

VÝSLEDKY RETROSPEKTIVNÍ ANALÝZY CÍLENÉ LÉČBY METASTATICKÉHO KARCINOMU PRSU TRASTUZUMABEM V MOÚ. IDENTIFIKACE PREDIKTIVNÍCH FAKTORŮ.

A RETROSPECTIVE ANALYSIS OF TRASTUZUMAB-BASED THERAPY IN METASTATIC BREAST CANCER PATIENTS AT MASARYK MEMORIAL CANCER INSTITUTE. IDENTIFICATION OF PREDICTIVE FACTORS.

SVOBODA MAREK^{1,6}, GRELL PETER¹, ŠIMÍČKOVÁ MARTA³, FABIAN PAVEL², PETRÁKOVÁ KATARÍNA¹, PALÁCOVÁ MARKÉTA¹, MACKOVÁ DAGMAR¹, TROJANEC RADEK⁴, HAJDÚCH MARIÁN⁴, PAVLÍK TOMÁŠ⁵, NENUTIL RUDOLF², VYZULA ROSTISLAV^{1,6}

¹KLINIKA KOMPLEXNÍ ONKOLOGICKÉ PÉČE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO.

²ODDĚLENÍ PATOLOGIE, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO.

³ODDĚLENÍ LABORATORNÍ MEDICÍNY, MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO.

⁴LABORATOŘ EXPERIMENTÁLNÍ MEDICÍNY, LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY PALACKÉHO, OLOMOUC.

⁵INSTITUT BIOSTATISTICKÝCH ANALÝZ, MASARYKOVA UNIVERZITA, BRNO.

⁶LÉKAŘSKÁ FAKULTA MASARYKOVY UNIVERZITY, BRNO.

Východiska

Léčba trastuzumabem, monoklonální protilátkou proti HER-2 receptoru, významně zvyšuje léčebnou odpověď (RR), prodlužuje čas do progresu onemocnění (TTP) i celkové přežití (OS) pacientek s HER-2 pozitivním metastatickým karcinomem prsu. Na straně druhé je tato léčba doprovázena primární i sekundární rezistencí onemocnění. Provedli jsme retrospektivní analýzu vlastního souboru pacientek, s cílem identifikovat prognostické faktory použitelné v běžné klinické praxi. **Metodika:** Do souboru bylo zařazeno 112 pacientek, které od dubna 2000 do ledna 2007 zahájily v Masarykově onkologickém ústavu paliativní protinádorovou terapii s trastuzumabem pro metastatický karcinom prsu. Sledovali jsme základní charakteristiky primárních tumorů (histologický typ, exprese estrogenového, progesteronového a HER-2 receptoru, amplifikace Her-2/neu genu), stav pacientek, rozsah onemocnění, vývoj koncentrace sérových nádorových markerů [karcinoembryonální antigen (CEA), CA 15-3, sérová koncentrace extracelulární části HER-2 receptoru (S-HER-2 ECD)] a parametry účinnosti léčby a přežití (RR, TTP, OS). **Výsledky:** U 95% pacientek byl trastuzumab podáván v kombinaci s cytostatiky (nejčastěji taxany – 83%), 1. a 2. linie léčby představovaly 88,4% aplikací. Medián TTP byl 284 dnů (9,3 měsíce), medián OS byl 612 dnů (20,1 měsíce), RR 54,5%. Nejvíce odpovědi na léčbu bylo v první linii léčby ($p < 0.0001$) a u nádorů s poměrem signálů sond HER-2/Ch17 $\geq 2,2$ ($p = 0,0092$). Trastuzumab byl předčasně ukončen u 11 pacientek (9,8% případů), u 7 (6,2%) z důvodů kardiotoxicity. Metastatické postižení CNS nastalo u 31 pacientek (27,7%). Sérový nádorový marker S-HER-2 ECD byl nejčastějším pozitivním markerem v době před zahájením léčby (72,5%) i při progresi onemocnění (55,9%). Coxova regresní analýza prokázala nejsilnější prognostický význam ve vztahu k TTP u markeru S-HER-2 ECD, a to jak k jeho hladině před zahájením léčby, tak i v době mezi 90. a 130. dnem léčby trastuzumabem. Nejlepším prediktorem OS byl stav CEA před zahájením léčby a stav S-HER-2 ECD v době mezi 90. a 130. dnem léčby. **Závěr:** Potvrdili jsme, že jediným prediktivním markerem odpovědi na léčbu trastuzumabem, který je zároveň absolutním indikačním kritériem, je průkaz HER-2 pozitivní tumoru. Stanovení sérové koncentrace S-HER-2 ECD před zahájením léčby a monitorace dynamiky tohoto markeru v průběhu léčby trastuzumabem je nejvýznamnějším prognostickým ukazatelem vývoje onemocnění (TTP i OS), a může tak přispět k časnému odhalení progresu a k individualizaci časového plánu kontrolních vyšetření.

Klíčová slova: metastatický karcinom prsu, trastuzumab, HER-2 gen, sérový HER-2 protein, doba do progresu, celkové přežití, prognóza.

Introduction

Trastuzumab is a humanized monoclonal antibody directed against the HER-2 receptor. Trastuzumab-based therapy significantly improves response rate (RR), time to progression (TTP) and overall survival (OS) for women with HER-2 positive metastatic breast cancer. Despite its initial efficacy, acquired resistance to trastuzumab develops in a majority of patients with MBC, and a large subset never responds, demonstrating primary resistance. The purpose of this retrospective study was to determine prognostic factors applicable to clinical practice. **Methods:** We enrolled 112 women with metastatic breast cancer, who started the trastuzumab-based therapy at Masaryk Memorial Cancer Institute until January 2007. Clinical and laboratory factors, such as: patients conditions, character of metastatic spread, histology, estrogen, progesterone and Her-2 receptor status, Her-2/neu gene amplification, and serum tumor markers CEA, CA 15-3 and extracellular domain of Her-2 receptor (S-HER-2 ECD) were monitored. The association of all factors to response to therapy, time to progression (TTP) and overall survival (OS) was assessed. **Results:** In 95% patients, the trastuzumab was combined with cytostatics (83% taxanes), 88,4% of patients started the trastuzumab as the first or second-line anticancer treatment. The median TTP was 284 days (9,3 months) and the median OS was 612 days (20,1 months) for all patients, RR was 54,5%. The highest RR was associated with the first-line treatment ($p < 0.0001$) and with HER-2 gene/Chromosome 17 ratio $> 2,2$ ($p = 0,0092$). Eleven patients (9,8%) discontinued the treatment because of toxicity, 7 patients did it as a result of cardiotoxicity (6,2%). CNS metastases occurred in 31 patients (27,7%). The S-HER-2 ECD was the most frequently elevated serum marker at the time of the

treatment initialization (72,5%) and at the time of the progression (55,9%). Cox regression analysis identified S-HER-2 ECD levels at the beginning and between day 90 and 130 of the trastuzumab therapy as the best predictors of TTP. On the other hand the best predictor of OS was level of CEA before the treatment started and level of S-HER-2 ECD between day 90 and 130 of the trastuzumab therapy. **Conclusions:** We confirmed that the only one predictive marker for response to trastuzumab therapy is a proof of HER-2 tumor positivity. The highest prevalence of S-HER-2 ECD positivity among serum tumor markers and the strong association between initial and subsequent S-HER-2 ECD serum concentrations and time to progression and overall survival make the S-HER-2 ECD the most significant prognostic marker.

Keywords: metastatic breast cancer, trastuzumab, HER-2 gene, serum HER-2 protein, time to progression, overall survival, prognosis.

Úvod

Zhoubné novotvary (ZN) prsu představují po ZN kůže druhou nejčastější malignitu u žen ve vyspělých zemích světa. Za předchozích 25 let vzrostl počet nově hlášených ZN prsu v České republice téměř dvojnásobně. Z posledních kompletních údajů NOR o incidenci ZN prsu vyplývá, že v roce 2005 dosáhl absolutní počet nových případů 5790 nemocných, t.j. incidence 110 na 100 000 žen a mortalita 40 na 100 000 žen (1,2). Vysoká incidence a mortalita ZN prsu představuje závažný medicínský a společenský problém. U přibližně 15 až 30% pacientek nádorové buňky na svém povrchu nadměrně exprimují HER-2 receptor, k čemuž dochází na podkladě amplifikace Her-2/neu genu (3-5). Tyto karcinomy, označované jako HER-2 pozitivní karcinomy, jsou charakteristické vysokým stupněm agresivity, a tedy i nepříznivou prognózou (3). Na straně druhé existuje účinná terapie, cíleně vyvinutá proti HER-2 receptoru. Jedná se o humanizovanou monoklonální protilátku proti extracelulární doméně HER-2 receptoru – trastuzumab (Herceptin®) (6). Zavedení trastuzumabu do klinické praxe nastalo v roce 1998, kdy byl ve Spojených státech amerických schválen Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) pro první linii léčby metastatického karcinomu prsu. V České republice došlo k obdobnému kroku o tři roky později. Trastuzumab se stal vůbec prvním léčivem, které je u solidních nádorů aplikováno na základě genetického vyšetření (7).

V současnosti je trastuzumab indikován k adjuvantní i paliativní léčbě pacientek s HER-2 pozitivním karcinomem prsu. V případě adjuvantní léčby trastuzumab významně snižuje riziko rekurence choroby, a tedy zvyšuje pravděpodobnost vyléčení pacientky. U pacientek s diseminovaným onemocněním trastuzumab významně prodlužuje čas do progresse onemocnění i celkové přežití (8). Na straně druhé výsledky klinických studií rovněž prokázaly, že i přes cílenou aplikaci je v důsledku primární a sekundární rezistence benefit z trastuzumabu omezen na skupinu přibližně 30 až 50% léčených pacientek (9). V Masarykově onkologickém ústavu (MOÚ) je trastuzumab v klinické praxi používán od roku 2000, kdy byla zahájena (zpočátku v rámci klinických studií) léčba prvních pacientek s metastatickým HER-2 pozitivním karcinomem prsu. V této indikaci bylo do 31.1.2007 léčených celkem 112 pacientek. Souběžně s klinickou praxí probíhal od roku 2005 i výzkumný projekt podporovaný Interní grantovou agenturou MZ ČR, jehož cílem bylo studovat mechanismy

rezistence k trastuzumabu a identifikovat molekulární prediktivní markery použitelné pro běžnou klinickou praxi. V předkládané práci prezentujeme výsledky léčby uvedených pacientek, společně s výsledky našeho výzkumného projektu, ve kterém jsme identifikovali vhodné prediktory odpovědi na protinádorovou terapii s trastuzumabem.

Metodika

Soubor pacientek

Do souboru byly zařazeny pacientky s metastatickým HER-2 pozitivním karcinomem prsu, které v období mezi dubnem 2000 až lednem 2007 zahájily v MOÚ paliativní protinádorovou terapii založenou na aplikaci trastuzumabu (úvodní dávka 4 mg/kg, další dávky 2 mg/kg 1x týdně, nebo 6mg/kg 1x za 3 týdny). Podmínkou k zahájení léčby bylo podepsání informovaného souhlasu s protinádorovou terapií. Výzkumná část projektu byla schválena etickou komisí MOÚ. Retrospektivní analýza byla založena na vyhodnocení anonymizovaných základních klinických údajů charakterizujících pacienta, léčbu a její vývoj: datum narození, datum diagnózy, datum zahájení léčby s trastuzumabem, pořadí linie léčby a způsob podávání trastuzumabu, performance status (stav fyzické výkonnosti), charakteristika metastatického postižení v době zahájení léčby, datum progresse choroby, charakter progresse, datum a příčina ukončení aplikace trastuzumabu. Klinický stav byl hodnocen onkologem při každé návštěvě pacienta, první restaging byl prováděn obvykle po 2 až 3 měsících od začátku terapie. Hodnocení odpovědi na terapii bylo provedeno podle RECIST kritérií (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (<http://www.eortc.be/recist>) pomocí zobrazovacích technik [ultrazvuk, počítačová tomografie (CT), magnetická rezonance (MRI), konvenční rentgenová vyšetření (RTG)] a metod nukleární medicíny (scintigrafie skeletu). Odpověď byla vyhodnocena jako progresse (PD - progressive disease), stabilizace (SD - stable disease), partiální remise (PR - partial response) a kompletní remise (CR – complete response).

Imunohistochemické vyšetření

Nádorová tkáň archivovaná po formalinové fixaci v paraforminovém bloku pocházela výhradně z diagnostické biopsie nebo z resekátu tumoru odebraném při mastektomii. Paraforminové bloky byly následně zpracovány do podoby složených tkáňových bloků (tissue arrays) pomocí manuálního přístroje TA-1 (A. Fintajsl, Brno, ČR). V každém případě

byly z každého původního tkáňového bloku vykrojeny dva vzorky o průměru 1,8 mm a maximální délce 3 mm. Tyto válečky byly přeneseny do předem připraveného místa shodných rozměrů v novém parafinovém bloku. Do každého nového parafinového bloku bylo možné postupně takto přenést 12 případů. Za účelem standardního imunohistochemického vyšetření (IHC) byly z tkáňových bloků nebo ze složených tkáňových bloků mikrotomem krájeny řezy o tloušťce 3–4 μm , které byly nejprve deparafinizovány v xylenu a následně hydratovány v řadě roztoků o stupňovitě klesající koncentraci ethanolu. K demaskování epitopů bylo nejčastěji použito mikrovlnného zahřívání a inkubace tkáně v citrátovém pufru pH 6,0. Protilátky byly ředěny dle doporučení výrobce v roztoku Antibody Diluent (DAKO, Dánsko). Vizualizace imunohistochemické reakce byla provedena pomocí kitu EnVision+ HRP/DAB (DAKO, Dánsko). K detekci proteinů byla použita polyklonální protilátka proti HER-2 receptoru (DAKO, DK), a monoklonální protilátky proti estrogenovému receptoru - α (ER) (Lab Vision, USA), progesteronovému receptoru (PR) (Lab Vision, USA). Výsledky imunohistochemického vyšetření byly v případě hodnocení exprese ER a PR zapsány v podobě procenta vyjadřujícího počty pozitivních buněk, při hodnocení exprese HER-2 receptoru bylo použito semikvantitativní hodnocení dle manuálu výrobce, které nabývalo hodnot 0 až 3+. Za pozitivní expresi ER a PR byly považovány hodnoty $\geq 10\%$. V případě HER-2 receptoru byla za pozitivní expresi považována pouze hodnota 3+. Karcinomy s pozitivní expresí HER-2 receptoru a s expresí hodnocenou stupněm 2+ byly podrobeny vyšetření amplifikace Her-2/neu genu metodou FISH.

Vyšetření metodou FISH

Amplifikace genu Her-2/neu byla vyšetřována pomocí metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace). Vyšetření bylo provedeno v MOÚ a/nebo v Laboratoři experimentální medicíny v Olomouci. Použita byla lokusově specifická sonda Her-2/neu (Spectrum Orange, Vysis® PathVysion® HER-2 DNA Probe kit, Vysis Inc. – Abbott Molecular, USA) a centromerická sonda pro chromosom 17 (CEP17, Spectrum Green, Vysis Inc. – Abbott Molecular, USA). Jednoznačně pozitivní výsledek amplifikace HER-2/genu byl konstatován v případě, že poměr počtu signálů sondy Her-2/neu a počtu signálů sondy pro chromosom 17 byl 2,2 a vyšší nebo bylo detekováno alespoň 6 kopií Her-2/neu genu. Za hraničně pozitivní byly označeny výsledky s poměrem signálů sondy pro Her-2/neu a sondy chromosomu 17 v rozmezí 1,8 až 2,19 nebo detekce 4 až 5,9 kopií Her-2/neu genu. Nádory s poměrem signálů $< 1,8$ nebo počtem kopií < 4 byly označeny za HER-2 negativní.

Analýza sérových markerů

Sledovali jsme tři nádorové markery: CEA (karcinoembryonální antigen), CA15-3 a S-HER-2 ECD. Onkofetální protein CEA a glykoprotein CA15-3 jsou nádorové markery standardně stanovené u karcinomu prsu, s využitím v predikci relapsu onemocnění a ke sledování jeho odpovědi na protinádorovou léčbu (10). V případě S-HER-2 ECD se jedná o solubilní frakci HER-2 receptoru, vznikající odštěpením téměř celé části extracelulární domény

(ECD) HER-2 receptoru pomocí enzymů ze skupiny metaloproteinás. Štěpením vzniká fragment o velikosti 97 až 115 kDa, který je následně detekovatelný v séru pacientek (11,12).

Za účelem stanovení sérové koncentrace sledovaných molekulárních markerů bylo použito sérum získané od pacientek z odběrů krve realizovaných při standardních diagnostických nebo kontrolních odběrech krve. Od každého pacienta byla k analýze použita řada sér, umožňující sledovat dynamiku měřených markerů. Jako první bylo použito sérum z období maximálně 30 dnů před zahájením aplikace trastuzumabu a dále séra v celém průběhu léčby, a to s obvykle 3 týdenními intervaly na počátku terapie (do 3 měsíců), následně odebíranými jednou za 2 až 3 měsíce. Vzorky séra byly bezprostředně po odběru a zpracování ukládány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do stanovení koncentrace sledovaných analytů. Stanovení S-HER-2 ECD bylo prováděno metodou Her-2/neu Microtiter ELISA (Oncogene Science, Bayer Corp., USA). Kontrola kvality byla prováděna testováním 3 hladin firemních kontrol a jednou kontrolou interní směsného vzorku séra s hodnotou v oblasti cut-off (15 $\mu\text{g/l}$). Koncentrace CA15-3 a CEA v séru byly měřeny na automatických analyzátoch AxSym (metoda MEIA, Abbott Molecular, USA) a ELECSYS 2010 (ECLIA, Roche, Germany) s doporučenými hladinami cut-off (30 kU/l a 4,6 $\mu\text{g/l}$, resp.). Kontrola kvality stanovení byla testována firemními kontrolami.

Statistické hodnocení

Výsledky realizovaných vyšetření byly převedeny do podoby kategoriálních dat a ve vztahu ke sledovaným parametřům byly zpracovány pomocí kontingenčních tabulek. Poté jsme testovali nezávislosti sledovaných kategorizovaných proměnných. K testům jsme použili Pearsonův chíkvadrát test nezávislosti a Fischerův exaktní test. Jestliže některá z četností v kontingenční tabulce byla menší než pět, byla nejprve data upravena Yatesovou korekcí a poté proveden samotný test. V analýzách přežití se při porovnání přežívání jednotlivých skupin pacientek využil buď Gehanův-Wilcoxonův test, případně Logrank test nebo Cox-regresní analýza. Křivky přežití byly sestaveny klasickou Kaplanovou-Meierovou metodou. Za statisticky signifikantní byly považovány hodnoty $p \leq 0,05$. K výpočtům byl použit statistický software MedCalc, verze 9.3.9.0. (www.medcalc.be).

Výsledky

Charakteristika pacientek

Analýzovaný soubor tvořilo celkem 112 pacientek, kterým byl karcinom prsu diagnostikován ve věku 23 až 75 let (medián 51 let). V době diagnózy bylo onemocnění u 11,6% žen v I. klinickém stadiu, u 42% ve II. klinickém stadiu, u 29,5% ve III. klinickém stadiu a v případě 14,3% žen bylo onemocnění diagnostikováno jako vzdáleně disseminované (IV. klinické stadium). Údaj o klinickém stadiu nebyl dohledatelný u 3 pacientek (2,6%). V době zahájení paliativní protinádorové léčby založené na aplikaci trastuzumabu byl věkový rozptyl pacientek v rozmezí 28 až 77 let (medián 54 let). V té době měly všechny pacientky onemocnění vzdáleně metastazované. Počet takto po-

stižených orgánových lokalit byl u 50 pacientek (44,6%) omezen na 1 místo, u 39 (34,9%) na dvě místa. V případě 23 pacientek (20,5%) bylo onemocnění rozšířeno do více než 2 orgánových lokalit. Nejčastěji byl metastatickým procesem postižen skelet (51,8% pacientek), játra (45,5%) a plíce (35,7%).

V době zahájení léčby trastuzumabem byla většina pacientek v dobrém stavu, bez významnější limitace projevy onemocnění nebo komorbidit. Performance status 0 a 1 (dle ECOG) byl zaznamenán u 83% pacientek. Léčba trastuzumabem byla zároveň 1. linií paliativní protinádorové léčby u 65 pacientek (58%), 2. linií u 34 pacientek (30,4%) a pouze u 13 pacientek (11,6%) představovala 3. a další linií paliativní léčby. U 106 pacientek (95%) byl trastuzumab aplikován současně s klasickými cytostatiky, a to nejčastěji v kombinaci s taxany (93 pacientek, 83%): a) paklitaxel v dávce 80-90 mg/m² 1x týdně nebo 175 mg/m² 1x za tři týdny; b) docetaxel 35 mg/m² 1x týdně nebo 75 mg/m² 1x za tři týdny, a dále s vinorelbinem (13 pacientek, 12%, dávka 25 mg/m²). Mezi výše uvedenými 93 pacientkami bylo 6 žen, které dostávaly v kombinaci s paklitaxelem i karboplatinu (AUC2). Pouze 6 (5%) pacientek bylo léčeno monoterapií trastuzumabem.

Charakteristika tumorů

Terapie trastuzumabem je indikována u karcinomů s prokázanou nadměrnou expresí HER-2 receptoru (IHC stanovená exprese HER-2 receptoru 3+) a/nebo s amplifikací Her-2/neu genu. V 76% případů (85 pacientek) byla indikace trastuzumabu založena na vyšetření vzorků primárních tumorů z doby diagnózy onemocnění. U 27 pacientek (24%) byl HER-2 status stanoven na základě vyšetření vzorků metastáz, z toho u 18 pacientek (16%) se jednalo o biopsie provedené bezprostředně před zahájením léčby trastuzumabem, u zbývajících 9 pacientek (8%) byly vzorky odebrány před zahájením předchozí paliativní chemoterapie. Z hlediska morfologických charakteristik bylo 93 (83%) karcinomů duktálních, 9 (8%) karcinomů lobulárních, 4 (3,6%) smíšených a v šesti případech byly stanoveny jiné histologické subtypy. Více než polovina karcinomů (59 případů, 52,7%) byla nízké diferencovaných (G3), naopak pouze ve 2 případech (1,8%) byl tumor ohodnocen jako dobře diferencovaný (G1). U čtvrtiny pacientek (25,9%) nebyl grade tumoru dohledatelný. Nadměrná exprese HER-2 receptoru IHC3+ byla zjištěna u 85 (75,9%) tumorů, ve 13 (11,6%) tumorech byla exprese ohodnocena stupněm 2+ nebo menším. U 5 tumorů (4,5%) byla konstatována pozitivita HER-2 exprese, bez semikvantifikace jejího stupně a u 9 tumorů (8%) nebyl výsledek IHC vyšetření dohledatelný. U posledních dvou skupin nebylo možné vyšetření opakovat, a to pro nedostatek nebo nedostupnost materiálu. Výsledek amplifikace Her-2/neu genu, stanovený pomocí metody FISH, byl k dispozici u 92 pacientek. U 82 nemocných byla v nádoru prokázána jednoznačná amplifikace Her-2/neu genu, u 5 pacientek byl výsledek hraniční a u zbývajících 5 pacientek nebyla prokázána amplifikace. U 71 FISH vyšetření byl dohledatelný údaj o poměru počtu detekovaných HER-2 genů a centromer chromosomu 17. Na základě poměru obou čísel a histogramu rozdělení jeho četností byly za účelem dalšího sta-

tistického zpracování tumory rozděleny do 3 skupin podle míry amplifikace (počtu kopií) Her-2/neu genu. V první skupině (13 tumorů, 11,6% z celkového počtu) byl poměr počtu kopií HER-2 genu a chromosomu 17 menší než 2,2. Ve druhé skupině (31 tumorů, 27,7%) byl uvedený poměr 2,2 až 6,9; ve třetí skupině (27 tumorů, 24,1%) přesahoval poměr číslo 7. Z celkového počtu 112 vyšetřených tumorů byla u 106 z nich (95%) prokázána buď nadměrná exprese HER-2 receptoru (IHC 3+) nebo hraniční či jednoznačná amplifikace Her-2/neu genu. V souvislosti s posledním uvedeným údajem je nezbytné poznamenat, že v prvních letech používání trastuzumabu byla jeho indikace možná pouze na základě výsledku imunohistochemického vyšetření. U pěti pacientek jsme zpětně metodou FISH přehodnotili HER-2 status nádoru na negativní, u jedné pacientky, která zahájila léčbu v roce 2000, nebyly údaje o HER-2 pozitivitě ani biologický materiál dohledatelný. Pozitivní exprese estrogenového receptoru alfa (dále jen ER) byla zjištěna u 43 (38,3%) tumorů, naopak 63 (56,3%) tumorů tento receptor neexprimovalo a v 6 případech (5,4%) nebyl status ER zjištěn. Pozitivní exprese progesteronového receptoru (dále jen PR) byla zjištěna u 28 (25%) tumorů, zatímco 71 (63,4%) tumorů PR neexprimovalo a ve 13 případech (11,6%) nebyl status PR zjištěn. Podrobná charakteristika souboru je uvedena v tabulce č. 1.

Charakteristika sérových analytů

Předterapeutická koncentrace sérových analytů

Předterapeutická (iniciální) sérová koncentrace S-HER-2 ECD u 81 nemocných vykazovala hodnotu mediánu 25,2 µg/l (Tab.2). Hladina zvýšená nad diskriminační mez positivity markeru, tzv. cut-off, (15 µg/l) byla prokázána u 72,5% nemocných. Neprokázali jsme závislost mezi jednotlivým počtem postižených metastatických míst a předterapeutickou hodnotou S-HER-2 ECD. Pokud jsme však srovnávali skupinu pacientek s metastatickým postižením limitovaným pouze na jeden orgánový celek (medián 20,2 µg/l) se skupinou s metastatickým postižením více než jedné orgánové soustavy (medián 61,3 µg/l), byl rozdíl iniciálních koncentrací signifikantní (p=0,006). Neprokázali jsme závislost mezi iniciální hodnotou S-HER-2 ECD a konkrétním orgánovým postižením (skelet vs plíce vs játra vs ostatní). Předterapeutická koncentrace S-HER-2 ECD nezávisela na výsledku imunohistochemického vyšetření nádorové exprese HER-2 receptoru (IHC 1+ vs IHC 2+ vs IHC 3+). Na straně druhé jsme pozorovali, že pacientky s nádory s poměrem počtu kopií Her-2/neu genu k počtu centromer chromosomu 17 (dále jen HER-2/Ch17) vyšším než 7, měly vyšší medián S-HER-2 ECD (51,4 µg/l), než pacientky s poměrem < 2,2 (17,1 µg/l), nebo 2,2 – 6,9 (16,45 µg/l) (p=0,033).

V případě koncentrace sérového CEA a CA15-3 byla zvýšena hladina před zahájením terapie u 50,7%, resp. u 63,2% (ve stejném pořadí) pacientek. Medián vstupních koncentrací byl u CEA 4,2 µg/l a u CA15-3 39,35 kU/l. Ani u CEA ani u CA15-3 nebyla prokázána závislost mezi jejich koncentrací a absolutním počtem metastaticky postižených míst. Pokud jsme však srovnávali hladiny obou markerů omezili na dvě skupiny pacientek, a to skupinu s metastatickým postižením limitovaným

pouze na jeden orgánový celek a skupinu s metastatickým postižením více než jedné orgánové soustavy, byl rozdíl předterapeutických koncentrací obou markerů mezi těmito skupinami signifikantní (CEA 3,35 vs 6,3 µg/l, $p=0,0075$; CA15-3 22,0 vs 58,6 kU/l, $p=0,0052$). Pouze u markeru CA15-3 jsme prokázali vztah mezi orgánovým postižením a iniciační koncentrací markeru. Pacientky, u kterých bylo metastatické postižení limitováno pouze na skelet, měly před zahájením terapie výrazně vyšší koncentraci CA15-3 (medián 156,0 kU/l), než pacientky, u kterých byly prokázány pouze viscerální metastázy (medián 31,9 kU/l), nebo postižení jiných orgánů (např. kůže, vzdálené oblasti lymfatických uzlin, a pod.) (medián 18,15 kU/l) ($p=0,019$). Mezi sérovými markery S-HER-2 ECD a CEA byl prokázána statisticky signifikantní závislost (korelační koeficient $r=0,841$, $p<0,0001$), stejně tak i mezi markery S-HER-2 ECD a CA15-3 (korelační koeficient $r=0,711$, $p<0,01$).

Výsledky léčby

Na terapii odpovědělo 61 patientek (54,5%), u kterých byla zaznamenána parciální nebo kompletní remise onemocnění. Pouze u 13 patientek (11,6%) byla již při prvním restagingu zjištěna progresie choroby. Ve 32 případech (28,5%) došlo ke stabilizaci onemocnění a u 6 patientek (5,4%) nebylo možné odpověď na léčbu vyhodnotit. Léčba byla vcelku dobře tolerována. Nežádoucí účinky léčby vedly k jejímu ukončení pouze u 11 patientek (9,8%). Z tohoto počtu byla příčinou ukončení kardiotoxicita trastuzumabu v 7 případech (6,2%), ve zbývajících 4 případech byly příčiny různé a mohly být, nebo přímo byly, zapříčiněny cytostatikem aplikovaným společně s trastuzumabem (dušnost, exantém, infekční komplikace).

Do 8.1.2008 byla zaznamenána progresie u celkem 97 patientek (86,6%) a v důsledku progresie choroby zemřelo 78 patientek (69,6%). Jedna pacientka zemřela na atypickou pneumonii v době leukopenie. Medián času do progresie onemocnění byl 284 dnů (9,3 měsíce), rozmezí 29 až 1543 dnů. Medián a průměr celkového přežití patientek od doby zahájení léčby trastuzumabem do doby úmrtí na progresi onemocnění byl 612 dnů (20 měsíců), rozmezí 40 až 2079 dnů. Metastatické postižení CNS bylo v průběhu terapie trastuzumabem zaznamenáno nově u 31 patientek (27,7%). Ve 22 případech bylo metastatické postižení CNS součástí první progresie onemocnění při léčbě trastuzumabem, u zbývajících 9 patientek bylo zjištěno až při druhé progresi onemocnění, přičemž první progresie byla extrakraniální a v léčbě trastuzumabem bylo pokračováno.

Prediktivní a prognostický význam studovaných ukazatelů

Základní klinické parametry a predikce odpovědi na léčbu trastuzumabem

Před hodnocením prediktivního významu sledovaných parametrů jsme pacientky rozdělili na skupinu „odpovídajících“, ve které dosáhly kompletní nebo parciální remise choroby (CR+PR), a skupinu „neodpovídajících“, jejichž onemocnění progredovalo nebo dosáhlo pouze stabilizace bez navození alespoň částečné remise (PD+SD).

Zjistili jsme statisticky významný vztah mezi odpovědí na

léčbu a následujícími klinickými parametry: 1. pořadím linie paliativní léčby, ve které byl použit trastuzumab; 2. poměrem signálu sondy pro Her-2/neu gen a centromerické sondy chromosomu 17. V prvním případě jsme zjistili, že nejvíce patientek odpovídajících na léčbu bylo při použití trastuzumabu již v první linii paliativní protinádorové léčby ($p<0,0001$) (viz obrázek č. 1). Ve druhém případě byla odpověď na léčbu pozitivně asociována s poměrem signálů sond HER-2/Ch17 $\geq 2,2$ ve srovnání se skupinou patientek, jejichž nádory měly uvedený poměr $< 2,2$ ($p=0,0065$). Zatímco u nemocných, odpovídajících na terapii nebyl Mezi skupinou nádorů s poměrem HER-2/Ch17 v rozmezí 2,2 - 6,9 a skupinou s poměrem ≥ 7 nebyl patrný statisticky významný rozdíl v odpovědi na léčbu. U dalších studovaných parametrů (např. druh použitého cytostatika, grade tumoru, exprese ER a/nebo PR receptorů, počet a místa vzdálených metastatických lokalit) jsme asociace s odpovědí na léčbu neprokázali. S ohledem na nízký počet patientek léčených trastuzumabem v monoterapii, jsme neanalyzovali vztah této skutečnosti a léčebné odpovědi.

Hladiny nádorových markerů ve vztahu ke klinické odpovědi

Koncentrace testovaných sérových nádorových markerů (S-HER-2 ECD, CEA, CA15-3) hodnocené před zahájením terapie byly korelovány s odpovědí na terapii. Ani u jednoho z analyzovaných markerů nebyla prokázána signifikantní diference mezi předterapeutickou koncentrací ve skupině respondérů a non-respondérů. Rovněž nebyl sledován žádný rozdíl v odpovědi na terapii mezi skupinou patientek, u kterých byla iniciačně zjištěna elevace kteréhokoliv z nádorových markerů nad příslušnou diskriminační mez positivity, tzv. cut-off, ve srovnání se skupinami patientek, u kterých hladiny jednotlivých markerů tuto mez nepřevyšovaly. Pro ilustraci uvádíme stav S-HER-2 ECD. Ve skupině respondérů i non-respondérů se procento případů, kdy se iniciační hladina S-HER-2 ECD pohybovala nad cut-off hodnotou (15 µg/l) nelišilo (73 versus 71 %).

Vztah studovaných ukazatelů k parametrům přežití

Z parametrů přežití jsme vyhodnocovali čas do progresie onemocnění (TTP) a dobu celkového přežití (OS). V obou případech (TTP i OS) byl počátečním datem den zahájení léčby trastuzumabem.

Klinické ukazatele

Ze sledovaných klinických ukazatelů jsme ve vztahu k parametrům přežití prokázali dvě závislosti: 1. pacientky s metastatickým postižením omezeným na 1 orgánovou soustavu měly delší TTP (366 vs 245 dnů, $p<0,001$) i OS (1066 vs 508 dnů, $p<0,001$) než pacientky s postižením více orgánových soustav; 2. pacientky léčené trastuzumabem v monoterapii měly kratší TTP než pacientky, kterým byl trastuzumab aplikován společně s cytostatiky (117 vs 288 dnů, $p=0,0001$). Neprokázali jsme signifikantní rozdíl v časech do progresie choroby v závislosti na jednotlivých cytostaticích. V případech studovaných vlastností primárních tumorů jsme prokázali rozdíl v TTP mezi pacientkami s karcinomy s nadměrnou expresí HER-2 hod-

nocenou stupněm 3+ a stupněm $\leq 2+$, a to ve prospěch vyšší míry exprese (310 vs 197 dnů, $p=0,009$). Výsledek poměru mezi počtem detekovaných kopií Her-2/neu genu a centromer chromosomu 17 neměl vliv na TTP ani OS. Stav exprese ER a PR neovlivnil TTP. Pouze v případě ER bylo prokázáno delší celkové přežití pacientek s karcinomy s pozitivní expresí ER (medián OS 1071 vs 533 dnů, $p=0,047$). Žádné další závislosti jsme mezi sledovanými charakteristikami tumoru a parametry přežití neprokázali. Podrobně jsou výše uvedené údaje shrnuty v tabulce č. 2.

Dynamika změn hladin nádorových markerů ve vztahu k progresi

Zajímalo nás, který ze stanovovaných sérových nádorových markerů nejlépe predikuje progresi onemocnění. Za pozitivní predikci jsme považovali situaci, kdy alespoň ve dvou po sobě jdoucích odběrech séra, ve kterém byly stanoveny všechny tři sledované markery, byl zachycen vzestup koncentrace příslušného nádorového markeru, přičemž minimálně v jednom z měření musela koncentrace markeru překročit diskriminační limit jeho positivity, tzv. cut-off (CEA 4,6 $\mu\text{g/l}$; CA15-3 30 kU/l; S-HER-2 ECD 15 $\mu\text{g/l}$). Z analýzy vyplynulo, že elevace S-HER-2 ECD nad hodnotu „cut-off“ byla nejčastěji detekovatelným „pozitivním“ markerem v době zjištění progresu (CEA 36,8% pacientek, CA15-3 44,1%, S-HER-2 ECD 55,9%) a tento marker svým vzestupem rovněž nejčastěji predikoval progresi choroby.

V analýze přežití jsme dále hodnotili vztah mezi sérovou koncentrací příslušného nádorového markeru v době bezprostředně před zahájením léčby a v době mezi 90. až 130. dnem od zahájení léčby k času do progresu onemocnění (TTP). Podrobně jsou výsledky uvedeny v tabulce č. 3. V případě koncentrací markerů před zahájením léčby trastuzumabem měla informace o tom, zda je nádorový marker pozitivní (tedy elevován nad cut-off) nebo negativní, prediktivní význam pouze v případě markeru CEA. Pacientky s iniciální sérovou koncentrací CEA elevovanou nad cut-off měly kratší čas do progresu choroby ve srovnání s pacientkami s CEA pod tuto mez (TTP: 231 dnů vs 385 dnů; $p = 0,025$) (viz obrázek č. 3). Pokud jsme však místo hodnoty cut-off u daného markeru použili medián jeho naměřených koncentrací v celém souboru v době před zahájením léčby, byla nejlepším prediktorem sérová hladina S-HER-2 ECD. Pacientky s iniciální koncentrací S-HER-2 ECD rovnající se nebo převyšující medián 25,2 $\mu\text{g/l}$, měly kratší čas do progresu ve srovnání s pacientkami s iniciální hladinou S-HER-2 ECD pod uvedenou mez (TTP: 251 dnů vs 366 dnů; $p = 0,0044$) (viz obrázek č. 4). V případě CEA jsme rovněž prokázali vztah mezi hladinou markeru rovnající se nebo převyšující medián měřených hodnot (medián CEA 4,2 $\mu\text{g/l}$) a kratším časem do progresu onemocnění (TTP: 256 dnů vs 366 dnů, $p = 0,032$), Coxova regresní analýza nicméně potvrdila, že nejsilnějším prediktorem kratšího TTP bylo dosažení nebo překročení hodnoty mediánu u markeru S-HER-2 ECD ($p=0,02$), viz tabulka č. 4. K zajímavým výsledkům jsme dospěli rovněž v případě srovnávání TTP v závislosti na vývoji hladin nádorových markerů stanovených mezi 90. a 130. dnem od zahájení léčby trastuzumabem. U všech tří

sledovaných markerů predikovala jejich pozitivita (elevace nad hodnotu cut-off) mezi 90. a 130. dnem kratší čas do progresu onemocnění (viz tabulka č. 4). Pacientky s koncentrací S-HER-2 ECD převyšující v této době hodnotu cut-off (15,0 $\mu\text{g/l}$) měly kratší čas do progresu ve srovnání s pacientkami s hladinou S-HER-2 ECD pod uvedenou mez (TTP: 201 dnů vs 366 dnů; $p = 0,0003$) (viz obrázek č. 5). U CEA (viz obrázek č. 6) a CA15-3 byly výsledky podobné (CEA, TTP: 154 vs 381 dnů, $p=0,0005$; CA15-3, TTP: 209 vs 350 dnů, $p=0,017$). V případě stavu nádorových markerů v době mezi 90. a 130. dnem léčby Coxova regresní analýza prokázala, že nejsilnějším prediktorem špatné prognózy (tj. kratšího TTP) je nádorový marker CEA ($p=0,012$) a S-HER-2 ECD ($p=0,032$) (viz tabulka č. 4).

Vztah monitorovaných markerů k době celkového přežití pacientek od zahájení léčby trastuzumabem

Z hlediska prognózy celkového přežití (OS) jsme opět testovali jak vztah k iniciálním hodnotám monitorovaných nádorových markerů, tak vztah ke stavu markerů v době mezi 90. až 130. dnem léčby trastuzumabem. V případě předterapeutických hodnot jsme prokázali největší prognostický význam u nádorového markeru CEA. Pacientky, které měly iniciální sérové koncentrace CEA nad diskriminační mez positivity markeru (4,6 $\mu\text{g/l}$), měly kratší OS ve srovnání s pacientkami s koncentrací pod uvedenou hodnotu (OS 518 vs 1486 dnů, $p=0,004$) (viz obrázek č. 7). U zbývajících dvou markerů (S-HER-2 ECD a CA15-3) podobná závislost prokázána nebyla, i když výsledek analýzy byl u S-HER-2 ECD signifikantně hraniční (OS 593 vs 1544 dnů, $p=0,06$). Pokud byl místo hodnoty cut-off u daného markeru opět použit medián všech jeho měřených vstupních koncentrací, nabyl kromě CEA prognostického významu i S-HER-2 ECD. Pacientky se vstupní koncentrací S-HER-2 ECD rovnající se nebo převyšující medián 25,2 $\mu\text{g/l}$ měly kratší čas celkového přežití od zahájení léčby trastuzumabem ve srovnání s pacientkami s iniciální hladinou S-HER-2 ECD pod uvedenou mez (OS: 593 vs 1071 dnů; $p = 0,019$). Silnější prognostický význam byl u mediánu hodnoty CEA (OS: 543 vs 1486 dnů, $p=0,009$). Naopak při analýze vztahu mezi délkou OS a stavem nádorových markerů mezi 90. až 130. dnem od zahájení léčby trastuzumabem, byla nejlepším prognostickým ukazatelem sérová koncentrace S-HER-2 ECD. Pacientky s koncentrací S-HER-2 ECD převyšující v této době hladinu cut-off (15 $\mu\text{g/l}$), měly výrazně kratší celkové přežití než pacientky, u kterých ve stejném období byla koncentrace S-HER-2 ECD pod uvedenou mez (OS 363 dnů vs 1071 dnů, $p<0,0001$) (viz obrázek č. 8). Tento výsledek neovlivnila ani skutečnost, zda léčba trastuzumabem probíhala v rámci první nebo další linie paliativní systémové protinádorové léčby. V případě stavu markeru CEA v době mezi 90. a 130. dnem léčby byl jeho prognostický význam slabší (OS 476 vs 710 dnů, $p=0,029$). Podrobně jsou výsledky shrnuty v tabulce č. 3. Coxova regresní analýza nicméně potvrdila, že nejsilnějším prediktorem délky celkového přežití byl stav nádorového markeru S-HER-2 ECD v době mezi 90. až 130. dnem léčby ($p=0,001$) (viz tabulka č. 4).

Diskuze

Karcinom prsu v současnosti představuje skupinu jednotlivých podtypů, charakterizovaných molekulárně, histologicky a svým biologickým chováním.

Molekulární klasifikace nádorů nabývá na významu, neboť se nacházíme v době, kdy jsme schopni „cíleně“ vytvářet „cílené“ protinádorové látky. Her-2 pozitivní karcinomy prsu vynikají možností použít cílenou léčbu, kterou je zejména monoklonální protilátka proti HER-2 receptoru, trastuzumab, a nově i nízkomolekulární inhibitor kinasové aktivity receptorů Her-2 a EGFR, lapatinib. Klinické použití trastuzumabu přineslo zvýšení efektivity léčby tohoto onemocnění, ale i nové otázky týkající se primární a sekundární rezistence nádoru k trastuzumabu (13). Předkládaná práce vychází ze souboru 112 pacientek s metastatickým karcinomem prsu léčených trastuzumabem, u kterého je nutné z důvodu další diskuse zdůraznit některé jeho základní charakteristiky: 1. u naprosté většiny pacientek (95%) byl trastuzumab aplikován společně s cytostatiky, přičemž nejčastěji se jednalo o kombinaci s taxany (83% pacientek); 2. trastuzumab mohl být podáván v kterékoliv linii protinádorové léčby, první a druhá linie nakonec představovaly 88,4% aplikací; 3. naprostá většina tumorů (106/95%) měla prokázanou buď nadměrnou expresi HER-2 receptoru (IHC 3+) nebo jednoznačnou či hraniční amplifikaci Her-2/neu genu (podrobně viz kapitola „výsledky - charakteristika tumorů“). V našem souboru nastala celková objektivní odpověď na léčbu (CR+PR) u 54,5% pacientek, medián času do progresu onemocnění (TTP) byl 284 dnů (9,3 měsíce), rozmezí 29 až 1543 dnů, a medián celkového přežití (OS) byl 612 dnů (20 měsíců), rozmezí 40 až 2079 dnů. Chceme-li objektivně srovnávat naše vlastní a dosud publikované výsledky a vycházíme-li z předpokladů, že výsledky mohou být ovlivněny pořadím linie protinádorové léčby s trastuzumabem a mírou nádorové exprese HER-2 receptoru, musíme na prvním místě citovat práce, jejichž soubory zahrnovaly pacientky s nádorovou expresí HER-2 receptoru hodnocenou při imunohistochemickém vyšetření stupněm 2+ nebo 3+, léčené trastuzumabem v kombinaci s chemoterapií v první či další linii. Za těchto okolností se celkové odpovědi na léčbu (RR) pohybovaly mezi 50 a 63% /Seidman 61% (14), Christodoulo 62% (15), Tedesco 50% (16), Esteva 63% (17)/, mediány časů do progresu onemocnění byly mezi 7 a 12 měsíci (m) /Seidman 7m (14), Christodoulo 11m (15), Tedesco 12,4m (16), Esteva 9m (17)/ a medián celkového přežití byl známý pouze u jedné z uvedených studií, a to Tedesco a kol. 22,1 měsíců (16). Pro ucelený pohled na dosažené výsledky je vhodné uvést i práce, ve kterých léčba trastuzumabem a chemoterapií probíhala pouze v první linii paliativní protinádorové léčby a stupeň nádorové exprese byl opět 2+ nebo 3+ /Slamon a kol.: RR 41%, TTP 6,9m, OS 22,1m (18); Gasparini a kol.: RR 75%, TTP 9,9m, OS nestanoveno (19); Sato a kol.: RR 65%, TTP 6,8m, OS nestanoveno (20); Chan a kol.: RR 63%, TTP 9,9m, OS 23,7m (21)/ nebo práce, které zařazovaly pouze pacientky s HER-2 3+ pozitivními tumory, léčené trastuzumabem a chemoterapií v první linii protinádorové léčby /Kagawa a kol.: RR 50%, TTP 10,8m, OS 21,8m (22); Marty a kol.: RR 61%, TTP 11,7m, OS 31,2m (23); Burstein a kol.: RR

68%, TTP 5,6m, OS nestanoveno (24)/. Všechny citované studie byly založeny na aplikaci trastuzumabu s taxany, kromě studií od Chan a kol. (21) a Burstein a kol. (24), ve kterých byl s trastuzumabem podáván vinorelbin. Citované práce dokazují, že jsme dosáhli srovnatelných výsledků jak v odpovědi na léčbu, tak v parametrech přežití.

Léčba trastuzumabem byla vcelku dobře tolerována, nežádoucí účinky vedly k jejímu předčasnému ukončení pouze u 11 pacientek (9,8%), přičemž kardiotoxicita se na dané skutečnosti podílela v 7 případech (6,2%). Metastatické postižení CNS bylo v průběhu terapie trastuzumabem zaznamenáno ve 27,7% případů. V případě výskytu kardiotoxicity a mozkových metastáz, které mají negativní dopad na další léčbu a v důsledku toho i na vývoj onemocnění, jsme rovněž v souladu s již publikovanými daty. Ke vzniku kardiotoxicity, v důsledku které je nutné ukončit léčbu trastuzumabem, dochází u 4% až 15% pacientek, dysfunkce levé srdeční komory vedoucí k závažnému srdečnímu selhání je popisována až u 4% pacientek (25,26). Přestože se tedy nejčastěji jedná o asymptomatickou a/ nebo reverzibilní kardiotoxicitu, kardiotoxický potenciál trastuzumabu dosud vylučuje jeho běžné klinické použití v kombinaci s neúčinnějšími cytostatiky – antracykliny. Metastatické postižení CNS je důsledkem agresivity HER-2 pozitivního karcinomu prsu a jeho relativní nárůst a vysoká incidence (25 až 40%) v současnosti vyniká zejména na pozadí schopnosti trastuzumabu účinně kontrolovat nádorové onemocnění extrakraniálně, neboť v důsledku hematoencefalické bariéry je jeho prostupnost do CNS značně omezená. Prvotní hypotéza, že trastuzumab potencuje výskyt metastatického postižení CNS je nepravděpodobná. To dokazují jak recentní práce zahraničních autorů, tak naše vlastní (27,28).

V naší práci jsme identifikovali několik prediktivních a prognostických faktorů odpovědi na protinádorovou terapii s trastuzumabem. V první řadě jsme potvrdili skutečnost, že nejvíce odpovědi na léčbu nastalo při použití trastuzumabu již v první linii paliativní protinádorové léčby ($p < 0,0001$), a dále že odpověď na léčbu byla pozitivně asociována s poměrem signálů sond HER-2/Ch17 $\geq 2,2$ ve srovnání se skupinou pacientek, jejichž nádory měly uvedený poměr $< 2,2$ ($p = 0,0092$). Negativní asociace mezi odpovědí nádoru na léčbu a stupněm jeho předlěčenosti je známá a bezesporu souvisí s indukci sekundární chemorezistence, jejíž molekulární mechanismy trastuzumab částečně sdílí s klasickými cytostatiky. Logickým důsledkem těchto předpokladů bylo zavedení trastuzumabu do adjuvantní léčby HER-2 pozitivního karcinomu prsu a v případě metastatického onemocnění je to snaha o zahájení paliativní léčby trastuzumabem co nejdříve. Poměr signálů sond HER-2/Ch17 $\geq 2,2$ je v současnosti diskriminační mezi pro prokázání jednoznačné HER-2 positivity karcinomu při použití metody FISH. V prvních letech podávání trastuzumabu, kdy toto kritérium nebylo stanoveno, byla praxe jiná a k zahájení léčby docházelo i u pacientek s nižší hodnotou uvedeného indexu (2-2,2), případně byla indikace k léčbě postavena pouze na základě imunohistochemického vyšetření (IHC) nádorové exprese HER-2 receptoru. Přestože v referenčních laboratořích jsou výsledky mezi IHC a FISH vyšetřením ve významné shodě,

chybovost spádových laboratoří o dva nebo více stupně IHC ve srovnání s referenční laboratoří jsou významné a například v České republice se pohybuje kolem 22%. A právě z těchto důvodů považujeme vyšetření amplifikace Her-2/neu genu metodou FISH před zahájením léčby trastuzumabem za nezbytné. U tumorů s indexem HER-2/Ch17 $\geq 2,2$ jsme neprokázali žádný další vztah mezi pozitivní odpovědí na léčbu, TTP, OS a hodnotou indexu HER-2/Ch17. Co do počtu pacientek, které neodpověděly na léčbu, bylo jejich zastoupení nejnižší ve skupině nádorů s poměrem HER-2/Ch17 ≥ 7 .

Velmi zajímavé výsledky jsme získali z analýzy sérových koncentrací nádorových markerů CEA, CA15-3 a S-HER-2 ECD. S-HER-2 ECD byl nejčastějším pozitivním (koncentrace přesahující hodnotu cut-off) nádorovým markerem jak před zahájením léčby (72,5% pacientek), tak i při progresi onemocnění léčeného trastuzumabem (55,9% pacientek). Vysokou prevalenci zvýšených hodnot S-HER-2 ECD u metastatického HER-2 pozitivního karcinomu prsu prokázaly i další studie (29). Ani jeden z nádorových markerů nedokázal predikovat stupeň odpovědi onemocnění na léčbu (CR,PR,SD,PD). Přitom existují práce dokazující pozitivní vztah mezi iniciálně zvýšenou hladinou S-HER-2 ECD a dobrou odpovědí na trastuzumab (30,31), stejně tak i negativní závislost, kdy při vysokých koncentracích ($> 500 \mu\text{g/l}$) může docházet k interferenci mezi odštěpenou solubilní částí HER-2 receptoru a trastuzumabem (32). Naopak jsme prokázali řadu závislostí mezi koncentrací a dynamikou markerů a časem do progresu onemocnění nebo dobou celkového přežití. V případě TTP byl Cox regresní analýzou prokázán nejsilnější prognostický význam předterapeutických hodnot S-HER-2 ECD, kdy dosažení nebo překročení hodnoty $25,2 \mu\text{g/l}$ bylo spojeno se signifikantně kratším TTP. Druhým markerem použitelným pro stanovení prognózy progresu onemocnění již před zahájením léčby byl CEA a mezní hodnotou v tomto případě byla hodnota cut-off $4,6 \mu\text{g/l}$. Další významné upřesnění prognózy progresu onemocnění je možné na základě stavu markerů v době mezi 90. a 130. dnem léčby. Nejsilnějším negativním prediktorem bylo překročení cut-off hodnoty u markerů CEA a S-HER-2 ECD. Nejvýznamnějším markerem v predikci celkového přežití použitelným před zahájením léčby trastuzumabem byl CEA s mezní hodnotou cut-off $4,6 \mu\text{g/l}$. Prognóza přežití mohla být opět významně upřesněna na základě stavu positivity markeru S-HER-2 ECD ($15 \mu\text{g/l}$) v době mezi 90. a 130. dnem léčby. Naše výsledky potvrdily, že iniciálně zvýšená hladina markeru CEA a S-HER-2 ECD je u karcinomu prsu obecně negativním prognostickým ukazatelem (33). V případě

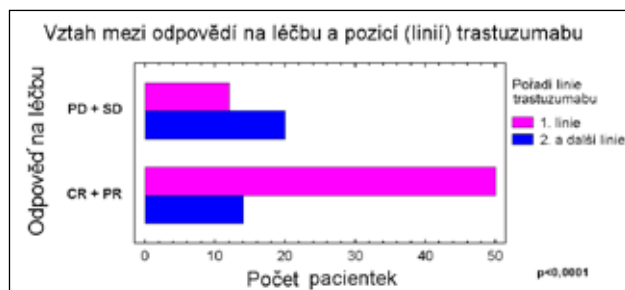
S-HER-ECD a cílené léčby trastuzumabem byly dosud publikované výsledky nejednoznačné a/nebo získané na velmi malém souboru pacientek. V roce 2000 jako první upozornili na vztah mezi dynamikou S-HER-2 ECD a vývojem onemocnění Schwartz a kol. (34), nicméně jejich soubor byl co do počtu pacientek léčených trastuzumabem velmi omezený, podobně jako soubor publikovaný Esteve a kol. v roce 2002 (30 pacientek) (35) nebo výsledky naší pilotní práce publikované Šimíčkovou a kol v roce 2005 (28 pacientek) (36). Z uvedených i dalších prací bylo zřejmé, že pokles koncentrace S-HER-2 ECD po zahájení léčby trastuzumabem je příznivým prognostickým faktorem. Nebylo však jednoznačné, jak velký pokles za určité časové rozmezí je klinicky významný, kolik takových pozorování je potřebných ani v jakém časovém intervalu od zahájení léčby trastuzumabem mají být odběry ke stanovení markerů realizovány. Právě tyto otázky zodpovídá naše práce. Doporučujeme stanovit iniciální sérovou koncentraci S-HER-2 ECD v době maximálně 30 dnů před zahájením aplikace trastuzumabu, druhé stanovení provést po 3 měsících léčby (mezi 90. až 130. dnem) a následně jednou za 2 až 3 měsíce. Další zajímavé údaje pro hodnocení výsledků a nákladové efektivity léčby trastuzumabem v ČR očekáváme od klinického registru Herceptin, který v současnosti probíhá v rámci Národního Onkologického Programu České republiky (37).

Závěr

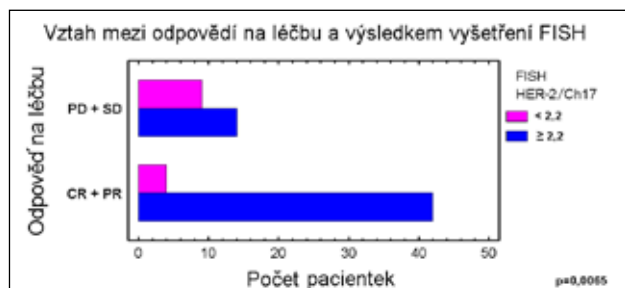
Naše vlastní praxe s trastuzumabem potvrdila výsledky publikované zahraničními autory. Z těchto zkušeností vyplývá, že léčba trastuzumabem by měla být použita v kombinaci s chemoterapií a pokud možno již v první linii paliativní protinádorové léčby, kde dosahuje nejlepších výsledků. Dosud jediným prediktivním markerem, který je zároveň absolutním indikačním kritériem, je průkaz jednoznačné HER-2 positivity tumoru, pokud možno metodou FISH. Stanovení sérové koncentrace S-HER-2 ECD před zahájením léčby a monitorace dynamiky tohoto markeru v průběhu léčby trastuzumabem je nejvýznamnějším prognostickým ukazatelem vývoje onemocnění (TTP i OS), a může tak přispět k časnému odhalení progresu onemocnění a k individualizaci časového plánu kontrolních vyšetření.

Poděkování

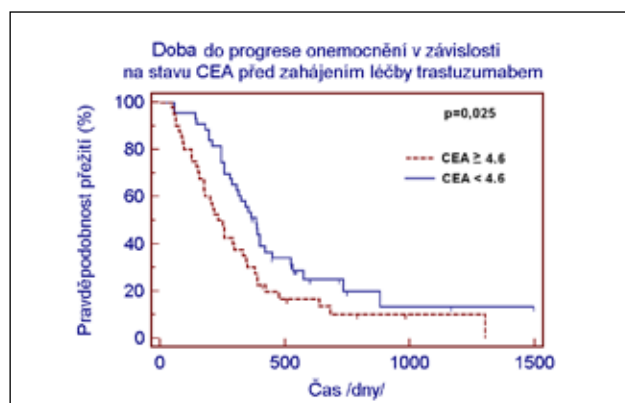
Za velmi cenné připomínky k rukopisu děkujeme MUDr. Kateřině Bouchalové, Ph.D. z Laboratoře experimentální medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Práce byla podpořena grantovým projektem IGA MZČR NR/8335-3.



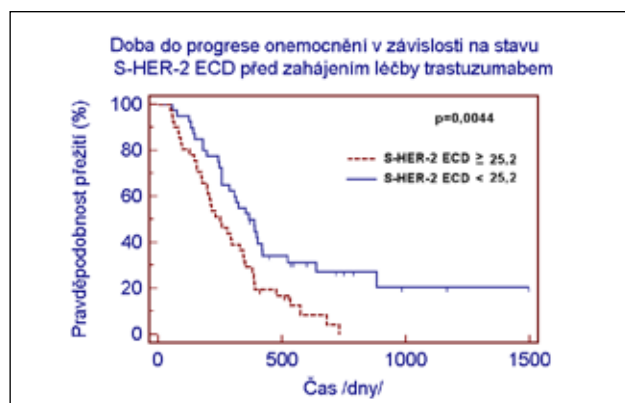
Obrázek č. 1.: Vztah mezi odpovědí na léčbu trastuzumabem a pořadím linie léčby, ve které byl trastuzumab podáván.



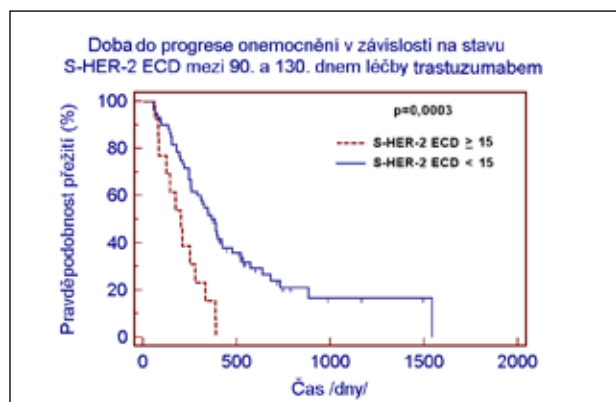
Obrázek č. 2.: Vztah mezi odpovědí na léčbu trastuzumabem a výsledkem vyšetření amplifikace genu Her-2/neu metodou FISH, vyjádřeného poměrem počtu signálů sondy Her-2/neu a počtu signálů sondy pro chromosom 17.



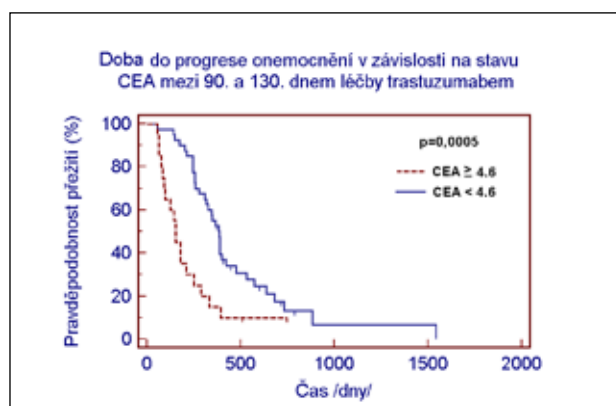
Obrázek č. 3.: Kaplan-Meierovy křivky přežití – doba do progresse onemocnění /TTP/ v závislosti na stavu CEA před zahájením léčby trastuzumabem. Hodnoty CEA jsou uvedeny v µg/l.



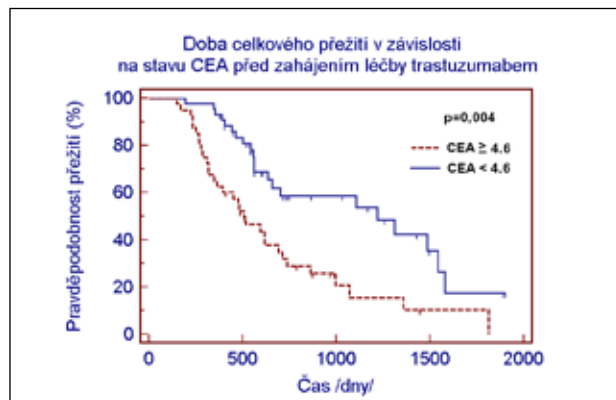
Obrázek č. 4.: Kaplan-Meierovy křivky přežití – doba do progresse onemocnění /TTP/ v závislosti na stavu S-HER-2 ECD před zahájením léčby trastuzumabem. Hodnoty S-HER-2 ECD jsou uvedeny v µg/l.



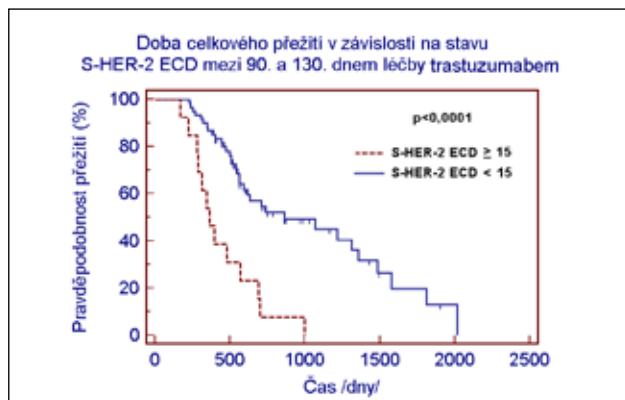
Obrázek č. 5.: Kaplan-Meierovy křivky přežití – doba do progresse onemocnění /TTP/ v závislosti na stavu S-HER-2 ECD v době mezi 90. a 130. dnem léčby trastuzumabem. Hodnoty S-HER-2 ECD jsou uvedeny v µg/l.



Obrázek č. 6.: Kaplan-Meierovy křivky přežití – doba do progresse onemocnění /TTP/ v závislosti na stavu CEA v době mezi 90. a 130. dnem léčby trastuzumabem. Hodnoty CEA jsou uvedeny v µg/l.



Obrázek č. 7.: Kaplan-Meierovy křivky přežití – doba celkového přežití /OS/ v závislosti na stavu CEA před zahájením léčby trastuzumabem. Hodnoty CEA jsou uvedeny v µg/l.



Obrázek č. 8.: Kaplan-Meierovy křivky přežití – doba celkového přežití /OS/ v závislosti na stavu S-HER-2 ECD v době mezi 90. a 130. dnem léčby trastuzumabem. Hodnoty S-HER-2 ECD jsou uvedeny v µg/l.

CHARAKTERISTIKA SOUBORU PACIENTEK S METASTATICKÝM KARCINOMEM PRSU LÉČENÝCH TRASTUZUMABEM											
112 (zařazený od 10.4.2000 do 31.1.2007)											
Cukový počet pacientek:											
Parametry	Počet pacientek		%	Parametry		Počet pacientek	%	Parametry		Počet pacientek	%
	Medián	54 let		Histologický typ	duktální			93	83		
Věk v době zahájení léčby	Rozezní	28-77 let		lobulární smíšený	9	8		2	39	34,9	
	0	37,5		jiny	6	5,4		3	14	12,5	
	1	51	45,5					□ 4	9	8	
	2	11	10					skelet	58	51,8	
Performance status	NS	8	7	G1	2	1,8		játra	51	45,4	
	1. linie	65	58	G2	22	19,6	Místa metastatického postižení v době zahájení léčby	plice	40	35,7	
	2. linie	34	30,4	NS	59	52,7		vzdálené uzliny	36	32,1	
	□ 3 linie	13	11,6	negativní pozitivní	63 43	56,3 38,3		CNS	11	10	
Pozice trastuzumabu v paliativní léčbě (linie)	Paklitaxel	57	51	NS	6	5,4		ostatní	23	20,5	
	Docetaxel	30	26,8	negativní	71	63,4	Metastatické postižení CNS v době léčby	celkem	33	29,5	
	Navelbin	13	11,6	pozitivní	28	25	trastuzumabem	nové	31	27,7	
	Paklitaxel/ CBDCA	6	5,3	Progesteronový receptor	NS	13	11,6	při první progresi	22	19,6	
Trastuzumab a cytostatika	Monoterapie	6	5,3		85	75,9	IHC HER-2 3+ nebo FISH prokazaná amplifikace	IHC HER-2 3+ nebo FISH prokazaná amplifikace	106*	95*	
	CR + PR	61	54,5	IHC HER-2 3+	5	4,5					
	SD	32	28,5	IHC HER-2 pozit.	7	6,2					
	PD	13	11,6	IHC HER-2 2+	6	5,4					
Odpověď na léčbu	NS	6	5,4	IHC HER-2 1+	9	8					
				IHC HER-2 NS							

Vysvětlivky:

NS – nebylo stanoveno, pozit. – pozitivní, bez určení stupně,

* U části tumorů byl metodou FISH zjištěn přechodný vztah k HER-2 statusu (podrobný komentář viz text, kapitola „Výsledky – charakteristika tumorů“), CBDCA – karboplatina.

Tabulka č. 1.: Základní charakteristika souboru.

VZTAH MEZI PARAMETRY PŘEŽÍTÍ A VYBRANÝMI CHARAKTERISTIKAMI SOUBORU					
Parametr	TTP (dny)	P/HR	OS (dny)	P/HR	
Performance status	0	304	617	NS	
	1	357	531		
Počet metastatických míst	1	366	1066	p<0,001	
	2	245	508	HR 0,48	p<0,001
Orgánové postižení	játra a/nebo plic	346	558	NS	
	pouze skelet	308	1417		
IHC HER-2	3+	310	635	p=0,009	
	2+	197	561	HR 2,15	NS
	< 2,2	274	543		
FISH HER-2/Ch17	2,2 – 6,9	366	702	NS	
	6,9	291	561		
	< 2,2	274	543	NS	
FISH HER-2/Ch17	2,2	315	635	NS	
IHC ER	pozitivní	287	1071	p=0,047	
	negativní	293	533	HR 1,6	
IHC PR	pozitivní	274	635	NS	
	negativní	291	561		
Pozice trastuzumabu v léčbě	1. linie	308	612	NS	
	2. linie	287	617		
	v monoterapii**	117	428		
	s paklitaxelem	310	617		
	s docetaxelem	297	635		
	s NVLB	209	510	NS	
	s paklitaxelem a CBDCA	334	533		

Tabulka č. 2.: Vztah mezi parametry přežití a vybranými charakteristikami souboru.

VZTAH MEZI PARAMETRY PŘEŽÍTÍ A KONCENTRACÍ SÉROVÝCH MARKERŮ					
Marker	Diskriminační mez	pp	TTP (dny)	P/HR	OS (dny)
S-HER-2 ECD před léčbou	< cut-off 15	21	324	NS	1544
	cut-off 15	60	293		593
	medián 25,2	40	366	p=0,0044	1071
	medián 25,2	41	251	HR 0,51	593
S-HER-2 ECD 90.-130. den léčby	< cut-off 15	60	366	p=0,0003	1071
	cut-off 15	13	201	HR 0,35	363
	cut-off 4,6	43	385	p=0,025	1486
CEA před léčbou	< cut-off 4,6	40	231	HR 0,59	518
	medián 4,2	39	366	p=0,032	1486
	medián 4,2	44	256	HR 0,60	543
CEA 90.-130. den léčby	< cut-off 4,6	40	381	p=0,0005	710
	cut-off 4,6	20	154	HR 0,38	476
	cut-off 30	33	315	NS	702
CA15-3 před léčbou	< cut-off 30	51	308	NS	692
	medián 39,4	42	315		996
	medián 39,4	42	293		593
CA15-3 90.-130. den léčby	< cut-off 30	45	350	p=0,017	702
	cut-off 30	15	209	HR 0,50	501

Tabulka č. 3.: Vztah mezi parametry přežití a koncentrací sérových markerů.

MULTIVARIACNÍ ANALÝZA Coxův regresní model proporcionálních rizik (multivariate Cox model of hazard ratio)					
Marker	Diskriminační mez	b	SE	P	Exp(b)
Doba do progresce choroby (TTP)					
S-HER-2 start	medián	0,6191	0,2662	0,02002	1,8572
CEA start	medián	0,4129	0,2619	0,1150	1,5112
S-HER-2 D90-130	cut-off	0,7734	0,3618	0,03253	2,1672
CEA D90-130	cut-off	0,7786	0,3110	0,01229	2,1784
CA15-3 D90-130	cut-off	0,6480	0,3196	0,04262	1,9117
Celkové přežití od zahájení léčby trastuzumabem (OS)					
S-HER-2 start	cut-off	0,4306	0,3667	0,2403	1,5381
CEA start	cut-off	0,8277	0,2976	0,0054	2,2881
S-HER-2 D90-130	cut-off	1,2323	0,3820	0,00125	3,429
CEA D90-130	cut-off	0,4663	0,3407	0,1711	1,5941
CA15-3 D90-130	cut-off	0,2276	0,3585	0,5251	1,2559

Tabulka č. 4.: Analýza optimálních prediktorů doby do progresce a celkového přežití pomocí multivariační analýzy.

Literatura

- Lacey JV, Devesa SS, Brinton LA. Recent trends in breast cancer incidence and mortality. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2002;39(2-3):82-88.
- Dušek L, Mužík J, Kubásek M, et al. Český národní webový portál epidemiologie nádorů [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2008-1-31]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987;235:177-82.
- Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer*, 2004; 5:63-69.
- Fabián P, Nenutil R, Petráková K. Incidence Her-2 amplifikace u mamárního karcinomu a její korelace s klinicko-patologickými parametry. Sestava 500 konsektivních mamárních karcinomů MOÚ. Abstrakt 098 in XXX. Brněnské onkologické dny a XX. Konference pro sestry a laboranty, Brno. 11.-13. květen 2006;153.
- Fendly BM, Winget M, Hudziak RM, et al. Characterization of Murine Monoclonal Antibodies Reactive to Either the Human Epidermal Growth Factor Receptor or Her2/neu Gene Product. *Cancer Research*, 1990;50:1550-1558.
- Barnes DM, Miles DW. Response of metastatic breast cancer to trastuzumab? *Lancet*, 2000;355(9199):160-1.
- Grell P, Svoboda M, Fabián P, et al. Klinické aspekty léčby karcinomu prsníka trastuzumabom. *Klinická onkologie*, 2008;5: v tisku.
- Grell P, Svoboda M, Fabián P, et al. Trastuzumab v léčbě karcinomu prsníka: mechanismy účinku a rezistence. *Klinická onkologie*, 2008;5: v tisku.
- Šimíčková M, Nekulová M. Nádorové markery. 1. vydání. *MedProGO*, 2004, 45 stran.
- Zabrecky JR, Lam T, McKenzie SJ, et al. The Extracellular Domain of p185/neu Is Released from the Surface of Human Breast Carcinoma Cells, SK-BR-3. *J Biol Chem*, 1991;266(3):1716-1720.
- Sugano K, Ushama M, Fukutomi T, et al. Combined Measurement of the c-erbB-2 Protein in Breast Carcinoma Tissues and Sera is Useful as a Sensitive Tumor Marker for Monitoring Tumor Relapse. *Int. J Cancer*, 2000;89:329-336.
- Svoboda M, Grell P, Fabián P, et al. Molekulární taxonomie a prediktivní systémy karcinomu prsu definované na základě profilů genové exprese. *Klinická onkologie*, 2006;19, Suppl. 2, s. 373-381.
- Seidman AD, Formier MN, Esteva FJ, et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. *J Clin Oncol*, 2001;19(10):2587-95.
- Christodoulou C, Klouvas G, Pateli A, et al. Prolonged administration of weekly paclitaxel and trastuzumab in patients with advanced breast cancer. *Anticancer Res*, 2003;23(1B):737-44.
- Tedesco KL, Thor AD, Johnson DH, et al. Docetaxel combined with trastuzumab is an active regimen in HER-2 3+ overexpressing and fluorescent in situ hybridization-positive metastatic breast cancer: a multi-institutional phase II trial. *J Clin Oncol*, 2004;22(6):1071-7.
- Esteva FJ, Valero V, Booser D, et al. Phase II study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, 2002;20(7):1800-8.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*, 2001;344:783-92.
- Gasparini G, Gion M, Mariani L, et al. Randomized Phase II Trial of weekly paclitaxel alone versus trastuzumab plus weekly paclitaxel as first-line therapy of patients with Her-2 positive advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2007;101(3):355-65.
- Sato N, Sano M, Tabei T, et al. Combination docetaxel and trastuzumab treatment for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer: a multicenter, phase-II study. *Breast Cancer*, 2006;13(2):166-71.
- Chan A, Martin M, Untch M, et al. Navelbine Herceptin Project. Vinorelbine plus trastuzumab combination as first-line therapy for HER 2-positive metastatic breast cancer patients: an international phase II trial. *Br J Cancer*, 2006;95(7):788-93.
- Kagawa N, Fukuda Y, Arai H, et al. Biweekly docetaxel and weekly trastuzumab treatment in HER 2-overexpressing metastatic breast cancer patients. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2006;33(8):1081-5.
- Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol*, 2005;23(19):4265-74.
- Burstein HJ, Harris LN, Marcom PK, et al. Trastuzumab and vinorelbine as first-line therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: multicenter phase II trial with clinical outcomes, analysis of serum tumor markers as predictive factors, and cardiac surveillance algorithm. *J Clin Oncol*, 2003;21(15):2889-95.
- Bird BR, Swain SM. Cardiac Toxicity in Breast Cancer Survivors: Review of Potential Cardiac Problems. *Clin Cancer Res* 2008;14(1):14-24.
- Telli ML, Hunt SA, Carlson RW, et al. Trastuzumab-Related Cardiotoxicity: Calling Into Question the Concept of Reversibility. *J Clin Oncol*, 2007;25(23):3525-3533.
- Linan NU, Winer EP. Brain Metastases: The HER2 Paradigm. *Clin Can Res*, 2007;13(6): 1648-1655.
- Svoboda M, Fabián P, Ondrová B, et al. Brain metastases in breast cancer: a retrospective cohort study of 187 patients and prognostic markers determination. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. Suppl, 253.
- Carney WP, Neumann R, Lipton A, et al. Potential Clinical Utility of Serum Her-2/neu Oncoprotein Concentrations in Patients with Breast Cancer. *Clin Chemistry*, 2003;49(10):1579-1598.
- Dnistrian AM, Schwartz MK, Schwartz DC, et al. Significance of serum Her-2/neu oncoprotein, CA 15-3, and CEA in the clinical evaluation of metastatic breast cancer. *J Clin Ligand Assay*, 2002;25:215-220.
- Esteva FJ, Cheli CD, Fritsche H, et al. Clinical utility of serum HER2/neu in monitoring and prediction of progression-free survival in metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab-based therapies. *Breast Can Res*, 2005;7(4):436-443.
- Pegram MD, Lipton A, Hayes DF, et al. Phase II Study of Receptor-Enhanced Chemosensitivity Using Recombinant Humanized Anti-p185Her-2/neu Monoclonal Antibody Plus Cisplatin in Patients With Her-2/neu-Overexpressing Metastatic Breast Cancer Refractory to Chemotherapy Treatment. *J Clin Oncol*, 1998;16(8):2659-2671.
- Vyzula R, Dusek L, Zaloudík J, et al. Breast cancer and neoadjuvant therapy: any predictive marker? *Neoplasma*, 2004;51(6):471-80.
- Schwartz MK, Smith C, Schwartz DC, et al. Monitoring therapy by serum Her-2/neu. *Int J Biol Markers*, 2000;15:324-329.
- Esteva FJ, Valero V, Booser D, et al. Phase II Study of Weekly Docetaxel and Trastuzumab for Patients With HER-2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol*, 2002;20(7):1800-1808.
- Šimíčková M, Petráková K, Pecan L, et al. Prediktivní význam sérového HER-2/neu u nemocných s karcinomem prsu léčených Herceptinem. *Klinická onkologie* 2005;18(1):23-26.
- Dušek L., Mužík J., Koptíková J., et al. Registrace dat tvoří nezbytnou informační základnu současné onkologie. *Klinická onkologie* 2007;20, Suppl:53-62.

Korespondenční adresa:
MUDr. Marek Svoboda PhD.
Klinika komplexní onkologické péče LF MU
Masarykův onkologický ústav v Brně
Žlutý kopec 7, 656 53 Brno
e-mail: msvoboda@mou.cz

Došlo / Submitted: 24. 7. 2008
Přijato / Accepted: 4. 9. 2008

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.