

# Profil aktivace receptorových tyrozinkináz a mitogenem aktivovaných proteinkináz v terapii Maffucciho syndromu

## Profile of Activation of Tyrosine Kinases and MAP Kinases in Therapy of Maffucci Syndrome

Melichárková K.<sup>1</sup>, Neradil J.<sup>2,3</sup>, Múdry P.<sup>1</sup>, Zitterbart K.<sup>1,3</sup>, Obermannová R.<sup>3,5</sup>, Skotáková J.<sup>4</sup>, Veselská R.<sup>1,2</sup>, Štěrbá J.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

<sup>2</sup> Laboratoř nádorové biologie, Ústav experimentální biologie, PřF MU, Brno

<sup>3</sup> Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>4</sup> Klinika dětské radiologie LF MU a FN Brno

<sup>5</sup> Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Maffucciho syndrom je vzácné kongenitální nehereditární onemocnění charakterizované přítomností mnohočetných hemangiomů a enchondromů s tendencí k malignímu zvratu. Kauzální terapie neexistuje a léčba je zaměřena na řešení komplikací. Stanovení vhodného postupu je komplikované a často je nutná multioborová spolupráce v péči o tyto pacienty. **Případ:** Autoři prezentují případ 20leté pacientky s Maffucciho syndromem. V průběhu života se u ní objevily mnohočetné enchondromy i progredující hemangiomy, které postupem času působily řadu komplikací jako např. omezení hybnosti, poruchy růstu, bolesti, fluidothorax nebo ascites. Byl vyšetřen profil fosforylace vybraných tyrozinových kináz a MAP kináz z progredujících ložisek hemangiomů, což vedlo ke změně léčebné strategie reflektující výsledky vyšetření. Personalizovaná léčba nasazená na základě profilu fosforylace kináz vedla ke klinicky významné léčebné odpovědi trvající šest měsíců.

### Klíčová slova

enchondromatóza – hemangiom – protein-tyrozinkinázy – MAP kinázový signální systém – individualizovaná medicína – Maffucciho syndrom

### Summary

**Background:** Maffucci syndrome is a rare congenital non-hereditary disease characterized by multiple hemangiomas and enchondromas, which may progress into malignancy. The causal therapy does not exist, and therapy is aimed at complications. The determination of appropriate therapy is complicated, and a multidisciplinary approach is often essential. **Case:** Authors are presenting the case of a 20-year-old patient with Maffucci syndrome. During her life, multiple enchondromas and progressing hemangiomas have been revealed and they have caused many complications, such as limited movement, growth failure, pain, fluidothorax and ascites. A profile of phosphorylation of selected tyrosine kinases and MAP kinases from progressing hemangioma was performed and with consideration of the result, it led to change of treatment strategy with encouraging clinical response lasting for six months.

### Key words

enchondromatosis – hemangioma – receptor protein-tyrosine kinases – MAP kinases signaling system – individualized medicine – Maffucci syndrome

Práce byla podpořena Evropským fondem pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky OP VaVpl – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101, projektem CEB, OPVK CZ.1.07/2.3.00/20.0183 a projektem MUNI/A/1552/2014.

This study was supported by the European Regional Development Fund and the State Budget of the Czech Republic – RECAMO, CZ.1.05/2.1.00/03.0101, by the project CEB, OPVK CZ.1.07/2.3.00/20.0183 and by the project MUNI/A/1552/2014.

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.



MUDr. Kristýna Melichárková

Klinika dětské onkologie

LF MU a FN Brno

Černopolní 9

613 00 Brno

e-mail:

kristyna.melicharkova@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 18. 4. 2015

Přijato/Accepted: 26. 6. 2015

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20152S47>

## Úvod

Maffucciho syndrom je vzácné kongenitální nehereditární onemocnění, které patří spolu s Ollierovou chorobou mezi enchondromatózy. Toto onemocnění je charakterizováno přítomností četných hemangiomů a enchondromů, které mají tendenci k malignímu zvratu až u 40 % pacientů [1]. Standardní léčebná doporučení, která by ovlivňovala přirozený průběh vzniku a progresu mnohočetných enchondromů a hemangiomů, nejsou k dispozici a doporučuje se jen symptomatická a podpůrná léčba [2,3].

## Případ

Dvacetiletá mladá žena byla sledována již od kojeneckého věku pro přítomnost mnohočetných enchondromů na končetinách, genua vara a poruchu kostního růstu s těžkou růstovou retardací. Její stav vyžadoval opakované korekční ortopedické výkony. Ve dvou letech věku

se u ní objevil myelodysplastický syndrom, který se následně rozvinul do RAEB (refractory anemia with excess blasts) s nutností terapie dle protokolu pro akutní myeloidní leukemii zahrnující i alogenní transplantaci kostní dřeně.

Ve věku šesti let se u ní začaly objevovat postupně progredující hemangiomy na rukou (obr. 1), proto bylo při podezření na Maffucciho syndrom provedeno celkové přešetření. Výsledky potvrdily přítomnost chondromu/enchondromu pravé sfenoidální kosti o velikosti 3,4 × 2,5 × 1,7 cm. V rámci základní nemoci docházelo k postupné progresi histologicky vřetenobuněčných hemangiomů na pažích a vzniku nových lézí na nohou i v parenchymových orgánech, proto bylo tři roky po transplantaci kostní dřeně doporučeno zahájit léčbu níže dávkovanou chemoterapií. Byla zvolena terapie vincristin 1,5 mg/m<sup>2</sup>/týden + cyklofosamid

300 mg/m<sup>2</sup>/à 3 týdny, avšak vzhledem ke špatné toleranci již vysoce předléčené pacientky bylo nutné tuto léčbu po šesti měsících přerušit.

Stav se postupně dále zhoršoval, objevilo se nové ložisko hemangiomu na játrech 4,8 × 3,8 cm a další ložiska na hrudníku a horních končetinách. Proběhl pokus o ovlivnění těchto ložisek kortikoterapií, a to metylprednisolonom 30 mg/kg/den D1, D3 a D5, 20 mg/kg/den D6 a v dávce 10 mg/kg/den D7 a dále navázáno prednisonem 4 mg/kg/den po 2 týdny [4]. Výsledkem této terapie byla v nejlepším případě smíšená odpověď. V průběhu léčby proběhly pokusy o ovlivnění ložisek zářením, laserem i chirurgickými korekcemi.

Od 18 let se pacientka potýkala s opakovaným chylózním fluidothoraxem a přítomností chylózní ascitické tekutiny v důsledku aktivity hemangiomů. Tento stav vyžadoval opakované punkce



Obr. 1. Fotografie levé ruky (zdroj: archiv KDO) a RTG snímek levé ruky (zdroj: archiv KDR).

ascitu, v průměru 2l ascitické tekutiny každé dva týdny. Byl nasazen bevacizumab 10 mg/kg/à 2 týdny, po osmi měsících terapie bylo dosaženo pouze stacionárního stavu s pokračující potřebou punkcí ascitu i fluidothoraxu. V této době byla změněna léčba na sirolimus 1 mg/den a paclitaxel 12,5 mg/m<sup>2</sup>/à 1 týden [5]. Tato terapie byla podávána šest měsíců s nutností redukce paclitaxelu na 50 % dávky pro hematologickou toxicitu. Výsledek byl pouze stacionární stav.

Nově byl vyšetřen profil fosforylace receptorových tyrozinkináz (RTK) a MAP kináz (mitogen-activated protein kinas) z ložiska na patě a dle těchto výsledků byla terapie upravena na sunitinib 12,5 mg/den a taxol 5,5 mg/týden. Mimo těchto léků měla dívka v dlouhodobé medikaci také  $\beta$ -blokátory z kardiologické indikace, u nichž některé práce poukazují na jejich anti-neoplastický potenciál [6]. Po nasazení této personalizované terapie došlo postupně k prodlužování intervalů pro evakuace ascitu či chylothoraxu, s periodou čtyř měsíců bez potřeby evakuace, což mělo významný dopad na kvalitu života pacientky. Po čtyřech měsících od poslední evakuace ascitu se i přes nasazenou léčbu obnovila potřeba evakuace chylothoraxu s potřebou opakovaných chirurgických intervencí a tedy i s přerušování, až vysazením antineoplastické medikace na dobu téměř tří měsíců. V průběhu významně redukované či vysazené antineoplastické léčby progredovala potřeba chirurgické derivace chylu charakteru jahodového mléka. Pacientka zemřela náhlou smrtí na akutní krvácení do dutiny břišní v důsledku spontánní ruptury jaterního hemangioendotheliomu tři měsíce po deeskalaci antineoplastické terapie, devět měsíců po zahájení personalizované terapie.

### Metodika a výsledky

Pro detekci fosforylace RTK byl použit Human Phospho-RTK Array Kit (R&D Systems) umožňující současné stanovení fosforylace 49 kináz z 16 receptorových rodin, přičemž u člověka bylo zatím popsáno 58 RTK rozdělených do 20 rodin v závislosti na podobnosti proteinové struktury receptorů [7]. Princip metody

detekce spočívá v nanesení proteinového lyzátu na nitrocelulóзовou membránu, na níž jsou ve dvojicích bodů imobilizovány specifické protilátky proti dané kináze. Fosforylované i nefosforylované formy proteinu se na protilátku naváží v ekvimolárním poměru a v následujícím kroku jsou fosforylované formy proteinu označeny protilátkou proti fosforylovanému tyrozinu konjugovanou s peroxidázou. Po aplikaci chemiluminiscenčního substrátu na membránu lze luminiscenci detekovat na filmu nebo pomocí chemiluminiscenčního skeneru.

Fosforylační status MAP kináz a vybraných serin/treoninových kináz a dalších signálních molekul byl analyzován pomocí Human Phospho-MAPK Array Kit (R&D Systems) umožňující současné stanovení fosforylace 26 kináz včetně zástupců tří hlavních rodin (ERK, JNK a p38). Princip metody je podobný jako v předchozím v případě, s tou výjimkou, že pro odlišení fosforylovaných a nefosforylovaných forem kináz je použito specifických protilátek přímo proti fosforylovaným formám kináz konjugovaných s biotinem. Na biotin se následně naváže streptavidin konjugovaný s peroxidázou, jež aktivuje chemiluminiscenční substrát.

Zmražený vzorek tkáně byl rozdělen na dvě části a lyzáty pro obě analýzy byly připraveny dle pokynů výrobce, následně bylo použito 300  $\mu$ g celkového proteinu pro každou z analýz. Míra fosforylace jednotlivých proteinů byla denzitometricky kvantifikována softwarem ImageJ, z duplikátů byl vypočítán průměr a od něj odečtena hodnota pozadí. Data byla normalizována vztahem k maximální hodnotě dosažené na každé z použitých membrán.

Fosforylace RTK byla výrazná především u receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), inzulinového receptoru (InsR) a obou variant receptoru pro růstový faktor krevních destiček (platelet derived growth factor – PDGFR $\alpha$  a PRGFR $\beta$ ) (graf 1A, C).

V rámci analýzy fosforylace MAP kináz byla zaznamenána vysoká míra fosforylace ERK1 a ERK2 a částečně i kinázy p38 $\gamma$ . Dále byla aktivována kináza Akt-2, jež patří do rodiny nejvýznamnějších

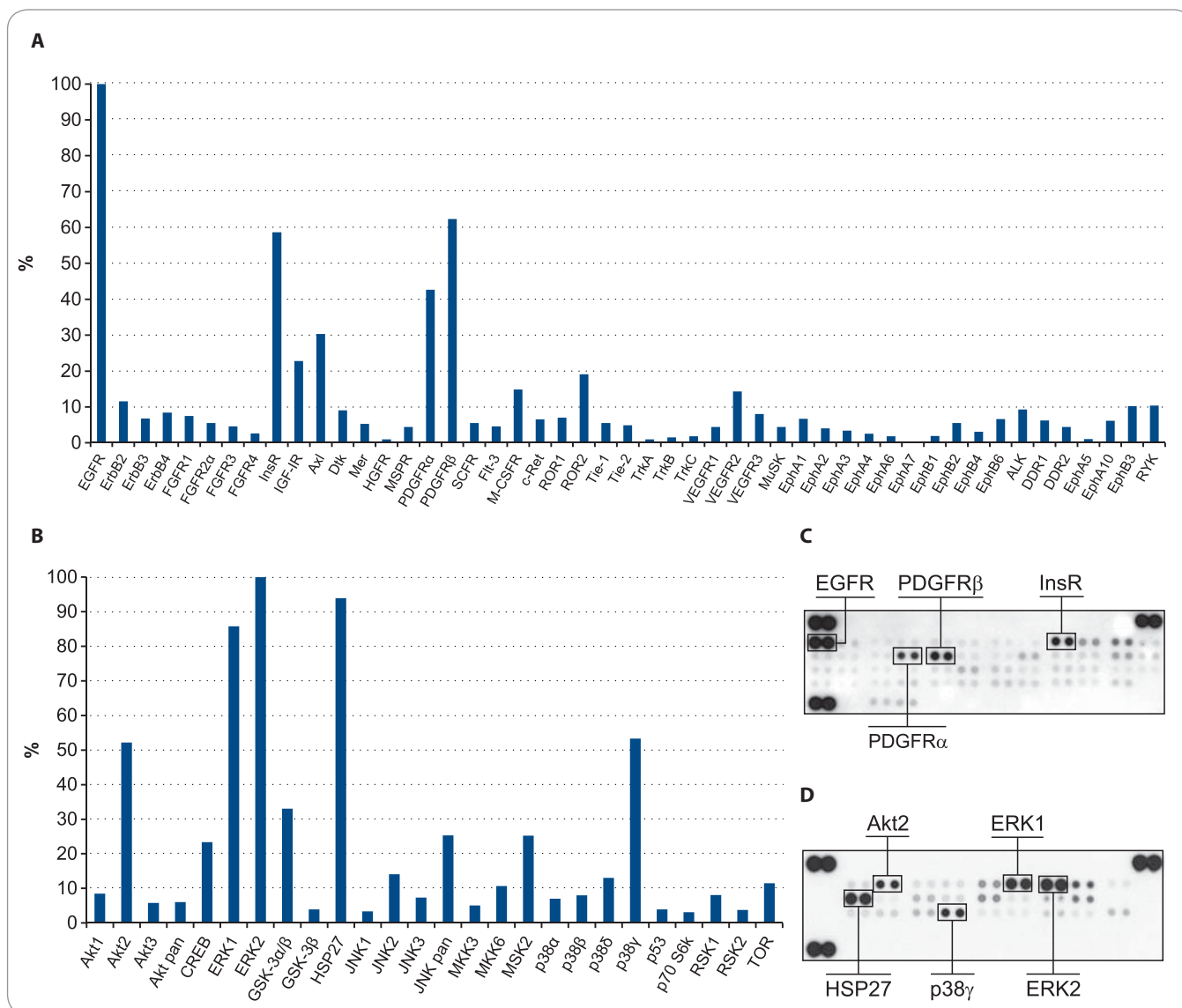
signálních molekul serin/treoninových kináz Akt. Jedním z nejvíce fosforylovaných proteinů, jenž může být fosforylačním cílem v případě aktivace kináz rodiny p38 [8], byl HSP27 (graf 1B, D).

### Diskuze

Maffucciho syndrom patří mezi velmi vzácná onemocnění a manifestuje se v 78 % před začátkem puberty [9]. Je charakterizován přítomností enchondromů, mnohočetných hemangiomů a vzácně také lymfangiomů. Standardní terapie neexistuje a výběr vhodné strategie může být velmi svízelný. Enchondromy vznikají nejčastěji v oblasti dlouhých kostí dolních končetin, nohy a ruky [9]. V případě, že omezují funkčnost končetiny, ovlivňují normální růst nebo působí bolest, je přistoupeno k chirurgickému řešení. Hemangiomy jsou benigní cévní tumory, které mohou vznikat prakticky kdekoli v těle, v rámci tohoto onemocnění mohou postupně progredovat a výrazně omezovat kvalitu života postiženého jedince. V literatuře jsou popsány případy, u nichž bylo úspěšně využito antiangiogenní terapie k ovlivnění hemangiomů u těchto pacientů [5].

V případě této pacientky bylo těžké vybrat vhodnou léčebnou strategii, mimo jiné především z důvodu komorbidit a rozsahu jejího onemocnění. Bylo vyzkoušeno několik, dříve v literatuře popsaných, léčebných modalit, avšak výsledky léčby byly dosti nepřesvědčivé. V rámci snahy nalézt vhodný terapeutický cíl na úrovni proteinů, který by odrážel skutečnou aktivitu v patologických buňkách, byl vyšetřen profil fosforylace RTK a navazujících signálních drah. Tato diagnostická metoda se jeví jako slibný prostředek, který by mohl umožnit podávání cílené biologické léčby pacientům s prokázanou aktivací signální dráhy na úrovni proteinů. Tento postup by v konečném důsledku mohl zlepšit výsledky léčby, snížit množství komplikací a celkově snížit náklady na léčbu vlastního onemocnění, které mohou být při empirickém podávání takovýchto léků dosti vysoké.

Na základě výsledků naší analýzy byl do léčebného schématu přidán sunitinib v kombinaci s paclitaxelem. Sunitinib je multikinázový inhibitor, který cílí pře-



**Graf 1. Profil fosforylace receptorových tyrozinkináz (RTK), MAP kináz a vybraných cytoplazmatických proteinů ve vzorku heman-giomu odebraného pacientce s Maffucciho syndromem.**

A. Denzitometrická analýza fosforylace RTK. B. Denzitometrická analýza fosforylace MAPK a vybraných cytoplazmatických proteinů. C. Proteinová array s označenými RTK, jež vykazují nejvyšší hodnotu hustoty. D. Proteinová array s označenými MAPK a vybranými cyto-plazmatickými proteiny, jež vykazují nejvyšší hodnotu hustoty.

devším proti receptoru pro růstový faktor krevních destiček (PDGFR) a proti receptoru pro cévní endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor – VEGFR), čímž ovlivňuje angiogenezi a buněčnou proliferaci. FDA (Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu léčiv) jej oficiálně schválila k léčbě GIST, renálního karcinomu a neuroendokrinních tumorů pankreatu, avšak pro silný antiangiogenní potenciál byl výhodný i pro naše účely. Paclitaxel je alkaloid, který blokuje depolymerizaci mikrotubulů dělicího vře-

ténka a je používán pro léčbu řady malignit. Při metronomickém dávkování a v kombinaci s dalšími léky prokázal významný antiangiogenní potenciál [10]. Prezentovaná kazuistika dokumentuje obtížnost péče o pacienty s Maffucciho syndromem, kdy interpretace klinického průběhu posledních týdnů a vysvětlení úmrtí pacientky zůstává spekulativní.

**Závěr**

Terapie vzácných onemocnění je ne-snadná. Neexistují ověřené postupy a vět-

šina poznatků o takových stavech je známa pouze z kazuistik. Velké randomi-zované klinické studie fáze III zde nikdy nebudou k dispozici, přestože je systém registrací a úhrad zdravotních pojiš-ťoven vyžaduje i v těchto případech. Vyšetření signálních drah aktivovaných RTK by mohlo do budoucna přispět k sestavování individualizované léčby tam, kde standardní léčba není známa anebo není dostatečně účinná, jako jsou vzácná, refrakterní nebo některá pokročilá nádorová onemocnění dětského

věku. Vytváření a následná realizace personalizovaných léčebných postupů vyžadují komplexní, multioborovou spolupráci a pečlivé vyvažování rizik a event. přínosů takových postupů.

#### Literatura

1. Verdegaal SH, Bovee JV, Pansuriya TC et al. Incidence, predictive factors, and prognosis of chondrosarcoma in patients with Ollier disease and Maffucci syndrome: an international multicenter study of 161 patients. *Oncologist* 2011; 16(12): 1771–1779. doi: 10.1634/theoncologist.2011-0200.
2. Lissa F, Argente J, Antunes G et al. Maffucci syndrome and soft tissue sarcoma: a case report. *Int Semin Surg Oncol* 2009; 6(1): 2. doi: 10.1186/1477-7800-6-2.
3. Lin PP, Moussallem CD, Deavers MT. Secondary chondrosarcoma. *J Am Acad Orthop Surg* 2010; 18(10): 608–615.
4. Park EA, Seo JW, Lee SW et al. Infantile hemangioendothelioma treated with high dose methylprednisolone pulse therapy. *J Korean Med Sci* 2001; 16(1): 127–129.
5. Riou S, Morelon E, Guibaud L et al. Efficacy of rapamycin for refractory hemangioendotheliomas in Maffucci's syndrome. *J Clin Oncol* 2012; 30(23): e213–e215. doi: 10.1200/JCO.2012.41.7287.
6. Pasquier E, Street J, Pouchy C et al.  $\beta$ -blockers increase response to chemotherapy via direct antitumour and anti-angiogenic mechanisms in neuroblastoma. *Br J Cancer* 2013; 108(12): 2485–2494. doi: 10.1038/bjc.2013.205.
7. Lewis RJ, Ketcham AS. Maffucci's syndrome: functional and neoplastic significance. Case report and review of the literature. *J Bone Joint Surg Am* 1973; 55(7): 1465–1479.
8. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010; 141(7): 1117–1134.
9. Dorion S, Landry J. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress Chaperones* 2002; 7(2): 200–206.
10. Pasquier E, Tuset MP, Street J et al. Concentration- and schedule-dependent effects of chemotherapy on the angiogenic potential and drug sensitivity of vascular endothelial cells. *Angiogenesis* 2013; 16(2): 373–386. doi: 10.1007/s10456-012-9321-x.