitreální aplikace, který jsme zvolili, je, domníváme se, poměrně bezpečný z hlediska případné diseminace nádoru. Vzhledem k použité cestě aplikace transkorneální, je teoreticky možné rozšíření nádorového procesu pouze do přední komory oka, kde lze ovšem také předpokládat vysokou koncentraci chemoterapeutik.

Všechny tyto závěry je třeba brát s určitou rezervou, neboť chování cytostatik a jejich efekt u experimentálních zvířat nemusí nutně přesně korelovat s jejich použitím u člověka.

8. Seznam zkratk

AdTS - adsorptive transfer technique (adsorptivní p enosová rozpoušt cí technika)

AUC - Area-under-the-concentration-versus-time-curve (plocha pod k ivkou dosažených koncentrací v závislosti na as)

DNA - DeoxyriboNucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)

DPH - difenylhydantoin

DPV - diferen ní pulsní voltametrie

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (enzymatická imunosorbentní esej)

ERG - elektroretinografie

FIA - fluorescent immunoassay (fluorescen ní imunoanalýza)

HPLC - vysokou ínná kapalinová chromatografie

ICRB - International Classification of Retinoblastoma (mezinárodní klasifikace retinoblastomu)

ISCEV - International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (mezinárodní spole nost pro klinickou elektrofyziologii)

m.s.o. - maximální skotopická odpov

MT - metalothionein

oc - odpov ípk

ot - odpov ty inel

RIA - radioimmunoassay (radioimunoanalýza)

SALT - sequential aggressive local therapy (agresívní lokální lé ba)

TNM - Tumour, Node, Metastasis (mezinárodní klasifikace nádorových onemocnění)

TTT - transpupilární termoterapie

URZ - uzavřený radionuklidový zdroj

VEC - vinkristin, etoposid, karboplatina

9. Seznam použité literatury

ABRAMSON, D.H., FRANK, Ch.M., DUNKEL, I.J. A phase I/II study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmology*. 1999, **106** (10), 1947-1950.

ABRAMSON, D.H., SCHEFLER, A.C. Update on retinoblastoma. *Retina*. 2004, **24** (6), 828-848.

ABRAMSON, D.H., SCHEFLER, A.C. Transpupillary thermotherapy as initial treatment for small intraocular retinoblastoma: technique and predictors of success. *Ophthalmology*. 2004, **111** (5), 984-991

ADAM, V. et al. An electrochemical detection of metallothioneins at the zeptomole level in nanolitre volumes. *Sensors*. 2008, **8** (4), 2293 – 2305.

AERTS, I. et al. In vivo efficacy of photodynamic therapy in three new xenograft models of human retinoblastoma. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010, **7** (4), 275-283.

BEDFORD, M.A., BEDOTTO, C., MCFAUL, P.A. Retinoblastoma: A study of 139 cases. *Br J Ophthalmol*. 1971, **55** (1), 19-27.

BENZ, M.S. et al. Complications of systemic chemotherapy as treatment of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 2000, **118** (4), 577-578.

BISHOP, J.O., MADSEN, E.C. Retinoblastoma. Review of the current status. *Surv Ophthalmol*. 1975, **19** (6), 342-366.

BOMAN, N.L. et al. Vincristine-induced dermal toxicity is significantly reduced when the drug is given in liposomes. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996, **37** (4), 351-355.

BROUWERS, E.E. et al. Determination of oxaliplatin in human plasma and plasma ultrafiltrate by graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, **382** (7), 1484-1490.

COHEN, V.M. et al. Vitreous Seeding From Retinal Astrocytoma in Three Cases. *Retina*. 2008, **28** (6), 884-888.

DANIGEL, H. et al. Drug monitoring of etoposide (VP16 -213). I. A combined method of liquid chromatography and mass spectrometry. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1985, **15** (2), 121-124.

DAVIS, F.A. The anatomy and histology of the eye and orbit of the rabbit. *Transactions of the American ophthalmological society*. 1929, **27**, 400-441.

DE SUTTER, E. et al. The prognosis of retinoblastoma in terms of globe saving treatment. A computer assisted study. Part I. *Ophthalmic Paediatr Genet*. 1987, **8** (2), : 77-84.

DOZ, F. et al Etoposide and carboplatin in extraocular retinoblastoma: a study by the Société Française d'Oncologie Pédiatrique. *J Clin Oncol*. 1995, **13** (4), 902-909.

DUKEL, I.J. et al. Retinoblastoma: potentially curable with intensive chemotherapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2010, **54** (3), 384-387.

EAGLE, R.C. et al. Malignant transformation of spontaneously regressed retinoblastoma, retinoma/retinocytoma variant. *Ophthalmology*. 1989, **96** (9), 1389-1395.

ELLSWORTH, R.M. Retinoblastoma. *Mod Probl Ophthalmol*. 1977, **18**, 84-100.

ENDO, T. et al. Immunohistochemical metallothionein expression in hepatocellular carcinoma: relation to tumor progression and chemoresistance to platinum agents. *J Gastroenterol*. 2004, **39** (12), 1196-1201.

FABRIK, I. et al. Employment of electrochemical techniques for metallothionein determination in tumor cell lines and patients with a tumor disease. *Electroanalysis*. **20** (14), 1521-1532.

FINLAY, G.J., BAGULEY, B.C. Effects of protein binding on the in vitro activity of antitumour acridine derivatives and related anticancer drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000, **45** (5), 417-422.

FLEXNER, S. A peculiar glioma (neuroepithelioma?) of the retina. *Johns Hopkins Hosp Bull*. 1891, **2**, 115-119.

FREEMAN, C.R. et al. Retinoblastoma: the case for radiotherapy and adjuvant chemotherapy. *Cancer*. 1980, **46** (9), 1913-1918.

FRIENDLY, D.S., PARKS, M.M. Concurrence of hereditary congenital cataracts and hereditary retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 1970, **84** (4), 525-527.

FUGARO, M.N. et al. Retinoblastoma in the eye of a llama (*Llama glama*). *Veterinary Ophthalmology*. 2005, **8**, 287-290.

FUJITAKA, M., et al. Serum concentrations of cortisone and cortisol in premature infants. *Metabolism*. 1997, **46** (5), 518-521.

FUNG, Y.K. et al. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*. 1987, **263** (4809), 1657-1661.

HARBOUR, J.W. et al. Local carboplatin therapy in transgenic murine retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996, **37** (9), 1892-1898.

HARRAP, K.R. Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat Rev*. 1985, **12** (Suppl A), 21-33.

HAYDEN, B.C. et al. Pharmacokinetics of systemic versus focal carboplatin chemotherapy in rabbit eyes: possible implication in the treatment of retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004, **45** (10), 3644-3649.

HAYDEN, B.H. et al. Subconjunctival carboplatin in retinoblastoma: impact of tumor burden and dose schedule. *Arch Ophthalmol*. 2000, **118** (11), 1549-1554.

HILGARTNER, H.L. Report of a case of double glioma treated by x-rays. *Texas Med J*. 1903, **18**, 322.

HURWITZ, M.Y. et al. Suicide gene therapy for treatment of retinoblastoma in a murine model. *Hum Gene Ther*. 1999, **10** (3), 441-448.

CHÉVEZ-BARRIOS, P. et al. Response of retinoblastoma with vitreous tumor seeding to adenovirus-mediated delivery of thymidine kinase followed by ganciclovir. *J Clin Oncol*. 2005, **23** (31), 7927-7935.

JACKSON, E. Report of the committee to investigate and revise the classification of certain retinal conditions. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1926, **94**, 367-370.

JENSEN, O.A. et al. Neuroepithelial tumor of the retina in a dog. *Veterinary Ophthalmology*. 2003, **6**, 57-60.

JOURNÉE-DE KORVER, J.G. et al. Transpupillary thermotherapy (TTT) by infrared irradiation of choroidal melanoma. *Doc Ophthalmol*. 1992, **82**, 185-191.

KANEKO, S., SUZUKI, A. Eye-Preservation Treatment of Retinoblastoma with Vitreous Seeding. *Jpn J Clin Oncol*. 2003, **33** (12), 601-607.

KARCIOGLU, Z.A. Fine Needle Aspiration Biopsy (FNAB) for Retinoblastoma. *Retina*. 2002, **22** (6), 707-710.

KARCIOGLU, Z.A., GORDON, R.A., KARCIOGLU, G.L. Tumor seeding in ocular fine needle aspiration biopsy. *Ophthalmology*. 1985, **92** (12), 1763-1767.

KATO, Y. et al. Determination of etoposide serum concentrations in small pediatric samples by an improved method of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Acta Med Okayama*. 2003, **57** (1), 21-24.

KATZ, N.N., MARGO, C.E., DORWART, R.H. Computed tomography with histopathologic correlation in children with leukokoria. *J Pediatr Ophthalmol Strab*. 1984, **21** (2), 50-56.

KIZEK, R. et al. Vztah metalothioneinu k rakovine a protinádorové léčbě. *Klin Biochem Metab*. 2004, **12** (33), 72-78.

KIZEK, R. et al. Využití katalytických reakcí na rtuové elektrody pro elektrochemické stanovení metalothioneinu. *Chemické listy*. 2004, **98** (4), 166–173.

KNOTTENBELT, D. C., HETZEL, U. ROBERTS, V. Primary intraocular primitive neuroectodermal tumor (retinoblastoma) causing unilateral blindness in a gelding. *Veterinary Ophthalmology*. 2007, **10** (6), 348-356.

KNUDSON, A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971, **68** (4), 820-823.

KREMMER, S., TOLKSDOF-KREMMER, A. STODTMEISTER, R. Simultaneous registration of VECF and pattern ERG during artificially raised intraocular pressure. *Ophthalmologica*. 1995, **209** (5), 233-241.

KRIZKOVA, S. et al. Comparison of metallothionein detection by using bridged reaction and enzyme-linked immunosorbent assay employing chicken yolk antibodies. *Electroanalysis*. 2009, **21** (23), 2575-2583.

KUKACKA, J. et al. Carboplatin monitoring by flameless atomic absorption spectrophotometry and metallothionein levels in pediatric patients with solid tumors. *Clinical Chemistry*. 2008, **54** (Suppl 6), A11.

LEE, W.H. et al. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*. 1987, **235** (4794), 1394-1399.

- LELE, K.P., PENROSE, L.S. .STALLARD, H.B. Chromosome deletion in a case of retinoblastoma. *Ann Hum Genet.* 1963, **27** (2), 171-174.
- LENNOX, E.L., DRAPER, G.J. SANDERS, B.M.. Retinoblastoma: a study of natural history and prognosis of 268 cases. *Br Med J.* 1975, **3** (5986), 731-734.
- LUMBROSO, L. et al. Chemothermotherapy in the management of retinoblastoma. *Ophthalmology.* 2002, **109** (6), 1130-1136.
- MARGO, C. et al. Retinocytoma: A benign variant of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 1983, **101** (10), 1519-1531.
- MARGOSHES, M., VALLEE B.L. A cadmium protein from equine kidney cortex. . *J Am Chem Soc.* 1957, **79** (17), 1813-1814.
- MASUYAMA, Y. et al. Treatment of retinoblastoma with argon laser photocoagulation. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 1984, **21** (5), 196-171.
- MEERUM TERWOGT, J.M. et al. Validated method for the determination of platinum from a liposomal source (SPI-77) in human plasma using graphite furnace Zeeman atomic absorption spectrometry. *Fresenius J Anal Chem.* 2000, **366** (3), 298-302.
- MENDELSON, M.E. et al. Intra ocular Concentrations of Chemotherapeutic Agents after Systemic or Local Administration. *Archives of Ophthalmology.* 1998, **116** (9), 1209-1212.
- MEYER-SCHWICKERATH, G., HELFERICH, E. Therapy of retinoblastoma. *Klin Monbl Augenheilkd Augenarzt Fortbild.* 1958 (6), 806-817.
- MOORE, R.F., STALLARD, H.B., MILNER, J.G. Retinal gliomata treated by radon seeds. *Br J Ophthalmol.* 1931, **15** (12), 673-696.
- MOORE, R.F. Choroidal sarcoma treated by the intraocular insertion of radon seeds. *Br J Ophthalmol.* 1930, **14** (4), 145-156.

MORGAN, G. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *Br J Ophthalmol.* 1971, **55** (9), 600-606.

MULVIHILL, A. Ocular motility changes after subtenon carboplatin chemotherapy for retinoblastoma. *Archives of Ophthalmology.* **121** (8), 1120-1124.

MURPHREE, A.L. Chemotherapy plus local treatment in the management of intraocular retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 1996, **114** (11), 1348-1356.

MURRAY, T.G. et al. Subconjunctival carboplatin therapy and cryotherapy in the treatment of transgenic murine retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 1997, **115** (10), 1286-1290.

NORK, M.T. et al. Measurement of regional choroidal blood flow in rabbits and monkeys using fluorescent microspheres. *Archives of Ophthalmology.* 2006, **124** (6), 860-868.

ONADIM, Z. et al. Genetic counselling in retinoblastoma: importance of ocular fundus examination of first degree relatives and linkage analysis. *Br J Ophthalmol.* 1991, **75** (3), 147-150.

POCHOP, P. et al. Optimalizace kombinované lé by retinoblastomu. *Cesk Slov Oftalmol.* 2004, **60** (2), 105-111.

POCHOP, P. et al. Využití Ru106 pro lé bu retinoblastomu. *Cesk Slov Oftalmol.* 2005, **61** (3), 192-197.

POLITO, A. et al. Macular translocation with 360 degrees retinotomy for management of retinal pigment epithelial tear: long-term results. *Br J Ophthalmol.* 2011, **95** (1), 74-78.

PRADUE, M.T. et al. Retinal function after subconjunctival injection of carboplatin in fibrin sealant. *Retina.* 2004, **24** (5), 776-782.

PRUSA, R. et al. The influence of platinum -based drugs on the amount of metallothio nein. *Toxicol Lett.* 2005, **158** (suppl 1), 66-67.

REESE, A.B. *Tumors of the eye*. Hagerstown: Harper and Row, 1976.

ROTHENBERG, S.J. et al. Increased ERG a - and b-Wave Amplitudes in 7- to 10-Year-Old Children Resulting from Prenatal Lead Exposure. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002, **43** (6), 2036-2044.

RYVOLOVA, M. et al. Analytical Methods for Metallothionein Detection. *Curr. Anal. Chem.* 2011, **7** (3), 243-261.

SAGERMAN, R.H. et al. Radiation induced neoplasia following external beam therapy for children with retinoblastoma. *Am J Roentgenol Rad Ther Nucl Med* . 1969, **105** (3), 529-535.

SAITA, T. et al. A highly sensitive enzyme -linked immunosorbent assay for etoposide using -D-galactosidase as a label. *Cancer Chemother Pharmacol* . 1990, **27** (2), 115-120.

SANBORN, G.G., AUGSBURGER, J.J., SHIELDS, J.A. Spontaneous regression of bilateral retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* . 1982, **66** (11), 685-690.

SHIELDS, C.L. et al. Plaque radiotherapy for retinoblastoma: long -term tumor control and treatment complications in 208 tumors. *Ophthalmology* . 2001, **108** (11), 2116-2121.

SHIELDS, C.L. et al. Chemoreduction plus focal therapy for retinoblastoma: factors predictive of need for treatment with external beam radiotherapy or enucleation. *Am J Ophthalmol* . 2002, **133** (5), 657-664.

SHIELDS, C.L. et al. Chemoreduction for retinoblastoma: analysis of tumor control and risks for recurrence in 457 tumors. *Am J Ophthalmol* . 2004, **138** (3), 329-337.

SHIELDS, C.L., DE POTTER, P. , HIMELSTEIN, B.P. Chemoreduction in the initial management of intraocular retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* . 1996, **114** (11), 1330-1338.

SHIELDS, J.A. et al. Retinoblastoma manifesting as orbital cellulitis. *Am J Ophthalmol* . 1991, **112** (4), 442-449.

SHIELDS, J.A. et al. Retinoblastoma in an 18-year-old male. *J Pediatr Ophthalmol*. 1976a, **13**, 275-277.

SHIELDS, J.A. et al. B-scan ultrasonography in the diagnosis of atypical retinoblastomas. *Can J Ophthalmol*. 1976b, **11** (1), 42-51.

SHIELDS, J.A. et al. The role of cryotherapy in the management of retinoblastoma. *Am J Ophthalmol*. 1989, **108** (3), 260-264.

SHIELDS, J.A. et al. Spontaneous pseudohypopyon secondary to diffuse infiltrating retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*. 1988, **106** (9), 1301-1302.

SHIELDS, J.A., SHIELDS, C.L. Episcleral plaque radiotherapy for retinoblastoma. *Ophthalmology*. 1989, **96** (4), 530-537.

SHIELDS, J.A., SHIELDS, C.L. *Intraocular Tumors: A Text and Atlas*. Philadelphia: WB Saunders Co., 1992.

SHIELDS, J.A., SHIELDS, C.L. *Retinoblastoma. Atlas of intraocular tumors*. Philadelphia: Lippincott Williams, 1999.

SHIELDS, J.A., SHIELDS, C.L. SIVALINGAM, V. Decreasing frequency of enucleation in patients with retinoblastoma. *Am J Ophthalmol*. 1989, **108** (2), 185-188.

SCHOFIELD, P.B. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*. 1960, **44** (1), 35-41.

SORSBY, A. Bilateral retinoblastoma: A dominantly inherited affection. *Br Med J*. 1972, **2** (5813), 580-583.

SORSBY, A, UNGAR, J. Intravitreal injection of penicillin; study on the levels of concentration reached and therapeutic efficacy. *Br J Ophthalmol*. 1948, **32** (12), 857- 864.

STALLARD, H.B. Radiotherapy for malignant melanoma of the choroid. *Br J Ophthalmol*. 1966, **50** (3), 147-155.

- STANNARD, C.E. et al. Treatment of malignant meningitis in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol.* 1975, **59** (7), 362-365.
- STEPHAN, H. et al. Photodynamic therapy in retinoblastoma: effects of verteporfin on retinoblastoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008, **49** (7), 3158-3163.
- SYED, N.A. et al. Retinoblastoma in a dog. *Arch Ophthalmol.* 1997, **115** (6), 758-763.
- THAKUR, J.S. et al. Extravasational side effects of cytotoxic drugs: A preventable catastrophe. *Indian J Plast Surg.* 2008, **41** (2), 145-150.
- VAN QUILL, K. R. et al. Subconjunctival Carboplatin in Fibrin Sealant in the Treatment of Transgenic Murine Retinoblastoma. *Ophthalmology.* 2005, **112** (6), 1151-1158.
- VELEZ, G. et al. Pharmacokinetics and Toxicity of Intravitreal Chemotherapy for Primary Intraocular Lymphoma. *Arch Ophthalmol.* 2001, **119** (10), 1518-524.
- VIRCHOW, R. *Die Krankhaften Geschwulste: sv.2.* Berlin: Hirschwald, 1864.
- WARDROP, J. *Observations of fungus or soft cancer.* Edinburgh: Archibald Constable and Co., 1809.
- WHITE, L. et al. Ineffective photodynamic therapy (PDT) in a poorly vascularized xenograft model. *Br J Cancer.* 1988, **57** (5), 455-458.
- WHITE, L. The role of chemotherapy in the treatment of retinoblastoma. *Retina.* 1983, **3** (3), 194-199.
- WILSON, M.W. et al. Real-time ophthalmoscopic findings of superselective intraophthalmic artery chemotherapy in a nonhuman primate model. *Arch Ophthalmol.* 2011, **129** (11), 1458-1465.

WILSON, T.W. et al. Penetration of chemotherapy into vitreous is increased by kryotherapy and cyklosporine in rabbits. *Arch Ophthalmol*. 1996, **114** (11), 1390-1395.

WINTERSTEINER, H. *Das Neuroepithelioma Retinae. Eine anatomische und klinische Studie*. Leipzig: Franz Deutizke, 1897.

YAMANE, T., KANEKO, A. , MOHRI ,M. The technique of ophthalmic arterial infusion therapy for patients with intraocular retinoblastoma. *Int J Clin Oncol*. 2004, **9** (2), 69-73.

ZHAO, H. et al. Research on Influences of Transient High IOP during LASIK on Retinal Functions and Ultrastructure. *J Ophthalmol* [online]. 2009; 2009: 230528. doi: [10.1155/2009/230528](https://doi.org/10.1155/2009/230528)

ZIMMERMANN, L.E. Ocular lesions of juvenile xanthogranuloma. Nevoxanthoendothelioma. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1965, **69**, 412-439.

ZUFÍA, L. et al. Simple and rapid determination of carboplatin in plasma by high - performance liquid chromatography. Error pattern and application to clinical pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001, **764** (1-2), 457-464.