

# KLINICKÁ ONKOLOGIE

Z obsahu:

Potenciál flavonoidu quercetinu v prevenci a léčbě nádorů – současný stav výzkumu

Detekcia mutácií v géne *FLT3* u pacientov východoslovenského regiónu

Resekce sarkomu dutiny břišní, pánve a retroperitonea



- 1 Účinnost u celé řady méně častých mutací<sup>1</sup>
- 2 Možnost snížení dávky při zachování účinnosti<sup>2-7</sup>
- 3 Účinnost u mozkových metastáz<sup>8</sup>
- 4 Pozitivní vliv na příznaky nádorového onemocnění a kvalitu života<sup>9,10</sup>
- 5 Vyšší účinnost oproti erlotinibu u skvamózního karcinomu<sup>7\*</sup>
- 6 Bez omezení následných možností léčby<sup>11-13</sup>
- 7 Delší PFS oproti chemoterapii v 1. linii léčby<sup>4,14</sup>
- 8 Delší OS u del19 oproti chemoterapii<sup>4,12,14-16</sup>
- 9 Ireverzibilní blokáda receptorů rodiny ErbB prokázána ve 2 globálních srovnávacích studiích<sup>4,6,11,12,14,17-20</sup>
- 10 Vyšší účinnost oproti gefitinibu<sup>6\*\*</sup>



# 10 DŮVODŮ PRO GIOTRIF®

TKI PRVNÍ VOLBY

## DŮVOD 3

GIOTRIF®

ve srovnání s chemoterapií  
**zlepšil účinnost u pacientů s EGFR M+ s metastázami v mozku<sup>8</sup>**

\* = vyšší účinnost v parametru OS, PFS; \*\* = vyšší účinnost v parametru PFS, TTF a ORR; CI = interval spolehlivosti; EGFR = receptor pro epidermální růstový faktor; HR = poměr rizik; OS = celková přežití; PFS = přežití bez progresse onemocnění; TTF = doba do selhání léčby; TKI = inhibitor tyrosinkinázy; ORR = četnost objektivní odpovědi; Del 19 = delece v exonu 19; EGFR M+ = mutace receptoru pro epidermální růstový faktor; CNS = centrální nervový systém.

### Reference:

1. Yang JC et al. *Lancet Oncol.* 2015;16:830-838. 2. Yang JCH et al. *Ann Oncol.* 2016;27(11):2103-2110. 3. Hirsch V et al. Poster č. 369 prezentovaný na výroční konferenci American Society of Clinical Oncology (ASCO); Chicago, IL, USA; 3. - 7. 2016. 4. Sequist LV et al. *J Clin Oncol.* 2013;31(27):3327-3334. 5. Wu YL et al. *Lancet Oncol.* 2014;15(2):213-222. 6. Park K et al. *Lancet Oncol.* 2016;17(5):577-589. 7. Soria JC et al. *Lancet Oncol.* 2015;16(8):897-907. 8. Schuler M et al. *J Thorac Oncol.* 2016;11(3):380-390. 9. Yang JC et al. *Clin Oncol.* 2013;31(27):3342-3350. 10. Wu et al. Poster prezentovaný na kongresu ESMO; Madrid, Španělsko; 26. - 30.9.2014. 11. Paz-Ares L et al. *Annals of Oncology.* 2017; doi:10.1093/annonc/mdw611. 12. Yang JC et al. *Lancet Oncol.* 2015;16(2):141-151. 13. Wu SG et al. *Oncotarget.* 2016; 7(11):12404-12413. 14. Wu YL et al. *Lancet Oncol.* 2014;15(2):213-222. 15. Fukuoaka M et al. *J Clin Oncol.* 2011;29:2866-2874. 16. Khozin S et al. *Oncology.* 2014;19(7):774-779. 17. Solca F et al. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343(2):342-350. 18. Souhrn údajů o přípravku GIOTRIF® (afatinib), 2017. 19. Souhrn údajů o přípravku IRESSA® (gefitinib), 2014. 20. Souhrn údajů o přípravku TARCEVA® (erlotinib), 2014.

### Zkrácená informace o přípravku Giotrif:

**Název přípravku:** GIOTRIF 20 mg potahované tablety, GIOTRIF 30 mg potahované tablety, GIOTRIF 40 mg potahované tablety, GIOTRIF 50 mg potahované tablety. **Složení:** Jedna potahovaná tableta obsahuje afatinibum 20/30/40/50 mg (ve formě afatinibi dimaleátu). **Indikace:** Giotrif je indikován jako monoterapie k léčbě dospělých pacientů • s lokálně pokročilým nebo metastatickým NSCLC se skvamózní histologií progredujícím při léčbě chemoterapií na bázi platiny nebo po této terapii. **Dávkování a způsob podání:** Léčba musí být zahájena a dozorována lékařem se zkušenostmi s protinádorovou léčbou. Před zahájením léčby je třeba určit mutační stav EGFR. Doporučená dávka je 40 mg jednou denně. Přípravek je nutno užívat bez potravy. Potrava nesmí být konzumována nejméně 3 hodiny před užitím přípravku a nejméně 1 hodinu po něm. **Vlččbě je nutno pokračovat až do případné progresse onemocnění nebo do vzniku nesnášenlivosti pacientem. Maximální denní dávka je 50 mg. U pacientů se středně těžkou nebo těžkou poruchou funkce ledvin je expozice afatinibu zvýšena. Sledujte pacienty s těžkou poruchou funkce ledvin a v případě netolerance upravte dávku. Kontraindikace:** Hypersensitivita na afatinib nebo na kteroukoli pomocnou látku. **Zvláštní upozornění:** Během léčby přípravkem Giotrif by hlášen průjem, včetně závažného průjmu. Při průjmu jsou důležitá proaktivní opatření, která zahrnují adekvátní hydrataci s podáváním antiidiaroiik, zejména v prvních 6 týdnech léčby a je nutno je zahájit již při prvních známkách průjmu. Antiidiaroiika (například loperamid) je nutno podávat, a pokud je to nezbytné, jejich dávku je třeba zvyšovat až k nejvyšší schválené doporučené dávce. Antiidiaroiika musí mít pacienti pohotovost k dispozici tak, aby bylo možno léčbu zahájit při prvních známkách průjmu a pokračovat v ní, dokud průjmovité stolice neustanou po dobu 12 hodin. U pacientů léčených Giotrifem byla hlášena kožní vyrážka/akné. Léčba přípravkem musí být přerušena nebo vysazena, pokud se u pacienta vyvíjí závažné bulózní, puchýřnaté nebo exfoliativní postižení. U pacientů, kteří jsou vystaveni slunečnímu záření, je vhodný ochranný oděv a použití krémů s ochranným faktorem proti slunečnímu záření. Vyšší expozice vůči Giotrifu byla pozorována u žen, u pacientů s nižší tělesnou hmotností a u pacientů s existující poruchou funkce ledvin. U pacientů užívajících Giotrif k léčbě NSCLC objevil zprávy o intersticiální plicní nemoci (ILD), poruše funkce jater, keratitidě. K vyloučení ILD je třeba pečlivě zhodnotit všechny pacienty s akutním rozvojem a/nebo nevysvětlitelným zhoršením plicních příznaků (dušnost, kašel horečka). U pacientů s kardiálními rizikovými faktory a u pacientů se stavy, které mohou ejekční frakci levé komory ovlivnit, je nutno zvážit monitoraci stavu srdce, a to včetně zhodnocení LVEF při počátečním vyšetření a během léčby. **Současná léčba silnými indukory P-gp může snížit expozici vůči afatinibu. Přípravek obsahuje laktosu. Interakce:** In vitro studie ukázaly, že afatinib je substrátem P-gp a BCRP. Proto se doporučuje podávat dávku silných inhibitorů P-gp (včetně ritonaviru, cyklosporinu A, ketokonazolu, itraconazolu, erythromycinu, verapamilu, chinidinu, takrolimu, nelinaviru, sachinaviru, amiodaronu a dalších) střídavě, nejlépe 6 hodin nebo 12 hodin od podání přípravku Giotrif. Silné indukory P-gp (včetně rifampicinu, karbamazepinu, fenytoinu, fenobarbitalu nebo těžalky tečkové a dalších) mohou snížit expozici vůči Giotrifu. **Nežádoucí účinky:** Nežádoucí reakce jsou obecně spojeny s inhibičním mechanismem účinku afatinibu na receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR). Nejčastějšími nežádoucími reakcemi byly průjem a nežádoucí příhody se vztahem ke kůži (vyrážka, akneiformní dermatitida, pruritus, suchá kůže), dále stomatitida, paronychie, pokles chuti k jídlu a epistaxe. Mezi časté nežádoucí reakce patřily cystitida, dehydratace, hypokalemie, dysgeuzie, konjunktivitida, suché oči, rinorea, dyspnoe, cheilitida, zvýšení alanin- a aspartátaminotransferázy, porucha renální funkce/renální selhání, syndrom palmoplantární erytrodysestázie, svalové spazmy, pyrexie a pokles tělesné hmotnosti. Nežádoucí účinky typu intersticiálního plicního onemocnění (ILD) byla hlášena u 0,7% pacientů léčených afatinibem. U pacientů užívajících Giotrif 40 mg byly pozorovány převážně přechodné abnormality jaterních testů (včetně zvýšení ALT a AST), která nevedla k vysazení léčby. **Zvláštní opatření pro uchování:** Uchovávat v původním obalu, chránit před vlhkostí a světlem. Datum poslední revize textu: 07/2017. Držitel rozhodnutí o registraci: Boehringer Ingelheim International GmbH, Ingelheim am Rhein, Německo. Registrační č.: Giotrif 20 mg EU/1/13/879/003; Giotrif 30 mg EU/1/13/879/006; Giotrif 40 mg EU/1/13/879/009; Giotrif 50 mg EU/1/13/879/012. Výdej pouze na lékařský předpis. Přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Materiál je určen pro odbornou veřejnost.

▼ Tento léčivý přípravek podléhá dalšímu sledování. Před podáním se seznamte s úplnou informací o přípravku.

Boehringer Ingelheim, spol. s r.o., Na Poříčí 1079/3a, 110 00 Praha 1, www.boehringer-ingelheim.cz; MEDInfo.CZ@boehringer-ingelheim.com

## Monoclonal gammopathy of undetermined significance

Monoklonální gamapatie jsou nesmírně zajímavou, ale také značně diverzifikovanou skupinou onemocnění zahrnující projevy celé řady diagnostických jednotek. Společně jsou charakterizovány patologickou produkcí paraproteinu (kompletní molekuly monoklonálního imunoglobulinu, volných lehkých řetězců nebo vzácně těžkých řetězců). Část monoklonálních gamapatií je primárně maligních – nejčastěji se vyskytující zástupcem je mnohočetný myelom se všemi jeho subtypy, dále Waldenströмова makroglobulinemie, paraprotein ale mohou produkovat i maligní buňky chronické lymfatické leukemie a low-grade non-hodgkinských lymfomů vycházejících z B linie. Primární AL amyloidóza je dalším možným projevem onemocnění, které je charakterizováno poškozením orgánů a tkání v důsledku depozice lehkých řetězců. Diferenciální diagnostika nemocí asociovaných s monoklonální gamapatií je široká, zahrnuje mimo jiné POEMS syndrom, Castlemanovu nemoc, revmatoidní onemocnění, Schnitzlerův syndrom, získaný C1q deficit, senzomotorickou neuropatii nebo capillary leak syndrom. Monoklonální gamapatie nejasného (či spíše neurčeného) významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS) je pak potenciálně premaligním stavem definovaným přítomností monoklonálního imunoglobulinu, limitovanou infiltrací plazmocytů

v kostní dřeni a nepřítomností orgánového postižení.

V problematice monoklonálních gamapatií došlo k významnému pokroku mimo jiné díky dlouholeté systematické práci lékařů Mayo Clinic. Samotný termín MGUS zavedl Dr. Robert A. Kyle, známý pro svůj přínos v oblasti výzkumu mnohočetného myelomu. Pro diagnostiku monoklonálních gamapatií je klíčová separace monoklonálního imunoglobulinu pomocí elektroforézy a jeho identifikace protilátkou pomocí imunofixace. Diagnostika často zahrnuje biopsii kostní dřene se stanovením míry její infiltrace klonálními plazmatickými buňkami. V této souvislosti nemohu nezmínit historicky významnou metodu – stanovení plasma cell labeling index (PCLI) – vyvinutou na Mayo Clinic. Jednalo se o imunofluorescenční identifikaci procenta proliferaujících plazmocytů v nátěru kostní dřene pomocí inkorporace bromodeoxyuridinu a jeho detekce monoklonální protilátkou. Adaptace detekce PCLI byla vyvinuta následně i pro flowcytometrickou aplikaci za pomoci barvení propidium iodidem. PCLI byl parametrem, který kupříkladu významně koreloval s rizikem progresivního myelomu (smoldering myeloma) do plně vyjádřené nemoci. Jeho hodnota nad 0,4 % korelovala rovněž s rizikem transformace MGUS do mnohočetného myelomu.

MGUS je relativně časté onemocnění a setká se s ním řada lékařů. Proto je

třeba vědět, jak o pacienty s touto diagnózou pečovat. V průměru je riziko maligní transformace MGUS velmi nízké a pohybuje se kolem 1 % za rok u mladších nemocných. O to lépe je tedy nutné identifikovat ty pacienty, kteří mají riziko transformace do maligního onemocnění zvýšené. Z publikovaných dat bylo zřejmé, že vypracování validních prediktivních modelů bude při nízkém procentu transformace do malignity velmi obtížné a bude vyžadovat velké soubory nemocných. První publikovaný a nejjednodušší Mayo model zahrnoval koncentraci monoklonálního imunoglobulinu, non-IgG izotyp a abnormální poměr volných lehkých řetězců. Další uveřejněný model již obsahoval parametr fenotypizace plazmatických buněk (identifikaci fyziologických a abnormálních plazmocytů) a identifikaci aneuploidních změn. Je potěšující, že byl vytvořen i český model zahrnující tyto parametry – procento infiltrace kostní dřene plazmocytů, imunoparézu (tedy potlačení sekrece fyziologických imunoglobulinů) a hodnotu hemoglobinu. Přehledový článek uveřejněný v tomto čísle poskytuje čtenáři také praktický návod, jaká má být diagnostická logistika u tohoto onemocnění, a jak je vhodné pacienty s diagnózou MGUS dispenzarizovat.

*prof. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.  
interní hematologická klinika  
LF MU a FN Brno*

# Od 1. dne chemoterapie v trojkombinaci PREVENCE CINIV<sup>1</sup>

# EMEND<sup>®</sup>

aprepitant

## Zkrácené informace o léčivém přípravku

### Emend 125 mg tvrdé tobolky a Emend 80 mg tvrdé tobolky. Složení: Jedna 125 mg tobolka

obsahuje aprepitantum 125 mg, jedna 80 mg tobolka obsahuje aprepitantum 80 mg. Pomocná látka se známým účinkem: 125 mg sacharózy (ve 125 mg tobolce), 80 mg sacharózy (v 80 mg tobolce). **Indikace:** Prevence nauzey a zvracení spojených s vysoce a středně silně emetogenní protinádorovou chemoterapií u dospělých a dospívajících od 12 let věku. EMEND 125 mg/80 mg se podává jako součást kombinované terapie. **Dávkování a způsob podání:** EMEND se podává po dobu 3 dní jako součást léčebného režimu zahrnujícího kortikosteroid a antagonistu 5-HT<sub>3</sub>. Doporučená dávka je 125 mg perorálně jednou denně před zahájením chemoterapie 1. den a 80 mg perorálně jednou denně 2. a 3. den ráno. Tvrdou tobolku je nutno polknout vcelku. Přípravek EMEND lze užívat bez ohledu na jídlo. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku. Současné podávání s pimozidem, terfenadinem, astemizolem nebo cisapridem. **Zvláštní upozornění a opatření pro použití:** Pro pacienty se středně těžkou poruchou funkce jater existuje pouze omezené množství dat a žádné údaje nejsou k dispozici pro pacienty s těžkou poruchou funkce jater. U těchto nemocných je nutno přípravek EMEND používat s opatrností. **Interakce na CYP3A4:** EMEND je nutno podávat s opatrností pacientům současně užívajícím perorálně podávané léčivé látky, které se primárně metabolizují cestou CYP3A4 a které mají úzké terapeutické rozmezí, jako je cyklosporin, takrolimus, sirolimus, everolimus, alfentanil, deriváty námelových alkaloidů, fentanyl a chinidin. Navíc je nutno k podávání současně s irinotekanem přistupovat s obzvláštní opatrností, protože uvedená kombinace by mohla mít za následek zvýšenou toxicitu. **Současné podávání s warfarinem:** U pacientů dlouhodobě léčených warfarinem je nutno hodnotu INR pozorně sledovat během léčby přípravkem EMEND a po dobu 14 dnů po každé 3-denní léčbě přípravkem EMEND. **Účinnost hormonálních kontraceptiv** se může během podávání přípravku EMEND a po dobu 28 dní po ukončení jeho podávání snížit. Během léčby přípravkem EMEND a ještě 2 měsíce po ukončení terapie přípravkem EMEND je třeba používat nehormonální záložní antikoncepční metody. **Pomocné látky:** Přípravek EMEND obsahuje sacharózu. Pacientům se vzácnými dědičnými poruchami s fruktózovou intolerancí, malabsorpcí glukózy a galaktózy nebo deficitem sacharázy-izomaltázy by neměl být tento lék podáván. **Interakce:** Současné podávání přípravku EMEND s deriváty námelových alkaloidů, může vést ke zvýšeným koncentracím těchto léčivých látek. **Kortikosteroidy: Dexamethason:** Obvyklou dávku perorálně podaného dexamethasonu je nutno při současném podávání s přípravkem EMEND v režimu 125 mg/80 mg snížit přibližně o 50 %. **Methylprednisolon:** Při současném podávání s přípravkem EMEND v režimu 125 mg/80 mg je třeba obvyklou dávku intravenózně aplikovaného methylprednisolonu snížit přibližně o 25 %, a obvyklou dávku perorálně podávaného methylprednisolonu přibližně o 50 %. **Chemoterapeutika:** Nemůže se vyloučit interakce s perorálně podávanými chemoterapeutickými léčivými přípravky, které se biotransformují převážně nebo částečně cestou CYP3A4 (např. etoposid, vinorelbin). Doporučuje se opatrnost a je vhodné tyto pacienty důsledně sledovat. K současnému podávání přípravku EMEND s léčivými látkami, které inhibují aktivitu CYP3A4 (např. ketokonazol, itraconazol, vorikonazol, posakonazol, klarithromycin, telithromycin, nefazodon a inhibitory proteázy), je třeba přistupovat opatrně, protože se předpokládá, že uvedené kombinace povedou ke zvýšeným plazmatickým koncentracím aprepitantu. Je nutno vyvarovat se současného podávání přípravku EMEND s léčivými látkami, které silně indukují aktivitu CYP3A4 (např. rifampicinem, fenytoinem, karbamazepinem, fenobarbitalem), protože tato kombinace vede k snížení plazmatických koncentrací aprepitantu. Současné podávání přípravku EMEND s bylinnými přípravky obsahujícími třezalku tečkovanou (*Hypericum perforatum*) se nedoporučuje. **Upozornění:** Přípravek EMEND může mít mírný vliv na schopnost řídit, jezdit na kole nebo obsluhovat stroje. Po užití se mohou objevit závratě a únava. **Nežádoucí účinky:** Nejčastějšími nežádoucími účinky, uváděnými ve vyšším výskytu u pacientů léčených režimem s aprepitantem než standardní terapií, u pacientů léčených vysoce emetogenní chemoterapií byly: škytávka (4,6 % oproti 2,9 %), zvýšení ALT (2,8 %, oproti 1,1 %), dyspepsie (2,6 %, oproti 2,0 %), zácpa (2,4 %, oproti 2,0 %), bolesti hlavy (2,0 %, oproti 1,8 %) a snížení chuti k jídlu (2,0 %, oproti 0,5 %). Nejčastějším nežádoucím účinkem uváděným ve vyšším výskytu u pacientů léčených režimem s aprepitantem než standardní terapií u pacientů léčených středně emetogenní chemoterapií byla únava (1,4 %, oproti 0,9 %). \*Nejčastějšími nežádoucími účinky hlášenými s vyšší incidencí u pediatrických pacientů léčených režimem aprepitantu než u kontrolního režimu během léčby emetogenní protinádorovou chemoterapií byla škytávka (3,3 % versus 0,0 %) a zarudnutí (1,1 % versus 0,0 %). **Druh obalu a obsah balení\*:** Na trhu jsou dostupné různé velikosti balení obsahující rozdílné síly. Hliníkový blistr obsahující jednu 80mg tobolku. Hliníkový blistr obsahující dvě 80mg tobolky. 5 hliníkových blistrů, každý obsahující jednu 80mg tobolku. Hliníkový blistr obsahující jednu 125mg tobolku. Na trhu nemusí být všechny velikosti balení. **Uchovávání:** Uchovávejte v původním obalu, aby byl přípravek chráněn před vlhkostí. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Merck Sharp & Dohme Ltd., Hertford Road, Hoddesdon, Hertfordshire EN 11 9BU, Velká Británie; dpoc\_czechslovak@merck.com. **Registrační číslo\*:** EU/1/03/262/001, EU/1/03/262/002, EU/1/03/262/003, EU/1/03/262/004, EU/1/03/262/005, EU/1/03/262/006. **Datum revize textu:** 23.3.2016.

**Tento přípravek je vázán na lékařský předpis a je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění.**

**Dříve než přípravek předepíšete, seznamte se prosím s úplným souhrnem údajů o přípravku.**

\*Všimněte si, prosím, změn v informacích o léčivém přípravku.

1. SPC léčivého přípravku Emend.



© Copyright Merck Sharp & Dohme s.r.o., 2017. Všechna práva vyhrazena.  
Merck Sharp & Dohme s.r.o., Na Valentince 3336/4, 150 00 Praha 5, Česká republika  
Tel.: +420 233 010 111, e-mail: dpoc\_czechslovak@merck.com, www.msd.cz

04-2018-ONCO-1214899-0000

# Obsah | Contents

## Editorial

<b>Monoclonal gammopathy of undetermined significance</b>	<b>163</b>
---	------------

## PŘEHLEDY | REVIEWS

<b>Neuroendokrinné neoplázie gastrointestinálního traktu z pohledu histopatologie</b>	<b>167</b>
---	------------

Histopathology of Neuroendocrine Neoplasms of the Gastrointestinal System

Mikuš Kuracinová K., Janega P., Janegová A., Čierna Z.

<b>Možná úloha lidských herpetických virů podčeláde Alphaherpesvirinae při vzniku některých nádorových onemocnění</b>	<b>178</b>
---	------------

A Possible Role of Human Herpes Viruses Belonging to the Subfamily Alphaherpesvirinae in the Development of Some Cancers

Mrázová V., Golais F., Búda D.

<b>Potenciál flavonoidu quercetinu v prevenci a léčbě nádorů – současný stav výzkumu</b>	<b>184</b>
--	------------

Potential of the Flavonoid Quercetin to Prevent and Treat Cancer – Current Status of Research

Neuwirthová J., Gál B., Smilek P., Urbánková P.

## PŮVODNÍ PRÁCE | ORIGINAL ARTICLES

<b>Trastuzumab v neoadjuvantní léčbě HER2+ karcinomu prsu – 5leté zkušenosti z onkologické kliniky 1. LF UK a VFN</b>	<b>191</b>
---	------------

Use of Trastuzumab for Neoadjuvant Therapy of HER2+ Breast Cancer – 5-Years of Experience in a Single Clinic

Bielčíková Z., Petruželka L., Chloupková R.

<b>Detekcia mutácií v géne <i>FLT3</i> u pacientov východoslovenského regiónu</b>	<b>200</b>
---	------------

Detection of *FLT3* Mutations in Patients from Eastern Slovakia

Dubayová K., Kožlejová Z., Vašková J., Čakanová G., Kiktavá M., Guman T., Sabo J., Karabinos A.

<b>Výsledky léčby krizotinibem v léčbě ALK pozitivního nemalobuněčného karcinomu plic v České republice</b>	<b>207</b>
---	------------

Effects of Treatment with Crizotinib on Non-small Cell Lung Carcinoma with ALK Translocation in the Czech Republic

Pešek M., Skříčková J., Kolek V., Šatánková M., Koubková L., Roubec J., Chloupková R., Černovská M., Benejová A., Kultán J., Hrnčiarik M., Zemanová M., Konečný M., Čoupková H., Svatoň M.

<b>Selected Genetic Polymorphisms Associated with Hypoxia and Multidrug Resistance in Monoclonal Gammopathies Patients</b>	<b>213</b>
--	------------

Vybrané genetické polymorfizmy asociované s hypoxií a multilékovou rezistencí u pacientů s monoklonálními gamapatiemi

Almasi M., Besse L., Brozova L., Jarkovsky J., Bezdekova R., Pour L., Minarik J., Kessler P., Pavliceck P., Roziakova L., Penka M., Hajek R., Vasku A., Sevcikova S.

**KAZUISTIKY | CASE REPORTS**

**Resekce sarkomu dutiny břišní, pánve a retroperitonea**

**230**

Resection of Abdominal, Pelvic and Retroperitoneal Tumors

Šimůnek R., Adámková-Krákorová D., Šefr R., Fait V.

**Aktuality z odborného tisku**

**235**

Bezplatná distribuce časopisu členům České onkologické společnosti České lékařské společnosti  
Jana Evangelisty Purkyně je uskutečněna za podpory společnosti



# Neuroendokrinné neoplázie gastrointestinálneho traktu z pohľadu histopatológie

## Histopathology of Neuroendocrine Neoplasms of the Gastrointestinal System

Mikuš Kuracinová K., Janega P., Janegová A., Čierna Z.

Ústav patologickej anatómie, LF UK a UN, Bratislava

### Súhrn

**Východiská:** Nádory vychádzajúce z neuroendokrinných buniek sú definované ako epitelové neoplázie s predominantne neuroendokrinnou diferenciáciou. Ide o samostatnú skupinu nádorov s charakteristickou histologickou stavbou a funkčnými vlastnosťami vyskytujúcimi sa na rôznych miestach v organizme, najmä v oblasti gastrointestinálneho systému (67 %) a pľúc (25 %). Aj keď ide obyčajne o pomaly rastúce nádory s indolentným priebehom, takmer všetky z nich majú malígny potenciál. Väčšina z nich má schopnosť tvoriť aktívne hormonálne látky. Spektrum klinických príznakov je rôznorodé, mnohé sú typické pre konkrétnu lokalitu neuroendokrinného nádoru. Aj keď tieto nádory poznáme > 130 rokov, koncept týkajúci sa klasifikácie stále nie je jednotný. **Cieľ:** Prehľadová práca poskytuje v úvodnej časti ucelený pohľad na neuroendokrinný systém človeka a nádory z neho vychádzajúce od ich objavenia až po v súčasnosti platnú terminológiu a klasifikácie. V druhej časti je pozornosť upriamená na nádory z endokrinných buniek gastrointestinálneho traktu, na ich klinickú symptomatológiu, makroskopický a mikroskopický obraz s dôrazom na ich klasifikáciu, diagnostické kritériá pri určovaní gradingu a TNM (tumour, node, metastasis) stagingu nádorov a na špecifiká v jednotlivých lokalitách zažívacieho traktu. **Záver:** Nádory z neuroendokrinných buniek predstavujú zriedkavé ochorenia, ktoré sa môžu klinicky prejaviť typickým obrazom karcinoidného syndrómu. Väčšia časť nádorov je však asymptomatických, čo spolu s ich obyčajne malými rozmermi a lokalitou v oblastiach čreva ťažko dostupných endoskopickému vyšetreniu často vedie k diagnostike v pokročilom štádiu ochorenia. Základom úspešnej diagnostiky a liečby nádorov vychádzajúcich z neuroendokrinných buniek je myslieť na ne v rámci diferenciálne-diagnostického postupu s exaktnou histopatologickou klasifikáciou, gradingom a stagingom podľa presne stanovených kritérií a najnovších klasifikácií a odporúčaní. V literatúre aj v odbornej verejnosti sa často používajú pojmy karcinoid, neuroendokrinný nádor, neuroendokrinný tumor či neuroendokrinný karcinóm synonymicky, no z hľadiska názvoslovia a klasifikácie je potrebné si osvojiť správnu terminológiu.

### Kľúčové slová

gastrointestinálne neuroendokrinné neoplázie – neuroendokrinné nádory – neuroendokrinné karcinómy – klasifikácia – NET – NEC

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 recommendation for biomedical papers.



MUDr. Zuzana Čierna, PhD.  
Ústav patologickej anatómie  
LF UK a UN  
Sasinkova 4  
811 08 Bratislava  
e-mail: ciernaz@gmail.com

Obdržané/Submitted: 21. 3. 2018

Prijaté/Accepted: 16. 4. 2018

doi: 10.14735/amko2018167

## Summary

**Background:** Tumors arising from neuroendocrine cells are defined as epithelial neoplasms with predominantly neuroendocrine differentiation. They comprise a distinct group of tumors with a characteristic histological structure and functional properties that develop at various sites, particularly the gastrointestinal system (67%) and lungs (25%). Although such tumors are usually slow-growing and indolent, almost all have malignant potential and most can produce active hormones. Clinical signs vary, and many are dependent on the site at which the tumor develops. Although these tumors were identified more than 130 years, their classification remains unclear. **Purpose:** This review provides a comprehensive overview of the human neuroendocrine system and its neoplasms, from their discovery to current terminology and classifications. In addition, the clinical symptomatology and macroscopic/microscopic features of tumors arising from endocrine cells of the gastrointestinal tract are described, with an emphasis on their classification, diagnostic criteria for their grading and TNM (tumor, node, metastasis) staging, and how these tumors differ according to their localization in the gastrointestinal tract. **Conclusion:** Tumors arising from neuroendocrine cells are rare and can cause typical symptoms of carcinoid syndrome. However, most of these tumors are asymptomatic, which, together with their typical small size and localization in the gut, makes them difficult to access endoscopically and often leads to diagnosis at an advanced stage. To successfully diagnose and treat tumors arising from neuroendocrine cells, they should be assessed using a differential diagnostic procedure and be histopathologically classified, graded, and staged according to specified criteria and the latest classifications and guidelines. Although the terms “carcinoid”, “neuroendocrine tumor”, and “neuroendocrine carcinoma” are often used synonymously in the literature and by professionals, more precise terminology is required for nomenclature and classification.

## Key words

gastrointestinal neuroendocrine neoplasms – neuroendocrine tumors – neuroendocrine carcinomas – classification – NET – NEC

## Úvod

Neuroendokrinný systém človeka je tvorený bunkami so spoločnými vlastnosťami buniek nervového aj endokrinného systému s dôležitou regulačnou úlohou, so schopnosťou vylučovať peptidové hormóny [1,2]. Neuroendokrinné bunky sa vyskytujú difúzne v mnohých orgánoch a tkanivách a sú súčasťou tzv. difúzneho neuroendokrinného systému (diffuse neuroendocrine system – DNES), v minulosti označovaného APUD systém (amine precursor uptake and decarboxylation) [3]. Napriek neustále pokračujúcemu výskumu zostávajú tieto bunky v mnohých ohľadoch záhadné a oprávnené aj v súčasnosti vzbudzujú pozornosť histopatológov. Ide o bunky s nejasným embryonálnym pôvodom, nepochybiteľným neural-like fenotypom a schopnosťou vylučovať na základe rôznych stimulov peptidové hormóny do krvi s dopadom na celý organizmus, prípadne je ich hormonálna aktivita limitovaná na okolie bunky [2]. Názov buniek vychádza z pôvodnej predstavy, že pochádzajú embryologicky z neurálnej lišty. Táto domnienka bola už koncom minulého storočia spochybnená a v súčasnosti sa predpokladá, že bunky majú endodermálny pôvod [2]. Z praktického hľadiska používajú všetky klasifikácie pri opise týchto buniek termín „neuroendokrinný“ vzhľadom na ich fenotyp a funkčné vlastnosti.

Nádory vychádzajúce z neuroendokrinných buniek sa môžu vyskytovať vo

všetkých lokalitách, kde sú fyziologicky tieto bunky prítomné. Okrem typických lokalít (gastrointestinálny trakt (GIT), bronchopulmonálny systém) boli opísané aj v jazyku [4], v močovo-pohlavnom systéme vrátane obličiek [5], prostaty [6,7], ovárií [8,9], prsníka [10,11] a maternice [12,13]. Vo všeobecnosti ide o pomaly rastúce tumory s malígnym potenciálom, so špecifickými biologickými a klinickými charakteristikami, a práve pre ich rôznorodosť je ich správna diagnostika náročná a často zdĺhavá [14].

Reálna incidencia nádorov z neuroendokrinných buniek nie je známa, väčšina z nich pravdepodobne uniká diagnóze počas života pacienta [15]. Podrobne sa incidencii venujú Leoncini et al v jednotlivých štátoch Európy na základe analýzy publikovaných štúdií a v USA na základe databázy SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) [16]. Celosvetovo sa incidencia dobre aj nízko diferencovaných nádorov z neuroendokrinných buniek zvyšuje vo väčšine anatomických miest [16].

## Od histórie po súčasnosť

Od objavenia neuroendokrinných nádorov (neuroendocrine tumors – NETs) až po ich zjednotenie a klasifikáciu prešlo viac ako 130 rokov. Keď Paul Langerhans objavil v roku 1869 pankreatické ostrovciky, bol pravdepodobne prvý, kto popísal normálne endokrinné bunky [17]. V roku 1870 si nemecký fyziológ Rudolf Heidenhain ako prvý všimol a opi-

sal prítomnosť gastrointestinálnych buniek v sliznici čreva, ktoré boli svojou štruktúrou a správaním odlišné od oxyn tických a enterických buniek. Podobné bunky popísal v roku 1897 aj ruský histológ a anatóm Nikolai Kultschitzky [17]. Je zrejmé, že podobné nálezy boli opisované rôznymi patológmi od roku 1867, avšak neboli uznané za samostatnú jednotku [17]. V roku 1907 Carmelo Ciaccio zaviedol pojem enterochromafinné pri popisovaní týchto buniek [18]. V tom istom roku Siegfried Oberndorfer ako prvý použil termín „karcinoid“. Zavedením názvu karcinoid sa snažil odlíšiť tieto zdalivo benígne lézie od malígnych adenokarcinómov [18]. V roku 1914 chirurg Antonin Gosset a patológ Pierre Masson použili techniku impregnácie striebrom na preukázanie vlastností buniek karcinoidov a predpokladali, že môžu vznikáť z enterochromafinných buniek (Kultschitzkeho buniek) intestinálnej sliznice [17]. Hoci si Oberndorfer spočiatku myslel, že sa jedná o benígne lézie, o dve dekády neskôr zmenil svoj názor na ich biologické správanie na základe nálezů metastatických ložísk. Jeho nový objav odpublikovaný v tureckom jazyku unikol väčšej pozornosti takmer celé storočie [17]. V roku 1924 Seale Harris ako prvý opísal inzulínóm a endogénny hyperinzulinizmus a o pár rokov neskôr jeho kolegovia popísali glukagónový syndróm. Robert Zollinger a Edwin Ellison popísali po prvýkrát gastrinóm v roku 1955 [17]. Postupne boli objavované a po-



**Tab. 1. Porovnanie WHO klasifikácií gastrointestinálnych neuroendokrinných neoplázií [22].**

WHO 1980	WHO 2000	WHO 2010
I. karcinoid	1. dobre diferencovaný endokrinný tumor (WDET) 2. dobre diferencovaný endokrinný karcinóm (WDEC) 3. nízko diferencovaný endokrinný karcinóm/ malobunkový karcinóm (PDEC)	1. NET G1 (karcinoid) 2. NET G2 3. NEC (veľkobunkový alebo malobunkový typ)
II. mukokarcinoid	4. zmiešaný exokrinný – endokrinný karcinóm (MEEC)	4. Zmiešaný adenoneuroendokrinný karcinóm (MANEC)
III. zmiešané formy karcinoid – adenokarcinóm		

NET – neuroendokrinné nádory, NEC – neuroendokrinné karcinómy

pisované ďalšie neuroendokrinné syndrómy. V roku 2013 Jens Rehfeld et al popísali syndróm zo zvýšeného vylučovania cholecystokinínu [19].

V roku 1963 sa začala používať schéma rozdelenia nádorov vychádzajúcich z neuroendokrinných buniek podľa rôznych úsekov embryonálneho čreva na nádory predného (foregut – pľúca, žalúdok, duodenum, pankreas, žlčník), stredného (midgut – jejunum, ileum, apendix, pravá časť hrubého čreva) a zadného (hindgut – ľavá časť hrubého čreva, rektum) čreva, ktorá poukazyvala na vzťah morfológie a topografie ich výskytu [20]. V roku 1995 taliansky patológ Carlo Capella et al publikovali ďalšiu klasifikáciu, v ktorej navrhovali zmenu názvu karcinoidný tumor na NET, zahrňujúci všetky nádory vychádzajúce z neuroendokrinných buniek [21]. V súčasnosti sú platné WHO (World Health Organization) klasifikácie pre gastrointestinálne NETs z roku 2010 [22], pre NETs pľúc z roku 2015 [23] a najnovšia pre NETs pankreasu z roku 2017 [24].

### Terminológia a klasifikácia

Terminológia nádorov vychádzajúcich z neuroendokrinných buniek sa niekoľkokrát menila a ani v súčasnosti nie je jednotná pre celú skupinu nádorov. Názvoslovie a klasifikácia týchto nádorov sa odlišuje v závislosti od ich anatomickej lokality [25–27].

Európska spoločnosť neuroendokrinných nádorov (European Neuroendocrine Tumor Society – ENETS) vydala v roku 2016 zatiaľ posledné odporúčania pre diagnostiku, liečbu a menežment pacientov s gastrointestinálnymi NETs [28]. Pre klasifikáciu a stanovenie gradingu odporúčajú

**Tab. 2. Grading gastrointestinálnych neuroendokrinných neoplázií [22].**

	NET G1	NET G2	NET G3
Počet mitóz/10 HPF*	< 2	2–20	> 20
Ki-67**	≤ 2 %	3–20 %	> 20 %

NET – neuroendokrinné nádory, NEC – neuroendokrinné karcinómy, AJCC – Union for International Cancer Control, UICC – American Joint Committee on Cancer

\* Mitózy sa počítajú v mitoticky najaktívnejších oblastiach, pri zväčšení 40x, v 10 HPF (high power fields) = 2 mm<sup>2</sup>, pričom je potrebné pozorne zhodnotiť minimálne 50 HPF podľa AJCC alebo 40 HPF podľa UICC.

\*\* Proliferačný index Ki-67 udáva percento pozitívnych buniek z 500–2000 buniek v proliferačne najaktívnejších oblastiach (tzv. hot spots) [33].

opierať sa o WHO klasifikáciu 2010, ktorá prijala gradingový systém zavedený spoločnosťou ENETS.

WHO klasifikácia gastroenteropancreatických nádorov z roku 2010 (tab. 1) používa pre celú skupinu nádorov názov neuroendokrinné neoplázie (gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms – GEP-NENs) [22] a zahŕňa nádory pažeráka, žalúdka, tenkého a hrubého čreva vrátane ampulárnej oblasti a apendixu, nádory rekta, pankreasu, žlčníka a extrahepatálnych žlčových ciest. Táto klasifikácia priniesla striktnějšíe pravidlá na rozdelenie NENs na základe morfológie a proliferačnej aktivity na NETs a neuroendokrinné karcinómy (neuroendocrine carcinomas – NECs). Spomínaná WHO klasifikácia síce pripúšťa, že termín „neuroendokrinná neoplázia“ sa môže používať synonymicky s názvom NET, no keďže NETs predstavujú konkrétnu podskupinu nádorov, budeme pre lepšiu prehľadnosť tento názov používať len v súvislosti s nimi. Okrem čistých NENs rozoznáva WHO klasifikácia aj

zmiešané adenoneuroendokrinné karcinómy (mixed adenoneuroendocrine carcinoma – MANEC), v ktorých každá komponenta tvorí > 30 % tumoru. Opísané sú aj dlaždicobunkové karcinómy koexistujúce s NEC [29]. V tab. 1 je porovnanie rôznych WHO klasifikácií NENs gastrointestinálneho systému.

WHO klasifikácia 2010 predkladá 3-stupňový grading NENs GIT vrátane pankreasu navrhnutý spoločnosťou ENETS na konferenciách v Ríme v rokoch 2005 [30] a 2006 [31]. Grading vychádza z morfológických kritérií a proliferačnej aktivity nádorových buniek stanovenej počtom mitóz a proliferačným indexom Ki-67 (tab. 2). V prípade, ak by došlo k rozporu medzi danými ukazovateľmi, stanovuje sa vyšší grading [32].

Výsledky viacerých štúdií poukázali, že spomínaný grading v prípade pankreatických NENs (PanNENs) nekoreluje úplne s odpoveďou na liečbu a prežívaním pacientov, najmä v skupine nízko diferencovaných pankreatických

Tab. 3. Porovnanie T štádií TNM klasifikácie pre NETs G1 a G2 žalúdka a apendixu podľa AJCC/UICC [34,35] a ENETS [30,31].

Lokalita	T štádium	NET G1–G2 AJCC/UICC	ENETS
žalúdok	T1	nádor ≤ 1 cm a invaduje laminu propria alebo submukózu	nádor ≤ 1 cm a invaduje laminu propria alebo submukózu
	T2	nádor > 1 cm alebo invaduje muscularis propria	nádor > 1 cm alebo invaduje muscularis propria alebo subserózu
	T3	nádor invaduje subserózu	nádor penetruje serózu
	T4	nádor perforuje viscerálne peritoneum (serózu) alebo invaduje iné orgány alebo príslušné štruktúry	nádor invaduje príslušné štruktúry
apendix	T1	nádor ≤ 2 cm	nádor ≤ 1 cm a invaduje submukózu a muscularis propria
	T2	nádor 2–4 cm	nádor ≤ 2 cm a invaduje submukózu, muscularis propria a/alebo minimálne (≤ 3 mm) invaduje subserózu/mezoapendix
	T3	nádor > 4 cm alebo subserózná invázia, alebo invázia do mezoapendixu	nádor > 2 cm a/alebo extenzívna invázia (nad 3 mm) subserózy/mezoapendixu
	T4	nádor perforuje peritoneum alebo invaduje príslušné orgány a štruktúry	nádor invaduje peritoneum/iné orgány

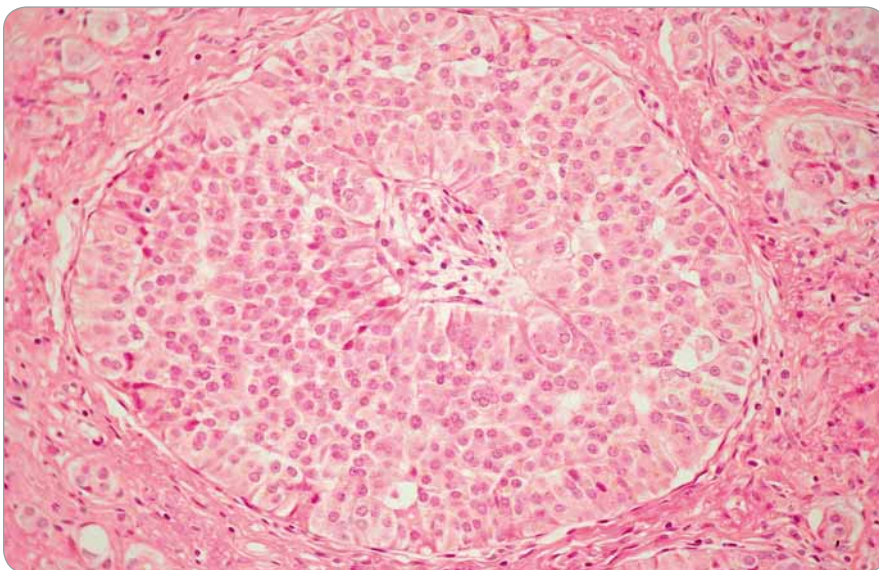
NET – neuroendokrinné nádory, AJCC – Union for International Cancer Control, UICC – American Joint Committee on Cancer, ENETS – Európska spoločnosť neuroendokrinných nádorov

NET (PanNETs). Na základe týchto štádií bola aktualizovaná klasifikácia PanNETs, ktorá je súčasťou novej WHO klasifikácie nádorov endokrinných orgánov z roku 2017 [24]. Najdôležitejšou zmenou je rozdelenie PanNETs G3 na dve skupiny. Prvú skupinu predstavuje nová kategória nádorov PanNETs G3, ktoré si zachovávajú dobre diferencovaný histologický vzor so zvýšenou mitotickou akti-

vitou a Ki-67 > 20 %. Druhú skupinu tvoria nádory zodpovedajúce morfológii a proliferáčnou aktivitou PanNETs podľa WHO klasifikácie 2010. Pri odlíšení týchto dvoch skupín nádorov je možné využiť imunohistochemické vyšetrenie, pre skupinu nádorov PanNETs G3 je typická strata expresie markerov DAXX a ATRX, pre nádory PanNETs strata expresie Rb a abnormálna expresia p53 [33]. Ďalšia

zmena sa týka hranice Ki-67 medzi PanNETs G1 a G2, ktorá bola vo WHO klasifikácii 2010 ≤ 2 %, v klasifikácii 2017 sa hranica posunula na Ki-67 < 3 %, aby boli zahrnuté aj hodnoty medzi 2 a 3 %, aj keď pôvodne sa uvažovalo o posunutí hranice až na 5 %. Tretia zmena nastala v premenovaní skupiny zmiešaných adenoneuroendokrinných nádorov. Keďže ne-neuroendokrinná zložka môže byť iná ako adenokarcinóm, zaviedol sa pojem "zmiešaná neuroendokrinná – ne-neuroendokrinná neoplázia", (mixed neuroendocrine – non-neuroendocrine neoplasm – MiNEN) [24].

ENETS navrhla prvý TNM stagingový systém pre NETs, ktorý bol prijatý na konferencii v Ríme v roku 2005 pre nádory žalúdka, duodéna a pankreasu [30] a v roku 2006 pre nádory ilea, apendixu, hrubého čreva a rekta [31]. Spomínaný systém bol čiastočne akceptovaný 7. vydaním TNM klasifikácie malígnych nádorov UICC (Union for International Cancer Control) a AJCC (American Joint Committee on Cancer). V súčasnosti je platné už 8. vydanie TNM klasifikácie UICC aj AJCC [34,35] so samostatnými kapitolami venovanými NETs G1 a G2 žalúdka, duodéna a ampulárnej oblasti, je-



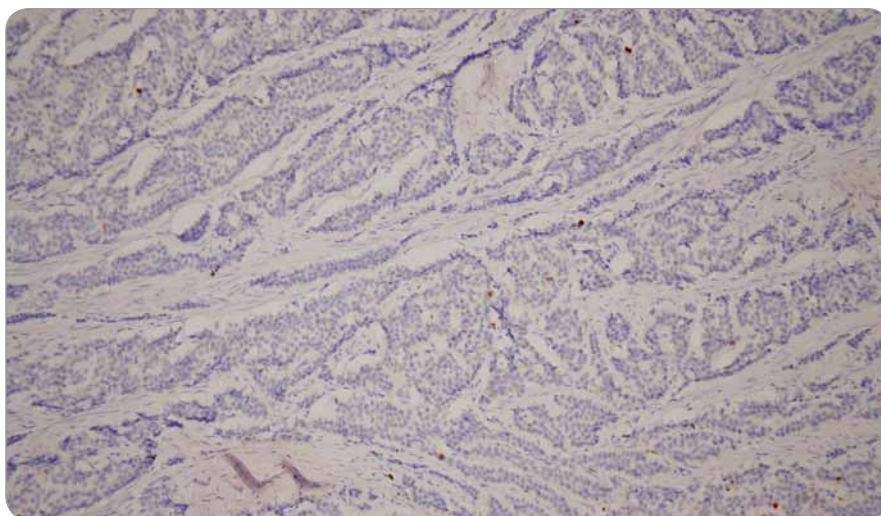
Obr. 1. Neuroendokrinný nádor G1. Hematoxylin eozin, 400x.

juna, ilea, apendixu, hrubého čreva, rekta a pankreasu. NEC G3 sa klasifikujú podľa kritérií TNM systému pre karcinómy príslušného orgánu. Oproti 7. vydaniu TNM klasifikácie nastali niektoré zmeny, pričom 8. vydanie AJCC a UICC akceptovalo TNM klasifikáciu navrhnutú spoločnosťou ENETS pre väčšinu orgánov, rozdiely sú len v T štádiách nádorov žalúdka a apendixu. Porovnanie T klasifikácií AJCC/UICC a ENETS je uvedené v tab. 3 so zvýraznením rozdielov medzi nimi. Na záver histopatologickej správy je potrebné uviesť použitú TNM klasifikáciu a vysvetliť, na základe ktorých faktorov bolo určené T štádium (veľkosť nádoru, rozsah invázie), aby bolo možné sa zorientovať medzi rôznymi klasifikáciami [1]. ENETS odporúča pre určenie stagingu vychádzať buď z TNM klasifikácie UICC/AJCC alebo ENETS, za najlepšie považuje použitie oboch klasifikácií [36].

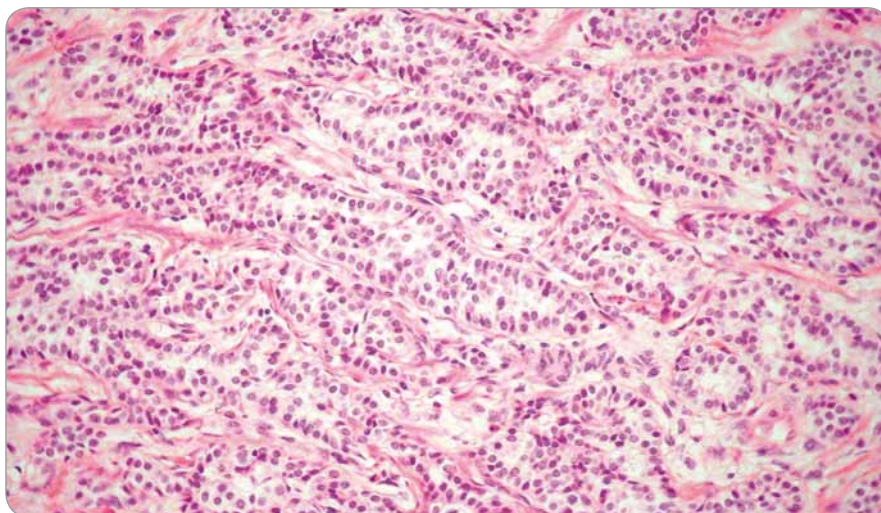
#### Všeobecná histopatologická a imunohistochemická charakteristika NENs

NENs sú často malé nádory žltej, žltomodrej až šedej farby, prekryté intaktnou alebo ulcerovanou sliznicou. V GIT vznikajú hlboko v sliznici, pomaly prerastajú všetky vrstvy sliznice, čoho dôsledkom je vznik malých tuhých uzlíkov prominujúcich do lúmenu orgánu. Žlté zafarbenie je spôsobené ukladaním cholesterolu a iných tukov. Po infiltrácii submukózy, lamina muscularis propria a serózy môžu nádory prerastať do okolitého tkaniva (napr. mezentéria). V prípade agresívnych tumorov sú časté metastázy do okolitých lymfatických uzlín a vzdialené metastázy hlavne do pečene a dutiny brušnej [37].

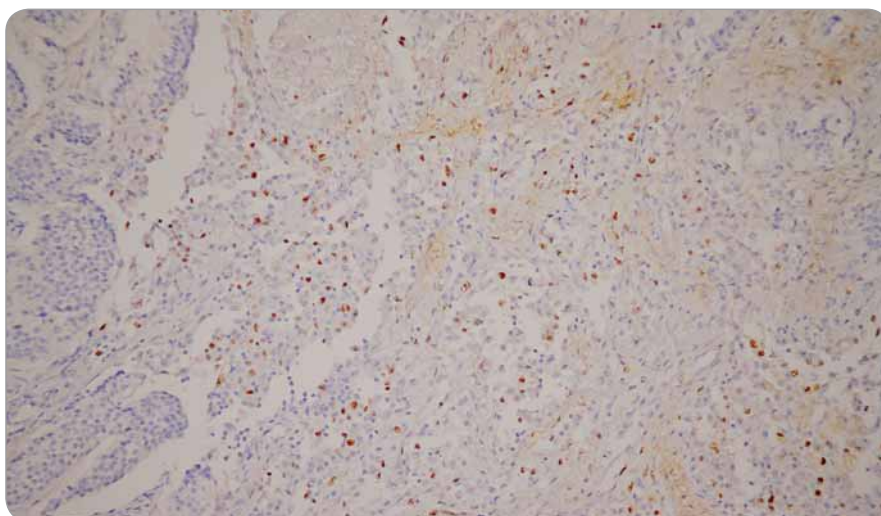
Histologicky sú NETs G1 (obr. 1, 2) charakterizované polygonálnymi bunkami s malým kompaktným, uniformným jadrom s jemne zrnitým chromatinom charakteru „salt and pepper“, obyčajne nenápadným jadriekom a s malým až stredným množstvom eozinofilnej cytoplazmy. Mitózy takmer chýbajú (< 2/10 HPF (high-power field)), zriedka sa vyskytuje angioinvázia, nekrózy nebývajú prítomné. Elektronovo-mikroskopicky sú pozorovateľné denzné granuly, ktoré obsahujú aktívne amíny a/alebo neuropeptidy.



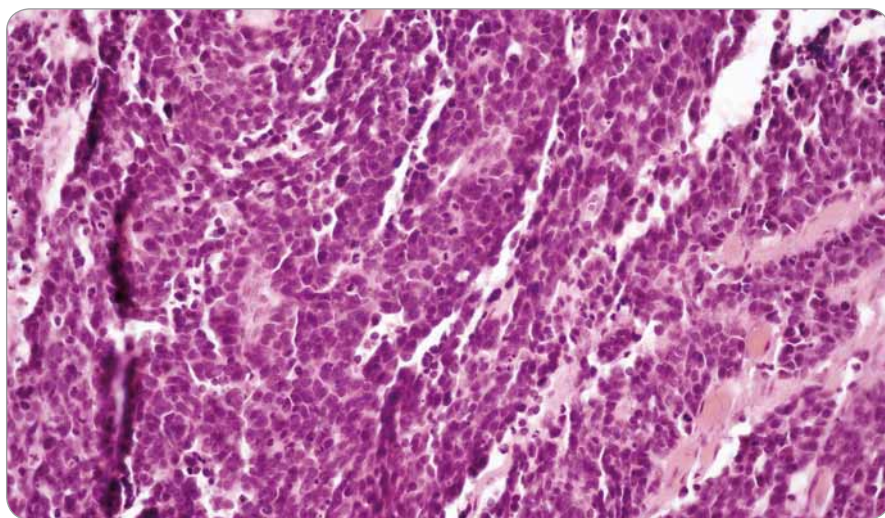
Obr. 2. Neuroendokrinný nádor G1. Imunohistochemické vyšetrenie s protilátkou proti Ki-67. Ojedinelá pozitívita Ki-67 < 2 %. 3,3-diaminobenzidín, 200x.



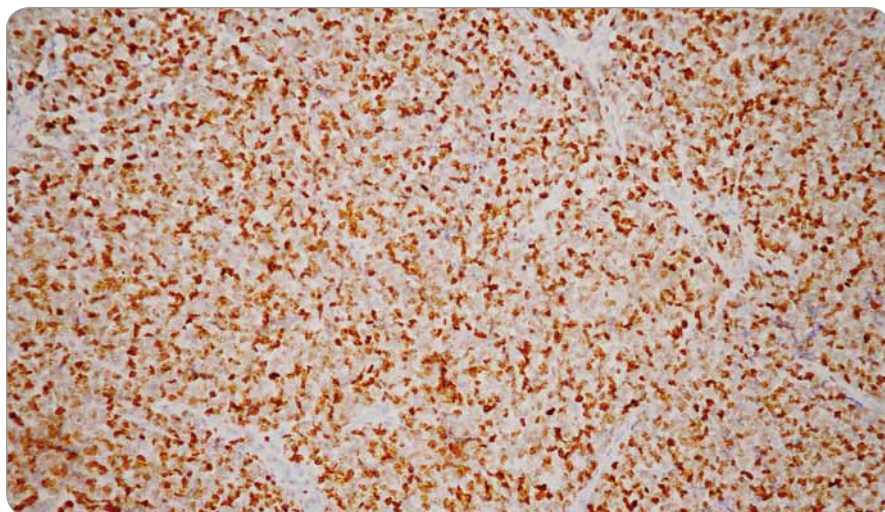
Obr. 3. Neuroendokrinný nádor G2. Hematoxylín eozín, 400x.



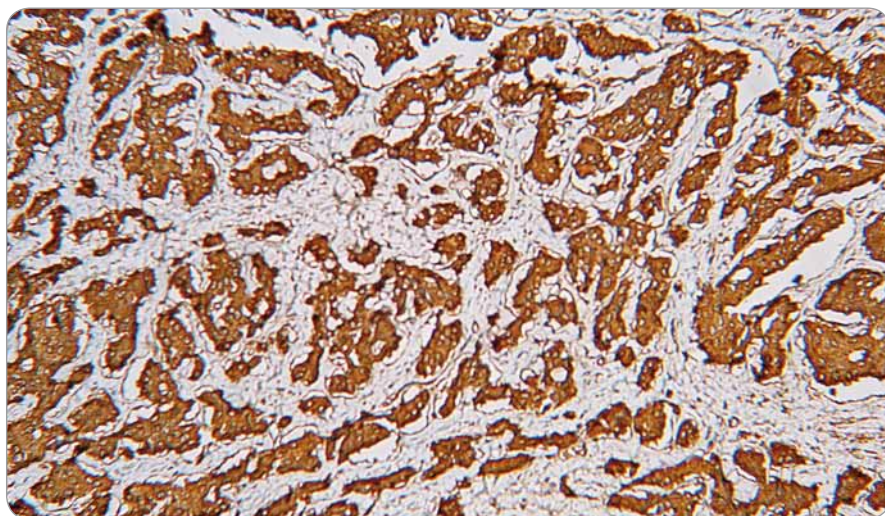
Obr. 4. Neuroendokrinný nádor G2. Imunohistochemické vyšetrenie s protilátkou proti Ki-67. Pozitívita Ki-67 2–20 %. 3,3-diaminobenzidín, 200x.



Obr. 5. Neuroendokrinný karcinóm G3. Hematoxylín eozín, 400×.



Obr. 6. Neuroendokrinný karcinóm G3. Imunohistochemické vyšetrenie s protilátkou proti Ki-67. Pozitivita Ki-67 > 20 %. 3,3-diaminobenzidín, 200×.



Obr. 7. Neuroendokrinný nádor. Imunohistochemické vyšetrenie s protilátkou proti chromogranínu. Silná difúzna pozitivita. 3,3-diaminobenzidín, 200×.

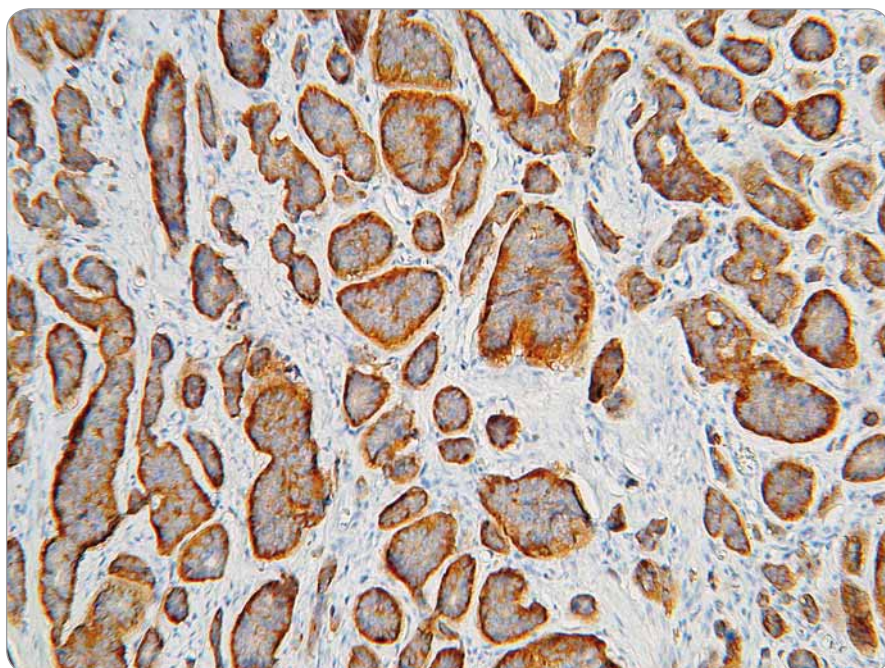
NETs G2 (obr. 3, 4) sú tvorené okrúhlymi až vretenovitými bunkami buď s veľkými vezikulárnymi jadrami a prominentnými eozinofilnými jadierkami alebo s menšími hyperchrómnymi jadrami s nepravidelným hrudkovitým chromatínom a malými jadierkami. Mitózy sú početnejšie (2–20/10 HPF), môžu byť aj atypické a ojedinele sa vyskytujú nekrózy.

NECs (obr. 5, 6) sú vysoko malígne, nízko diferencované G3 nádory pozostávajúce z anaplastických okrúhlych, polyhedrických až vretenovitých buniek. Mitózy sú početné (> 20/10 HPF), nekrózy sú rozsiahle a často multifokálne. Na základe veľkosti buniek a jadrových charakteristík sa NECs delia na malobunkový a veľkobunkový podtyp. Malobunkové karcinómy pozostávajú z malých okrúhlych, ovoidných alebo vretenovitých buniek s malým množstvom cytoplazmy. Jadrá obsahujú jemne zrnitý chromatín, bez viditeľných jadriek alebo len s nenápadnými jadierkami. Veľkobunkové NECs sú všeobecne tvorené strednými až veľkými bunkami s nepravidelným atypickým jadrom a prominentnými jadierkami. Jadro-cytoplazmový pomer je menší ako v prípade malobunkových karcinómov [29,38,39].

Pre nádory vychádzajúce z neuroendokrinných buniek je charakteristická imunohistochemická pozitivita markerov typických pre neuroendokrinnú diferenciáciu, ako sú chromogranín A (obr. 7), synaptofyzín (obr. 8), CD56 (neural cell adhesion molecule – NCAM1), neurón-špecifická enoláza (neuron-specific enolase – NSE) a PGP9.5 (protein gene product 9.5) [40]. Okrem toho sú tieto nádory schopné produkovať rôzne proteíny v závislosti od typu buniek a ich lokality, napr. serotónin, gastrín, somatostatín, pankreatický polypeptid, ghrelín. Expresiu spomínaných proteínov môžeme taktiež dokázať imunohistochemickými metódami.

#### Klinická manifestácia NENS

Typickým prejavom zvýšeného vylučovania peptidových hormónov z nádorov z neuroendokrinných buniek je skupina príznakov nazývaných karcinoidný syndróm. Za normálnych okolností dokáže



Obr. 8. Neuroendokrinný nádor. Imunohistochemické vyšetrenie s protilátkou proti syntafyzínu. Silná difúzna pozitivita. 3,3-diaminobenzidín, 200x.

Tab. 4. Príznaky najčastejších neuroendokrinných nádorov pankreasu [1].

Typ NETu pankreasu	Symptómy
inzulinóm	zmätenosť, nadmerné potenie, slabosť, závrať, bezvedomie, úľava po jedle
gastrinóm	Zollinger-Ellisonov syndróm, hnačky, alebo hnačky s peptickými ulceráciami
glukagonóm	nekrolytický migračný erytém, strata hmotnosti, diabetes mellitus, hnačky, stomatitída
VIPóm	Verner-Morrisonov syndróm, profúzne vodnaté hnačky s hypokaliémiou
nádor vylučujúci somatostatín	cholelitiáza, strata hmotnosti, hnačky a steatorea, diabetes mellitus
nefunkčné pankreatické NETs	symptómy spojené s nádorovou masou v pankrease, prípadne s pečeňovými metastázami

NET – neuroendokrinné nádory

pečeň pomerne rýchlo zmetabolizovať peptidové hormóny vylúčené týmito nádormi, čo však neplatí v prípade ich metastatického rozsevu do pečene. Prejavuje sa u 8–35 % pacientov a je často asociovaný s prítomnosťou NET G1 (karcinoidu) v tenkom čreve [41]. Karcinoidný syndróm vzniká účinkom serotonínu a iných vazoaktívnych látok, ktoré vstupujú do systémovej cirkulácie a ovplyvňujú pečeňový metabolizmus [42,43].

Karcinoidný syndróm zahŕňa rôzne príznaky. Opakujúce sa bolesti brucha sa najčastejšie objavujú pri karcinoidoch tenkého čreva. Kožné prejavy sú pomerne včasný a častý príznak (94 %). Typicky sa prejaví v oblasti hlavy a krku, je sprevádzaný nepríjemným pocitom tepla, svrbením, opuchom a erytémom hornej časti tela, zvýšeným slinením a slzením. Hnačka a malabsorpcia sa prejavujú až v 84 %. Stolicie sú ob-

jemné, penivé alebo je prítomná steatorrhea. Tento stav môže a nemusí byť spojený s bolesťou brucha, návalmi a kŕčmi. Až v 60 % môže dôjsť k srdcovej chybe na trikuspidálnej chlopni, fibróze endokardu, pulmonálnej stenóze. Piskoty alebo asthma-like syndrom sa objavujú v 25 % v dôsledku bronchiálnej konstriktie, čo neskôr môže vyústiť až do chronického kašľa a dyspnoe [44]. Funkčné PanNETs majú svoj vlastný špecifický klinický obraz (tab. 4) [1]. Klinický obraz NETs bez príznakov karcinoidného syndrómu je pomerne nešpecifický. Stanovenie vhodného diagnostického a terapeutického postupu si vyžaduje medziodborovú spoluprácu onkológov, endokrinológov, rádiológov, chirurgov a patológov.

#### NENs jednotlivých častí GIT

GEP-NENs predstavujú geneticky rôznorodú skupinu nádorov produkujúcich peptidové a ne-peptidové hormóny koordinujúce funkciu čriev. Tieto nádory môžu byť klinicky symptomatické, „funkčné“ alebo tiché, „nefunkčné“ [45]. V GIT existuje najmenej 13 typov neuroendokrinných buniek produkujúcich bioaktívne peptidy alebo amíny [42]. Tvorba jednotlivých hormónov je často závislá od lokalizácie primárneho nádoru (tab. 5).

Dáta z prieskumov hovoria o stúpajúcej incidencii NETs, čo môže byť aj dôsledkom zlepšenia a spresnenia diagnostických metód [46]. Najčastejšie NETs G1 (karcinoidy) v mužskej populácii nachádzame v tenkom čreve, v oblasti terminálneho ilea, u žien v apendixe [47]. Kým vo všeobecnosti majú dobre diferencované NETs skôr indolentný priebeh, nízko diferencované NECs sú charakteristické svojou agresivitou a skorým metastázovaním.

#### NENs pažeráka

NENs pažeráka sú pomerne vzácne a zriedkavé nádory, s incidenciou 0,05–7,6 % zo všetkých malignít pažeráka [48]. Tieto nádory rastú prevažne v dolnej tretine pažeráka, často sú asociované s Barrettovým ezofágom [49]. Väčšina NENs pažeráka sú NECs G3 alebo zmiešané adenoneuroendokrinné karcinómy [22]. Celkovo sa považujú za nádory s agresívnym správaním a zlou prognózou.

**NENs žalúdka**

Žalúdočné NENs boli v minulosti považované za nádory s pomerne nízkym výskytom, predstavovali < 2 % zo všetkých gastrointestinálnych NENs a < 1 % zo

všetkých nádorov žalúdka. V dôsledku zvýšeného počtu gastroscopických vyšetrovaní stúpa zachyt týchto nádorov, posledné analýzy hovoria o vzostupe ich výskytu na >10 % [50,51].

Väčšinu NENs žalúdka tvoria NETs – dobre diferencované, nefunkčné nádory z buniek podobných enterochromafinným (enterochromaffin like cells – ECL), vznikajúce predovšetkým v oblasti tela a fundu žalúdka. Podľa WHO aj ENETS rozlišujeme tri typy gastrických NENs, ich rozpoznanie je dôležité pre určenie správneho diagnostického postupu a liečby (tab. 6) [22,52,53].

Typy 1 a 2 vznikajú ako dôsledok vplyvu zvýšenej gastrinémie na enterochromafinné bunky v mukóze tela a fundu žalúdka [54]. Žalúdočné NENs 1. a 2. typu sú väčšinou mnohopočetné tumory, menšie ako 1–1,5 cm a sú obmedzené na mukózu, menej submukózu, bez prieniku do lamina muscularis propria. Typ 1 predstavuje najčastejšiu gastrickú NEN, tvorí až 80 % zo všetkých žalúdočných NENs [33,55]. Ide často o malé multifokálne lézie asociované s autoimunitnou chronickou atrofickou gastritídou.

**Tab. 5. Produkcia hormónov v závislosti od lokalizácie nádoru [47].**

Lokalizácia	Hormóny
žalúdok	histamín, gastrín, serotonín, somatostatín
duodenum	gastrín, serotonín, somatostatín
jejunum	
ileum	enteroglukagón, serotonín, substancia P, tachykinin
cékum	
apendix	enteroglukagón, peptid YY, serotonín, somatostatín
kolon	enteroglukagón, serotonín, somatostatín
rektum	
pankreas	ACTH, kalcitonín, cholecystokinín, glukagón, gastrín, insulín, neurotensín, pankreatický polypeptid, prolaktín, somatostatín, vazopresín, intestinálny peptid

ACTH – adrenokortikotropný hormón

**Tab. 6. Klasifikácia gastrických NENs podľa ENETS [52].**

	Typ 1	Typ 2	Typ 3
% zastúpenie v skupine NENs	70–80	5–6	14–15
charakteristika nádoru	< 1–2 cm, mnohopočetné, polypoidné	< 1–2 cm, mnohopočetné, polypoidné	> 2 cm, polypoidné s ulceráciami
sprevádzajúce ochorenie	atrofická gastritída	gastrinóm / MEN 1	žiadne
grading	G1–G2 NET	G1–G2 NET	G3 NEC
WHO 2010 klasifikácia	G1	G1/G2	G1–G3
hladiny gastrinu v sére	miernie zvýšené	miernie zvýšené	fyziológické
% metastáz	2–5	10–30	50–100

NEN – neuroendokrinné neoplázie, NET – neuroendokrinné nádory, NEC – neuroendokrinné karcinómy, ENETS – Európska spoločnosť neuroendokrinných nádorov

**Tab. 7. Porovnanie WHO klasifikácií neuroendokrinných neoplázií pankreasu [24].**

WHO 1980	WHO 2000/2004	WHO 2010	WHO 2017
nádor z ostrovčekových buniek (adenóm/karcinóm)	dobře diferencovaný endokrinný tumor/karcinóm (WDET/WDEC)	NET G1/G2	NET G1/G2/G3 dobře diferencovaná NEN
nízko diferencovaný endokrinný karcinóm	nízko diferencovaný endokrinný karcinóm/malobunkový karcinóm (PDEC)	NEC (G3), veľkobunkový alebo malobunkový typ	NEC (G3), veľkobunkový alebo malobunkový typ (nízko diferencovaná NEN)
	zmiešaný exokrinný-endokrinný karcinóm (MEEC)	zmiešaný adenoneuroendokrinný karcinóm	zmiešaná neuroendokrinná - ne-neuroendokrinná neoplázia

NET – neuroendokrinné nádory, NEN – neuroendokrinné neoplázie, NEC – neuroendokrinné karcinómy

tídou a hypergastrinemiou [45,56]. Typ 2 žalúdočná NEN predstavuje približne 5 % zo všetkých žalúdočných NENs [55]. Typicky sa prejavuje zväčšením žalúdka so zhrubnutou stenou v dôsledku hypertroficko-hypersekretorickej gastropatie a početných slizničných a podslizničných lézií. Tento typ je asociovaný s mnohopočetnou NENs typu 1 (MEN1) a Zollinger-Ellisonovým syndrómom (ZES), ktoré vznikajú v dôsledku autozomálne dominantnej mutácie MEN1 génu na chromozóme 11q13. Nádory produkujúce gastrín (gastrinómy) typicky prítomné u pacientov s MEN1-ZES vedú k hypergastrinémii s následným vývojom hyperplázie ECL buniek, dysplázie a NEN 2. typu [54,56]. Tento typ sa zriedka vyskytuje u pacientov so sporadickým ZES [57].

Nádory 3. typu predstavujú sporadické NENs, ktoré vznikajú pri fyziologických hladinách gastrínu v mukóze žalúdka bez významnej patológie a tvoria okolo 13 % zo všetkých žalúdočných NENs. Sú agresívnejšie ako NENs 1. a 2. typu, často ide o väčšie, hlboko invadujúce, metastazujúce, G3 nádory [52].

Niektorí autori uvádzajú aj 4. typ NENs [55]. Makroskopicky ide o mnohopočetné malé lézie, histologický obraz odhalí hypertrofiu a hyperpláziu parietálnych buniek.

NEC žalúdka patrí medzi raritné nádory [55]. Predstavuje nízko diferencovaný, vysoko malígny nádor, ktorý väčšinou v čase diagnózy invaduje hlboko do steny žalúdka a infiltruje lymfatické a krvné cievy [58].

### NENs tenkého čreva

NENs tenkého čreva je možné rozdeliť na základe miesta výskytu na dve skupiny, nádory hornej časti tenkého čreva (duodenum a proximálne jejunum) a nádory dolnej časti tenkého čreva (distálne jejunum, ileum a Meckelov divertikel).

#### Duodenum a proximálne jejunum

Jedná sa o pomerne zriedkavé nádory, rádovo tvoria 5,7–7,9 % zo všetkých NETs [33]. V duodéne sa v rámci NENs najčastejšie vyskytujú NETs. Bolo opísaných päť typov duodenálnych NENs na základe hormonálnej látky, ktorú zvyšene produkujú. Gastrín-produkujúce

NENs sa vyskytujú sporadicky alebo ako súčasť MEN1-ZES, môžu byť nefunkčné alebo funkčné (gastrinómy). Svojím výskytom patria medzi najčastejšie NENs, tvoria 62 % zo všetkých NENs duodéna a proximálneho jejunum [56,58]. Somatostatín-produkujúci nádor predstavuje druhý typ duodenálnych NENs vyskytujúci sa prevažne v ampulárnej/periampulárnej časti duodéna, často asociovaný s von Recklinghausenovou chorobou (neurofibromatóza typ 1) [59]. Medzi ďalšie patrí gangliocytický paraganglióm [47], nefunkčný NET s obsahom serotonín- a kalcitonín-pozitívnych buniek [58] a NEC [59].

#### Distálne jejunum a ileum

V oblasti distálneho jejunum a ileum sa vyskytujú len NETs (karcinoidy), NECs neboli v týchto oblastiach popísané. Väčšina nádorov sa nachádza v terminálnom ileu a najčastejšie ide o serotonín-produkujúce NETs z enterochromafinných buniek, ktoré na základe proliferatívnej aktivity spadajú do kategórie G1. V ileu sa vyskytuje až 49,9 % intestinálnych NETs [33]. Približne 8 % ileálnych NETs je asociovaných s karcinoidným syndrómom [22].

#### Apendix

NET apendixu patrí medzi najčastejšie apendikálne tumory [60] náhodne nájdené pri apendektómii, až 90 % je menších ako 1 cm [58]. Zo všetkých nádorov apendixu NETs predstavujú až 85 % [35]. Najčastejšie ide o serotonín-produkujúce nádory vychádzajúce z enterochromafinných buniek. Apendikálne NETs < 2 cm metastazujú pomerne zriedkavo, avšak s veľkosťou nádoru rastie aj výskyt metastáz [51,60].

#### NENs hrubého čreva a rekta

NENs sa najčastejšie vyskytujú v rekte, menej v céku, colon sigmoideum, rektosigmoideum a colon ascendens. Ide prevažne o NETs, ktoré podľa proliferatívnej aktivity spadajú do skupiny G1. NECs sú zriedkavé, no v porovnaní s inými časťami GIT sa v kolorekte vyskytujú častejšie [22].

#### Hrubé črevo

NENs hrubého čreva sú veľmi zriedkavé. Klinicky sa prezentujú poruchami vy-

prázdňovania, gastrointestinálnym krvácaním, bolesťami brucha, stratou hmotnosti. Asymptomatické lézie, ktoré sa nájdu počas skriningovej kolonoskopie, sú spravidla neodlíšiteľné od iných lézií hrubého čreva.

#### Rektum

Tieto nádory sú často asymptomatické, malé lézie nájdené náhodne pri endoskopickom vyšetrení. V lokalizovanej forme je v čase diagnózy 75–85 % nádorov [61]. Nádory submukózy < 1 cm predstavujú až 80 % rektálnych NETs [47].

#### NENs pankreasu

PanNENs sú pomerne zriedkavé nádory predstavujúce 1–3 % zo všetkých malígnych pankreasu [33, 62–64]. WHO klasifikácia a grading PanNENs sa líši od ostatných gastrointestinálnych NENs (tab. 7). Pováčšine sa jedná o dobre diferencované NETs (40–91 %) [64].

NETs sa môžu klinicky prejavovať hormonálnym syndrómom v dôsledku hypersekrecie hormónov buď vlastných endokrinnému pankreasu alebo iných. Hovoríme o „funkčných, syndrómových NETs“ (inzulinóm, gastrinóm, glukagonóm). NETs, ktorých bunky exprimujú špecifický hormón, no neprejavujú sa klinicky, nazývame „nefunkčné, nesyndrómové NETs“ a v diagnostickom závere píšeme, z akých buniek vychádzajú, napr. z  $\alpha$ -buniek/glukagón-produkujúci NET, z  $\beta$ -buniek/inzulín-produkujúci NET, z G-buniek/gastrín produkujúci NET.

V minulosti tvorili funkčné PanNETs 60–80 %, no v súčasnosti sa ukazuje prevažne nefunkčných PanNETs (> 60 %) [24]. PanNETs sú väčšinou sporadické nádory, no môžu sa vyskytovať aj ako súčasť vrodených syndrómov, najčastejšie u pacientov s MEN1 syndrómom (gastrinóm, inzulinóm) a von Hippel Lindau (VHL) syndrómom (väčšinou nefunkčné nádory) [65].

#### Záver

GEP-NENs sú zriedkavé nádory, ktoré sa môžu prejavovať typickými príznakmi karcinoidného syndrómu. V takom prípade je diagnostika s využitím biochemických, zobrazovacích a bioptických metód poväčšine nenáročná. Karcinoidný syndróm

sa však prejaví len v 8–35 % prípadov. U ostatných pacientov sú príznaky nešpecifické, alebo sú nádory asymptomatické, často náhodené náhodne v chirurgickom resekaté odstránenom z inej indikácie. Vzhľadom na bezpríznakovosť časti nádorov, často ich malé rozmery a lokalitu v oblastiach čreva ťažko dostupných endoskopickému vyšetreniu sú GEP-NENS mnoho ráz objavené v pokročilom štádiu, v štádiu infiltrácie do okolitých štruktúr, v štádiu lymfogénneho a hematogénneho rozsevu. Základom úspešnej diagnostiky a liečby je myslieť na ne v rámci diferenciálne-diagnostického postupu. Vďaka v súčasnosti dostupným vysoko senzitívnym diagnostickým zobrazovacím metódám je možné zachytiť ochorenie vo včasnom štádiu, kedy je terapia najefektívnejšia. Nemenej dôležitá z hľadiska diagnostiky a liečby je exaktná histopatologická klasifikácia s určením gradingu a stagingu podľa presne stanovených kritérií v súlade s najnovšími klasifikačnými schémami a odporúčaniami s ohľadom na lokalitu nádoru.

V literatúre aj v odbornej verejnosti sa často používajú pojmy karcinoid, NET či NEC synonymicky, no z hľadiska názvoslovnia a klasifikácie je potrebné si osvojiť správnu terminológiu. Ako NENS označujeme celú skupinu nádorov z neuroendokrinných buniek GIT, ide teda o všeobecnejšie pomenovanie. NET označujú dobre diferencované nádory s gradíngom G1 (karcinoidy) a G2. NEC charakterizujú nízko diferencované nádory G3. Len správna a jednotná terminológia a klasifikácia nádorov z neuroendokrinných buniek umožní bezproblémovú komunikáciu medzi špecialistami z jednotlivých odborov a zabezpečí správne zvolenú liečbu a menežment pacientov s týmto zriedkavým, no spoločensky významným ochorením.

## Literatúra

- Ramage JK, Ahmed A, Ardill J et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours (NETs). *Gut* 2012; 61(1): 6–32. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300831.
- Rosai J. The origin of neuroendocrine tumours and the neural crest saga. *Mod Pathol* 2011; 24 (Suppl 2): S53–S57. doi: 10.1038/modpathol.2010.166.
- Matějka VM, Fiala O, Tupý R et al. Chylózní ascites jako závažná komplikace neuroendokrinního tumoru ilea – kazuistika. *Klin Onkol* 2013; 26(5): 358–361. doi: 10.14735/amko2013358.
- Esmati E, Babaei M, Matini A et al. Neuroendocrine carcinoma of the tongue. *J Cancer Res Ther* 2015; 11(3): 659. doi: 10.4103/0973-1482.139395.
- Dvorackova J, Macak J, Brzula P et al. Primary neuroendocrine carcinoma of the kidney. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2013; 157(3): 257–260. doi: 10.5507/bp.2012.053.
- Li Z, Chen CJ, Wang JK et al. Neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Asian J Androl* 2013; 15(3): 328–332. doi: 10.1038/aja.2013.7.
- Moratalla Charcos LM, Pastor Navarro T, Cortes Vizcaino V et al. Large-cell neuroendocrine carcinoma of prostate. *Arch Esp Urol* 2013; 66(4): 368–371.
- Lindboe CF. Large cell neuroendocrine carcinoma of the ovary. *APMIS*. 2007; 115(2): 169–176. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_570.x.
- Aslam MF, Choi C, Khulpateea N. Neuroendocrine tumour of the ovary. *J Obstet Gynaecol* 2009; 29(5): 449–451. doi: 10.1080/01443610902946903.
- Hanna MY, Leung E, Rogers C et al. Primary large-cell neuroendocrine tumor of the breast. *Breast J* 2013; 19(2): 204–206. doi: 10.1111/tbj.12081.
- Rehman A. Primary neuroendocrine carcinoma of the breast. *J Coll Physicians Surg Pak* 2013; 23(4): 282–284. doi: 04.2013/JCPSP.282284.
- Ueda G, Yamasaki M. Neuroendocrine carcinoma of the uterus. *Curr Top Pathol* 1992; 85: 309–335.
- Schmidt D. Neuroendocrine tumors of the uterus. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1997; 81: 260–265.
- Tan EH, Tan CH. Imaging of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World J Clin Oncol* 2011; 2(4): 28–43. doi: 10.5306/wjco.v2.i1.28.
- Vitek P, Strenkova J, Sedláčková E et al. Registry neuroendokrinných nádorů (NET) v ČR po třech letech sběru dat. *Klin Onkol* 2013; 26(4): 271–280. doi: 10.14735/amko2013271.
- Leoncini E, Boffetta P, Shafir M et al. Increased incidence trend of low-grade and high-grade neuroendocrine neoplasms. *Endocrine* 2017; 58(2): 368–379. doi: 10.1007/s12020-017-1273-x.
- de Herder WW, Rehfeld JF, Kidd M et al. A short history of neuroendocrine tumours and their peptide hormones. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016; 30(1): 3–17. doi: 10.1016/j.beem.2015.10.004.
- Modlin IM, Shapiro MD, Kidd M et al. Siegfried oberndorfer and the evolution of carcinoid disease. *Arch Surg* 2007; 142(2): 187–197. doi: 10.1001/archsurg.142.2.187.
- Rehfeld JF, Federspiel B, Bardram L. A neuroendocrine tumor syndrome from cholecystokinin secretion. *N Engl J Med* 2013; 368(12): 1165–1166. doi: 10.1056/NEJMc1215137.
- Williams ED, Sandler M. The classification of carcinoid tumours. *Lancet* 1963; 1(7275): 238–239.
- Capella C, Heitz PU, Hoffer H et al. Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch* 1995; 425(6): 547–560.
- Bosman FT CF, Hruban RH, Theise ND. WHO Classification of tumours of the digestive system. Fourth edition. WHO 2010: 417.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: Impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol* 2015; 10(9): 1243–1260. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.
- Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G et al. WHO classification of tumours of endocrine organs. Fourth edition. WHO 2017: 355.
- Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D et al. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 2010; 39(6): 707–712. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181ec124e.
- Rindi G, Arnold R, Bosman FT et al. Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. 4th edition. In: Classification of tumour of the digestive system. Lyon: IARC Press 2010.
- Travis WD. The concept of pulmonary neuroendocrine tumours. In: Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink (eds). Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press; 2004.
- Enets.org. [online]. Available from: [https://www.enets.org/current\\_guidelines.html](https://www.enets.org/current_guidelines.html).
- Hirabayashi K, Zamboni G, Nishi T et al. Histopathology of gastrointestinal neuroendocrine neoplasms. *Frontiers in oncology* 2013; 3: 2. doi: 10.3389/fonc.2013.00002.
- Rindi G, Klöppel G, Alhman H et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2006; 449(4): 395–401. doi: 10.1007/s00428-006-0250-1.
- Rindi G, Klöppel G, Couvelard A et al. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 2007; 451(4): 757–762. doi: 10.1007/s00428-007-0452-1.
- Yang Z, Tang LH, Klimstra DS. Effect of tumor heterogeneity on the assessment of Ki67 labeling index in well-differentiated neuroendocrine tumors metastatic to the liver: implications for prognostic stratification. *Am J Surg Pathol* 2011; 35(6): 853–860. doi: 10.1097/PAS.0b013e31821a0696.
- Kim JY, Hong SM, Ro JY. Recent updates on grading and classification of neuroendocrine tumors. *Annals of diagnostic pathology* 2017; 29: 11–16. doi: 10.1016/j.andiagpath.2017.04.005.
- Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (eds). TNM Classification of malignant tumours. Hoboken: Wiley Blackwell 2017: 253.
- Amin MB, Edge S, Greene F (eds). AJCC Cancer Staging Manual. New York: Springer 2017: 1032.
- Pape UF, Niederle B, Costa F et al. ENETS consensus guidelines for neuroendocrine neoplasms of the appendix (excluding goblet cell carcinomas). *Neuroendocrinology* 2016; 103(2): 144–152. doi: 10.1159/000443165.
- Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist K et al. The epidemiology of metastases in neuroendocrine tumors. *Int J Cancer* 2016; 139(12): 2679–2686. doi: 10.1002/ijc.30400.
- Elizabeth A. Montgomery MD LVM. Biopsy interpretation of the gastrointestinal tract mucosa: volume 2: neoplastic. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2012: 352.
- Kumar V, Abbas A, Fausto N (eds). Robbins and cotran pathologic basis of disease. Eighth edition. Philadelphia: Elsevier 2010: 1464.
- Ramage JK, Davies AH, Ardill J et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours. *Gut* 2005 54 (Suppl 4): 1–16. doi: 10.1136/gut.2004.053314.
- Rorstad O. Prognostic indicators for carcinoid neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *J Surg Oncol* 2005; 89(3): 151–160. doi: 10.1002/jso.20179.
- Jes A. Circulating markers for endocrine tumours of the gastrointestinal tract. *Ann Clin Biochem* 2008; 45(5): 451. doi: 10.1258/acb.2008.200825.
- Modlin IM, Oberg K, Chung DC et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 2008; 9(1): 61–72. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70410-2.
- Uskul BT, Turker H, Dincer IS et al. A primary tracheal carcinoid tumor masquerading as chronic obstructive pulmonary disease. *South Med J* 2008; 101(5): 546–549. doi: 10.1097/SMJ.0b013e31816bf624.
- Modlin IM, Kidd M, Latich I et al. Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* 2005; 128(6): 1717–1751.
- Oberg KE. Gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Ann Oncol* 2010; 21 (Suppl 7): 72–80. doi: 10.1093/annonc/mdq290.
- Salyers WJ, Vega KJ, Munoz JC et al. Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract: Case reports and literature review. *World J Gastrointest Oncol* 2014; 6(8): 301–310. doi: 10.4251/wjgo.v6.i8.301.



48. Egashira A, Morita M, Kumagai R et al. Neuroendocrine carcinoma of the esophagus: Clinicopathological and immunohistochemical features of 14 cases. *PLoS One* 2017; 12(3): e0173501. doi: 10.1371/journal.pone.0173501.
49. Deng HY, Ni PZ, Wang YC et al. Neuroendocrine carcinoma of the esophagus: clinical characteristics and prognostic evaluation of 49 cases with surgical resection. *Journal of thoracic disease* 2016; 8(6): 1250–1256. doi: 10.21037/jtd.2016.04.21.
50. Jung M, Kim JW, Jang JY et al. Recurrent gastric neuroendocrine tumors treated with total gastrectomy. *World J Gastroenterol* 2015; 21(46): 13195–13200. doi: 10.3748/wjg.v21.i46.13195.
51. Kulke MH, Shah MH, Benson AB et al. Neuroendocrine tumors, version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw* 2015; 13(1): 78–108.
52. Delle Fave G, O'Toole D, Sundin A et al. ENETS Consensus guidelines update for gastroduodenal neuroendocrine neoplasms. *Neuroendocrinology* 2016; 103(2): 119–124. doi: 10.1159/000443168.
53. Scherubl H, Cadiot G, Jensen RT et al. Neuroendocrine tumors of the stomach (gastric carcinoids) are on the rise: small tumors, small problems? *Endoscopy* 2010; 42(8): 664–671. doi: 10.1055/s-0030-1255564.
54. von Rosenvinge EC, Wank SA, Lim RM. Gastric masses in multiple endocrine neoplasia type I-associated Zollinger-Ellison syndrome. *Gastroenterology* 2009; 137(4): 1222–1237. doi: 10.1053/j.gastro.2009.03.050.
55. Dias AR, Azevedo BC, Alban LBV et al. Gastric Neuroendocrine Tumor: Review and Update. *Arq Bras Cir Dig* 2017; 30(2): 150–154. doi: 10.1590/0102-6720201700020016.
56. Kloppel G, Perren A, Heitz PU. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014: 13–27.
57. Delle Fave G, Capurso G, Milione M et al. Endocrine tumours of the stomach. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19(5): 659–673. doi: 10.1016/j.bpg.2005.05.002.
58. Modlin IM, Oberg K, Chung DC et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol* 2008; 9(1): 61–72. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70410-2.
59. Makhoulouf HR, Burke AP, Sobin LH. Carcinoid tumors of the ampulla of Vater: a comparison with duodenal carcinoid tumors. *Cancer* 1999; 85(6): 1241–1249.
60. Pasieka JL. Carcinoid tumors. *Surg Clin North Am* 2009; 89(5): 1123–1137. doi: 10.1016/j.suc.2009.06.008.
61. Louthan O. Neuroendokrinní nádory rekta. *Klin Onkol* 2009; 22(5): 195–201.
62. Batchelor E, Madaj P, Gianoukakis AG. Pancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr Res* 2011; 36(1): 35–43. doi: 10.3109/07435800.2010.525085.
63. Krampitz GW, Norton JA. Pancreatic neuroendocrine tumors. *Curr Probl Surg* 2013; 50(11): 509–545. doi: 10.1067/j.cpsurg.2013.08.001.
64. Klimstra DS, Beltran H, Lilenbaum R et al. The spectrum of neuroendocrine tumors: histologic classification, unique features and areas of overlap. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015: 92–103. doi: 10.14694/EdBook\_AM.2015.35.92.
65. Falconi M, Eriksson B, Kaltsas G et al. ENETS consensus guidelines update for the management of patients with functional pancreatic neuroendocrine tumors and non-functional pancreatic neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 2016; 103(2): 153–171. doi: 10.1159/000443171.

# Možná úloha ľudských herpetických vírusov podčel'ade Alphaherpesvirinae pri vzniku niektorých nádorových ochorení

## A Possible Role of Human Herpes Viruses Belonging to the Subfamily Alphaherpesvirinae in the Development of Some Cancers

Mrázová V., Golais F., Búda D.

Katedra Mikrobiológie a virológie, PriF UK, Bratislava

### Súhrn

Ľudské vírusy herpes simplex typ 1 a 2 (HSV-1, HSV-2) sa väčšinou na základe séroepidemiologických štúdií dávajú do súvislosti s viacerými nádorovými ochoreniami. Nepredpokladá sa však, že by pri vzniku nádorov mali priamu úlohu. Pôsobia pravdepodobne len ako kofaktory. Experimentálne sa podarilo dokázať ich schopnosť transformovať bunky *in vitro* odstránením ich vysokej lytickej schopnosti určitou dávkou UV žiarenia alebo fotoinaktiváciou v prítomnosti fotosenzitizérov, napr. neutrálnej červene alebo metylénovej modrej alebo kultiváciu v podmienkach potláčajúcich ich lytickú schopnosť. K vzniku nádorov by mohli prispieť niekoľkými mechanizmami. Podľa mechanizmu „hit and run“ navodí vírusová DNA interakciu s bunkovou DNA a indukciou genetických a epigenetických zmien len iniciáciu transformácie a na ďalšom procese neoplastickej progresie sa už nepodiela. Podľa mechanizmu „hijacking“ môže vírusový produkt v infikovaných bunkách aktivovať signálnu dráhu a spôsobiť tým nekontrolovateľnú proliferáciu. Takýmto produktom je napr. produkt génu HSV-2 označovaného ako ICP10, ktorý kóduje onkoproteín RR1PK aktivujúci signálnu dráhu Ras. V dvoch prípadoch, v prípade serózneho karcinómu vaječníkov a v niektorých nádoroch prostaty boli dokázané vírusom kódované mikroRNA ako možní spolopôvodcovia vzniku nádorov. Možnú úlohu by mohli hrať aj nedávno popísané rastové faktory asociované s herpetickými vírusmi s transformačným a transformáciu potláčajúcim účinkom. Nakoniec, existuje rad dôkazov, že HSV-2 môže zvyšovať riziko vzniku cervikálneho karcinómu po infekcii s ľudskými papilómovými vírusmi.

### Kľúčové slová

HSV-1 – HSV-2 – nádory – mechanizmy transformácie

### Summary

Seroepidemiological studies suggest that human herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2) are linked with several types of cancer; however, they do not appear to play a direct role and are considered to be cofactors. The abilities of HSV-1 and -2 to transform cells *in vitro* can be demonstrated by suppressing their lytic ability via irradiation with a specific dose of ultraviolet light, photoinactivation in the presence of photosensitizers (e.g., neutral red or methylene blue), and culture under specific conditions. Several mechanisms have been proposed to explain the actions of these viruses. According to the hit-and-run mechanism, viral DNA initiates transformation by interacting with cellular DNA and thereby inducing mutations and epigenetic changes, but is not involved in other stages of neoplastic progression. By contrast, according to the hijacking mechanism, viral products in infected cells can activate signaling pathways and thereby cause uncontrolled proliferation. Such products include RR1PK, an oncoprotein that activates the Ras pathway and is encoded by the HSV-2 gene ICP10. Virus-encoded microRNAs may act as cofactors in tumorigenesis of serous ovarian carcinoma and some prostate tumors. Herpes virus-associated growth factors that facilitate or suppress transformation may play important roles in tumor formation. Finally, there is much evidence that HSV-2 increases the risk of cervical cancer after infection of human papilloma viruses.

### Key words

HSV-1 – HSV-2 – cancer – mechanisms of transformation

Tato práca bola podporená APVV 0621-12.

This work was supported by APVV 0621-12.

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 recommendation for biomedical papers.



Mgr. Veronika Mrázová

Onkologický ústav sv. Alžbety  
Katedra Mikrobiológie a virológie  
PriF UK

Mlynská dolina  
Ilkovičova 6  
842 15 Bratislava

e-mail:  
mrazova.veronika1@gmail.com

Obdržané/Submitted: 29. 11. 2016  
Prijaté/Accepted: 20. 3. 2018

doi: 10.14735/amko2018178

## Úvod

Ľudské herpetické vírusy podčelade Alphaherpesvirinae, Herpes simplex vírus typ 1 (HSV-1) známy ako pôvodca oparu a Herpes simplex vírus typ 2 (HSV-2), pôvodca genitálneho herpesu sú v ľudskej populácii početne rozšírené. Za normálnych okolností spôsobujú pľuzgieriky na koži a slizniciach. Po primárnej infekcii ostávajú po celú dobu života hostiteľa v stave latencie. Genóm HSV-1 ostáva latentný v senzorických neurónoch ganglia trojklaného nervu, kým genóm HSV-2 sa nachádza v sakrálnom gangliu. Spontánne alebo vplyvom rozličných stimulov dochádza k aktivácii latencie a vzniku sekundárnych herpetických infekcií. Je však možná aj alternatívna cesta vedúca k transformácii a vzniku nádorov. Táto možnosť je u HSV-1 a HSV-2 zatiaľ len hypotetická [1]. U niektorých iných ľudských herpetických vírusov patriacich do iných podčeladi bola dokázaná onkogenita a sú považované za pôvodcov niektorých nádorových ochorení. Tak napr. vírus Epstein a Barrovej (EBV), pôvodca infekčnej mononukleózy, je asociovaný s určitými druhmi nádorov ako sú napr. Hodgkinov lymfóm, Burkittov lymfóm, rakovina žalúdka alebo nazofaryngeálny karcinóm [2,3]. Podobne onkogénny je aj vírus asociovaný s Kaposiho sarkómom (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus – KSAV) [4]. U HSV-1 a HSV-2 nebol dokázaný vzťah k nijakým nádorovým ochoreniam. Predpokladá sa však, že v niektorých prípadoch by mohli mať nepriamu úlohu a pôsobiť ako kofaktory alebo kokancerogény. Metgut et al [5] a Gupta a Metgut [6] sa domnievajú, že takúto úlohu by mohli HSV-1 a HSV-2 mať pri vzniku orálneho karcinómu, v oboch prípadoch sa však jednalo len o nepotvrdené hypotézy. Existuje však rad nepriamych biologických a seroepidemiologických dôkazov ako aj experimentov na zvieratách, ktoré poukazujú na možný vzťah HSV-1 a HSV-2 k niektorým nádorovým ochoreniam.

## Seroepidemiologické a biologické štúdie

Už v 70. a 80. rokoch minulého storočia bolo množstvo prác, ktoré poukazovali

na to, že pacienti s niektorými nádorovými ochoreniami majú zvýšenú hladinu protilátok voči HSV-1 a HSV-2. V tomto smere je najlepšie preštudovaný cervikálny karcinóm, ktorý sa dáva do vzťahu k HSV-2 [7–9]. V bunkách cervikálneho karcinómu kultivovaných *in vitro* boli dokázané vírus-špecifické antigény [10–12], v jednom prípade došlo v týchto nádorových bunkách aj k aktivácii latentného HSV-2 [13]. Podobné výsledky sú dosahované aj v súčasnosti, Li a Wen [14] považujú sérostatus HSV-2 za nezávislý indikátor cervikálnych nádorov. Koanga et al [15] sa domnievajú, že infekcia s HSV-2 by mohla hrať pri vzniku cervikálneho karcinómu nepriamu úlohu navodením zápalového procesu vedúceho ku genotoxickým poškodeniam. Tomkins et al [16] dokázali v prípade infekcie s HSV-2 patologické zmeny pripomínajúce cervikálny nádor bez prítomnosti ľudských vírusov papilómov (human papilloma viru – HPV).

Na druhej strane Vonka et al [17] nedokázali nijaký vzťah medzi výskytom cervikálneho karcinómu a výskytom protilátok voči HSV-2, aj keď nepriamu úlohu tohto vírusu nevylúčili, a také isté výsledky dosiahli aj Lehtinen et al [18]. V súčasnosti sú však za hlavných pôvodcov cervikálneho karcinómu považované HPV [19,20]. Touto problematikou sa už podrobne zaoberali Váňová a Golais [21]. Sú však dôkazy, že HSV-2 môže zvyšovať riziko vzniku cervikálneho karcinómu po infekcii s HPV [22,23] Zhao et al [24] zistili, že koinfekcia HSV-2 s HPV v prípade cervikálnej intraepiteliálnej neoplazie a v prípade karcinómu dlaždicových buniek bola podstatne vyššia ako u zdravých žien. Pomer šancí (odds ratios – ORs) bol v prvom prípade 34,2 a v druhom prípade 61,1. Je otázka, akým mechanizmom by mohol HSV-2 prispieť k vzniku a progresii cervikálnych nádorov. Cervikálna intraepiteliálna neoplazia (CIN) má III štádia – CIN I, mierne štádium, CIN II mierna dysplazia a CIN III, ktorá vedie od závažnej dysplazie až k vzniku invazívneho karcinómu [25,26]. Perzistentná, latentná alebo abortívna infekcia cervikálnych buniek samotným HSV-2 by mohla viesť k vzniku zmien pripomínajúcich CIN [16] v dôsledku mutácií, aktivácii syntézy ri-

bonukleotid reduktázy (RRA) a produkcie rastových faktorov [27]. Tieto zmeny by potom mohli počas dvojitej infekcie HSV-2 a HPV výrazne prispieť k vzniku cervikálnych karcinómov, ako je uvedené na obr. 1 [27].

Podobná situácia je aj s HSV-1 a jeho možného vzťahu k nádorom hlavy a krku, ale hlavne nádorov ústnej dutiny. Parker et al [28] zistili, že séropozitivita na HSV-1 a HSV-2 nemusí priamo ovplyvňovať výskyt nádorov hlavy a krku, ale môže zvyšovať riziko spojené s fajčením, alkoholizmom alebo infekciou papilómovými vírusmi. Shillitoe a Silverman [29] zistili u pacientov s nádormi ústnej dutiny zvýšenú hladinu protilátok voči HSV-1 a Vijayakumar et al [30] dokázali v nádorových bunkách pacientov antigény HSV-1 metódou imunofluorescencie a imunoperoxidázovej techniky. Neskôr však Steele a Shillitoe [31] začali predpokladať, že HSV-1 pôsobí spolu s inými kofaktormi. Podobne aj u nádorov orofaryngu predstavuje výskyt protilátok voči HSV-1 len mierne riziko, ktoré však môže byť zvýšené prítomnosťou papilómových vírusov, ako uvádzajú Starr et al [32]. Problematika vzťahu HSV-1 k nádorom hlavy a krku je predmetom aj ďalších štúdií. Jain [33] nedokázal v prípade orálneho karcinómu preukazný rozdiel v hladine IgG proti HSV-1 medzi prekancerogénnymi a karcinogénnymi pacientmi ( $p = 0,629$ ), avšak štatisticky významné rozdiely boli dokázané medzi kontrolnou skupinou a prekancerogénnymi/karcinogénnymi pacientmi ( $p = 0,001$ ). Osman et al [34] vyšetrili 177 vzoriek orálneho karcinómu a v 22 vzorkách dokázali metódou polymerázovej reťazovej reakcie (polymerase chain reaction – PCR) DNA HSV-1 a v 8 vzorkách DNA HSV-2. V dvoch prípadoch bol dokázaný HSV-1 v bunkách laryngeálneho nádoru negatívnych na HPV. Lowenthal a Lin [35] dokázali vírus imunocytochemickými metódami a Devilleres-Mendoza a Chang [36] na základe histopatológie. Bolo dokázané, že HSV-1 môže expresiu HPV ovplyvňovať aj *in vitro*. Turunen et al [37] zistili, že infekcia buniek UD-SCC-2 derivovaných z hypolaryngeálneho karcinómu pozitívna na HPV16 vedie k zvýšenej expresii genómu HPV po ožiarení s RTG.

HSV-1 a HSV-2 boli dokázané vo všetkých študovaných typoch nádorov štítnej žľazy. Počas rastu nádorov získavali dokonca tyroidné bunky vyššiu vnímavosť na HSV v dôsledku zvýšenej exprese nektínu-1, ktorý má funkciu mediátora penetrácie vírusu do bunky [38,39]. Kofman et al [40] však predpokladajú, že HSV má v tomto prípade len nepriamu úlohu, vznik nádorov navodzuje potlačením apoptózy a takýto mechanizmus predpokladajú aj pri niektorých mozgových nádoroch. Thomas et al [41] poukazujú na možný vzťah medzi hladinou protilátok voči HSV-2 a nádorom prostaty. Ypiranga a Moraes [42] dokázali DNA HSV-1 v kožných epiteliálnych nádoroch.

### Experimentálne štúdie

Experimentálne štúdie s cieľom dokázať onkogenicitu HSV-1 a HSV-2 sa zakladali na prácach v bunkových kultúrach a experimentálnych zvieratách. Onkogénne vírusy navodzujú v infikovaných bunkách stav, ktorý sa nazýva transformácia buniek. Transformované bunky vykazujú na rozdiel od normálnych stratu kontaktnej inhibície, rastú vo viacerých vrstvách, majú zmenenú morfológiu, chromozómové aberácie, vytvárajú kolónie v riedkom agare a sú onkogénne *in vivo*, po vpravení do organizmu experimentálnych zvierat vytvárajú nádory [43,44].

Prevažná väčšina herpetických vírusov hlavne z podčelade Alphaherpesvirinae, ale aj Betaherpesvirinae (cytomegalovírusy) sa vyznačuje vysokou lytickou schopnosťou, t. j. schopnosťou navodiť v infikovaných bunkách zreteľný, cytopatický efekt (CPE) s rýchlym priebehom. Táto vysoká lytická schopnosť znemožňovala štúdium prípadnej onkogénnej aktivity, pretože gény zodpovedné za produktívnu infekciu a lýzu maskovali expresiu génov zodpovedných za možnú transformáciu. Pre štúdium možného onkogénneho potenciálu týchto vírusov bolo potrebné buď selektívne odstrániť lytické gény, alebo nájsť kultivačné podmienky, počas ktorých by bola ich expresia potlačená. Bolo popísaných niekoľko takýchto modelov transformácie. Určitou dávkou UV žiarenia je možné odstrániť lytické gény a bunky je možné transformovať pomocou génov

indukujúcich transformáciu, ktoré sú na UV žiarenie rezistentnejšie [45–48]. Podrobne bola študovaná transformácia ľudských a myších buniek aj s myším gamaherpesvírusom 68 (MHV-68) ožiarení UV svetlom. Aj keď je tento vírus zaradený do inej podčelade Gammaherpesvirinae, v mnohých biologických vlastnostiach pripomína zástupcov čelade Alphaherpesvirinae [49–51]. Preto výsledky dosiahnuté s týmto vírusom môžu byť aplikovateľné aj na HSV-1 a HSV-2. V bunkách transformovaných s MHV-68 bola dokázaná vírusová DNA metódou PCR a vírusový antigén pomocou imunofluorescencie. Imunofluorescenčné štúdie však navyše ukázali, že v transformovaných bunkách dochádza k rozpadu aktívnych filamentov [52]. Podobne bola možná transformácia po infekcii fotoinaktivovaným vírusom, t. j. ak bol vírus zafarbený neutrálnou červeňou alebo metylénovou modrou a ožiarení viditeľným svetlom [53–55]. V ďalších modeloch sa podarila transformácia s *ts* mutantami HSV-2 pri supraoptimálnej teplote [56] alebo po infekcii krysích embryonálnych buniek s HSV-1 a HSV-2 a ich kultivácii pri suboptimálnych teplotách [57].

Onkogénny potenciál HSV-1 a HSV-2 bol dokázaný aj v experimentálnych zvieratách. Wentz et al [58] použili HSV-1 a HSV-2 inkativované formalínom a UV žiarením. Inaktivovaný vírus aplikovali na cervix myšiek a 78–90 % zvierat vyvinulo premaligné a maligné cervikálne lézie. Podobné výsledky dosiahli Anthony et al [59] s izolovanou DNA HSV-2.

### Predpokladané mechanizmy transformácie a onkogenézy

Napriek dôkazom transformačnej aktivity *in vitro* a onkogénneho potenciálu *in vivo* mechanizmus transformácie s HSV-1 a HSV-2 nie je zatiaľ známy. Vírus nemá vo svojom genóme nijaký onkogén, ani nekóduje nijaký proteín, ktorý by mohol byť zodpovedný za transformáciu a onkogenicitu. Preto všetky predpokladané mechanizmy sa zakladajú na nepriamej účasti vírusu, ktorý pôsobí ako kofaktor alebo kokarcinogén a môže sa rôznymi spôsobmi podieľať na iniciácii transformácie alebo nádorotvorného procesu.

### Mechanizmus „hit and run“

Ako už bolo uvedené vyššie, bunky infikované s HSV-1, alebo HSV-2, za podmienok, keď bol ich lytický účinok na bunky odstránený alebo potlačený vedie k zmene morfológie buniek. Vzniknú transformované bunky, ktoré sa správajú ako onkogénne. Po vpravení do vhodného experimentálneho zvierata vyvolávajú nádory [60,61].

Ďalšie práce však ukázali, že takáto transformácia nepripomína „klasickú“ transformáciu s inými DNA vírusmi, napr. adenovírusmi alebo polyómavírusmi. V bunkách transformovaných s HSV-1 a HSV-2 nebola dokázaná stabilná prítomnosť vírusových antigénov pripomínajúcich napr. E1A antigén adenovírusov alebo T antigén vírusov polyómu. Počas pasážovania transformovaných buniek vírusová DNA perzistovala v bunkách veľmi krátko a vírusové proteíny, aj keď boli detegovateľné v prvých pasážach, vo vyšších pasážach ich expresia vymizla. Transformovaný fenotyp buniek však ostal zachovaný. Jediným vysvetlením tohto javu bolo, že vírus je schopný transformovať bunky mechanizmom „hit and run“, t. j. je schopný pôsobiť za určitých podmienok ako mutagén [62–63].

Porovnávaním sekvencií vírusovej DNA v transformovaných bunkách a infikovaním buniek definovanými fragmentami vírusovej DNA sa podarila transformácia. V týchto bunkách sa našli oblasti DNA s transformačnou aktivitou, tzv. minimálne transformačné oblasti (mtr). Transformačná oblasť HSV-1 (mtr-1) sa nachádza v ľavej tretine genómu, zatiaľ čo tie isté funkcie HSV-2 sú rozdelené na mtr-2 a mtr-3 a nachádzajú sa približne v strede genómu [64–67]. Hypotézu „hit and run“ by mohol potvrdzovať aj fakt, že tieto úseky nie sú potrebné na udržiavanie transformovaného fenotypu, podieľajú sa pravdepodobne len na iniciácii transformácie [68,69].

Mechanizmus „hit and run“ sa dlho predpokladal len u herpetických vírusov podčelade Alphaherpesvirinae. Dnes je však už považovaný za všeobecný mechanizmus transformácie vlastný nielen herpetickým vírusom. Dočasné získanie kompletného alebo nekompletného vírusového genómu môže byť úplne po-

stačujúce na indukciu malignej konverzie buniek *in vivo* a nádorového rastu. Potom čo vírus navodí dedičné zmeny v expresii bunkového genómu (iniciácia), ďalšia existencia vírusu v bunkách už nie je potrebná. Tento mechanizmus už bol dokázaný napr. u vírusov hepatitídy B a C, u adenovírusov, ale aj u herpetických vírusov z podčelade Gamaherpesvirinae. Tiež sa predpokladá u retrovírusu HTLV-1 [70].

### Mechanizmus „hijacking“

Tento mechanizmus bol popísaný v druhej polovici minulého storočia. HSV-1, HSV-2, ako aj iné herpetické vírusy dokážu celoživotne perzistovať v infikovanom organizme navodením latentnej infekcie, z ktorej sa dokážu periodicky aktivovať navodzujúc sekundárne herpetické infekcie. Na replikáciu po aktivácii latencie sú schopné využívať kľúčové molekuly kaskád signálnych dráh. Avšak väčšina týchto molekúl je zapojená do dôležitých bunkových funkcií ako proliferácia, diferenciácia alebo migrácia buniek, mechanizmy reparácie DNA apod. Nežiadúca aktivácia signálnej dráhy vírusom môže viesť k deregulácii niektorých vyššie uvedených procesov a tým k nekontrolovanej proliferácii buniek. Takýto zásah vírusu nazvali Filippakis et al [71] „hijacking“. Jedna zo signálnych dráh, ktorá býva často ovplyvňovaná herpetickými vírusmi, je dráha Ras regulujúca široký okruh bunkových funkcií [72].

Zistilo sa, že v géne HSV-2 sa nachádza onkogén označovaný ako ICP10. Je to chimerický gén kódujúci veľkú subjednotku vírusovej ribonukleotid reductázy (RR1), ale na jeho 5' konci sa nachádza časť pochádzajúca z buniek kódujúca receptor pre rastový faktor serín-treonín proteín kinázu (PK). Bolo dokázané, že onkoproteín HSV-2 RR1PK aktivuje signálnu dráhu Ras [73–75]. Okrem toho boli dokázané aj iné jeho aktivity, napr. mitogénna aktivita v diploidných bunkách, inhibícia apoptózy v neurónoch, ako aj aktivácia signálnej dráhy ERK (extracellular signal-regulated kinase) [76,77]. Proteín ICP10 bol dokázaný už predtým v bunkách cervikálneho karcinómu [78–80], ale podobný proteín bol dokázaný aj v bunkách me-

lanómu [81]. U HSV-1 je situácia odlišná. Génu *ICP10* u HSV-2 zodpovedá gén *ICP6*, ktorý však nemá funkciu onkogénu [82]. HSV-1 by sa na onkogenéze mohol podieľať napr. potláčaním syntézy niektorých bunkových proteínov [83], aktiváciou syntézy bunkových „heat shock“ proteínov [84,85] alebo potláčaním apoptózy [86–88].

### Vírusové miRNA a nádory

MikroRNA (miRNA) sú malé, nekódujúce RNA, ktoré sa viažu na komplementárne sekvencie na 3' konci netranslatovateľného úseku mRNA, a táto väzba má za následok inhibíciu translácie. Niektoré miRNA sú dôležité pre normálny vývin organizmu, niektoré sú postrádateľné, hrajú však kritickú úlohu v patologických podmienkach, ako sú napr. infekcia vírusmi, tumorigenéza alebo tvorba metastáz [89–90]. Väčšina vírusov kóduje vlastné miRNA s rozmanitými funkciami, napr. predlžujú životnosť infikovaných buniek, obchádzajú imunitnú odpoveď organizmu alebo potláčajú lytickú schopnosť vírusu v perzistentne infikovaných bunkách [91].

Podľa údajov za posledných 5 rokov HSV-1 kóduje 25 a HSV-2 24 rozličných miRNA [92,93]. Ich funkcie sú rozmanité, ale najdôležitejšiu úlohu hrajú pri navodení a udržiavaní latencie a v predlžovaní prežívania infikovaných buniek ovplyvňovaním tak vlastných, ako aj bunkových génov [94–97]. Informácií o možnom vplyve týchto miRNA na vznik nádorových ochorení je zatiaľ pomerne málo. Pandya et al [98] dokázali miRNA HSV-2, miR-H25 v tkanive serózneho karcinómu vaječníkov a považujú ju za dôležitý biomarker spolu s miRNA EBV miR-BERT7, aj keď zatiaľ nie je známe, či sú tieto miRNA priamo zodpovedné za vznik nádoru alebo len indukujú rezistenciu na cytostatiká. Yun et al [99,100] dokázali zvýšenú expresiu dvoch herpetických miRNA, HSV-1-miR-H18 a HSV-2-miR-H9-5p v tkanive nádoru prostaty. K zvýšenej expresii týchto miRNA nedochádzalo v bunkách benignej hyperplazie prostaty. miRNA kódovaná HSV-2, HSV-2-miR-H9-5p bola dokázaná v spojení so vznikom metastáz z nádoru pľúc do kostnej drene [101].

### Nové látky asociované s herpetickými vírusmi pripomínajúce rastové faktory

Skupina nových látok asociovaných s herpetickými vírusmi bola objavená začiatkom 90. rokov minulého storočia. K ich produkcii dochádza v bunkách transformovaných vírusmi alebo v infikovaných bunkách kultivovaných za podmienok nepermissívnych pre replikáciu vírusov. Majú schopnosť transformovať normálne, netransformované bunky, ale ak sa pridajú k transformovaným bunkám, menia ich transformovaný fenotyp na normálny. Obe aktivity je možné neutralizovať protilátkami voči danému vírusu alebo určitými monoklonálnymi protilátkami voči vírusovému glykoproteínu B (gB) [102–103]. Podobný faktor bol dokázaný aj v bunkách transformovaných s MHV-68 [104]. Tieto rastové faktory asociované s herpetickými vírusmi boli zatiaľ dokázané len v podmienkach *in vitro*, ale predpokladá sa, že k ich produkcii by mohlo dochádzať aj v infikovanom organizme počas perzistentnej alebo latentnej infekcie [105]. Dôležitejšia je však z tohto hľadiska ich schopnosť meniť transformované bunky na bunky s normálnym, netransformovaným fenotypom, ktoré by potenciálne mohli meniť aj fenotyp nádorových buniek v organizme. U faktora asociovaného s MHV-68 sa podarilo s využitím fyzikálno-chemických metód, ako je delenie na kolónu systému vysokorychlostní kapalinové chromatografie (fast protein liquid chromatography – FPLC) Sephadex G15 a kolónu vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tzv. obrátenými fázami (reverse phase high-performance liquid chromatography – RP-HPLC) C18, oddeliť obe aktivity a pripraviť látku len s transformačným účinkom a účinkom potláčajúcim transformáciu [106]. Obe látky by v budúcnosti mohli nájsť uplatnenie. Jedna na štúdium transformácie buniek herpetickými vírusmi, druhá ako nádejná látka s možným účinkom na malignitu nádorových buniek.

### Záver

Otázka vírusovej etiológie rakoviny je veľmi zložitá a je veľmi málo pravdepodobné, že by za vznik rakovinového

ochorenia bol zodpovedný nejaký vírus ako jediný kauzatívny agens. To platí aj v prípade HPV ako pôvodcov cervikálneho karcinómu [107]. Hoci je HPV dôležitý pri transformácii cervikálnych epitelových buniek, nie je postačujúcim agensom. K tomu, aby vznikol cervikálny karcinóm, sú potrebné ďalšie kofaktory a procesy odohrávajúce sa v bunkovej a molekulárnej rovine [108,109]. Popri HSV-2 môže byť takýmto vírusovým kofaktorom aj ľudský gamaherpesvírus EBV [23].

V bunkách transformovaných vírusmi „klasickými“ mechanizmami sa nachádzajú vírusom kódované proteíny (onkoproteíny), ktoré môžu slúžiť ako vhodný diagnostický marker.

U HPV sú takýmto onkoproteínmi E6 a E7 [19–21]. V niektorých prípadoch však môže vírus transformovať bunky a ostať pri tom nepoznaný. Je to napr. v prípade transformačného mechanizmu „hit and run“, keď sa vírus, či už ako primárny agens alebo len ako kofaktor, podieľa len na iniciácii transformácie a vzniku nádoru, ale vo finálnom štádiu tumorigenézy sa už v bunkách nijaké vírusové produkty nenachádzajú a takýto mechanizmus sa predpokladá nielen u herpetických vírusov [70]. Podobne aj proteín ICP10 môže jednorázovým zásahom („one-hit“) aktivovať signálnu dráhu Ras, spustiť proces nekontrolovateľnej proliferácie, v ktorom už jeho prítomnosť nie je potrebná [71,77].

## Literatúra

- Roizman B, Whitley RJ. An inquiry into the molecular basis of HSV latency and reactivation. *Annu Rev Microbiol* 2013; 67(5): 355–374. doi: 10.1146/annurev-micro-092412-155654.
- Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003; 22(33): 5108–5512. doi: 10.1038/sj.onc.1206556.
- Maeda E, Akahane M, Kiryu S et al. Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. *Jpn J Radiol* 2009; 27(1): 4–19. doi: 10.1007/s11604-008-0291-2.
- Edelman DC. Human herpesvirus 8 – A novel human pathogen. *Virology* 2005; 2: 18. doi: 10.1186/1743-422X-2-78.
- Metgud R, Astekar M, Verma M et al. Role of viruses in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rev* 2012; 6(2): e21. doi: 10.4081/oncol.2012.e21.
- Gupta K, Metgud R. Evidence suggesting involvement of viruses in oral squamous cell carcinoma. [online]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/622496>.
- Aurelian L, Schumann B, Marcus RL et al. Antibody to HSV-2 induced tumor specific antigens in serums from patients with cervical carcinoma. *Science* 1973; 181(4095): 161–164.
- Nahmias AJ, Naib ZM, Josey WE et al. Prospective studies of the association of genital herpes simplex infection and cervical anaplasia. *Cancer Res* 1973; 33(6): 1491–1497.
- Sabin AB, Tarro G. Herpes simplex and herpes genitalis viruses in etiology of some human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70(11): 3225–3229.
- Aurelian L. Virions and antigens of herpes virus type 2 in cervical carcinoma. *Cancer Res* 1973; 33(6): 1539–1547.
- Goldberg RJ, Gravell M. A search for herpes simplex virus type 2 markers in cervical carcinoma. *Cancer Res* 1976; 36(2): 795–799.
- Thankamani V, Kumari TV, Vasudevan DM. Detection of herpes simplex virus type 2 antigen(s) in biopsies from carcinoma of uterine cervix. *J Exp Pathol* 1985; 2(2): 123–133.
- Aurelian L, Standberg JD, Melendez LV et al. Herpes virus type 2 isolated from cervical tumor cells grown in tissue culture. *Science* 1971; 174(4010): 704–707.
- Li S, Wen X. Seropositivity to herpes simplex virus type 2, but not to type 1 is associated with cervical cancer: NHANES (1999–2014). *BMC Cancer* 2017; 17(1): 726. doi: 10.1186/s12885-017-3734-2.
- Koanga MML, Ngono NA, Ngawa G et al. Association of cervical inflammation and cervical abnormalities in women infected with herpes simplex virus 2 (HSV2). *Int J Trop Public Health* 2014; 4(1): 10–14.
- Tomkins A, White C, Higgins SP. Primary herpes simplex virus infection mimicking cervical cancer. *BMJ Case Reports* 2015; 2015. pii: bcr2015210194. doi: 10.1136/bcr-2015-210194.
- Vonka V, Kanka J, Hirsch I et al. Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type 2 virus. II. Herpes simplex type 2 antibody presence in sera taken at enrollment. *Int J Cancer* 1984; 33(1): 61–66.
- Lehtinen M, Koskela P, Jellum E et al. Herpes simplex virus and risk of cervical cancer: A longitudinal, nested case-control study in the nordic countries. *Am J Epidemiol* 2002; 156(8): 687–692.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N et al. The casual relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(4): 244–265.
- Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 1–17.
- Váňová B, Golais F. Onkogénny potenciál papilómavírusov. *Klin Onkol* 2013; 26(6): 399–403.
- Smith JS, Herrero R, Bosetti C et al. Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(21): 1604–1613.
- Szostek S, Zawilinska B, Kopec J et al. Herpesviruses as possible cofactors in HPV-16 related oncogenesis. *Acta Biochim Pol* 2009; 56(2): 337–342.
- Zhao Y, Cao X, Zheng Y et al. Relationship between cervical disease and infection with human papillomavirus types 16 and 18, and herpes simplex virus 1 and 2. *J Med Virol* 2012; 84(12): 1920–1927. doi: 10.1002/jmv.23353.
- Weismanová E, Weismann P. HPV a krčok maternice: Genetická podstata malignej transformácie bunky. *Onkológia*; 2008; 3(6): 389–392.
- Ortoski RA, Kell CS. Anal cancer and screening guidelines for human papillomavirus in men. *J Am Osteopath Ass* 2011; 111(3 suppl 2): S35–S43.
- Raju K. Virus and cervical cancer: Role and implication: A review. *Biomed Res Ther* 2015; 2(3): 220–230. doi: 10.7603/s40730-015-0007-z.
- Parker TM, Smith EM, Ritchie JM et al. Head and neck cancer associated with herpes simplex virus 1 and 2 and other risk factors. *Oral Oncol* 2006; 42(3): 288–296. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.08.003.
- Shillitoe EJ, Silverman S. Oral cancer and herpes simplex virus – a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1979; 48(3): 216–224.
- Vijayakumar T, Kumari TV, Vasudevan DM et al. Demonstration of HSV-1 antigen in patients with oral cancer by immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *J Exp Pathol* 1987; 3(1): 75–86.
- Steele C, Shillitoe EJ. Viruses and oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2(2): 153–175.
- Star JR, Daling JR, Fitzgibbons ED et al. Serologic evidence of herpes simplex virus 1 infection and oropharyngeal cancer risk. *Cancer Res* 2001; 61(23): 8459–8464.
- Jain M. Assessment of correlation of herpes simplex virus-1 with oral cancer and precancer – A comparative study. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(8): 14–17. doi: 10.7860/JC DR/2016/18593.8229.
- Osman AH, Enan KA, Mohamed EA. Molecular detection of herpes simplex virus (1,2) in oral squamous cell carcinoma at Khartoum. *Clin Med J* 2017; 3(2): 10–14.
- Lowenthal BM, Lin GY. Herpes simplex virus positive, human papillomavirus negative laryngeal squamous cell carcinoma presenting in an immunocompetent male with dysphonia. *Hum Pathol* 2017; 10: 50–51. doi: 10.1016/j.jehpc.2017.06.001.
- Devillers-Mendoza DD, Chang JV. Cytopathologic herpes simplex virus features in laryngeal squamous cell carcinoma. *Philipp J Otolaryngol Head Neck Surg* 2016; 31(1): 61–64.
- Turunen A, Hukkanen V, Kulmala J et al. HSV-1 infection modulates the radioresponse of a HPV16 positive head and neck cancer cell line. *Anticancer Res* 2016; 36(2): 565–574.
- Jensen K, Patel A, Hoperia V et al. Human herpes simplex viruses in benign and malignant thyroid tumours. *J Pathol* 2010; 221(2): 193–200. doi: 10.1002/path.2701.
- Stamatiou DP, Derdas SP, Zoras OL et al. Herpes and polyoma family viruses in thyroid cancer. *Oncol Lett* 2016; 11(3): 1635–1644. doi: 10.3892/ol.2016.4144.
- Kofman A, Marcinkiewicz L, Dupart E et al. The roles of viruses in brain tumorigenesis and oncomodulation. *J Neurooncol* 2011; 105(3): 451–466. doi: 10.1007/s11060-011-0658-6.
- Thomas F, Elguero E, Brodeur J et al. Herpes simplex virus type 2 and cancer: A medical geography approach. *Int Genet Evol* 2011; 11(6): 1239–1242. doi: 10.1016/j.meegid.2011.04.009.
- Ypiranga S, de Moraes AM. Prevalence of human herpes virus type 1 in epithelial skin cancer. *An Bras Dermatol* 2009; 84(2): 137–142.
- Modrow S, Falke D, Truyen U (eds). *Molekulare Virologie*. 3. vydání. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 2010: 45–52.
- Freshney RI. *Culture of animal cells: A manual basic technique and specialized applications*. 6th edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons 2011: 279–297.
- Duff R, Rapp F. Properties of hamster embryo fibroblasts transformed in vitro after exposure to ultraviolet-irradiated herpes simplex virus type 2. *J Virol* 1971; 8(4): 469–477.
- Rapp F, Duff R. Transformation of hamster embryo fibroblasts by herpes simplex viruses type 1 and 2. *Cancer Res* 1973; 33(6): 1527–1534.
- Boyd AL, Orme TW. Transformation of mouse cells after infection with ultraviolet irradiation-inactivated herpes simplex virus type 2. *Int J Cancer* 1975; 16(4): 526–538.
- Rapp F, Reed C. Experimental evidence for the oncogenic potential of herpes simplex virus. *Cancer Res* 1976; 36(2): 800–806.
- Simas JP, Efstathiou S. Murine gammaherpesvirus 68: a model for the study of gammaherpesvirus pathogenesis. *Trends Microbiol* 1998; 6(7): 276–282.
- Mistríková, FJ, Rašlová H, Mirmusová M et al. A murine gammaherpesvirus. *Acta virol* 2000; 44(3): 211–226.
- Nash AA, Dutia BM, Stewart JP et al. Natural history of murine gammaherpesvirus infection. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356(1408): 569–579. doi: 10.1098/rstb.2000.0779.

52. Mrázová V, Betáková T, Kudelová M et al. Murine gammaherpesvirus (MHV-68) transforms cultured cells in vitro. *Intervirology* 2015; 58(2): 69–72. doi: 10.1159/000370071.
53. Li JL, Jerkofsky MA, Rapp F. Demonstration of oncogenic potential of mammalian cells by DNA-containing viruses following photodynamic inactivation. *Int J Cancer* 1975; 15(2): 190–202.
54. Kucera LS, Gusdon JP, Edwards I et al. Oncogenic transformation of rat embryo fibroblasts with photoinactivated herpes simplex virus: rapid in vitro cloning of transformed cells. *J Gen Virol* 1977; 35(3): 473–485. doi: 10.1099/0022-1317-35-3-473.
55. Yen GSL, Simon EH. Photosensitization of herpes simplex virus type 1 with neutral red. *J Gen Virol* 1978; 41(2): 273–281.
56. Takahashi M, Yamanishi K. Transformation of hamster embryo and human embryo cells by temperature sensitive mutants of herpes simplex virus type 2. *Virology* 1974; 61(1): 306–311.
57. Darai G, Braun R, Flügel RM et al. Malignant transformation of rat embryo fibroblasts by herpes simplex virus types 1 and 2 at suboptimal temperature. *Nature* 1997; 265(5596): 744–746.
58. Wentz WB, Reagan JV, Heggle AD et al. Induction of uterine cancer with inactivated herpes simplex virus types 1 and 2. *Cancer* 1981; 48(8): 1787–1790.
59. Anthony DD, Wentz WB, Reagan JW et al. Induction of cervical neoplasia in the mouse by herpes simplex virus type 2 DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(12): 4520–4524.
60. Skinner GR. Transformation of primary hamster fibroblasts by type 2 herpes simplex virus: evidence for a „hit and run“ mechanism. *Br J Exp Path* 1976; 57(4): 361–376.
61. Galloway DA, McDougall JK. The oncogenic potential of herpes simplex viruses: evidence for a „hit-and-run“ mechanism. *Nature* 1983; 302(5903): 21–24.
62. McDougall JK. „Hit and run“ transformation leading to carcinogenesis. *Dev Biol (Basel)* 2001; 106: 77–82.
63. Stevenson PG, May JS, Connor V et al. Vaccination against a „hit and run“ viral cancer. *J Gen Virol* 2010; 91(9): 2176–2185. doi: 10.1099/vir.0.023507-0.
64. Galloway DA, Copple CD, McDougall JK. Analysis of viral DNA sequences in hamster cells transformed by herpes simplex virus type 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(2): 880–884.
65. Reyes GR, LaFemina R, Hayward SD et al. Morphological transformation by DNA fragment of human herpesviruses: Evidence for two distinct transforming regions in herpes simplex viruses types 1 and 2 and lack of correlation with biochemical transformation of the thymidine kinase gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1980; 44(1): 629–641.
66. Galloway DA, Nelson JA, McDougall JK. Small fragments of herpesvirus DNA with transforming activity contain insertion sequence-like structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81(15): 4736–4740.
67. Hayashi Y, Iwasaka T, Smith CC et al. Multistep transformation by defined fragments of herpes simplex virus type 2 DNA: oncogenic region and its gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(24): 8493–8497.
68. Cameron IR, Park M, Dutia BM et al. Herpes simplex virus sequences involved in the initiation of oncogenic morphological transformation of rat cells are not required for maintenance of the transformed state. *J Gen Virol* 1985; 66(3): 517–527. doi: 10.1099/0022-1317-66-3-517.
69. Bauer G, Kahl S, Sawhney IS et al. Transformation of rodent fibroblasts by herpes simplex virus: Presence of morphological transforming region 1 (MTR1) is not required for the maintenance of the transformed state. *Int J Cancer* 1992; 51(5): 754–760.
70. Niller HH, Wolf H, Minarovits J. Viral hit and run-oncogenesis: Genetic and epigenetic scenarios. *Cancer Lett* 2011; 305(2): 200–217. doi: 10.1016/j.canlet.2010.08.007.
71. Filipkakis H, Spandidos DA, Sourvinos G. Herpesviruses: Hijacking the Ras signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(7): 777–785. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.03.007.
72. Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C et al. Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *Int J Oncol* 2002; 21(2): 237–241.
73. Smith CC, Kulka M, Wymer JP et al. Expression of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is required for virus growth and neoplastic transformation. *J Gen Virol* 1992; 73(6): 1417–1428. doi: 10.1099/0022-1317-73-6-1417.
74. Smith CC, Aurelian L. The large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is associated with the virion tegument and has PK activity. *Virology* 1997; 234(2): 235–242.
75. Aurelian L. Herpes simplex virus type 2: unique biological properties include neoplastic potential mediated by the PK domain of the large subunit of ribonucleotide reductase. *Front Biosci* 1998; 3: 237–249.
76. Perkins D, Pereira EF, Aurelian L. The herpes simplex virus type 2 R1 protein kinase (ICP10PK) functions as a dominant regulator of apoptosis in hippocampal neurons involving activation of the ERK survival pathway and upregulation of the antiapoptotic protein Bag-1. *J Virol* 2003; 77(2): 1292–1305.
77. Smith CC. The herpes simplex virus type 2 protein ICP10PK: a master of versatility. *Front Biosci* 2005; 10: 2820–2831.
78. Aurelian L, Kessler II, Rosenhein NB et al. Viruses and gynecologic cancers: herpesvirus protein (ICP10/AG-4): a cervical tumor antigen that fulfills the criteria for a marker of cancerogeneity. *Cancer* 1981; 48 (Suppl 2): 455–471.
79. Aurelian L, Smith CC, Klacsman KT et al. Expression and cellular compartmentalization of a herpes simplex type 2 protein (ICP10) in productively infected and cervical tumor cells. *Cancer Invest* 1983; 1(4): 301–313.
80. Iwasaka T, Smith C, Aurelian L et al. The cervical tumor-associated antigen (ICP10/AG4) is encoded by the transforming region of the genome of herpes simplex virus type 2. *Jpn J Canc Res* 1985; 76(10): 946–958.
81. Smith CC, Yu YX, Kulka M et al. A novel human gene similar to the protein kinase (PK) coding domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) codes for a serine-threonine PK and is expressed in melanoma cells. *J Biol Chem* 2000; 275(33): 25690–25699. doi: 10.1074/jbc.M002140200.
82. Sze P, Herman RC. The herpes simplex virus type 1 ICP6 gene is regulated by a „leaky“ early promoter. *Virus Res* 1992; 26(2): 141–152.
83. Matis J, Kudelová M. Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses. *Acta virol* 2001; 45(5–6): 269–277.
84. LaThangue NB, Latchman DS. A cellular protein related to heat-shock protein 90 accumulated during virus infection and is overexpressed in transformed cells. *Exp Cell Res* 1988; 178(1): 169–179.
85. Mackowiak PA, Goggans ML, Raese J et al. Heat-shock protein induction by herpes simplex virus type 1 in MD canine kidney cells. *J Therm Biol* 1992; 17(3): 169–174. doi: 10.1016/0306-4565(92)90029-F.
86. Galvan V, Roizman B. Herpes simplex virus 1 induces and blocks apoptosis at multiple steps during infection and protects cells from exogenous inducers in a cell-type-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(7): 3931–3936.
87. Nguyen ML, Blaho AJ. Apoptosis during herpes simplex virus infection. *Adv Virus Res* 2007; 69: 67–97. doi: 10.1016/S0065-3527(06)69002-7.
88. Nunes-Alves C. Viral pathogenesis: HSV avoids the RIPper. *Nature Rev Microbiol* 2015; 13(4): 185–189. doi: 10.1038/nrmicro3453.
89. Pfeffer S, Voinnet O. Viruses, microRNAs and cancer. *Oncogene* 2006; 25(46): 6211–6219. doi: 10.1038/sj.onc.1209915.
90. Friedman JM, Jones PA. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss Med Wkly* 2009; 139(33–34): 466–472. doi: smw-12794.
91. Zhuo Y, Gao G, Shi JA et al. MiRNAs, biogenesis, origin and evolution, functions on virus-host interaction. *Cell Physiol Biochem* 2013; 32(3): 499–510. doi: 10.1159/000354455.
92. Grundhoff A, Sullivan CS. Virus-encoded microRNAs. *Virology* 2011; 411(2): 325–343. doi: 10.1016/j.virol.2011.01.002.
93. Boss IW, Plaisance KB, Renner R. Role of virus-encoded microRNAs in herpesvirus biology. *Trends Microbiol* 2009; 17(12): 544–553. doi: 10.1016/j.tim.2009.09.002.
94. Sun L, Li Q. The microRNAs of Herpes simplex virus (HSV). *Virus Sin* 2012; 27(6): 332–337.
95. Umbach JL, Kramer MF, Jurak I et al. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNA. *Nature* 2008; 454(7205): 780–783. doi: 10.1038/nature07103.
96. Grey F. Role of microRNAs in herpesvirus latency and persistence. *J Gen Virol* 2015; 96(4): 739–751. doi: 10.1099/vir.0.070862-0.
97. Feldman ER, Tibbetts SA. Emerging roles of herpesvirus microRNAs during in vivo infection and pathogenesis. *Curr Pathobiol Rep* 2015; 3(3): 209–217. doi: 10.1007/s40139-015-0085-z.
98. Pandya D, Mariani M, McHugh M et al. Herpes simplex virus microRNA expression and significance in serous ovarian cancer. *PLoS One* 2014; 9(12): e114750. doi: 10.1371/journal.pone.0114750.
99. Yun SJ, Jeong P, Kang HW et al. Urinary microRNAs of prostate cancer: virus-encoded hsv1-miR-H18 and hsv2-miR-H9-5p could be valuable diagnostic markers. *Int Neurourol J* 2015; 19(2): 74–84. doi: 10.5213/inj.2015.19.2.74.
100. Yun SJ, Jeong P, Kang HW et al. Increased expression of herpes-virus-encoded hsv1-miR-H18 and hsv2-miR-H9-5p in cancer-containing prostate tissue compared to that in benign prostate hyperplasia tissue. *Int Neurourol J* 2016; 20(2): 122–130. doi: 10.5213/inj.1632552.276.
101. Wang X, Lin S, Zhou Z et al. A herpes simplex virus type 2-encoded microRNA promotes cell metastasis by targeting suppressor of cytokine signaling 2 in lung cancer. *Tumour Biol* 2017; 39(5): 1010428317701633. doi: 10.1177/1010428317701633.
102. Golais F, Sabó A, Bačíková D. Transforming activity of crude extract of pseudorabies virus-transformed cells. *Acta virol* 1988; 32(1): 83–85.
103. Golais F, Csabayová M, Leško J et al. Herpes simplex virus type 2 and pseudorabies virus associated growth factors and their role in the latency invitro. *Acta virol* 1992; 36(6): 505–515.
104. Golais F, Košťál M, Csabayová M et al. The glycoprotein B gene and its syn3 locus of herpes simplex virus type 1 are involved in the synthesis of virus-associated growth factor (HSGF-1). *Acta virol* 1992; 36(6): 516–523.
105. Konvalina I, Gašperik J, Golais F. A novel class of growth factors related to herpesviruses. *Acta vet* 2002; 71(1): 29–36.
106. Šupolíková M, Vojts Staňová A, Kudelová M et al. Cells transformed by murine herpesvirus 68 (MHV-68) release compound with transforming and transformed phenotype repressing activity resembling growth factors. *Acta virol* 2015; 59(4): 418–422.
107. Haverkos H, Rohrer M, Pickworth W. The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial. *Biomed Pharmacother* 2000; 54(1): 54–59.
108. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010; 10(8): 550–560. doi: 10.1038/nrc2886.
109. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 1–17.

# Potenciál flavonoidu quercetinu v prevenci a léčbě nádorů – současný stav výzkumu

## Potential of the Flavonoid Quercetin to Prevent and Treat Cancer – Current Status of Research

Neuwirthová J., Gál B., Smilek P., Urbánková P.

Klinika otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku, LF MU a FN u sv. Anny v Brně

### Souhrn

Přírodní látky s bioaktivním účinkem jsou ve výzkumu považovány za slibné kandidáty pro prevenci a léčbu nádorů. Quercetin je dobře známý flavonoid, který prokázal protinádorový účinek na základě *in vitro* i *in vivo* studií. Cílem tohoto přehledu je odhalit molekulární mechanismy jeho chemopreventivního efektu a zaměřit se na jeho potenciál pro onkologickou léčbu. Quercetin vykazuje bifázický hormetický efekt, který je závislý na dávce. V nízkých koncentracích působí jako antioxidant a má chemopreventivní vlastnosti. Ve vysokých dávkách se z něj stává naopak prooxidant a stává se tak výhodným při léčbě nádorů. Quercetin má mnoho intracelulárních cílů a zasahuje do signálních cest nádorových buněk, což mu dává potenciál překonat rezistenci na léčbu. Studie ukazují, že tento flavonoid se váže na různé receptory, které hrají důležitou roli v kancerogenezi, reguluje expresi mnoha genů, vyvolává epigenetické změny a mění aktivitu enzymů metabolizace kancerogenů. Vedle toho má i protizánětlivý a protivirový účinek. Vyvolání apoptózy quercetinem v nádorových buňkách bez poškození zdravých tkání již bylo potvrzeno na různých buněčných liniích. Vedle zástavy buněčného cyklu byl popsán antiangiogenní, antiinvazivní a antimetastatický účinek. V kombinaci s chemoterapií a radioterapií quercetin působí v synergii tak, že zvyšuje citlivost na léčbu a současně chrání zdravé buňky před nežádoucími účinky léčby. Bezpečnost quercetinu a jeho potenciál pro prevenci a léčbu nádorů zdokumentovaly nejen experimenty na zvířatech, ale také klinická studie fáze I na onkologických pacientech. V posledních letech se studie zaměřují na možnosti využití forem nanočástic překonávající problém různé dostupnosti quercetinu pro cílové tkáně, která dosud limitovala jeho zavedení do klinické praxe.

### Klíčová slova

quercetin – flavonoid – chemoprevence – oxidační stres – apoptóza – protinádorová látka – protinádorová léčba – karcinom

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 recommendation for biomedical papers.



MUDr. Břetislav Gál, Ph.D.

Klinika otorinolaryngologie  
a chirurgie hlavy a krku  
LF MU a FN u sv. Anny v Brně  
Pekařská 53  
656 91 Brno  
e-mail: b.gal@fnusa.cz

Obdrženo/Submitted: 22. 1. 2018

Přijato/Accepted: 16. 4. 2018

doi: 10.14735/amko2018184



## Summary

Naturally occurring bioactive compounds are promising candidates to prevent and treat cancer. Quercetin is a well-known plant flavonoid that is reported to have anticancer actions *in vitro* and *in vivo*. This review focuses on the molecular mechanisms underlying the chemopreventive effect of quercetin and its therapeutic potential in oncology. Quercetin elicits biphasic, hormetic, dose-dependent effects. It acts as an antioxidant and thus elicits chemopreventive effects at low concentrations, but functions as a pro-oxidant and may therefore elicit chemotherapeutic effects at high concentrations. Quercetin has multiple intracellular molecular targets with the potential to reverse treatment resistance and affect pleiotropic signaling processes that are altered in cancer cells. Studies suggest that quercetin binds to several receptors that play important roles in carcinogenesis, regulates expression of various genes, induces epigenetic changes, and interferes with enzymes that metabolize chemical carcinogens. In addition, it also elicits anti-inflammatory and antiviral effects. The ability of quercetin to induce apoptosis of cancer cells without affecting non-cancer cells has been documented using various cell lines. Quercetin also has antiangiogenic and antimetastatic properties. When used in combination with chemotherapy and radiotherapy, quercetin can act as a sensitizer and protect non-cancer cells from the side effects of currently used cancer therapies. The safety and potential usefulness of quercetin for the prevention and treatment of cancer have been documented in both animal experiments and a phase I clinical trial. Current studies are focused on nano-formulations to overcome the low bioavailability of natural quercetin, which limits its clinical use as an antitumor agent.

## Key words

quercetin – flavonoid – chemoprevention – oxidative stress – apoptosis – antitumor agent – cancer therapy – cancer

## Úvod

Chemoprevence pomocí přirozených složek stravy představuje důležitou součást prevence zhoubných onemocnění. Dle epidemiologických dat je konzumace ovoce a zeleniny bohatých na flavonoidy spojena s obecně nižším výskytem nádorů. Počátkem 90. let minulého století metaanalýza přibližně 200 studií prokázala nižší incidenci různých druhů malignit, zejména pak karcinomů dutiny ústní, jícnu, žaludku, tlustého střeva, pankreatu, ale i hrtanu, plic a některých dalších [1]. Výzkum *in vitro* se proto zaměřil na popsání jednotlivých mechanismů, kterými flavonoidy působí proti nádorům. Mezi dosud odhalené patří antioxidantní efekt, protizánětlivý účinek, aktivace endogenních detoxikačních enzymů, ale i některé specifické mechanismy zásahu do signálních cest s následkem zástavy buněčného cyklu a indukce apoptózy nádorových buněk [2]. Quercetin je považován v rámci chemoprevence i léčby nádorů za jednoho z nejatraktivnějších zástupců rostlinných flavonoidů a výzkum s ním v onkologii dosáhl přes *in vitro* a *in vivo* experimenty až ke klinické studii fáze I. V našich podmínkách je v rámci běžných potravin nejbohatším a typickým zdrojem quercetinu cibule, červené a modré bobulovité ovoce (brusinky, borůvky, třešně, rybíz, aronie, jeřábina, rakytník apod.) a jablka. V Itálii je navíc zdrojem červené víno a v Japonsku zase čaj. Z jiných významných, ale ve stravě méně častých

zdrojů, se jedná o kapary, čerstvý libeček, rukolu aj. V rámci zeleniny je quercetin kromě cibule v menším množství nalézán i v chřestu, pórků, brokolici, kapustě, listovém salátu apod. Protože se jedná o lipofilní látku, je schopen procházet skrze membrány a ovlivnit signální cesty v buňce. Protinádorová aktivita quercetinu byla prokázána na různých druzích buněčných linií a zasahuje na více úrovních kancerogeneze.

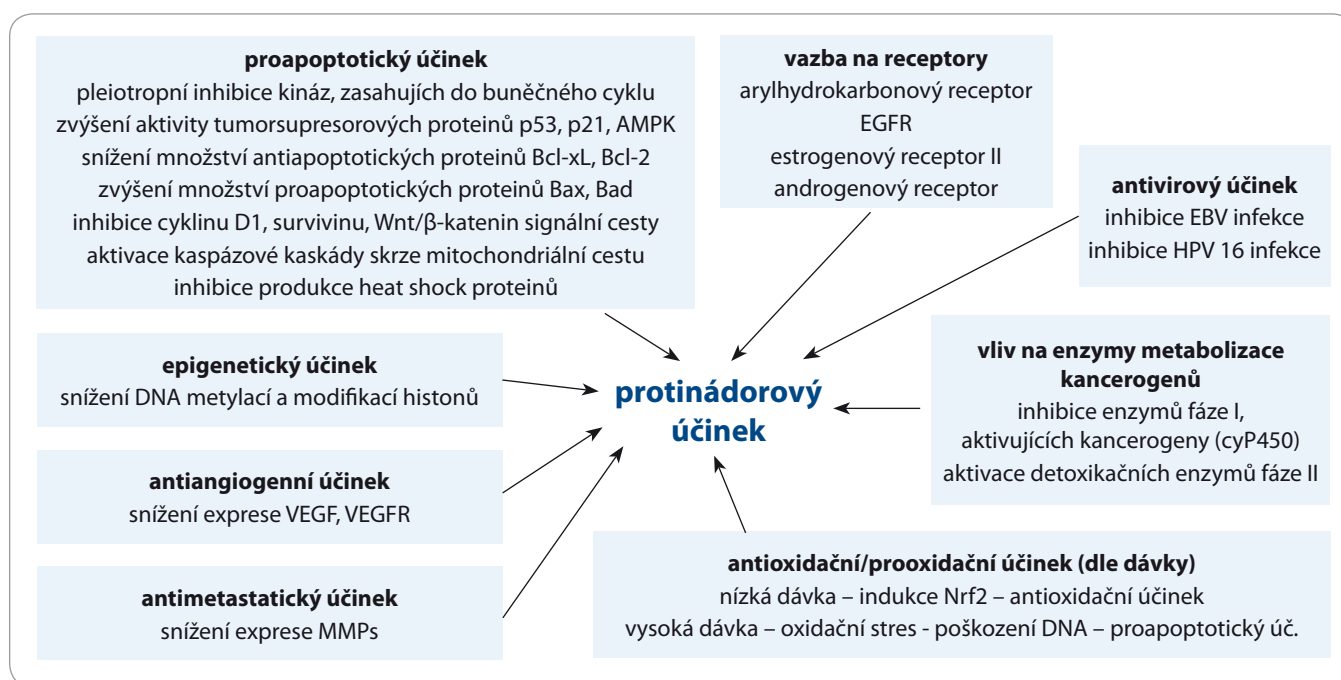
### ***In vitro* prokázané mechanismy protinádorového účinku quercetinu**

*In vitro* studie prokazující protinádorový efekt quercetinu, proběhly na různých buněčných liniích, konkrétně dutiny ústní, hrtanu, nosohltanu, slinných žláz, plic, jícnu, žaludku, tlustého střeva, jater, pankreatu, prostaty, prsu, děložního čípku, endometria, ovarií, mozku, melanomu, leukemií, lymfomů a některých dalších. Stupeň protinádorové aktivity se ve studiích u různých lokalit odlišuje a ovlivňuje ho dávka i vlastní délka působení quercetinu [3]. Mechanismy, kterými dle studií quercetin zasahuje do kancerogeneze (schéma 1), by se daly schematicky rozdělit do následujících kapitol.

### **Blokáda buněčného cyklu a indukce apoptózy nádorových buněk**

Quercetin je dle *in vitro* studií schopen více mechanismy blokovat buněčný cyklus a vyvolat apoptózu. Důležité je zjiš-

tění, že takto působí specificky u nádorů, avšak ne u buněk zdravých tkání. Příkladem jsou linie lidských buněk transformovaných onkogenem lidského papilomaviru (human papilloma virus – HPV) 16, hrajícího jak známo úlohu ve vývoji spinocelulárních karcinomů polykacích cest aj. Quercetin v tomto experimentu zastavil buněčný cyklus v G1 fázi a ani exprese onkoproteinů E6 a E7 spojených s HPV infekcí nebyla schopna tuto zástavu buněčného cyklu překonat [4]. Quercetin obecně inhibuje proliferaci různých druhů nádorových buněk, a sice zástavou v G1 nebo G2/M fázi, která následně indukuje apoptózu. Jiným příkladem jsou studie u buněčných linií nazofaryngeálního karcinomu [5], močového měchýře [6] a dalších. Stran vlastní schopnosti zástavy buněčného cyklu bylo posáno více mechanismů. Quercetin se považuje za pleiotropní kinázový inhibitor zasahující do různých signálních cest nádoru. Dokonce i v nízké koncentraci 2  $\mu\text{M}$  ( $\mu\text{mol/l}$ ) je schopen inhibice 16 druhů kináz o > 80 % a mnoho z těchto kináz jsou pozitivní regulátory buněčného cyklu, jejichž inhibicí se dosáhne antiproliferativního efektu. Simultánní zásah do různých signálních cest je obecně u protinádorových látek výhodou, neboť se tak do jisté míry překonává rezistence na léčbu [7]. Vlivem quercetinu dochází ke snížení množství antiapoptotických proteinů (Bcl-xL, Bcl-2) a naopak ke zmnožení proapoptotických proteinů (Bax, Bad) [8]. Na buněč-



**Schéma 1. Jednotlivé mechanismy protinádorového účinku quercetinu.**

AMPK – AMP-aktivovaná proteinová kináza, EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor, EBV – virus Epstein-Barrové, HPV – lidský papillomavirus, VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, VEGFR – receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

ných liniích karcinomu střeva byl popsán antiproliferativní mechanismus quercetinu skrze inhibici Wnt/β-katenin signální cesty [9]. Quercetin zvyšuje aktivitu tumorsupresorových proteinů p53, p21 a AMP-aktivované proteinové kinázy (AMPK). Bylo prokázáno zvýšení stability p53 [10]. Nedostatečná aktivita p53 v buňkách vede jak známo ke snížené schopnosti DNA oprav a tím ke genové nestabilitě, což hraje důležitou roli v kancerogenezi i v následné progresi nádorů. Naopak zvýšení aktivity p53 má za následek zástavu buněčného cyklu v G1 nebo G2/M fázi [11]. V procesu apoptózy se skrze změnu transmembránového potenciálu z mitochondrií uvolňuje cytochrom C, který následně aktivuje proteázy kaspázy degradující buněčnou DNA. U quercetinu byla popsána indukce apoptózy skrze kaspázovou kaskádu na příkladu spinocelulárních karcinomů dutiny ústní [12], ale i na dalších.

#### Epigenetický účinek

Flavonoidy vedle toho v buňce působí i na tzv. epigenetické úrovni, a to ve smyslu zásahu do procesu DNA metylace a modifikace histonů (ace-

tylace, metylace nebo fosforylace), ale i skrze změny exprese mikroRNA hrajících úlohu v kancerogenezi [13,14]. Enzymy DNA metylotransferázy (DNMTs) a histonové deacetylázy (HDACs, SIRT1-SIRT7) mají jak známo patologicky zvýšenou aktivitu v rámci procesu kancerogeneze, a jejich inhibice je proto jedním z cílů protinádorové léčby a prevence. Inaktivace tumorsupresorových genů, vzniklá často následkem DNA metylace nebo histonové deacetylace v oblasti jejich promotérů, se považuje za nejvýznamnější změnu v časně fázi kancerogeneze. Quercetin, podobně jako některé jiné polyfenoly, tlumí aktivitu DNMTs a tím DNA metylaci. Quercetin ve studii *in vitro* v závislosti na zvyšující se dávce dokázal zvrátit hypermetylaci tumorsupresorového genu *p16* [6]. Dalším příkladem mohou být buněčné linie karcinomů jícnu, na kterých podobným způsobem snížil DNA metylaci i acetylaci histonů [15].

#### Protizánětlivý účinek

Jak známo, chronické prozánětlivé prostředí napomáhá vývoji nádorů a urychluje ho. Protizánětlivý efekt je proto jedním z mechanismů chemoprevence.

Mezi látky s protizánětlivým účinkem patří i quercetin. Bylo prokázáno, že blokuje expresi prozánětlivého genu COX2 [16,17], inhibuje prozánětlivou cestu NF-κB a produkci prozánětlivých cytokinů [18]. Tento účinek se v rámci chemoprevence uplatňuje zejména u karcinomů sliznice gastrointestinálního traktu (GIT) a dutiny ústní [19]. Protizánětlivý efekt quercetinu skrze snížení NF-κB může být následkem aktivace *SIRT1*, podobně jako u jiných polyfenolů [20]. Aktivace *SIRT1* vede mimo jiné i k potlačení transkripce matrixových metaloproteináz (MMPs), které hrají důležitou roli v metastazování nádorů [21].

#### Inhibice angiogeneze

V rámci sledované inhibice angiogeneze quercetinem byla opakovaně prokázána snížená exprese MMPs, vaskulárního endoteliálního faktoru (vascular endothelial growth factor – VEGF) i jeho receptoru (VEGFR) [8,22–24].

#### Inhibice invazivity a metastazování nádorových buněk

Quercetin skrze inhibici STAT3 signální cesty snižuje expresi genů MMPs, což jsou

enzymy narušující struktury extracelulárního prostředí buněk. Snížením exprese MMPs se tak sníží invazivita i metastazování nádorů [25]. Na příkladu buněk spinocelulárních karcinomů dutiny ústní bylo prokázáno, že quercetin snižuje expresi MMP-2 a -9, VEGF, NF- $\kappa$ B, NO-syntázy (iNOS), COX-2, fokální adhezivní kinázy (FAK), mitogenem aktivované proteinkinázy, mimobuněčným signálem regulované kinázy 1 a 2 (MAPK/ERK1/2) a fosfatidylinositid-3 kinázy (PI3K/AKT) signální cesty [26].

### Vliv na enzymy metabolizace kancerogenů

Mezi významný mechanismus chemoprevence patří i zásah do metabolických procesů v organismu ve smyslu blokády enzymů aktivujících kancerogeny, anebo naopak aktivizace detoxikačních enzymů zbavujících organismus škodlivých látek. *In vivo* na zvířecích modelech a následně i u lidských dobrovolníků byla prokázána schopnost inhibice cytochromu P450 CYP1A2, který je aktivátorem prokancerogenů [27]. Dále byla u quercetinu zaznamenána aktivace detoxikačních enzymů fáze II, jako je glutathion S-transferáza, UDP-glukuronosyl transferáza, NAD(P)H/chinon oxidoreduktáza a hemoxygenáza-1, zbavujících organismus kancerogenů. Quercetin zvyšuje transkripci i stabilitu Nrf2 proteinu a skrze něj aktivuje vazebnou aktivitu antioxidantních replikačních elementů (AREs) a transkripci genů detoxikačních enzymů fáze II [28,29].

### Antioxidační versus prooxidační hormetický účinek v závislosti na dávce

Podobně jako to známe na příkladu vitamínu C, je u quercetinu pozorována antioxidační aktivita ve fyziologických nízkých dávkách a naopak prooxidační aktivita v dávkách vysokých. Tento bifázický, tzv. hormetický efekt je vlastní mnoha flavonoidům a jeho výsledkem je to, že v nízkých dávkách pozorujeme opačný účinek než v dávkách vysokých [30]. V koncentracích quercetinu kolem 1–40  $\mu$ M, které odpovídají příjmu přirozenou stravou, je prokázána antioxidační aktivita [31]. Tato je zprostředkována především skrze indukci

Nrf2 [32]. Jak známo indukce Nrf2 chemopreventivními látkami pomáhá buňkám zvládnout oxidační stres a má svůj potenciál v prevenci nádorů. Na straně druhé přínos antioxidantních látek je potřeba brát s rezervou v období během léčby onkologických pacientů, kdy mohou přispět k rezistenci nádorových buněk na oxidační stres vyvolaný chemoterapií a radioterapií [33]. U quercetinu se v tomto smyslu mění účinek v závislosti na dávce, navíc specificky u nádorových buněk. Ve vysokých dávkách 40–100  $\mu$ M, kterých by bylo možno dosáhnout jedině suplementací, byl u quercetinu popsán prooxidační cytotoxický efekt [31]. Jak již bylo zmíněno, cytotoxicita byla za daných zvýšených dávek quercetinu popsána specificky a pouze u nádorových buněk, avšak ne u buněk zdravých tkání. Skrze prooxidační účinek a poškození DNA dochází k aktivaci apoptózy v nádoru [34], čímž může být quercetin pomocnou látkou nejen v prevenci, ale i během onkologické léčby.

### Vazba na receptory hrající roli v kancerogenezi

Quercetin je dle studií schopen vazby na různé receptory, příkladem může být aryl hydrokarbonový receptor (AhR), který hraje roli ve vývoji mnoha chemicky indukovaných karcinomů [35]. Quercetin je antagonistou AhR, čímž inhibuje expresi cytochromů P450 CYP1, patřících mezi aktivátory prokancerogenů v kancerogenezi (viz výše). Dále má quercetin schopnost vazby na estrogenový receptor [36] a na androgenový receptor [37], které mají klíčový význam u hormonálně-dependentních malignit, a v neposlední řadě na receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor – EGFR) [38], který je obecně důležitou signální strukturou kancerogeneze [39]. Zásah do aktivity signálních cest těchto receptorů má svůj chemopreventivní vliv. V rámci estrogenových receptorů bylo zjištěno, že quercetin působí jako fytoestrogen a inhibuje proliferaci např. melanomových buněk [40]. Estrogenové receptory typu II, se kterými interaguje quercetin, jsou přítomny jak u buněk melanomu, tak i u dalších, jako jsou karcinomy prsu, ovarií, kolorekta apod. [41].

### Inhibice exprese heat shock proteinů

Quercetin tlumí produkci heat shock proteinů, což bylo prokázáno na různých druzích nádorů [42]. Heat shock proteiny tvoří komplexy s mutovaným p53 a umožňují nádorovým buňkám obejít zástavu buněčného cyklu. Tyto proteiny zvyšují přežívání nádorů za různých stresových podmínek, jako je snížená prokrvení anebo zvýšená teplota. Jsou také spojeny s rezistencí na onkologickou terapii, a quercetin proto zvyšuje citlivost na léčbu [43].

### Protivirový účinek

Samostatná oblast výzkumu quercetinu je zaměřena na možnosti využití jeho protivirového efektu. Tento se stal předmětem výzkumu na prvním místě u onemocnění chřipkou, kde probíhají studie se slibnými výsledky [44]. V rámci chemoprevence je pak sledován jeho prokázaný efekt proti infekci Epstein-Barrové [45,46], která jak známo hraje roli při vývoji některých malignit, jako jsou karcinomy žaludku, nosohltanu anebo lymfomy. Dalším významným virem spojeným s kancerogenezi je virus HPV [47]. Vlivem quercetinu byla popsána zástava buněčného cyklu u HPV 16 transformovaných buněk [48]. Jiná studie prokázala v souhlasu s předchozí také schopnost zástavy buněčného cyklu v G1 fázi při HPV 16 infekci, avšak tato nebyla prokázána u viru HPV 18, na jehož replikaci působí quercetin odlišným způsobem [49].

### In vivo studie

Hlavními místy pro chemopreventivní účinek quercetinu se zdá být zejména dutina ústní a GIT, tedy lokality, ve kterých dochází k přímému kontaktu quercetinu se sliznicemi [3,50]. Proběhlo v tomto smyslu mnoho experimentů na zvířatech. Na modelu křečků byl po indukci kancerogenem (dimethylbenz(a)anthracene – DMBA) zaznamenán snížený výskyt a zpomalený růst karcinomů buňkální sliznice ve skupině s quercetinem. Vlivem quercetinu byla popsána zástava buněčného cyklu, indukce apoptózy, snížení invazivity nádorových buněk i útlum angiogeneze [51]. Nedávno byl proveden experiment s podobnou metodikou i stejnými výsledky. Na modelu křečků

bylo vlivem quercetinu v dutině ústní znamená méně premaligních lézí (hyperplazií a dysplazií), nižší stupeň jejich závažnosti i méně invazivních karcinomů. V nádorových buňkách byla zaznamenána signifikantní inhibice exprese NF- $\kappa$ B a Bcl-2 a skrze to i vyšší stupeň apoptózy. Závěrem studie bylo, že quercetin je slibnou chemopreventivní látkou v indikaci spinocelulárních karcinomů dutiny ústní [19]. Tumory myši, histologicky z buněčných linií faryngeálního spinocelulárního karcinomu, podobně prokázaly regresi v růstu po podání quercetinu. Vedle toho negativní vliv na fyziologické fibroblasty byl minimální, jedná se proto o specifický účinek pouze na nádorovou tkáň [52]. Jiný experiment proběhl po aplikaci kancerogenu (azoxymethanu) za účelem indukce kolorektálního karcinomu u myši, kde podání quercetinu podobně signifikantně snižovalo riziko vývoje prekanceróz a karcinomů [53]. I po absorpci quercetinu do krevního oběhu však dochází k protinádorovému efektu. Příkladem může být studie na myších, ve které quercetin po perorálním podání zbrzdil vývoj chemicky (DMBA a krotonovým olejem) indukovaných kožních karcinomů [54]. Podobně byly provedeny i experimenty s chemicky (benzopyrenem) indukovanými nádory plic, kde opět vlivem perorálního podání quercetinu došlo ke snížení kancerogeneze [55,56].

### Klinické studie

Slibné výsledky *in vitro* a *in vivo* experimentů podpořily i zahájení studií na lidech. V klinické studii fáze I byl u parenterálně aplikovaného quercetinu prokázán útlum tyrozinkinázových signálních cest lymfocytů u 9 z 11 případů a tato inhibice přetrvávala až 16 hod po aplikaci. Vedle toho parenterálně aplikovaný quercetin více než 5 $\times$  snížil koncentraci karcinoembryonálního antigenu (CA 125) u pacientky v terminálním stadiu karcinomu ovarií. Jednalo se o disseminovaný případ onemocnění stadia IV bez reakce na standardní léčbu cisplatinou a cyklofosfamidem. Během léčby chemoterapií došlo k postupnému nárůstu CA 125 až na 290 U/ml. Po 3 měsících od ukončení paliativní chemoterapie byla tato pacientka zavzata do studie, kde již po 2 cyklech parenterál-

ního samotného quercetinu (v dávce 420 mg/m<sup>2</sup>) došlo ke snížení CA 125 až na 55 U/ml. Vzhledem k dobré odpovědi na quercetin byla následně k dalším třem cyklům quercetinu přidána i karboplatina k potenciaci účinku a konečná hodnota CA 125 dosáhla 45 U/ml. U pacienta s pokročilým karcinomem jater byl v této studii zaznamenán podobný trend, a sice snížení alfa-fetoproteinu (AFP) ze 460 na 40 U/ml [57].

### Populační studie

Přestože je hodnocení populačních studií vzhledem k multifaktoriálním vlivům v praxi obtížné, a jejich výsledky je proto potřeba brát s rezervou, lze se vzhledem k velkým zhodnoceným souborům shodnout na prokázaném chemopreventivním efektu quercetinu u různých druhů nádorů. Švédská studie, která zhodnotila přes 500 případů adenokarcinomu žaludku a přes 1 000 kontrol, našla významnou asociaci mezi příjmem quercetinu a nižším výskytem těchto nádorů, a to až o 43 % [58]. Jiná studie srovnala přibližně 1 500 případů kolorektálního karcinomu s 1 500 kontrolami a popsala snížení incidence tumorů o 32 % při konzumaci quercetinu [59]. V případě karcinomů plic bylo vlivem quercetinu popsáno snížení výskytu tumorů o 51 % a u těžkých kuřáků dokonce o 65 % [60].

### Synergismus quercetinu s radioterapií nebo chemoterapií

Vedle chemoprevence je quercetin sledován i jako radioprotektor zdravých tkání. Perorální a lokální aplikace quercetinu v klinické studii na 64 pacientech dokázala zmírnit poškození kůže při radioterapii v lokalitě karcinomů hlavy a krku [61]. Vedle toho studie ukazují na schopnost potenciace účinku onkologické léčby při kombinaci quercetinu s chemoterapií a radioterapií a podporují další výzkum v této oblasti [62]. Synergismus byl prokázán u mnoha druhů chemoterapeutik [63]. Příkladem může být synergistický efekt quercetinu s cisplatinou, prokázáný na příkladu karcinomů nosohltanu [64]. Na buňkách karcinomu hrtanu zvýšilo přidání quercetinu k cisplatině stupeň apoptózy o 16 %. Závěrem této studie bylo, že kombinace cisplatiny

s quercetinem je slibnou metodou pro potenciaci účinku chemoterapie u karcinomů hlavy a krku [65]. Studie na jiných nádorových buňkách popsala po přidání 0,01–10  $\mu$ M quercetinu 1,5–30násobnou potenciaci cytotoxického účinku cisplatin [66]. Výsledným efektem může být nejen zvýšení léčebného efektu cisplatin, ale současně i snížení nefrotoxicity léčby [67]. Studie s obdobnými výsledky pak proběhly i na jiných druzích chemoterapeutik. Kombinace quercetinu a podobných přírodních látek s chemoterapií představuje volbu pro sledování do budoucna stran možnosti zvýšení efektivity při současném snížení toxicity léčby a může ukazovat i na jednu z potenciálních cest snížení rezistence na onkologickou léčbu [68].

### Farmakokinetika quercetinu

U quercetinu je stran jeho biologické dostupnosti, podobně jako u jiných flavonoidů, problémem nízká rozpustnost ve vodě, a studie proto řeší možné mechanismy zvýšení jeho účinnosti v organismu [2]. Stravou se u běžné populace udává průměrný příjem 5–40 mg denně (při západním stylu stravy se odhaduje v průměru 16 mg/den), ale u jedinců konzumujících ovoce a zeleninu s vysokým obsahem quercetinu může dosáhnout denní dávka až 200–500 mg [3]. Absorpce z GIT je obecně u flavonoidů relativně nízká vzhledem k malé rozpustnosti ve vodě [3]. V rámci rostlinných zdrojů se quercetin vyskytuje v různých formách, které mimo jiné ovlivňují i jeho vstřebatelnost z trávicího traktu do krve. Nejlepší biologická dostupnost se v rámci běžně dostupných potravin udává u cibule, což je dáno nejen vysokou koncentrací, ale i lépe vstřebatelnými formami quercetinu v ní [69]. Koncentrace, ve kterých studie udávají schopnost 50% útlumu růstu nádorových buněk (IC<sub>50</sub>), se pohybují v širokém rozmezí 7 nM až do nefyziologicky vysokých hodnot přes 100  $\mu$ M. Nejčastěji udávaná sérová koncentrace quercetinu s protinádorovým efektem je 10  $\mu$ M a té by bylo u lidí možno dosáhnout po perorální suplementaci kolem 1 500 mg denně [70–72]. Po příjmu běžné stravy se koncentrace quercetinu v krvi udává řádově 100 nM až 1  $\mu$ M [3,69], po příjmu velkého množ-

ství stravy bohaté na quercetin pak lze dosáhnout hladin v maximu 5–10  $\mu\text{M}$  [3]. Výhodou quercetinu je relativně dlouhý poločas eliminace ze séra, takže při každodenním příjmu se dosahuje stabilních hladin [3,72]. Důležité je, že i při fyziologických hladinách v séru lze podpořit zástavu buněčného cyklu nádorů. Subpopulace nádorových buněk zastavených v G1 fázi se v experimentu i při koncentraci quercetinu 10  $\mu\text{M}$ , napodobující model peaku v krvi dosažitelný perorálním příjmem, zvýšila z 6,4 na 9,2 %. Tato fyziologická hladina quercetinu byla také schopna ovlivnit regulátor exprese proteinu p21 [73]. Studie dále prokazují, že cytotoxický efekt quercetinu se projevuje specificky na nádorových buňkách, kdežto u zdravých buněk by k poškození docházelo až při velmi vysokých koncentracích 100–500  $\mu\text{M}$ , kterých nelze v organismu perorálním příjmem dosáhnout [74]. Pro srovnání – pro dosažení antiproliferačního a proapoptického účinku je u nádorových buněk melanomu B16-BL6 potřeba pouze 3,5  $\mu\text{M}$  [75] anebo 10  $\mu\text{M}$  pro SK-Br3, MDA-MB-453 a MDA-MB-231 karcinomu prsu [73]. Současný výzkum se zaměřuje zejména na zvýšení biologické dostupnosti quercetinu zejména cestou nanotechnologií (nanočástic), díky nimž existuje možnost zvýšení koncentrace polyfenolů v cílových tkáních [76,77].

## Závěr

Quercetin je jedním z rostlinných flavonoidů, který *in vitro*, *in vivo* i v klinické studii fáze I prokázal protinádorový efekt. Byla u něj popsána schopnost zástavy buněčného cyklu, vyvolání apoptózy, inhibice angiogeneze, invazivity i metastazování nádorů. Quercetin zasahuje současně na více úrovních kancerogeneze, čímž má potenciál ovlivnit rezistenci na léčbu. Byl u něj prokázán synergismus s chemoterapií a snížení toxicity léčby. Kromě studia vlastních mechanismů účinku se do budoucna očekává větší důraz na výzkum farmakologických možností zvýšení jeho vstřebatelnosti a dostupnosti pro cílové tkáně.

## Literatura

- Block G, Patterson B, Subar A. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 1992; 18(1): 1–29. doi: 10.1080/01635589209514201.
- Gibellini L, Pinti M, Nasi M et al. Quercetin and Cancer Chemoprevention. Evidence-based Complement Alternat Med 2011; 2011: 591356. doi: 10.1093/ecam/nea053.
- Sak K. Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. *Nutr Cancer* 2014; 66(2): 177–193. doi: 10.1080/01635581.2014.864418.
- Beniston RG, Campo MS. Quercetin elevates p27(Kip1) and arrests both primary and HPV16 E6/E7 transformed human keratinocytes in G1. *Oncogene* 2003; 22(35): 5504–5514.
- Ong CS, Tran E, Nguyen TT et al. Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions. *Oncol Rep* 2004; 11(3): 727–733.
- Ma L, Feungang JM, Konarski P et al. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. *Front Biosci* 2006; 11: 2275–2285.
- Russo GL, Russo M, Spagnuolo C et al. Quercetin: a pleiotropic kinase inhibitor against cancer. *Cancer Treat Res* 2014; 159: 185–205. doi: 10.1007/978-3-642-38007-5\_11.
- Kashyap D, Mittal S, Sak K et al. Molecular mechanisms of action of quercetin in cancer: recent advances. *Tumour Biol* 2016; 37(10): 12927–12939. doi: 10.1007/s13277-016-5184-x.
- Shan BE, Wang MX, Li RQ. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer Invest* 2009; 27(6): 604–612. doi: 10.1080/07357900802337191.
- Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72(3): 797–804. doi: 10.1271/bbb.70680.
- Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR et al. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(18): 8493–8497.
- Haghiac M, Walle T. Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutr Cancer* 2005; 53(2): 220–231. doi: 10.1207/s15327914nc5302\_11.
- Pan MH, Lai CS, Wu JC et al. Epigenetic and disease targets by polyphenols. *Curr Pharm Des* 2013; 19(34): 6156–6185.
- Slabý O. MikroRNA vstupují do klinického testování. *Klin Onkol* 2012; 25(2): 139–142.
- Yadav VR, Prasad S, Sung B et al. Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. *Toxins (Basel)* 2010; 2(10): 2428–2466. doi: 10.3390/toxins2102428.
- Xiao X, Shi D, Liu L et al. Quercetin Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenesis through Inactivation of P300 Signaling. *PLoS One* 2011; 6(8): e22934. doi: 10.1371/journal.pone.0022934.
- Raja SB, Rajendiran V, Kasinathan NK et al. Differential cytotoxic activity of Quercetin on colonic cancer cells depends on ROS generation through COX-2 expression. *Food Chem Toxicol* 2017; 106(Pt A): 92–106. doi: 10.1016/j.fct.2017.05.006.
- Nair MP, Mahajan S, Reynolds JL et al. The Flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells via Modulation of the NF- $\kappa$ B System. *Clinical and Vaccine Immunology* 2006; 13(3): 319–328.
- Zhang W, Yin G, Dai J et al. Chemoprevention by Quercetin of oral squamous cell carcinoma by suppression of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in DMBA-treated hamsters. *Anticancer Res* 2017; 37(8): 4041–4049. doi: 10.21873/anticancerres.11789.
- Chung S, Yao H, Caito S et al. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501(1): 79–90. doi: 10.1016/j.jabb.2010.05.003.
- Mendoza EE, Burd R. Quercetin as a systemic chemopreventive agent: structural and functional mechanisms. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11(14): 1216–1221.
- Igura K, Ohta T, Kuroda Y et al. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis *in vitro*. *Cancer Lett* 2001; 171(1): 11–16.
- Pratheeshkumar P, Budhraj A, Son Y-O et al. quercetin inhibits angiogenesis mediated human prostate tumor growth by targeting VEGFR- 2 regulated AKT/mTOR/P70S6K signaling pathways. *PLoS One* 2012; 7(10): e47516. doi: 10.1371/journal.pone.0047516.
- Song W, Zhao X, Xu J et al. Quercetin inhibits angiogenesis-mediated human retinoblastoma growth by targeting vascular endothelial growth factor receptor. *Oncology Letters* 2017; 14(3): 3343–3348. doi: 10.3892/ol.2017.6623.
- Yu D, Ye T, Xiang Y et al. Quercetin inhibits epithelial-mesenchymal transition, decreases invasiveness and metastasis, and reverses IL-6 induced epithelial-mesenchymal transition, expression of MMP by inhibiting STAT3 signaling in pancreatic cancer cells. *OncoTargets and therapy* 2017; 10: 4719–4729. doi: 10.2147/OTT.S136840.
- Lai WW, Hsu SC, Chueh FS et al. Quercetin inhibits migration and invasion of SAS human oral cancer cells through inhibition of NF- $\kappa$ B and matrix metalloproteinase-2/-9 signaling pathways. *Anticancer Res* 2013; 33(5): 1941–1950.
- Chen Y, Xiao P, Ou-Yang DS et al. Simultaneous action of the flavonoid quercetin on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2A6, N-acetyltransferase and xanthine oxidase activity in healthy volunteers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36(8): 828–833. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05158.x.
- Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin. *Free Radic Biol Med* 2007; 42(11): 1690–1703. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.017.
- Odenthal J, van Heumen BW, Roelofs HM et al. The influence of curcumin, quercetin, and eicosapentaenoic acid on the expression of phase II detoxification enzymes in the intestinal cell lines HT-29, Caco-2, HuTu 80, and LT97. *Nutr Cancer* 2012; 64(6): 856–863. doi: 10.1080/01635581.2012.700994.
- George VC, Dellaire G, Rupasinghe HPV. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *J Nutr Biochem* 2017; 45: 1–14. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.11.007.
- Vargas AJ, Burd R. Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management. *Nutr Rev* 2010; 68(7): 418–428. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00301.x.
- Kimura S, Warabi E, Yanagawa T et al. Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387(1): 109–114. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.136.
- Pastorek M, Müller P, Vojtěšek B. Nrf2 – dve tváře regulátora antioxidantního systému. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 2): 26–31. doi: 10.14735/amko20152547.
- Min K, Ebeler SE. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced DNA damage and enhances DNA repair in Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(11): 2716–2722. doi: 10.1016/j.fct.2009.07.033.
- Mohammadi-Bardbori A, Bengtsson J, Rannug U et al. Quercetin, resveratrol, and curcumin are indirect activators of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). *Chem Res Toxicol* 2012; 25(9): 1878–1884. doi: 10.1021/tx300169e.
- Bulzomi P, Galluzzo P, Bolli A et al. The pro-apoptotic effect of quercetin in cancer cell lines requires ER $\beta$ -dependent signals. *J Cell Physiol* 2012; 227(5): 1891–1898. doi: 10.1002/jcp.22917.

37. Boam T. Anti-androgenic effects of flavonols in prostate cancer. *Ecantermedicalsience* 2015; 9: 585. doi: 10.3332/ecancer.2015.585.
38. Baby B, Antony P, Vijayan R. Interactions of quercetin with receptor tyrosine kinases associated with human lung carcinoma. *Nat Prod Res* 2017; 1–4. doi: 10.1080/14786419.2017.1385015.
39. Sírák I, Hátlová J, Petera J et al. Receptor pro epidermální růstový faktor a jeho úloha v radioterapii. *Klin Onkol* 2008; 21(6): 338–347.
40. Caltagirone S, Ranelletti FO, Rinelli A et al. Interaction with type II estrogen binding sites and antiproliferative activity of tamoxifen and quercetin in human non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17(1): 51–59. doi: 10.1165/ajrcmb.17.1.2728.
41. Piantelli M, Maggiano N, Ricci R et al. Tamoxifen and quercetin interact with type II estrogen binding sites and inhibit the growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 1995; 105(2): 248–253.
42. Hansen RK, Oesterreich S, Lemieux P et al. Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239(3): 851–856. doi: 10.1006/bbrc.1997.7572.
43. Zanini C, Giribaldi G, Mandili G et al. Inhibition of heat shock proteins (HSP) expression by quercetin and differential doxorubicin sensitization in neuroblastoma and Ewing's sarcoma cell lines. *J Neurochem* 2007; 103(4): 1344–1354. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04835.x.
44. Wu W, Li R, Li X et al. Quercetin as an antiviral agent inhibits Influenza A Virus (IAV) entry. *Viruses* 2016; 8(1): 6. doi: 10.3390/v8010006.
45. Lee M, Son M, Ryu E et al. Quercetin-induced apoptosis prevents EBV infection. *Oncotarget* 2015; 6(14): 12603–12624. doi: 10.18632/oncotarget.3687.
46. Lee HH, Lee S, Shin YS et al. Anti-Cancer Effect of Quercetin in Xenograft Models with EBV-Associated Human Gastric Carcinoma. *Molecules* 2016; 21(10): 1286. doi: 10.3390/molecules21101286.
47. Váňová B, Golais F. Onkogénny potenciál papilomavírusov. *Klin onkol* 2013; 26(6): 399–403. doi: 10.14735/amko2013409.
48. Beniston RG, Campo MS. Quercetin elevates p27(Kip1) and arrests both primary and HPV16 E6/E7 transformed human keratinocytes in G1. *Oncogene* 2003; 22(35): 5504–5514. doi: 10.1038/sj.onc.1206848.
49. Beniston RG, Campo MS. HPV-18 transformed cells fail to arrest in G1 in response to quercetin treatment. *Virus Res* 2005; 109(2): 203–209. doi: 10.1016/j.virusres.2004.12.002.
50. Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. *Cancer Lett* 2008; 269(2): 315–325. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.046.
51. Priyadarsini RV, Vinothini G, Murugan RS et al. The flavonoid quercetin modulates the hallmark capabilities of hamster buccal pouch tumors. *Nutr Cancer* 2011; 63(2): 218–226. doi: 10.1080/01635581.2011.523503.
52. Castillo MH, Perkins E, Campbell JH et al. The effects of the bioflavonoid quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin. *Am J Surg* 1989; 158(4): 351–355.
53. Warren CA, Paulhill KJ, Davidson LA et al. Quercetin may suppress rat aberrant crypt foci formation by suppressing inflammatory mediators that influence proliferation and apoptosis. *J Nutr* 2009; 139(1): 101–105. doi: 10.3945/jn.108.096271.
54. Ali H, Dixit S. Quercetin attenuates the development of 7, 12-dimethyl benz (a) anthracene (DMBA) and croton oil-induced skin cancer in mice. *J Biomed Res* 2015; 29(2): 139–144. doi: 10.7555/JBR.29.20130025.
55. Kamaraj S, Vinodhkumar R, Anandakumar P et al. The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a) pyrene. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(12): 2268–2273.
56. Jin NZ, Zhu YP, Zhou JW et al. Preventive effects of quercetin against benzo[a]pyrene-induced DNA damages and pulmonary precancerous pathologic changes in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98(6): 593–598. doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto\_382.x
57. Ferry DR, Smith A, Malkhandi J et al. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for in vivo tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 1996; 2(4): 659–668.
58. Ekstrom AM, Serafini M, Nyren O et al. Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: Results from a population-based study in Sweden. *Ann Oncol* 2011; 22(2): 438–443. doi: 10.1093/annonc/mdq390.
59. Theodoratou E, Kyle J, Cetnarskyj R et al. Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(4): 684–693. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0785.
60. Lam TK, Rotunno M, Lubin JH et al. Dietary quercetin, quercetin-gene interaction, metabolic gene expression in lung tissue and lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2010; 31(4): 634–642. doi: 10.1093/carcin/bgp334.
61. Rozenfeld LG, Abyzov RA, Bozhko GT. The possibilities of protection against local radiation injuries in ORL-oncologic patients. *Vestn Otorinolaryngol* 1990; 2: 56–58.
62. Brito AF, Ribeiro M, Abrantes AM et al. Quercetin in cancer treatment, alone or in combination with conventional therapeutics? *Curr Med Chem* 2015; 22(26): 3025–3039.
63. Miles SL, McFarland M, Niles RM. Molecular and physiological actions of quercetin: need for clinical trials to assess its benefits in human disease. *Nutr Rev* 2014; 72(11): 720–734. doi: 10.1111/nure.12152.
64. Daker M, Ahmad M, Khoo AS. Quercetin-induced inhibition and synergistic activity with cisplatin – a chemotherapeutic strategy for nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Cell Int* 2012; 12(1): 34. doi: 10.1186/1475-2867-12-34.
65. Kuhar M, Imran S, Sigh N. Curcumin and Quercetin combined with Cisplatin to induce apoptosis in human laryngeal carcinoma Hep-2 cells through the mitochondrial pathway. *Journal of Cancer Molecules* 2007; 3: 121–128.
66. Scambia G, Ranelletti FO, Benedetti Panici P et al. Inhibitory effect of quercetin on primary ovarian and endometrial cancers and synergistic activity with cis-diaminedichloroplatinum (II). *Gynecol Oncol* 1992; 45(1): 13–19.
67. Sanchez-Gonzalez PD, Lopez-Hernandez FJ, Perez-Barriocanal F et al. Quercetin reduces cisplatin nephrotoxicity in rats without compromising its anti-tumour activity. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(11): 3484–3495. doi: 10.1093/ndt/gfr195.
68. Chen C, Zhou J, Ji C. Quercetin: a potential drug to reverse multidrug resistance. *Life Sci* 2010; 87(11–12): 333–338. doi: 10.1016/j.lfs.2010.07.004.
69. Lee J, Mitchell AE. Pharmacokinetics of quercetin absorption from apples and onions in healthy humans. *J Agric Food Chem* 2012; 60(15): 3874–3881. doi: 10.1021/jf3001857.
70. Lamson DW, Brignall MS. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern Med Rev* 2000; 5(3): 196–208.
71. Nielsen SE, Kall M, Justesen U et al. Human absorption and excretion of flavonoids after broccoli consumption. *Cancer Lett* 1997; 114(1–2): 173–174.
72. Hollman PC, van Trijp JM, Mengelers MJ et al. Bioavailability of dietary antioxidant flavanol quercetin in man. *Cancer Lett* 1997; 114(1–2): 139–140.
73. Jeong JH, An JY, Kwon YT et al. Effects of low dose quercetin: Cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression. *J Cell Biochem* 2009; 106(1): 73–82. doi: 10.1002/jcb.21977.
74. Matsuo M, Sasaki N, Saga K et al. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(2): 253–259.
75. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87(4): 595–600.
76. Men K, Duan X, Wei XW et al. Nanoparticle-delivered quercetin for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14(6): 826–832.
77. Davatgaran-Taghipour Y, Masoomzadeh S, Farzaei MH et al. Polyphenol nanoformulations for cancer therapy: experimental evidence and clinical perspective. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 2689–2702. doi: 10.2147/IJN.S131973.

# Trastuzumab v neoadjuvantní léčbě HER2+ karcinomu prsu – 5leté zkušenosti z onkologické kliniky 1. LF UK a VFN

## Use of Trastuzumab for Neoadjuvant Therapy of HER2+ Breast Cancer – 5-Years of Experience in a Single Clinic

Bielčíková Z.<sup>1</sup>, Petruželka L.<sup>1</sup>, Chloupková R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

<sup>2</sup> Institut biostatistiky a analýz, LF MU, Brno

### Souhrn

**Úvod:** Trastuzumab (Herceptin® – H) je v České republice léčebným standardem HER2 dependentního (HER2+) karcinomu prsu (breast cancer – BC) od roku 2009. Neoadjuvantní aplikace H pomáhá zvýšit počet patologických kompletních remisí (pathologic complete remission – pCR) a má tak vliv na prognózu nemocných. **Cíl:** Cílem naší práce bylo zhodnocení efektu neoadjuvantní terapie (NAT) s H u pacientek s časným HER2+ BC a korelace léčebného výsledku s přežíváním (overall survival – OS) nemocných. pCR jsme definovali jako absenci invazivního karcinomu v tkáni prsní žlázy (ypT0) při možné přítomnosti reziduální nemoci ve formě neinvazivního karcinomu (ypTis) a absenci nádorových buněk v axilárních lymfatických uzlinách (ypN0). Počet pCR jsme korelovali s hormonální závislostí nádoru, srovnali jsme počet dosažených pCR u nemocných s hormonálně pozitivním (estrogenní receptor – ER+) a hormonálně negativním (ER–) onemocněním. **Výsledky:** Do hodnocení bylo zapojeno 148 žen s HER2+ BC, predominantně ve stadiu II. Celkem 50,7 % z nich bylo v době diagnózy premenopauzálních, 45,9 % mělo ER– onemocnění. Většina pacientek byla léčena sekvenčně antracyklínem a poté taxanem a H. pCR byla zaznamenána u 50 % nemocných (74/148), ER+ nádory regredovaly častěji do stadia ypTis (24/35), ER– nádory do stadia ypT0ypN0 (26/39). OS 1 rok u pacientek, které dosáhly pCR, bylo signifikantně lepší ve srovnání se skupinou pacientek, které na NAT nezareagovaly (100,0 vs. 95,3 %;  $p = 0,009$ ), medián OS nebyl u pacientek s pCR dosažen. **Závěr:** Pacientky, které dosáhly pCR, měly lepší prognózu ve srovnání se ženami, u kterých pCR nebylo dosaženo.

### Klíčová slova

neoadjuvantní terapie – trastuzumab – časný karcinom prsu – patologická kompletní remise – prognóza

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 zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



MUDr. Zuzana Bielčíková, Ph.D.

Onkologická klinika

1. LF UK a VFN v Praze

U Nemocnice 499/2

128 08 Praha 2

e-mail: zuzana.bielcikova@vfn.cz

Obdrženo/Submitted: 14. 9. 2017

Přijato/Accepted: 15. 2. 2018

doi: 10.14735/amko2018191

## Summary

**Background:** Trastuzumab (Herceptin® – H) has been the standard-of-care for patients with HER2+ breast cancer (BC) since 2009 in the Czech Republic. Neoadjuvant application of H increases the number of patients who achieve pathological complete remission (pCR) and improves patients' outcomes. **Aim:** This study aimed to assess the effect of neoadjuvant therapy (NAT) with H in patients with early HER2+ BC and to correlate the therapeutic outcome with overall survival (OS). We defined pCR as no invasive carcinoma (ypT0) or *in situ* residual carcinoma (ypTis) in breast tissue and no invasive carcinoma in axillary lymphatic nodes (ypN0). To correlate pCR with the hormone dependency of BC, we compared the number of patients who achieved pCR between those with hormone-dependent (estrogen receptor (ER)+) BC and those with hormone-negative (ER-) BC. **Results:** We evaluated data from 148 patients with HER2+ BC, most of whom were at stage II. Of these, 50.7% were premenopausal women and 45.9% had ER- BC. Most patients were treated with anthracyclines followed by taxanes and H. pCR was reported in 50% of patients (74/148). ER+ BC regressed more often to ypTis stage (24/35), ER- BC to ypT0ypN0 stage (26/39). The 1-year OS rate of patients who achieved pCR was significantly higher than that of patients who did not (100.0% vs. 95.3%,  $p = 0.009$ ). Median OS was not achieved in pCR patients group. **Conclusion:** Patients who achieved pCR had a better prognosis than patients who did not.

## Key words

neoadjuvant therapy – trastuzumab – early breast cancer – pathological complete remission – prognosis

## Úvod

HER2+ karcinom prsu (breast cancer – BC) patří mezi prognosticky méně příznivé varianty BC [1]. Chování nádoru ovlivněného amplifikací HER2 je příčinou poměrně častého postižení spádového lymfatického systému a pokročilosti primární nemoci. Terapie časného nebo lokálně pokročilého HER2+ BC je proto často směřována k primární systémové terapii. Cílem neoadjuvantní terapie (NAT) je časný zásah do procesu nádorové diseminace a/nebo zmenšení objemu primární nemoci [2–4] a její efekt je posuzován velikostí reziduální nemoci.

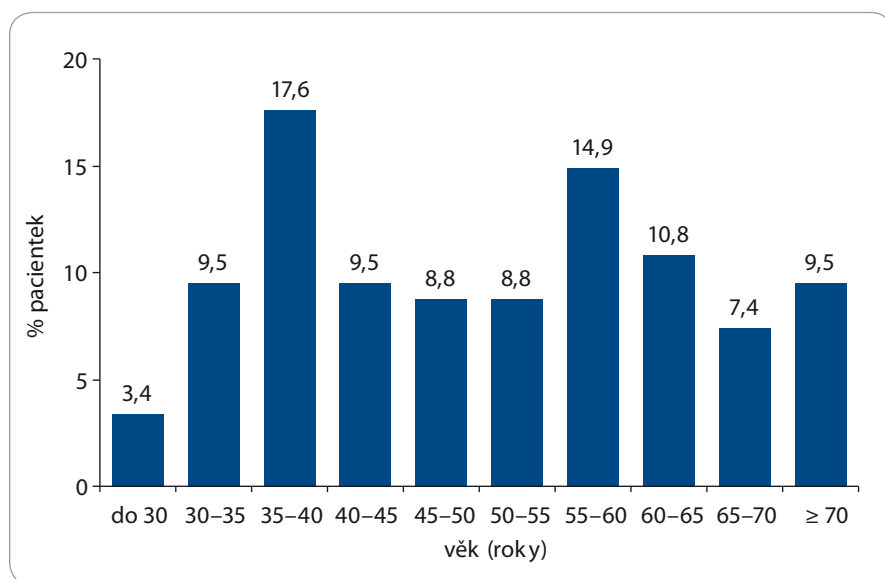
Vztah patologické kompletní remise (pathologic complete remission – pCR)

a prognózy pacientů léčených NAT byl sledován jak u BC, tak u jiných diagnóz [5,6]. Základním předpokladem pro vyhodnocení prognostického významu pCR bylo zakotvení jednotné definice při různorodosti patologického hodnocení reziduální nemoci [7–8]. pCR koreluje s průběhem zejména triple negativního (TN) a HER2+ BC [9–11], u kterých dosahuje zároveň nejvyšší četnosti.

Ve studii TECHNO (Taxol Epirubicin Cyclophosphamid Herceptin Neoadjuvant) byla pCR jediným prognostickým faktorem [12]. Ženy léčené kombinovanou chemoterapií a trastuzumabem (Herceptinem® – H) měly v případě dosažení pCR lepší prognózu a 3leté celkové přežívání (overall survival – OS) 96,3 % ve

srovnání s pacientkami, které pCR nedosáhly (3leté OS 85,0 %). pCR byla zaznamenána u 38,7 % žen, její definice zahrnovala ypT0/ypTisypN0 nálezy. Klinické studie s H v neoadjuvantní indikaci a pCR jako primárním cílem potvrdily efekt cílené terapie ve smyslu zvýšení podílu pCR ve srovnání s chemoterapií samotnou [13–20]. V metaanalýze studií s H bylo dosaženo dvojnásobné četnosti pCR u pacientek léčených chemoterapií a H oproti režimům bez anti-HER2 léčby [21]. Jedním z předpokládaných mechanismů efektivity H je jeho působení nejen na progenitorové buňky, ale také na kmenové buňky [22–23], a tedy zásah přímo do kancerogeneze nemoci.

Další zvýšení počtu pCR přinesla duální anti-HER2 blokáda kombinovaná se systémovou chemoterapií. Ve studii NeoALTTO (Neoadjuvant Lapatinib and/or Trastuzumab Treatment Optimization) [24] počet pCR při léčbě H a Lapatinibem překonal hranici 50 %, ve studii NeoSphere (A Study of Pertuzumab in Combination With Herceptin in Patients With HER2 Positive Breast Cancer) [25] u pacientek s hormonálně negativním karcinomem (s negativními estrogenovými receptory (ER-) hranici 60 %, ve studii Tryphaena [26] počet pCR dosáhl 57–66 %. Ve všech studiích měla skupina pacientek, která na NAT reagovala dosažením pCR, lepší prognózu ve srovnání se skupinou žen s reziduální nemocí po ukončení NAT. V metaanalýze 36 studií s anti-HER2 léčbou byl poměr rizik (hazard ratio – HR) pro přežití bez události



Graf 1. Věk pacientek v době zahájení neoadjuvantní léčby Herceptinem.



(event-free survival – EFS) pro pacienty s dosaženou pCR vs. non-pCR 0,29 pro ER– a 0,52 pro ER+ skupinu [27].

Bezpečnost H byla hodnocena v mnoha studiích. Vyšší podíl očekávané kardiotoxicity byl zaznamenán při konkomitantním podání H a antracyklinů [28–29]. Kardiální rizikové faktory jako hypertenze či diabetes zůstávají ve vztahu k H podmíněnému riziku kardiotoxicity v ne zcela jasném vztahu. Dle Seidmana et al [30] byl v multifaktoriálním hodnocení potenciálních rizikových faktorů (věk, hypertenze, radioterapie hrudní stěny, pokles ejekční frakce levé komory srdeční (EF LK), kumulativní dávka antracyklinů) vyhodnocen pouze věk jako signifikantně pozitivně asociovaný s rizikem kardiální toxicity H. V jiné studii [31] se toto pozorování nepotvrdilo, jako rizikový faktor pro vznik kardiotoxicity se prokázal pokles EF LK. Podle studie NSABP-B31 [32] jsou třemi základními rizikovými faktory pro kardiotoxicitu asociovanou s H věk, pokles EF LK a antihypertenzní komedikace. Režimy bez antracyklinů vč. dvoukombinace anti-HER2 léčiv jsou stran kardiotoxicity bezpečnou modalitou léčby. Ve studii NSABP-B31 byla při sledování až 7 let zaznamenána kardiální událost u 4 % pacientek léčených H ve srovnání s 1,3 % pacientek léčených chemoterapií bez H [32]. Symptomatické kardiální postižení bylo ve studii NOAH zaznamenáno při 3letém sledování u 2 % pacientek léčených H [29].

V níže uvedeném souboru popisujeme pacientky s časným HER2+ BC léčené neoadjuvantně systémovou chemoterapií a H na Onkologické klinice 1. LF UK a VFN v Praze v letech 2009–2016. Cílem práce je zejména zhodnocení léčebných výsledků měřených počtem dosažených pCR a přežíváním nemocných v odstavu 1, 3 a 5 let po ukončení NAT.

### Soubor pacientů

Do studie bylo zařazeno 148 žen s mediánem věku 51 let. Věková distribuce pacientek je znázorněna na grafu 1, mladé ženy do 40 let tvořily 30,5 % hodnocené skupiny. Pacientky do 35 let tvořily 12,9 %, 50,7 % pacientek bylo premenopauzálních (tab. 1). Většina nemocných byla léčena pro BC stadia II (64,2 %) a III (28,4 %) (tab. 1).

Tab. 1. Charakteristiky pacientek.

	n = 148
<b>Věk v době léčby trastuzumabem (roky)</b>	
medián (min.–max.)	51 (27–77)
<b>Věk v době léčby trastuzumabem, n (%)</b>	
≤ 35 let	28 (18,9)
35–60 let	79 (53,4)
≥ 60 let	41 (27,7)
<b>Menopauzální status v době diagnózy, n (%)</b>	
premenopauzální	75 (50,7)
postmenopauzální	73 (49,3)
<b>Performance status v době diagnózy, n (%)</b>	
PS 0	118 (79,7)
PS 1	20 (13,5)
PS 2	1 (0,7)
N/A	9 (6,1)
<b>Stadium nemoci podle TNM v době diagnózy, n (%)</b>	
0	1 (0,7)
I	7 (4,7)
IIA	44 (29,7)
IIB	51 (34,5)
IIIA	18 (12,2)
IIIB	24 (16,2)
IV	2 (1,4)
N/A	1 (0,7)

N/A – neuvedeno v registru

Histologické parametry jsou specifikovány níže (tab. 2) – v 87,2 % se jednalo o invazivní duktální karcinom (invasive ductal carcinoma – IDC), v 62,8 % o nádor s nízkou diferenciací (G3), 53,4 % nádorů bylo ER+ (95/148 nádorů vykazovalo pozitivitu estrogenového a/nebo progesteronového receptoru), pouze jedna pacientka měla HER2 (receptor pro epidermální růstový faktor typu 2) negativní onemocnění podle definitivní histologie, na podkladě HER2+ biopstického nálezu byla ale neoadjuvantně léčena H (tab. 2). Vysoké procento neznámého proliferačního stavu nádoru (Ki67) přisuzujeme nedostatečnému přepisu těchto dat do registru, ačkoli je toto vyšetření standardní součástí histologického záznamu.

Hodnocené pacientky byly neoadjuvantně léčeny nejčastěji sekvencí antracyklinů a taxanů v kombinaci s H. Standardně používanými režimy na naší klinice jsou – z antracyklinů 4 × AC (doxorubicin 60 mg/m<sup>2</sup> + cyklofosamid 600 mg/m<sup>2</sup> à 21 dnů) nebo 3 × FEC 100 (fluorouracil 500 mg/m<sup>2</sup> + epirubicin 100 mg/m<sup>2</sup> + cyklofosamid 500 mg/m<sup>2</sup> à 21 dnů), z taxanů 9–12 × T (paklitaxel 80 mg/m<sup>2</sup> týdně) nebo 3–4 × D (docetaxel 100 mg/m<sup>2</sup> à 21 dnů) podávaný s růstovým faktorem G-CSF, H byl podán venózně v dávce 2 mg/kg týdně nebo 6 mg/kg à 21 dnů (nasyovací dávky 4, resp. 8 mg/kg) nebo subkutánně v jednotné dávce 600 mg à 21 dnů. Celkem 140/148 žen řádně NAT ukončilo, další důvody ukončení léčby jsou

Tab. 2. Histologické nálezy z předoperační biopsie.

	n = 148
<b>Histologický typ karcinomu prsu, n (%)</b>	
duktální	129 (87,2)
lobulární	7 (4,7)
smíšený dukální a lobulární	1 (0,7)
jiný	11 (7,4)
<b>Grading, n (%)</b>	
1	1 (0,7)
2	52 (35,1)
3	93 (62,8)
N/A	2 (1,4)
<b>ER (exprese estrogenových receptorů), n (%)</b>	
negativní	68 (45,9)
pozitivní	79 (53,4)
N/A	1 (0,7)
<b>PR (exprese progesteronových receptorů), n (%)</b>	
negativní	70 (47,3)
pozitivní	77 (52,0)
N/A	1 (0,7)
<b>Ki 67, n (%)</b>	
< 15 %	7 (4,7)
15–35 %	27 (18,2)
> 35 %	41 (27,7)
N/A	73 (49,3)
<b>HER-2/neu – imunohistochemicky (IHC), n (%)</b>	
0	1 (0,7)*
1+	0 (0,0)
2+	16 (10,8)
3+	131 (88,5)
<b>HER-2/neu – ISH, n (%)</b>	
negativní	1 (0,7)**
pozitivní	98 (66,2)
N/A	49 (33,1)

N/A – v registru neuvedeno, \* ISH pozitivní, \*\* IHC2+, léčena H neoadjuvantně, adjuvantně léčba Herceptinem ukončena (v pooperační histologii nádor HER2 negativní)

uvedeny v tabulce (tab. 3). Obvykle ultrazvukové přešetření prsu a spádových lymfatických uzlin pacientky na našem pracovišti minimálně 2×, první zpravidla po 2–4 cyklech antracyklinů (tato data do registru zavedena nebyla).

### Metodika

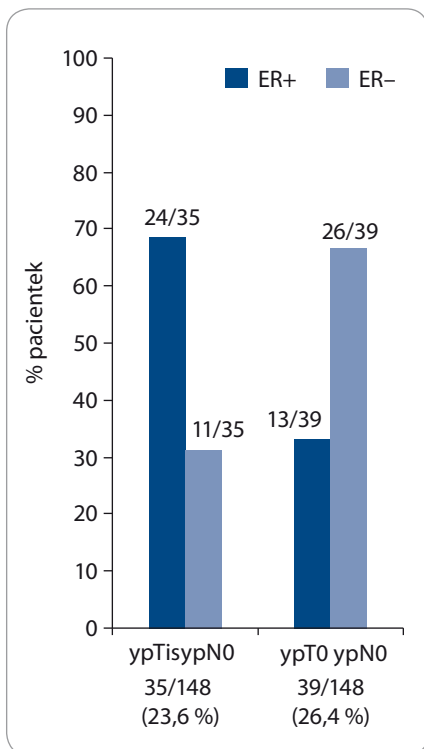
Zdrojem dat byl registr BREAST, z kterého byly extrahovány údaje o nemocných léčených na našem pracovišti v letech 2009–2016. Pacientky ukončily terapii před 10. říjnem 2016. Cílem ana-

lyzy bylo zhodnocení efektu NAT a H a stanovení počtu dosažených pCR. pCR jsme definovali jako absenci invazivního karcinomu v tkáni prsní žlázy (ypT0) při možné přítomnosti reziduální nemoci ve formě neinvazivního karcinomu (ypTis) a absenci nádorových buněk v axilárních lymfatických uzlinách (ypN0). Počet pCR jsme korelovali s hormonální závislostí nádoru, srovnali jsme tedy počet dosažených pCR u nemocných s ER+ a ER– onemocněním. Dalším cílem byla analýza OS pacientek a korelace léčebného výsledku (pCR) s OS. OS bylo definováno jako čas od zahájení léčby H v neoadjuvanci do smrti pacientky. Čas bez známek nemoci (disease-free survival – DFS) definovaný jako období od zahájení léčby H v neoadjuvanci do recidivy nemoci nebo úmrtí byl sekundárním cílem hodnocení. V případě, že k sledované události nedošlo, byla pacientka cenzorována k datu poslední aktualizace záznamu v registru. Cílem sledování bylo také zhodnocení výskytu nežádoucích účinků léčby (NÚ).

Pro popis souboru pacientů byly využity základní statistické metody – absolutní četnosti, procentuální vyjádření a medián pro spojité proměnné. Analýza přežití byla vypočítána pomocí metody Kaplan-Meiera. Pro srovnání OS a DFS v podskupinách byl použit log-rank test. Všechny statistické testy byly kalkulovány na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

### Výsledky

Klinický benefit léčby (stabilizace nemoci nebo regrese nemoci) byl zaznamenán u 98,6 % pacientek, hodnocení bylo provedeno na základě radiologického vyšetření před plánováním chirurgického výkonu. Pouze 2 pacientky progredovaly, 143/148 žen podstoupilo po ukončení NAT operaci, 93/143 (65,0 %) ablaci, 48/143 (33,6 %) prs zachovný výkon. Typ výkonu na axile byl v registru specifikován pouze u 41,3 % žen, při suspekci na postižení spádových lymfatických uzlin před vstupním radiologickým vyšetřením ale standardně indikujeme exenteraci axily. V opačném případě (klinicky N0) provádíme mapování sentinelové uzliny (sentinel lymph node – SLN) a k exenteraci axily přistupujeme až v druhé době při



**Graf 2. Podíl pCR u ER pozitivních a ER negativních nádorů.**

ER+/- hormonálně pozitivní/negativní onemocnění

pozitivně SLN potvrzené histologickým vyšetřením.

pCR jsme zaznamenali u 50,0 % žen (74/148), v 26,4 % (39/148) se jednalo o histologický nález ypT0ypN0, v 23,6 % (35/148) o nález ypTisypN0. Detaily pooperačních histologických nálezů jsou uvedeny v tab. 4. Srovnání stavu ER/progesteronového receptoru (PR) bylo provedeno u nálezů, které nebyly hodnoceny jako pCR (74/148). Pooperačně došlo k poklesu exprese ER/PR, za klinicky relevantní jsme považovali expresi ER/PR > 10 % nádorových buněk. Efekt NAT byl zaznamenán v poklesu proliferační aktivity nádoru (Ki67) a špatné diferenciaci nádoru. Vyšší podíl nezhodnocených nálezů (N/A) je dán limity vyšetření reziduální nemoci, s kterými se v praxi běžně setkáváme.

pCR bylo v 50 % (37/74) dosaženo u nádorů ER+ a v 50 % u ER- podle imunohistochemického hodnocení ze vstupní biopsie. Po odlišení ypT0 a ypTis nálezů byla zjištěna vyšší míra odpovědi (ypT0) u nádorů ER-, naopak ER+ nádory zůstaly častěji reziduální nemocí

**Tab. 3. Charakteristiky neoadjuvantní léčby.**

	n = 148
<b>Způsob podání trastuzumabu, n (%)</b>	
intravenózně	125 (84,5)
subkutánně	23 (15,5)
<b>Dávka trastuzumabu při i.v. podání, n (%)</b>	n = 125
2 mg/kg týdně	71 (56,8)
6 mg/kg a 3 týdny	53 (42,4)
N/A	1 (0,8)
<b>Konkomitantní terapie s trastuzumabem, n (%)</b>	
ano	143 (96,6)
ne	5 (3,4)
<b>Typ konkomitantní terapie*, n (%)</b>	
paklitaxel	89 (60,1)
docetaxel	49 (33,1)
goserelin	4 (2,7)
antracyklin	2 (1,4)
jiná	11 (7,4)
<b>Důvod ukončení NAT, n (%)</b>	
řádné ukončení léčby	140 (94,6)
nežádoucí účinky léčby	3 (2,0)
progrese nemoci	3 (2,0)
odmítnutí léčby pacientkou	2 (1,4)
Trvání terapie trastuzumab v neoadjuvanci [měsíce]	n = 146
medián (min.–max.)	2,5 (0,5–6,0)

N/A neuvedeno v registru, NAT – neoadjuvantní terapie

\* může být použito více modalit léčby, např. chemoterapie a hormonální terapie

(ypTis) – 24/35 (69 %) ER+ a 11/35 (31 %) ER- nádorů bylo po léčbě hodnoceno jako ypTis, naopak 13/39 (33 %) ER+ a 26/39 (67 %) ER- nádorů bylo po léčbě kompletně vyléčeno (ypT0). Celkový počet pCR mezi léčenými pacientkami (n = 148) dosáhl 23,6 a 26,4 % při hodnocení ypTis a ypT0ypN0 (graf 2).

Celkem 137/148 pacientek pokračovalo po ukončení NAT adjuvantní systérovou terapií – 131/137 pacientek pokračovalo v terapii H, 71/137 pacientek bylo léčeno hormonální léčbou, 1 pacientka chemoterapií. Celkem 3 pacientky, u kterých byla zaznamenána progrese, byly dále léčeny paliativně. NÚ H v rámci NAT byly v registru zaznamenány pouze u 5 nemocných, v 1 pří-

padě se jednalo o výskyt kardiotoxicity, v 1 případě o výskyt plicní toxicity a ve 3 případech o kožní toxicitu NAT (není vyloučeno, že se jednalo o přetrvávající NÚ taxanů).

K datu poslední aktualizace záznamů bylo v hodnocené skupině žen evidováno pouze 10 úmrtí. Medián OS ani medián DFS nebyl dosažen. Po době sledování 12 měsíců (1leté OS, 95% CI) přeživalo 97,6 % (94,9–99,9) žen, po 3 letech (3leté OS, 95% CI) 90,2 % (83,4–96,9) a po 5 letech (5leté OS, 95% CI) 87,8 % (79,9–95,8) pacientek (tab. 5).

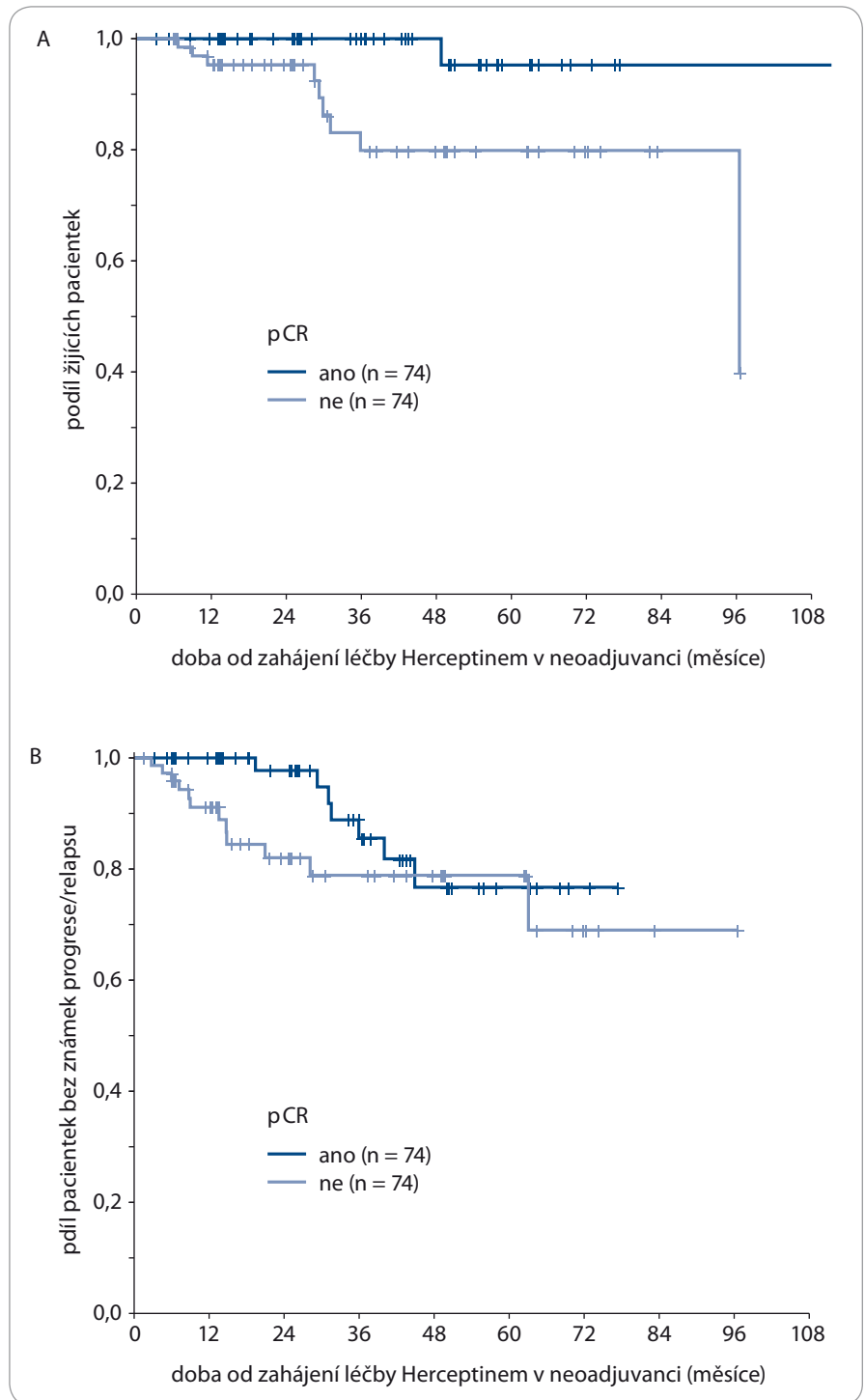
Při srovnání pCR a non-pCR skupiny byl medián OS signifikantně delší u žen, které dosáhly pCR (graf 3). Medián OS pro pCR skupinu žen nebyl dosažen, u non-

**Tab. 4. Pooperační histologické nálezy.**

n = 74	
<b>ER (exprese estrogenových receptorů), n (%)</b>	
0–10 %	27 (36,5)
> 10 %	34 (45,9)
N/A	13 (17,6)
<b>PR (exprese progesteronových receptorů), n (%)</b>	
0–10 %	37 (50,0)
> 10 %	23 (31,1)
N/A	14 (18,9)
<b>Ki67, n (%)</b>	
0–20 %	36 (48,6)
> 20 %	16 (21,6)
N/A	22 (29,7)
<b>HER-2, n (%)</b>	
0	5 (6,8)
1+	4 (5,4)
2+	13 (17,6)
3+	32 (43,2)
N/A	20 (27,0)
<b>FISH, n (%)</b>	
negativní	2 (2,7)
pozitivní	7 (9,5)
N/A	69 (93,2)
<b>Grade, n (%)</b>	
1	3 (4,1)
2	19 (25,7)
3	21 (28,4)
N/A	31 (41,9)
N/A – neuvedeno v registru	

-pCR skupiny dosáhl 96,5 měsíce (95% IS 11,9–181,1). Jednoho roku a 3 let se dožilo 100,0 % žen (pCR) vs. 95,3 % (non-pCR, 1leté OS) a 79,9 % (non-pCR, 3leté OS), 5 let se dožilo 95,2 % žen v pCR skupině vs. 79,9 % žen v non-pCR skupině.

Výsledky OS/DFS v korelaci se stavem receptorů u pCR skupiny nebyly signifikantní, trend pro lepší prognózu nemocných je vidět u ER- nádorů (tab. 6). Další



**Graf 3. Hodnocení OS (A) a DFS (B) podle léčebného efektu NAT.**

OS – celkové přežití, DFS – přežití bez nemoci, pCR – patologická kompletní remise, NAT – neoadjuvantní terapie

hodnocení kohorty pacientek vyžaduje její delší sledování.

**Souhrn**

Celkem 148 pacientek s HER2+ časným nebo lokálně pokročilým BC bylo neoad-

juvantně léčeno chemoterapií a H. Nejčastěji voleným režimem byl 4 × AC – 12 × TH (data z registru nemáme, v praxi indikujeme režim AC – TH téměř vždy, obvykle s výjimkou stadia I nemoci). Délka trvání NAT nevybočovala ze stan-

dardů (vycházíme z údaje v registru, že 94,6 % žen ukončilo NAT řádně). Medián věku nemocných byl 51 let, téměř 1/3 nemocných tvořily mladé pacientky do 40 let, 12,9 % patientek bylo ve věku do 35 let. Kromě HER2 pozitivivity přispíval k agresivitě nemoci zejména vysoký grade (62,8 % patientek) a ER negativita (45,9 % patientek). pCR dosáhlo 50,0 % žen, v 26,4 % případech patolog nenalezl reziduální nemoc (ypT0ypN0), v 23,6 % případech v prsní tkáni detekoval *in situ* zbytkový karcinom (ypTisypN0). Vyšší podíl ypT0 nálezů byl spojen s ER- primárními karcinomy, naopak ER pozitivita vedla častěji k menší odpovědi (ypTis). OS analýza ukázala, že nemocné, které dosáhly pCR, měly v následujícím období lepší prognózu – 1leté OS 100,0 vs. 95,3 %, 5leté OS 95,2 vs. 79,9 %; p = 0,009.

**Diskuze**

pCR je významným prognostickým faktoremu HER2+ a TNBC [9–11, 33]. Četnost pCR se při monoterapii H a chemoterapii pohybuje kolem 25–30 %, při duální anti-HER2 blokádě a chemoterapii až kolem 50–60 %. V naší kohortě patientek byla pCR zaznamenána u 1/2 z nich (74/148). Při srovnání je nutno mít na mysli, že hodnocení pCR může být v různých pracích různé. pCR bez známek reziduální nemoci (ypT0ypN0) bylo v naší skupině dosaženo u 26,4 % patientek, zbylých 23,6 % nemocných dosáhlo téměř kompletní odpovědi v podobě *in situ* reziduální nemoci.

Polovina nádorů, které na NAT zareagovaly pCR, byla ER+ (37/74), polovina ER- (37/74). Ze studií víme, že lepší odpovědi bývá dosaženo u ER- nádorů [27]. Ve studii NeoSphere byl počet pCR v rameni s docetaxelem a H 20,0 % u ER+ vs. 36,8 % u ER- nádorů, v rameni s H, pertuzumabem a docetaxelem byl rozdíl velmi zřetelný, 26,0 vs. 63,2 %. Rozdíl v četnosti kompletních odpovědí vidíme v naší skupině pouze po rozdělení pCR nálezů na ypT0ypN0 vs. ypTisypN0 skupiny – 66,7 % ER- nádorů zareagovalo absolutně vs. 68,6 % ER+ nádorů částečně. Příčinou absence lepší odpovědi u ER- nádorů v pCR skupině jako celku mohl být malý počet patientek (pouze 74).

**Tab. 5. Přežívání u pCR a non-pCR skupiny nemocných**

	pCR		p*
	ANO (n = 74)	NE (n = 74)	
<b>Medián OS (95% CI)</b>	nedosážen	96,5 měsíce (11,9–181,1)	<b>0,009</b>
1y OS (%; 95% CI)	100,0 (-)	95,3 (90,1–99,9)	
3y OS (%; 95% CI)	100,0 (-)	79,9 (66,7–93,0)	
5y OS (%; 95% CI)	95,2 (86,1–99,9)	79,9 (66,7–93,0)	
<b>Medián DFS (95% CI)</b>	nedosážen	nedosážen	
1y DFS (%; 95% CI)	100,0 (-)	91,1 (84,3–97,9)	
3y DFS (%; 95% CI)	85,6 (73,7–97,4)	78,9 (67,1–90,6)	
5y DFS (%; 95% CI)	76,7 (60,9–92,6)	78,9 (67,1–90,6)	

OS – celkové přežívání, DFS – čas bez znamení nemoci, pCR – patologická kompletní remise  
\* log-rank test, tučně – signifikantní nález

**Tab. 6. Hodnocení OS a DFS u pCR skupiny žen v korelaci se stavem ER ze vstupní biopsie.**

	Expres ER		p*
	ANO (n = 37)	NE (n = 37)	
<b>Medián OS (95% CI)</b>	nedosážen	nedosážen	0,34
1y OS (%; 95% CI)	100,0 (-)	100,0 (-)	
3y OS (%; 95% CI)	100,0 (-)	100,0 (-)	
5y OS (%; 95% CI)	100,0 (-)	90,9 (73,9–99,9)	
<b>Medián DFS (95% CI)</b>	nedosážen	nedosážen	
1y DFS (%; 95% CI)	100,0 (-)	100,0 (-)	
3y DFS (%; 95% CI)	92,9 (79,4–99,9)	80,0 (62,3–97,7)	
5y DFS (%; 95% CI)	92,9 (79,4–99,9)	63,0 (37,8–88,2)	

OS – celkové přežití, DFS – doba přežití bez nemoci, pCR – patologická kompletní remise, ER – astrogenní receptor  
\*log-rank test

Dosažení pCR u vyššího procenta nemocných brání nádorová heterogenita, a to i u podskupin, u kterých bychom pCR očekávali. Víme, že u triple pozitivních nádorů je prognostický význam pCR méně spolehlivý, což vychází z odlišné nádorové biologie HER2+ nádorů s a bez hormonální dependence. Prediktory pro dosažení pCR chybí, i když se objevují první práce představující molekulární markery nebo nomogramy [34–37]. Odpovědi chybí i na další otázky – 1. Mohla by napomoci dosažení pCR přídatná terapie v podobě systémové léčby indikované nad rámec stan-

dardně trvající léčby? 2. Mohou ženy, u kterých pCR nebylo dosaženo, profitovat z duální anti-HER2 léčby? 3. A naopak, mohou některé ženy profitovat ze samotné anti-HER2 léčby a taxanů s vynecháním antracyklinů nebo ze samotné cílené terapie? 4. Mohly by některé pacientky, u kterých bylo dosaženo pCR, bezpečně ukončit systémovou terapii neoadjuvantně s vynecháním pooperačního H? Medián trvání léčby H v neoadjuvantní části byl 2,5 měsíce, 94,6 % žen ukončilo NAT řádně. V adjuvantním H pokračovalo 131/137 žen, prakticky všechny

ženy s ER+ nádory (71/79) pokračovaly také adjuvantní hormonální léčbou.

K relapsu a generalizaci nemoci po ukončení NAT a operaci došlo u 12 pacientek. U dalších 3 nemocných došlo k progresi nemoci a přechodu léčby do paliativní v průběhu nebo po ukončení NAT. Tyto 3 pacientky neabsolvovaly chirurgický výkon. Lokalizace metastáz byla následovná – játra (3/12), kosti (2/12), CNS (2/12), plíce (2/12), kůže/měkké tkáně (2/12), jiné lokality (3/12). U některých pacientek bylo zaznamenáno postižení více orgánových systémů.

Z operovaných žen (143/148) 65,0 % (93/143) podstoupilo ablaci, 33,6 % prs zachovný výkon (48/143), u 2 pacientek nebyl typ výkonu v registru specifikován. Důvodů pro vyšší podíl ablačních výkonů může být několik – 1. převaha agresivních histotypů, zejména vysoký podíl G3 nádorů; 2. pokročilost nemoci, tedy pacientky ve stadiu IIIA/IIIB (28,4 % a/nebo nádory nad 5 cm, tedy část nádorů ve stadiu IIB (celkem ve stadiu IIB 34,5 % pacientek); 3. vyšší podíl mladých pacientek zvažujících rekonstrukční výkony (kompletní data o podílu nosiček hereditárních syndromů nemáme). Ze studií víme, že podíl prs zachovných výkonů nemusí být ovlivněn přidáním cílené anti-HER2 léčby a počtem pCR [38].

NÚ při neoadjuvantní léčbě H jsme zaznamenali pouze u 5 pacientek, zcela jistě se jednalo o klinicky relevantní NÚ, naopak NÚ bez klinické signifikance mohly být opomenuty a do registru nezaneseny.

## Literatura

1. Haque R, Ahmed SA, Inzhakova G et al. Impact of breast cancer subtypes and treatment on survival: an analysis spanning two decades. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012; 21(10): 1848–1855. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-12-0474.
2. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD et al. Preoperative chemotherapy: updates of National surgical adjuvant breast and bowel project protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol* 2008; 26(5): 778–785. doi: 10.1200/JCO.2007.15.0235.
3. Gralow JR, Burstein HJ, Wood W et al. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease. *J Clin Oncol* 2008; 26(5): 814–819. doi: 10.1200/JCO.2007.15.3510.
4. Killelea BK, Yang VQ, Mougalian S et al. Neoadjuvant chemotherapy for breast cancer increases the rate of breast conservation: results from the National cancer database. *J Am Coll Surg* 2015; 220(6): 1063–1069. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2015.02.011.

5. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C et al. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute. *J Clin Oncol* 1998; 16(1): 93–100. doi: 10.1200/JCO.1998.16.1.93.
6. Vecchio FM, Valentini V, Minsky BD et al. The relationship of pathologic tumor regression grade (TRG) and outcomes after preoperative therapy in rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62(3): 752–760. doi: 10.1016/j.ijrobp.2004.11.017.
7. Kuroi K, Toi M, Tsuda H et al. Unargued issues on the pathological assessment of response in primary systemic therapy for breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2005; 59 (Suppl 2): 387–392.
8. Ogston KN, Miller ID, Payne S et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast* 2003; 12(5): 320–327.
9. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(8): 1275–1281. doi: 10.1200/JCO.2007.14.4147.
10. Cortazar P, Zhang L, Untch M et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014; 384(9938): 164–172. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62422-8.
11. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2012; 30(15): 1796–1804. doi: 10.1200/JCO.2011.38.8595.
12. Untch M, Fasching PA, Konecny GE et al. Pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy plus trastuzumab predicts favorable survival in human epidermal growth factor receptor 2 – overexpressing breast cancer: results from the TECHNO trial of the AGO and GBG study groups. *J Clin Oncol* 2011; 29(25): 3351–3357. doi: 10.1200/JCO.2010.31.4930.
13. Ahluwalia MS, Daw HA. Neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel and epirubicin for HER-2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(30): 7760–7761. doi: 10.1200/JCO.2005.03.0213.
14. Dawood S, Gonzalez-Angulo AM, Peintinger F et al. Efficacy and safety of neoadjuvant trastuzumab combined with paclitaxel and epirubicin: A retrospective review of the M. D. Anderson experience. *Cancer* 2007; 110(6): 1195–1200. doi: 10.1002/cncr.22895.
15. Coudert BP, Largillier R, Arnould L et al. Multicenter phase II trial of neo- adjuvant therapy with trastuzumab, docetaxel, and carboplatin for human epidermal growth factor receptor-2-overexpressing stage II or III breast cancer: Results of the GETN(A)-1 trial. *J Clin Oncol* 2007; 25(19): 2678–2684. doi: 10.1200/JCO.2006.09.9994.
16. Limentani SA, Brufsky AM, Erban JK et al. Phase II study of neoadjuvant docetaxel, vinorelbine, and trastuzumab followed by surgery and adjuvant doxorubicin plus cyclophosphamide in women with human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(10): 1232–1238. doi: 10.1200/JCO.2005.05.3306.
17. Buzdar AU, Valero V, Ibrahim NK et al. Neoadjuvant therapy with paclitaxel followed by 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide chemotherapy and concurrent trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: An update of the initial randomized study population and data of additional patients treated with the same regimen. *Clin Cancer Res* 2007; 13(1): 228–233. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1345.
18. Lazaridis G, Pentheroudakis G, Pavlidis N. Integrating trastuzumab in the neoadjuvant treatment of primary breast cancer: Accumulating evidence of efficacy, synergy and safety. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 66(1): 31–41. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.07.002.
19. Gianni L, Semiglazov V, Manikhas GM et al. Neoadjuvant trastuzumab in locally advanced breast cancer (NOAH): Antitumor and safety analysis. *J Clin Oncol* 2007; 25: 532–539. doi: 10.1200/JCO.2006.08.9987.
20. Peintinger F, Buzdar AU, Kuerer HM et al. Hormone receptor status and pathologic response of HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab. *Ann Oncol* 2009; 19(12): 2020–2025. doi: 10.1093/annonc/mdn427.
21. Petrelli F, Fausto K, Borgonovo M et al. Neoadjuvant chemotherapy and concomitant trastuzumab in breast cancer: a pooled analysis of two randomized trials. *Anti-cancer Drugs* 2011; 22(2): 128–135.
22. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26(17): 2813–2820. doi: 10.1200/JCO.2008.16.3931.
23. Korkaya H, Paulson A, Iovino F et al. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* 2008; 27(47): 6120–6130. doi: 10.1038/onc.2008.207.
24. de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M et al. Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO): survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol* 2014; 15(10): 1137–1146. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70320-1.
25. Gianni L, Pienkowski T, Im YH et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(1): 25–32. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70336-9.
26. Schneeweiss A, Chia S, Hickish T et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol* 2013; 24(9): 2278–2284. doi: 10.1093/annonc/mdt182.
27. Broglio KR, Quintana M, Foster M, et al. Association of pathologic complete response to neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer with long-term outcomes: A meta-analysis. *JAMA Oncol* 2016; 2(6): 751–760. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.6113.
28. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(16): 3676–3685. doi: 10.1200/JCO.2005.07.032.
29. Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V et al. Neoadjuvant chemotherapy with trastuzumab followed by adjuvant trastuzumab versus neoadjuvant chemotherapy alone, in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (the NOAH trial): a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *Lancet* 2010; 375(9712): 377–384. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61964-4.
30. Seidman A, Hudis C, Pierri MK et al. Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *J Clin Oncol* 2002; 20(5): 1215–1221. doi: 10.1200/JCO.2002.20.5.1215.
31. Guarneri V, Lenihan DJ, Valero V et al. Long-term cardiac tolerability of trastuzumab in metastatic breast cancer: the M.D. Anderson cancer center experience. *J Clin Oncol* 2006; 24(25): 4107–4115. doi: 10.1200/JCO.2005.04.9551.
32. Romond EH, Jeong JH, Rastogi P et al. Seven-year follow-up assessment of cardiac function in NSABP B-31, a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel (ACP) with ACP plus

trastuzumab as adjuvant therapy for patients with node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(31): 3792–3799. doi: 10.1200/JCO.2011.40.0010.

33. Cortayer P, Zhang L, Untch M et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014; 384(9938): 163–172. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62422-8.

34. Fujii S, Yamashita S, Yamaguchi T et al. Pathological complete response of HER2-positive breast can-

cer to trastuzumab and chemotherapy can be predicted by HSD17B4 methylation. *Oncotarget* 2017; 8(12): 19039–19048. doi: 10.18632/oncotarget.15118.

35. Fujii T, Kogawa T, Wu J et al. Nomogram to predict pathologic complete response in HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant systemic therapy. *Br J Cancer* 2017; 116(4): 509–514. doi: 10.1038/bjc.2016.444.

36. Guiu S, Mouret Reynier MA, Toure M et al. Predictive factors of response in HER2-positive breast cancer treated by neoadjuvant therapy. *J Oncol* 2013; 854121. doi: 10.1155/2013/854121.

37. Cudós AG, Morales S, Alvarez AN et al. Pathological complete response in HER2 positive breast cancer treated with trastuzumab and chemotherapy: Predictive factors report. *J Clin Oncol* 2017; 35 (Suppl 15): e12133. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.e12133.

38. Valachis A, Mauri D, Polyzos NP et al. Trastuzumab combined to neoadjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast* 2011; 20(6): 485–490. doi: 10.1016/j.breast.2011.06.009.

# Detekcia mutácií v géne *FLT3* u pacientov východoslovenského regiónu

## Detection of *FLT3* Mutations in Patients from Eastern Slovakia

Dubayová K.<sup>1</sup>, Kožlejšová Z.<sup>2</sup>, Vašková J.<sup>3</sup>, Čakanová G.<sup>3</sup>, Kiktavá M.<sup>4</sup>, Guman T.<sup>5</sup>, Sabo J.<sup>2</sup>, Karabinos A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF Košice

<sup>2</sup> Ústav lekárskej a klinickej biofyziky UPJŠ LF Košice

<sup>3</sup> SEMBID, s.r.o., Košice

<sup>4</sup> Oddelenie lekárskej genetiky, Medirex, a. s., Košice

<sup>5</sup> Klinika hematológie a onkohematológie UPJŠ LF a UNLP Košice

### Souhrn

**Východisko:** Práca poukazuje na význam monitoringu mutácií v géne *FLT3* aplikáciou jednoduchej metódy molekulovej genetiky. **Pacienti a metódy:** Súbor tvorilo 141 pacientov vo veku od 19 do 81 rokov s primárnou akútnou myeloblastovou leukémiou (AML) a 8 pacientov s prechodom myelodysplastického syndrómu (MDS) do AML. Metódou PCR bola analyzovaná DNA zo vzorky periférnej krvi a/alebo kostnej drene. Dôkaz internej tandemovej mutácie *FLT3* génu (*FLT3*-ITD) je založený na amplifikácii exónov 14 a 15. Bodová mutácia v tyrozín kinázovej doméne *FLT3* génu (*FLT3*-TKD) bola detegovaná restričnou analýzou PCR produktu exónu 20. Fragmenty boli separované elektroforeticky. PCR produkty pozitívnych vzoriek boli analyzované aj na mikročipe (Bioanalyzer 2100). **Výsledky:** Interná tandemová duplikácia *FLT3*-ITD bola potvrdená u 19 % pacientov a bodová mutácia *FLT3*-TKD u 8 %. Dvaja pacienti (1 %) mali obidve mutácie. Najväčšiu skupinu *FLT3*+ tvorili pacienti bez iných chromozómových aberácií (59 %) a pacienti s translokáciou t(15; 17)/*PML-RARA* (15 %). Úmrtnosť pacientov v skupine *FLT3*+ bola 33 % oproti 10 % v skupine *FLT3*-. V rámci *FLT3*+ skupiny bolo percento úmrtnosti takmer rovnaké u *FLT3*-ITD aj *FLT3*-TKD, paradoxne 77-ročná pacientka s dvojistou mutáciou *FLT3*-ITD/TKD bola v remisii. Ôsmich pacientov s prechodom MDS do AML sme posudzovali samostatne. U troch pacientov bola pri prechode do AML potvrdená *FLT3* pozitivita, z toho u dvoch *FLT3*-ITD a u jedného *FLT3*-TKD. Iné génové aberácie z vyšetrovaného panelu u nich potvrdené neboli. Prežívanie týchto pacientov s *FLT3*+ bolo dlhšie ako u *FLT3*- pacientov. Výsledky dôkazu mutácií v géne *FLT3* u pacientov východoslovenského regiónu korelujú s publikovanými výsledkami iných databáz. **Záver:** Aplikovaná PCR metóda je spoľahlivá, relatívne rýchla a finančne nenáročná, čo umožňuje rutinný monitoring mutácií v géne *FLT3*. Verifikácia *FLT3* positivity na mikročipe je elegantnou náhradou analýzy na kapilárnej elektroforéze.

### Klíčov slova

akútna myeloblastová leukémia – DNA – PCR – mutácia – *FLT3*-ITD – *FLT3*-TKD

Táto práca bola podporen grantom z Európskeho fondu regionlného rozvoja OPVaV-2009/2.2/05-SORO (ITMS kód: 26220220143).

The study was supported by the European Regional Development grant OPVaV-2009/2.2/05-SORO (ITMS code: 26220220143).

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 zaslané do biomedicínskch časopis.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. Ing. Katarna Dubayová, PhD.  
Ústav lekárskej a klinickej biochémie  
UPJŠ LF Košice  
Trieda SNP 1  
040 11 Košice  
e-mail: sembid.vyskum@gmail.com

Obdržané/Submitted: 19. 10. 2017

Prijat/Accepted: 15. 2. 2018

doi: 10.14735/amko2018200



## Summary

**Background:** The study investigated *FLT3* gene mutations in patients from eastern Slovakia using a simple molecular method. **Patients and Methods:** We analyzed 141 patients with primary acute myeloid leukemia (AML) and 8 patients with AML that developed from myelodysplastic syndrome (MDS) who were aged 19–81 years. DNA isolated from peripheral blood and/or bone marrow was analyzed by PCR. FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) was detected by amplification of exons 14 and 15. Point mutations in the *FLT3* tyrosine kinase domain (FLT3-TKD) were detected by digesting the PCR product of exon 20 with the restriction endonuclease EcoRV. Fragments were separated electrophoretically. PCR products of the positive samples were also analyzed using a microchip device (Bioanalyzer 2100). **Results:** FLT3-ITD and point mutations in the FLT-TKD were detected in 19 and 8% of patients, resp. Two patients (1%) harbored both types of mutations. Patients with and without FLT3 mutations were called FLT+ and FLT-, resp. Most FLT3+ patients had no chromosomal aberrations (59%) or harbored the t(15; 17) translocation in PML-RARA (15%). The mortality rate was 33% among FLT3+ patients and 10% among FLT3- patients. Among FLT3+ patients, the mortality rates of patients with FLT3-ITD and point mutations of the FLT-TKD were almost the same. A 77-year-old female patient with both FLT3-ITD and a point mutation in the FLT3-TKD was in remission. The eight patients who developed AML from MDS were assessed separately. Of these, three patients were FLT3+; two patients displayed FLT3-ITD, and one patient harbored a point mutation in the FLT3-TKD. No other genetic aberrations were detected. FLT3+ patients lived for longer than FLT3- patients. These analyses of *FLT3* gene mutations in patients from eastern Slovakia are consistent with published data from other databases. **Conclusion:** The applied PCR method is reliable, relatively fast, and affordable, and can be used for routine monitoring of *FLT3* gene mutations. FLT3 mutations can be verified using a microchip as an alternative to capillary electrophoresis.

## Key words

acute myelogenous leukemia – DNA – PCR – mutation – FLT3-ITD – FLT3-TKD

## Úvod

Cytogenetika a molekulová genetika významne prispieva k diagnostike leukémií, pretože na podklade prítomnosti chromozómových aberácií definuje genetické markery, ktoré spolu s klinickými parametrami charakterizujú ochorenie a určujú jeho prognózu. Podľa prítomnosti rôznych genetických abnormalít sú pacienti stratifikovaní do prognostických skupín – priaznivá, intermediárna a nepriaznivá prognóza [1,2]. Dôkaz prítomnosti špecifických mutácií v génoch metódami molekulovej genetiky umožňuje monitorovať priebeh ochorenia a hodnotiť odpoveď na liečbu na molekulovej úrovni u pacientov bez štrukturálnych či numerických chromozómových aberácií. U pacientov s chromozómovými aberáciami má taktiež aj prognostický význam.

Jednou z mutácií, ktoré sa podieľajú na procese leukemogenézy, je mutácia v géne *FLT3*. Tento gén má dôležité postavenie v procese proliferácie, diferenciácie a prežívania prekursorových krvotvorných buniek. Je lokalizovaný na 13. chromozóme (13q12.2), pozostáva z 24 exónov a pokrýva približne 96 kb. Gén *FLT3* kóduje proteín s tyrozínkinázovou (TK) aktivitou triedy III. Tento receptor je zložený z extracelulárnej (tvorí ju päť N-glykozylovaných „imunoglobulín like“ slučiek) transmembránovej, juxta-

membránovej a dvoch intracelulárnych TK domén [3]. Je exprimovaný prevažne na prekursorových kmeňových bunkách v kostnej dreni [4,5]. FLT3 proteín je syntetizovaný ako monomér a po glykozylácií je umiestnený do cytoplazmatickej membrány. FLT3 môže reagovať s ligandom – proteín z triedy rastových faktorov, ktorý stimuluje proliferáciu hematopoetických buniek. Po väzbe ligandu na imunoglobulínovú doménu receptora dôjde k dimerizácii, čo vedie ku konformačným zmenám v juxtamembránovej doméne a následnej autofosforylácii, čím sa aktivizuje TK, ktorá následne aktivizuje viaceré signálne intracelulárne dráhy (obr. 1).

V géne *FLT3* sú známe dve špecifické mutácie – interná tandemová duplikácia (FLT3-ITD, viď nižšie) a bodová mutácia v TK doméne (FLT3-TKD). Interná tandemová duplikácia zahrňuje 3–400 bázových párov (bp) v exóne 14 a vedie k zmene proteínovej štruktúry v oblasti juxtamembránovej domény. Poškodenia juxtamembránovej domény môžu meniť jej dĺžku ako inzercie a delécie, preto niektorí autori ich nazývajú aj LM mutácie („length mutations“). Vo väčšine štúdií sú všetky mutácie postihujúce túto podjednotku označované ako FLT3-ITD mutácie [6]. Pri bodovej mutácii v aktívnej slučke TK domény (FLT3-TKD) sa jedná o zámenu guanínu za

tymín, čo spôsobí zámenu aspartátu (D) na kodóne 835 za tyrozín (Y) [7,8].

Mutácie v géne *FLT3* spôsobia konštitutívnu aktiváciu receptora [9], a tak aj bez prítomnosti ligandu dôjde k dimerizácii, následným konformačným zmenám a autofosforylácii TK, výsledkom čoho je nekontrolovateľná proliferácia (obr. 1). Jedna z posledných štúdií tvrdí, že dĺžka a lokalizácia inzercie zásadne podmieňujú charakter internej tandemovej duplikácie a môžu potencovať fulminantnosť ochorenia už aj tak s nepriaznivou prognózou [10–12].

FLT3-ITD sa vyskytuje u 25–30 % pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (AML) a FLT3-TKD u 7 % pacientov [13–15]. Existuje aj asociácia medzi FLT3-ITD a jednotlivými podtypmi AML podľa French-American-British (FAB) klasifikácie. Najčastejšie sa vyskytuje u pacientov s M3 AML [16]. Táto mutácia sa objavuje aj u 3 % pacientov s myelodysplastickým syndromom (MDS) a ojedinele aj u pacientov s chronickou myeloidnou leukémiou (CML). FLT3 mutácie neboli nájdené u pacientov s chronickou lymfocytovou leukémiou (CLL), mnohopočetným myelómom, non-Hodgkinovým lymfómom a samozrejme u zdravých jedincov [17,18]. U detí s AML je výskyt FLT3-ITD nižší a pohybuje sa okolo 15 %, pričom u FLT3-TKD je to 7 % podobne ako u dospelých [19]. Prítomnosť

FLT3-ITD u pacientov s AML sa považuje za nepriaznivý prognostický faktor. U týchto pacientov bol zistený vyšší výskyt relapsov a prudký nárast leukemických blastov v periférnej krvi (PK) a kostnej dreni (KD), problematické je aj navodenie kompletnej remisie [20].

Cieľom práce bolo poukázať na význam monitoringu mutácií v géne *FLT3* a možnosť aplikácie jednoduchých metód molekulovej genetiky u pacientov s diagnózou AML *de novo* a u pacientov so sekundárnou AML, ktorá sa vyvinula z MDS.

### Pacienti a metódy

#### Súbor pacientov

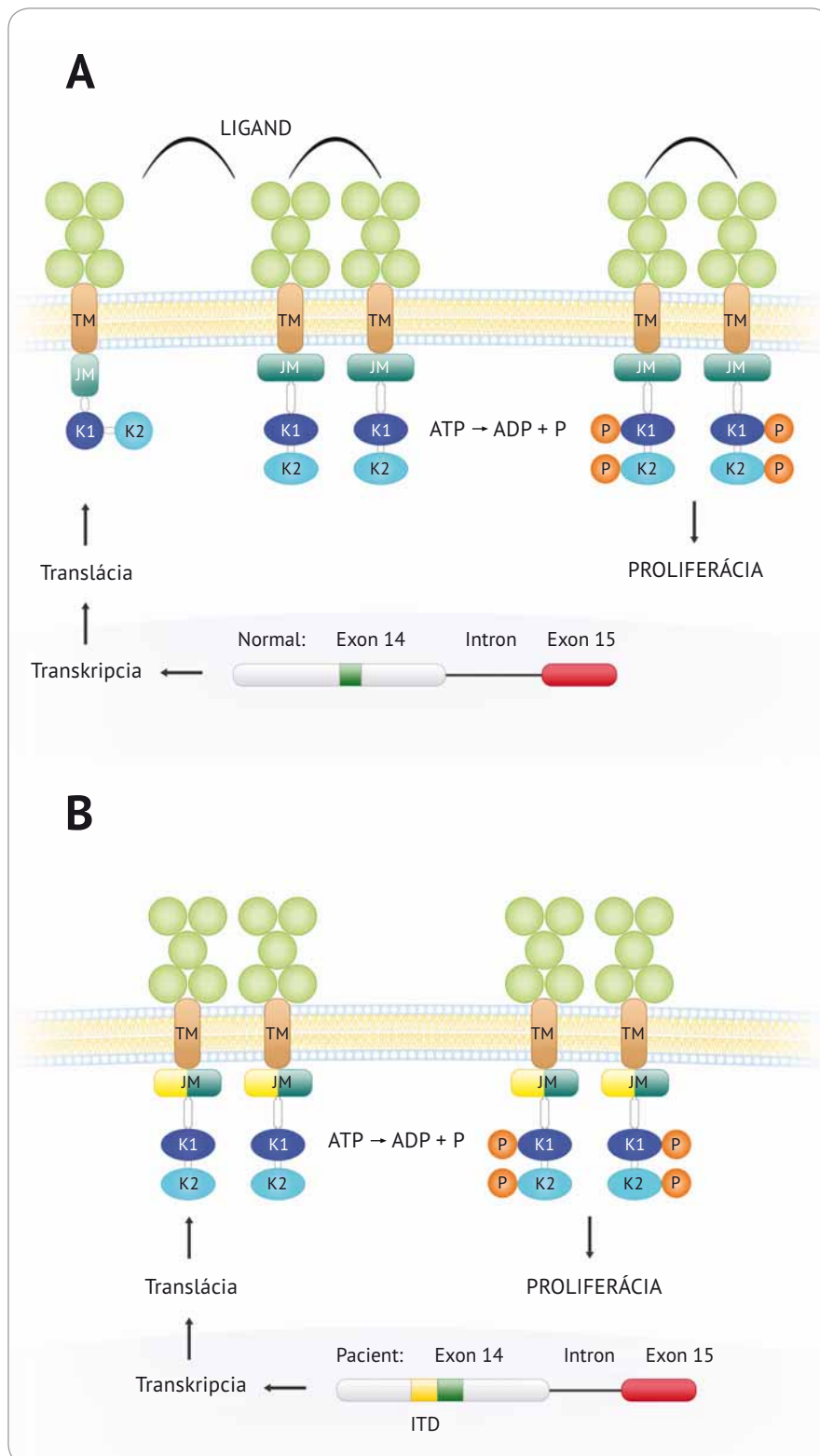
Dospelí pacienti Kliniky hematológie a onkohematológie UPJŠ LF a UNLP Košice – 141 pacientov (67 mužov a 74 žien) s diagnózou AML *de novo*, priemerný vek v čase diagnózy bol 54,7 rokov (19–81 rokov) a 8 pacientov (5 mužov a 3 ženy) s diagnózou sekundárna AML (MDS s prechodom do AML), priemerný vek 65,6 rokov (60–79 rokov). Analyzovaná bola vzorka PK a KD uvedených pacientov. Prezentované výsledky sú anonymné.

#### Izolácia DNA

Genómová DNA (gDNA) bola izolovaná zo vzorky PK a/alebo aspirátu KD podľa štandardného protokolu kitu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) na automatickom robotizovanom zariadení Qia-cube (Qiagen). Vzorka DNA bola buď hneď analyzovaná, alebo uskladnená pri  $-20^{\circ}\text{C}$  do následného spracovania.

#### Genetická analýza *FLT3* génu a iných chromozómových aberácií

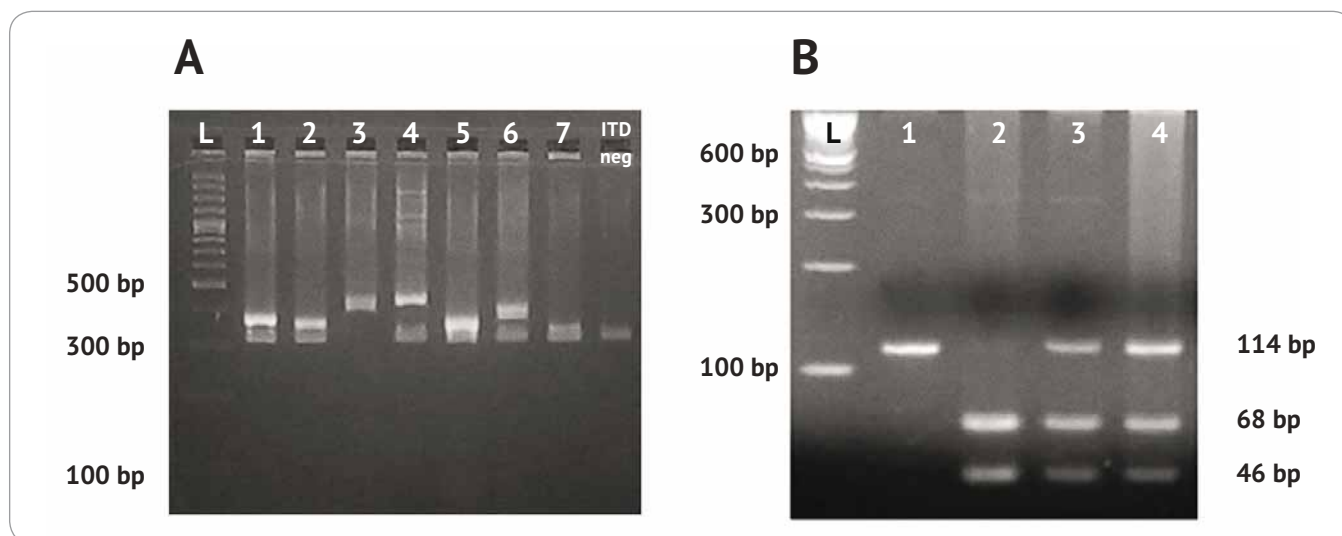
Dôkaz internej tandemovej duplikácie v géne *FLT3* (FLT3-ITD) je založený na amplifikácii exónu 14 a 15 metódou polymerázovej reťazovej reakcie (polymerase chain reaction – PCR) [21]. PCR produkt nemutovaného génu má veľkosť 328 bp. Dlhšie fragmenty svedčia o prítomnosti FLT3-ITD. Detekcia mutácie v tyrozínkinázovej doméne (FLT3-TKD) je založená na restriktívnej analýze PCR produktu exónu 20, ktorý je substrátom restriktívnej endonukleázy *EcoRV*. *EcoRV* vertikálne štiepi DNA sekvenciu 5'-GAT|ATC-3' a rozštiepi amplifikovaný frag-



Obr. 1. Schéma aktivácie FLT3 receptora.

A. Transmembránový FLT3 proteín ako monomér reaguje s ligandom za vzniku proteínového diméru, ktorého konformácia umožní fosforyláciu. Takto aktivovaná tyrozínkináza odštaruje riadenú proliferáciu.

B. Pridaný úsek nukleotidov v exóne 14 v géne *FLT3* spôsobí zmenu v primárnej štruktúre proteínu a tak aj bez prítomnosti ligandu dôjde k dimerizácii, a autofosforylácii tyrozínkinázy, výsledkom čoho je nekontrolovateľná proliferácia.



**Obr. 2. Separácia PCR produktov klasickou elektroforézou.**

A. FLT3-ITD L – ladder 100 bp, 1-7 FLT3-ITD pozitívni pacienti, FLT3-ITD negatívni pacienti bez mutácie

B. FLT3-TKD 1 – pacient s mutáciou v oboch alelách, 2 zdravý jedinec bez mutácie FLT3-TKD, 3,4 – pacienti s jednou mutovanou alelou FLT3-TKD

bp – bázoové páry

ment veľkosti 114 bp na 68 bp a 46 bp. V prípade bodovej mutácie je guanín (G) zamenený za tymín (T). *EcoRV* túto sekvenciu neštípi a tak nerozštiepený fragment veľkosti 114 bp potvrdzuje prítomnosť mutácie. Ak je prítomný len fragment 114 bp, je mutácia prítomná v oboch alelách. Vo väčšine prípadov je mutovaná len jedna alela a výsledkom reakcie sú produkty 114, 68 a 46 bp (obr. 3B). Separácia produktov PCR bola realizovaná horizontálnou elektroforézou na 3% agaróze, vizualizácia UV svetlom. Fotodokumentácia z každej analýzy bola archivovaná. PCR produkty pozitívnych vzoriek boli analyzované aj mikročipovou elektroforézou na zariadení Bioanalyzer 2100 (Agilent). Metodický postup analýzy zvyšných chromozómových/genetických aberácií je uvedený inde [1].

### Výsledky

Mutácie v géne *FLT3* boli detegované jednoduchou a relatívne rýchlou PCR diagnostikou na základe elektroforetickej separácie a identifikácie veľkosti fragmentov (obr. 2). V prípade positivity na prítomnosť *FLT3* mutácie bol PCR produkt verifikovaný aj separáciou na mikročipe Bioanalyzer 2100 (obr. 3), kde bola presne stanovená veľkosť fragmentu, ako aj pomer intenzity mutovanej a nemutovanej alely.

### AML pacienti

Súbor tvorilo 141 dospelých pacientov, u ktorých bola diagnostikovaná AML *de novo*. Priemerný vek AML pacientov v čase diagnózy bol 54,7 rokov (19–81 rokov). Priemerný vek *FLT3* negatívnych pacientov (*FLT3*<sup>-</sup>) bol 54,3 rokov, skupina *FLT3* pozitívnych pacientov (*FLT3*<sup>+</sup>) bola staršia, priemerný vek bol 59,1 rokov.

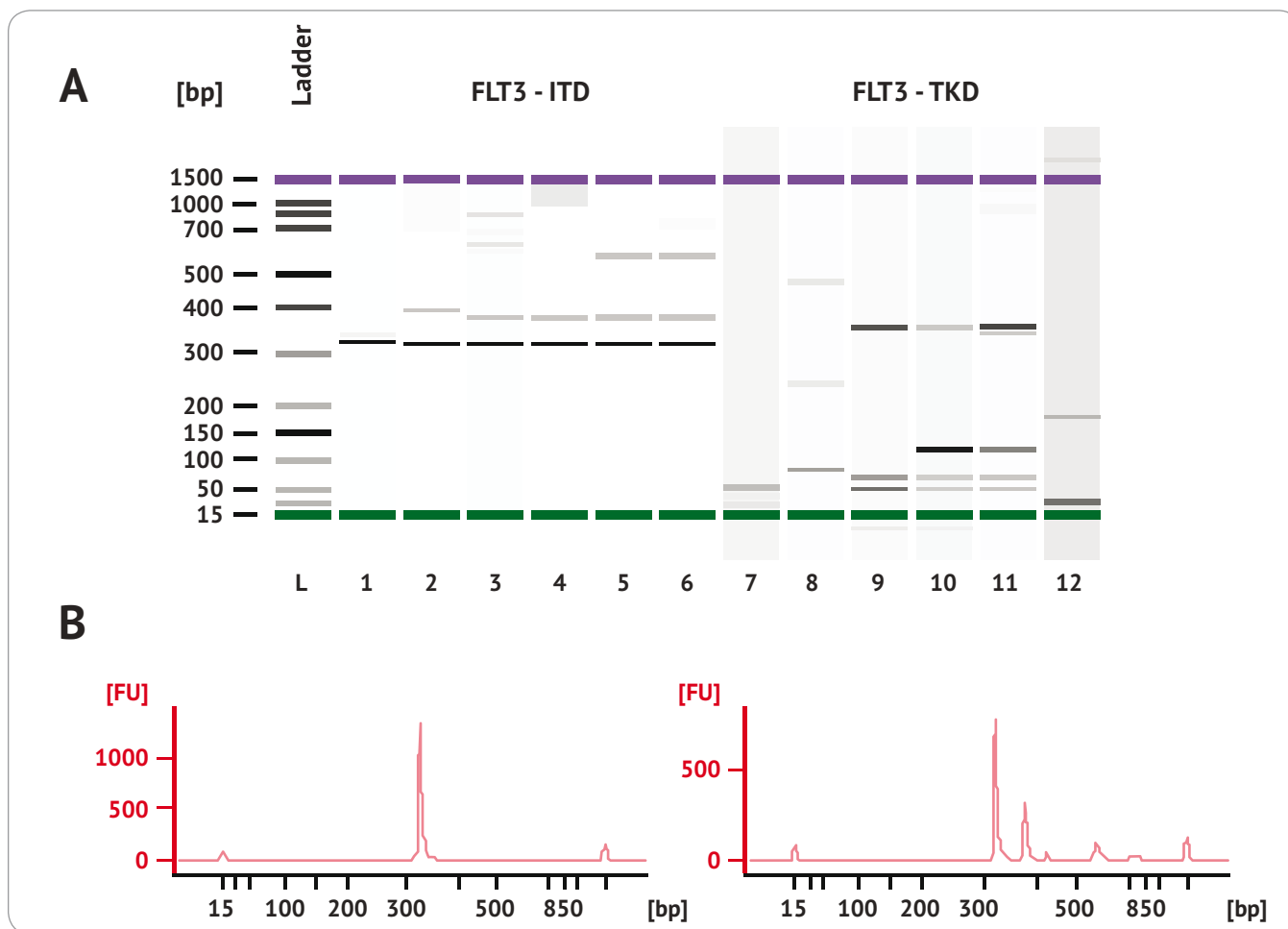
Pacienti s mutáciou v géne *FLT3* tvoria 1/3 (28 %). Pomer mužov (48) a žien (54) v skupine bez *FLT3* mutácie je pomer takmer rovnaký, u *FLT3*<sup>+</sup> pacientov je žien (26) 2× viac ako mužov (13). *FLT3*-*ITD* bola potvrdená u 18 % pacientov a bodová mutácia *FLT3*-*TKD* v 8 % zo všetkých AML pacientov. Dvaja pacienti mali obidve mutácie. V jednom prípade sme potvrdili mutáciu *FLT3*-*ITD* v oboch alelách, rovnako aj mutáciu *FLT3*-*TKD* v oboch alelách sme zachytili u jedného pacienta. Obidvaja pacienti zomreli pár dní od potvrdenia diagnózy.

V rámci skupín *FLT3*<sup>+/-</sup> sme pacientov ďalej rozdelili podľa prítomnosti ďalších chromozómových aberácií – bez aberácií, trizómia chromozómu 8, *PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *AML1-ETO*, *MLL*, komplexný karyotyp. Percentuálne zastúpenie pacientov v jednotlivých špecifických podskupinách bolo takmer

rovnaké u *FLT3*<sup>-</sup> aj u *FLT3*<sup>+</sup>, s výnimkou translokácie *t(15; 17)/PML-RARA*, kde u *FLT3*<sup>+</sup> pacientov to bolo 15 oproti 7 % *FLT3*<sup>-</sup> a naopak, pacienti s komplexným karyotypom a viac ako dvoma ďalšími prítomnými genetickými aberáciami v skupine *FLT3*<sup>-</sup> tvorili 14 oproti 3 % v súbore *FLT3*<sup>+</sup>. V skupine *FLT3*<sup>+</sup> pacientov sme nezachytili ani jednu translokáciu *t(8; 21)/AML1-ETO*.

Porovnávali sme úmrtnosť pacientov do 1 roka od stanovenia diagnózy. Mutácia v géne *FLT3* predstavuje nepriaznivý prognostický faktor, čo sa potvrdilo aj vo vyššej úmrtnosti pacientov v skupine *FLT3*<sup>+</sup> (33 %) oproti 10 % v skupine *FLT3*<sup>-</sup>. V skupine *FLT3*<sup>-</sup> bolo 57 pacientov (56 %) s normálnym karyotypom, z toho zomreli 3 pacienti, čo predstavuje 5 % pacientov s normálnym karyotypom a *FLT3* negativitou. *FLT3* pozitivitu a normálny karyotyp malo 23 pacientov (59 %), z toho 30 % pacientov (7 pacientov) zomrelo. Aj u pacientov s normálnym karyotypom, ktorí sú zaradení do skupiny s intermediárnou prognózou, sa potvrdil posun k horšej prognóze v prípade mutácie v géne *FLT3*.

V rámci *FLT3*<sup>+</sup> skupiny bola vyššia úmrtnosť u pacientov s *FLT3*-*ITD* (9 pacientov) ako u pacientov s *FLT3*-*TKD* (3 pacienti), ale percentuálne zastúpenie úmrtí v rámci danej mutácie bolo takmer



**Obr. 3. Separácia PCR produktov FLT3-ITD na mikročipe Bioanalyzer 2100.**

A. Elektroforeogram: L-ladder, 1 – nemutovaný gén *FLT3* = 328 bp (zdravý jedinec), 2-6 pacienti s ITD-*FLT3* v jednej alele (328 bp – nemutovaná alela, fragmenty dlhšie ako 328 bp = *FLT3*-ITD), 7- negatívna kontrola amplifikácie (voda), 9 – zdravý jedinec bez mutácie *FLT3*-TKD, 10,11 – mutácia v 1 alele, 12 - negatívna kontrola amplifikácie (voda).

B. Pík 328 bp je fragment nemutovaného génu.

C. Pík 385 bp je dôkaz prítomnosti *FLT3*-ITD, 328 bp je nemutovaná alela (WT), vypočítava sa aj pomer výšky píku mutovanej a nemutovanej alely (*FLT3*-ITD : WT).

bp – bázoové páry

rovnaké (35, resp. 36 %). Jedna 77-ročná pacientka s dvojitou mutáciou *FLT3*-ITD-*TKD* bola paradoxne v remisii.

#### MDS pacienti s prechodom do AML

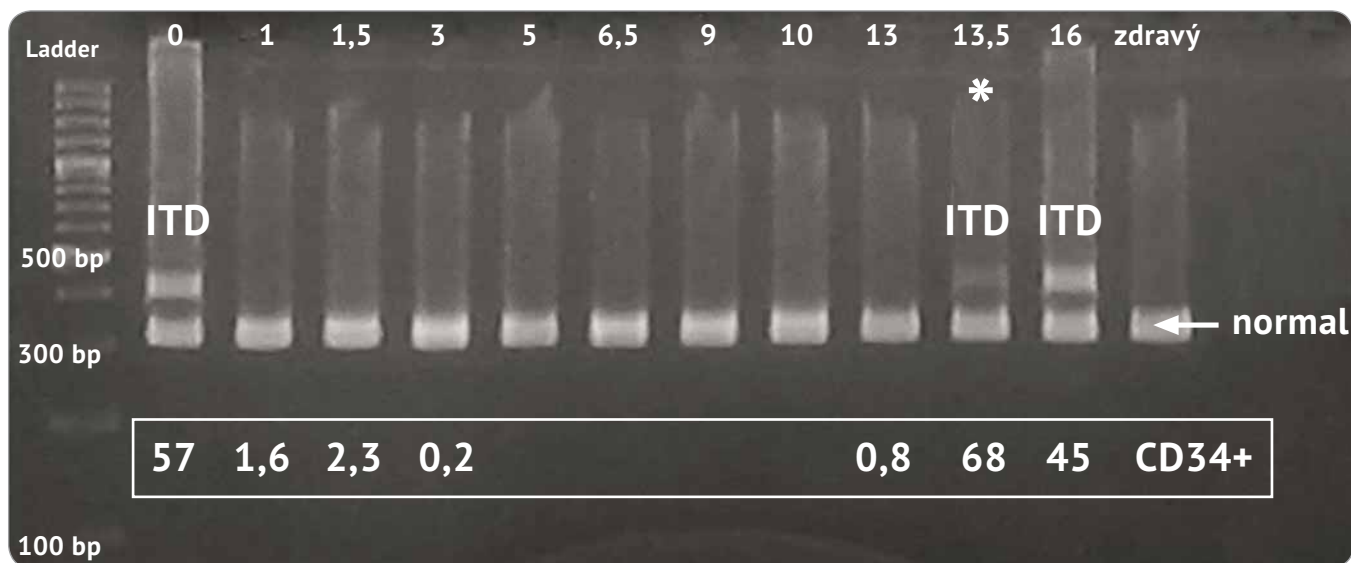
Pacientov s diagnózou MDS (8 pacientov), ktorí boli vyšetrení v súvislosti s prechodom MDS do AML, sme zaradili do samostatného súboru. Priemerný vek pacientov bol 65,6 rokov. Z piatich *FLT3*-pacientov s prechodom do AML traja zomreli do 6 mesiacov od potvrdenia prechodu do AML. Ostatní remisiu nedosiahli. U troch MDS pacientov bola pri prechode do AML potvrdená *FLT3* pozitivita, z toho u dvoch (1 muž a 1 žena,

obaja vo veku 60 rokov) *FLT3*-ITD a u jedného *FLT3*-TKD. U *FLT3* + pacientov bola táto mutácia jedinou pozitívnou genetickou aberáciou z vyšetřovaného panelu. U ženy bola *FLT3*-ITD počas MDS diagnózy negatívna, pozitívna sa potvrdila až pri prechode do AML po 9 mesiacoch od monitorovania *FLT3* počas diagnózy MDS. Pacientka po roku od prechodu do AML je v dispenzári. Druhý pacient – 60ročný muž, bol u nás vyšetřený prvýkrát až pri prechode MDS do AML a odvtedy až do úmrtia (po 16 mesiacoch) bol monitorovaný na *FLT3*-ITD-pozitivitu. Priebeh ochorenia tohto pacienta je zaznamenaný na obr. 4. Pre názornosť sú tu uvedené aj hodnoty CD34+,

ktoré podobne ako ostatné hematologické parametre korelovali s prítomnosťou mutácie *FLT3*-ITD. Veľkosť fragmentu mutovanej alely bola identická pri 1. analýze aj pri relapse ochorenia (po 13,5 mesiacoch), no odlišný bol pomer medzi mutovanou a nemutovanou alelou. Pri nasledujúcom kontrolnom vyšetrení (po 16 mesiacoch) bol už aj pomer medzi obidvoma alelami rovnaký ako pri 1. analýze.

#### Diskusia

Mutácie v géne *FLT3* u pacientov s AML patria k negatívnym prognostickým markerom a výrazne zvyšujú riziko relapsov a úmrtia, preto ich monitoring je už sú-



**Obr. 4. Elektroforeogram PCR fragmentov génu FLT3 u pacienta s prechodom MDS do AML.**

Vzorky boli zoradené podľa časovej osi za účelom potvrdenia identity mutácie FLT3-ITD pri prvej analýze a v čase relapsu. V hornej časti záznamu je časová os monitoringu FLT3 v mesiacoch, hviezdíčkou je vyznačený relaps. Zdravý jedinec bol do analýzy zaradený ako kontrola amplifikácie nemutovanej alely (normal). Uvedené hodnoty CD34+ korelujú s FLT3 pozitivitou

ITD – interná tandemová mutácia, PCR – polymerázová reťazová reakcia, MDS – myelodysplastický syndróm, AML – akútna myeloblastová leukémia

**Tab. 1. Porovnanie výsledkov monitoringu FLT3 vo vzorkách pacientov s AML de novo analyzovaných v laboratóriu SEMBID a s publikovanou štúdiou (Thiede, 2002). Uvedené hodnoty sú v %.**

	FLT3-		ITD		FLT3+ TKD		ITD + TKD	
	SEMBID	Thiede	SEMBID	Thiede	SEMBID	Thiede	SEMBID	Thiede
všetci pacienti	72	73,6	18,4	18,7	9,2	5,9	1,4	1,7
bez aberácií	56	39,1	66	65	36	60,3	100	88
+ 8	5,9	9,6	3,8	3,3	9,1	10,3	0	0
PML/RARA	6,9	3,6	15,3	7,1	27	6,9	0	0
CBFB/MYH11	2,9	5	7,7	0,6	0	8,6	0	4,8
2 a viac aberácií	13,7	18,3	3,8	1,6	0	8,6	0	4,8

ITD – interná tandemová mutácia, TKD – tyrozínkinázová doména, AML – akútna myeloblastová leukémia

časťou základných molekulovo-genetických vyšetrovacích panelov. Výsledky dôkazu mutácií v géne FLT3 u pacientov východoslovenského regiónu s diagnózou AML de novo korelujú s publikovanými výsledkami štúdie nemeckých pacientov [21] napriek takmer rádovému rozdielu v počte pacientov (979 pacientov v uvedenej štúdii oproti 142 pacientov v aktuálnej štúdii) (tab. 1). Pre porovnanie výsledkov sme vybrali štúdiu, kde na dôkaz mutácií v géne FLT3 bola použitá rovnaká PCR metóda. Rozdiely vo výskyte translokácií t (15;

17)/PML-RARA a 16inv(16)(p13;q22)/t(16; 16) (p13; q22)/CBFB- MYH11 oproti databáze nemeckých pacientov sú spôsobené pravdepodobne malým počtom pacientov v našom súbore. U pacientov s translokáciou PML/RARA bol pomer medzi FLT3- a FLT3-ITD+ približne 1 : 2 v oboch súboroch.

V súbore boli aj 2 pacientky (44 a 77 rokov) s obidvoma mutáciami. Predpokladá sa [22], že prítomnosť obidvoch mutácií zhoršuje prognózu. Napriek tomu 77-ročná pacientka s obidvoma mutáciami dosiahla remisiu. Materiál

tejto pacientky bude podrobený ďalším analýzám za účelom zistenia presného typu bodovej mutácie, ako aj lokalizovania mutácií FLT3-ITD a FLT3-TKD na alelách, t. j. či sú mutácie na tej istej alebo rôznych alelách.

U všetkých pacientov sme vyšetřovali paralelne PK aj KD pri vstupnom vyšetření aj pri monitorovaní účinku terapie. V oboch materiáloch boli mutácie identické a dobre detegovateľné. Len v jedinom prípade relapsu bola mutácia prítomná len vo vzorke KD, vzorka PK bola negatívna.

Typ a veľkosť FLT3-ITD mutácie boli pri vstupnom vyšetrení a relapse u všetkých monitorovaných pacientov rovnaké, teda jednalo sa o rovnaký klon.

Mutácie v géne *FLT3* boli vyšetrované aj u MDS pacientov. Do štúdie sme vybrali len tých pacientov, u ktorých bol diagnostikovaný prechod do AML. Zaujímavosťou bolo, že pacienti bez FLT3 mutácie po prechode do AML zomreli do 6 mesiacov, zatiaľ čo pacient s FLT3-ITD prežil 16 mesiacov a druhá pacientka s FLT3-ITD zatiaľ prežíva viac ako rok. Tento fakt koreluje s publikovaným údajom [17], kde pacienti bez FLT3 mutácie prežívali kratšie (priemer 16 mesiacov) ako pacienti s mutáciou FLT3 (19 mesiacov). Vzhľadom na náš veľmi malý súbor sekundárnych AML pacientov nie je možné robiť podrobnejšie závery ani porovnávať údaje s literatúrou.

Na dôkaz mutácií v géne *FLT3* sme aplikovali jednoduchú PCR metódu so separáciou fragmentov na klasickej agarózovej elektroforéze a verifikácii pozitivity na mikročipe na zariadení Bioanalyzer 2100, kde sme presne určili veľkosti fragmentov ako aj pomer medzi mutovanou a nemutovanou alelou v prípade FLT3-ITD. Táto metóda bola dostatočne citlivá na dôkaz mutácií. Nebol problém ani s amplifikáciou dlhších úsekov FLT3-ITD, kde je viditeľný vyšší podiel mutovanej alely, ktorá je dlhšia ako nemutovaný fragment s nižšou intenzitou.

Výber vhodnej metódy je dôležitý pre správne zachytenie nielen pozitivity, ale aj pomeru medzi mutovanou (FLT3-ITD) a nemutovanou alelou (wild type – WT) v súvislosti s prognózou a možnosťou skoršieho relapsu a celkovým prežívaním pacienta. Dlhšie fragmenty a vyšší pomer FLT3-ITD : WT zhoršujú prognózu ochorenia [23].

## Záver

Výsledky analyzovaného súboru poukazujú na vhodne zvolenú PCR metódu, ktorá je relatívne rýchla a finančne nenáročná, čo umožňuje monitorovať mutácie v géne *FLT3* nielen u pacientov s AML, ale rutinne aj u všetkých MDS a CMMoL (chronická myelomonocytová leukémia) pacientov. Aplikovaná metóda bola do-

statočne citlivá na dôkaz mutácií a bezproblémovú amplifikáciu aj dlhších úsekov FLT3-ITD. Verifikácia *FLT3* pozitivity na mikročipe nahrádza separáciu PCR produktu na kapilárnej elektroforéze, ktorá je finančne podstatne náročnejšia ako analýza na mikročipe.

V rutinej klinickej praxi sú FLT3+ pacienti zatiaľ dilemou. Z dôvodu určenia prognózy v súčasnosti pre našich klinikov úplne stačí dôkaz FLT3 pozitivity a pravidelný monitoring tejto mutácie pri každej kontrole. Stanovenie pomeru FLT3-ITD : WT sa zatiaľ nevyžaduje. Monitoring MDS a CMMoL pacientov na prítomnosť *FLT3* mutácií by mal byť súčasťou základného vyšetrovacieho panelu v rámci molekulovej genetiky, pretože objavenie sa FLT3 pozitivity u týchto pacientov je predzvesťou prechodu do AML.

Vzhľadom na vývoj inhibítorov FLT3-tyrozínkinázy v súvislosti s liečbou FLT3+ pacientov sa uvažuje aj o zavedení štandardného postupu pri monitorovaní minimálneho reziduálneho ochorenia (minimal residual disease – MRD) na základe kvantifikácie FLT3-ITD (podobne ako u CML monitoring fúzneho génu *BCR/ABL*). V mnohých prípadoch je mutácia v géne *FLT3* jediný pozitívny genetický marker u AML pacientov.

## PodĎakovanie

Vďaka za spoluprácu patrí Mgr. Ivete Lučkovej a RNDr. Františkovi Spišákovi, PhD.

## Literatúra

1. Vašková J, Dubayová K, Čakanová G et al. Incidence and prognostic value of known genetic aberrations in patients with acute myeloid leukemia – a two year study. *Klin Onkol* 2015; 28(4): 278–283. doi: 10.14735/amko2015278.
2. Testa U, Pelosi E. The impact of FLT3 mutations on the development of acute myeloid leukemias. [online]. *Leukemia Research and Treatment*; 2013. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/275760>.
3. Grafone T, Palmisano M, Nicci C et al. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncology Reviews* 2012; 6(1): 8e. doi: 10.4081/oncol.2012.e8.
4. Rosnet O, Schiff C, Pebusque MJ et al. Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 1993; 82(4): 1110–1119.
5. Rosnet O, Buhning HJ, Delapayere O et al. Expression and signal transduction of the FLT3 tyrosine kinase receptor. *Acta Haematol* 1996; 95(3–4): 218–223. doi: 10.1159/000203881.
6. Griffith J, Black J, Faerman C et al. The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 2004; 13(2): 169–178.

7. Abu-Duhier FM, Goodeve AC, Wilson GA et al. Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2001; 113(4): 983–988.
8. Yamamoto Y, Kioyi H, Nakano Y et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97(8): 2434–2439.
9. Quentmeier H, Reinhardt J, Zaborski M et al. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines. *Leukemia* 2003; 17(1): 120–124. doi: 10.1038/sj.leu.2402740.
10. Whitman SP, Archer KJ, Feng I et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplications of FLT-3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001; 61(19): 7233–7239.
11. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meschinchi S et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107(9): 3724–3726. doi: 10.1182/blood-2005-08-3453.
12. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood* 2009; 114(12): 2386–2392. doi: 10.1182/blood-2009-03-209999.
13. Kioyi H, Ohno R, Ueda R et al. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene* 2002; 21(16): 2555–2563. doi: 10.1038/sj.onc.1205332.
14. Kusec R, Vrsalovic M, Bobetic T et al. Fms-Like Tyrosine Kinase (FLT3) gene ITD mutation in acute myeloid leukemia. *Zdrav Vestn* 2004; 73 (supl 1): 5–7.
15. Small D. FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006: 178–184. doi: 10.1182/asheducation-2006.1.178.
16. Zaker F, Mohammadzadeh M, Mohammadi M. Detection of KIT and FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia with Different Subtypes. *Arch Iran Med* 2010; 13(1): 21–25.
17. Daver N, Strati P, Jabbour E et al. FLT3 mutations in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol* 2013; 88(1): 56–59. doi: 10.1002/ajh.23345.
18. Takahashi S. Downstream molecular pathways of FLT3 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia: biology and therapeutic implications. [online]. *Journal of Hematology & Oncology* 2011; 4: 13. Available from: <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-13>.
19. Ilenciková D, Sýkora J, Mikulášová Z et al. Identifikácia molekulárných markerov u detí s akútnou myeloblastovou leukémiou (AML). *Klin Onkol* 2012; 25(1): 26–35. doi: 10.14735/amko201226.
20. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2009; 15(13): 4263–4269. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1123.
21. Thiede C, Steudel C, Mohr B et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99(12): 4326–4335.
22. Bagrintseva K, Geisenhof S, Kern R et al. FLT3-ITD-TKD dual mutants associated with AML confer resistance to FLT3 PTK inhibitors and cytotoxic agents by overexpression of Bcl-x(L). *Blood* 2005; 105(9): 3679–3685. doi: 10.1182/blood-2004-06-2459.
23. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013: 220–226. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.220.

# Výsledky léčby krizotinibem v léčbě nemalobuněčného ALK pozitivního karcinomu plic v České republice

## Effects of Treatment with Crizotinib on Non-small Cell Lung Carcinoma with ALK Translocation in the Czech Republic

Pešek M.<sup>1</sup>, Skříčková J.<sup>2</sup>, Kolek V.<sup>3</sup>, Šatánková M.<sup>2</sup>, Koubková L.<sup>4</sup>, Roubec J.<sup>5</sup>, Chloupková R.<sup>6</sup>, Černovská M.<sup>7</sup>, Benejová A.<sup>2</sup>, Kultán J.<sup>3</sup>, Hrnčiarik M.<sup>8</sup>, Zemanová M.<sup>9</sup>, Konečný M.<sup>6</sup>, Čoupková H.<sup>10</sup>, Svatoň M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Klinika pneumologie a ftizeologie, LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup> Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno

<sup>3</sup> Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF UP a FN Olomouc

<sup>4</sup> Pneumologická klinika 2. LF UK a FN Motol, Praha

<sup>5</sup> Klinika plicních nemocí a tuberkulózy LF OU a FN Ostrava

<sup>6</sup> Institut biostatistiky a analýz, LF MU, Brno

<sup>7</sup> Pneumologická klinika 1. LF UK a Thomayerova nemocnice, Praha

<sup>8</sup> Plicní klinika LF UK a FN Hradec Králové

<sup>9</sup> Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

<sup>10</sup> Klinika komplexní onkologické péče, MOÚ, Brno

### Souhrn

**Úvod:** Nemocní s pokročilými ALK (anaplastic lymphoma kinase) pozitivními nemalobuněčnými karcinomy plic (non small cell lung cancer – NSCLC) mohou významně profitovat z léčby ALK inhibitorem 1. generace – krizotinibem. Referujeme o výsledcích této léčby podle údajů zadaných v registru TULUNG, které poskytla jednotlivá pneumoonkologická centra v České republice. **Soubor pacientů a metody:** Analyzovali jsme soubor nemocných s NSCLC z pneumoonkologických center zapojených v registru TULUNG, u kterých byla prokázána metodou FISH ALK translokace a měly plný záznam v registru z let 2011–2017. Tomuto požadavku odpovídalo celkem 60 pacientů. **Výsledky:** Medián věku nemocných činil 58 let. V souboru převažovali muži (53 %), adenokarcinomy (90 %), kuřáci s exkuřáky (61,7 %) a pacienti se stavem výkonnosti 0 (65 %). V době zahájení léčby krizotinibem převažovalo onemocnění stadia IV (88,3 %), u ostatních nemocných pak stadia IIIA, resp. B. Vzhledem k úhradovým podmínkám převládala indikace ve 2. linii léčby (u 71,7 % nemocných). Nežádoucí příhody se vyskytly u 20,0 % léčených pacientů, nežádoucí účinky grade 3 a vyšší u 11,7 % nemocných. Kompletní remise, parciální remise, stabilizace onemocnění a progresse nemocných byly dosaženy u 6,7, 25, 21,7 a 25 % nemocných. Medián doby do progresse (progression-free survival – PFS) činil 5,8 měsíce, celkové přežití (overall survival – OS) nemocných bylo 12,6 měsíce. Celková doba přežití nemocných od zahájení léčby 1. linií byla 27,9 měsíce. Významně delší čas do PFS i OS se prokázal u nekuřáků a bývalých kuřáků v porovnání s kuřáky (PFS 9,7 vs. 5,8 vs. 3,8 měsíce;  $p = 0,029$ ; OS 26,8 vs. 15,3 vs. 7,0 měsíce,  $p = 0,015$ ). **Závěr:** Cílená léčba krizotinibem u nemocných s pokročilými ALK pozitivními NSCLC je dobře snášena a přináší prokazatelný benefit. Zatímco mezinárodní doporučení odborných společností navrhuje tuto léčbu podávat již v 1. linii, v České republice je ještě stále hrazena ve 2. a vyšších liniích, třebaže je dle výsledku klinických studií účinnější i méně toxická než obvyklá chemoterapie.

### Klíčová slova

translokace genu ALK – krizotinib – cílená léčba – tyrozinkinázové inhibitory

Práce byla podpořena grantem AZV 17-30748A.

This work was supported by AZV grant No. 17-30748A.

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 recommendation for biomedical papers.



MUDr. Martin Svatoň, Ph.D.  
Klinika pneumologie a ftizeologie  
LF UK a FN Plzeň  
alej Svobody 80  
304 60 Plzeň  
e-mail: svatonm@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 17. 1. 2018

Přijato/Accepted: 20. 2. 2018

doi: 10.14735/amko2018207

## Summary

**Background:** Patients with advanced anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) may gain significant benefit from treatment with the first-generation ALK inhibitor crizotinib. This study investigated the effects of crizotinib in advanced ALK-positive NSCLC patients via analyzing data submitted to the TULUNG registry by pneumo-oncology centers in the Czech Republic. **Patients and methods:** We analyzed the data of 60 NSCLC patients submitted to the TULUNG registry by pneumo-oncology centers who had ALK translocation confirmed by fluorescence *in situ* hybridization and complete data records from 2011 to 2017. **Results:** The median age of patients was 58 years. A total of 53% of patients were men, 90% had adenocarcinomas, 61.7% were smokers or ex-smokers, and 65% had a performance status of 0. Upon initiation of crizotinib therapy, most patients were at stage IV (88.3%) and the remainder were at stage IIIA or IIIB. Crizotinib was the second-line therapy in 71.7% of patients. A total of 20% of patients suffered side effects, while 11.7% suffered grade 3 and 4 adverse effects. A total of, 6.7, 25, 21.7, and 25% of patients displayed a complete response, a partial response, stable disease, and progressive disease, resp. Progression-free survival (PFS) was 5.8 months. Overall survival (OS) was 27.9 months from the initiation of the first-line therapy and 12.6 from the initiation of crizotinib therapy. PFS and OS were longer among nonsmokers and ex-smokers than among smokers (PFS, 9.7 vs. 5.8 vs. 3.8 months,  $p = 0.029$ ; OS, 26.8 vs. 15.3 vs. 7.0 months,  $p = 0.015$ ). **Conclusion:** Targeted crizotinib therapy is well tolerated and has significant benefit in patients with advanced ALK-positive NSCLC. Although international guidelines recommend that crizotinib is only used as a first-line therapy, it is used as a second-line and higher-line therapy in the Czech Republic. Clinical studies provide evidence that targeted therapy elicits better effects and less toxicity than routine chemotherapy.

## Key words

ALK translocation – crizotinib – targeted biological therapy – tyrosine kinase inhibitors

## Úvod

Nemalobuněčné karcinomy plic (non small cell lung cancer – NSCLC) jsou nejen u nás, ale i celosvětově nejčastějším zhoubným nádorem zapříčiňujícím úmrtí pacientů. I přes velký po-

krok v oblasti systémové terapie je mortalita stále vysoká. Jedním z hlavních diagnostických úkolů posledních let je snaha o zlepšení zachytu NSCLC pacientů vhodných pro specifickou biologickou léčbu nízkomolekulárními inhi-

bitory proteinových tyrozinkináz, které selektivně snižují proliferaci plicních nádorových buněk a tím zastavují růst nádoru. Zároveň mohou aktivovat nádorovým růstem potlačenou apoptózu nádorových buněk.

Molekulárně genetické vyšetřovací metody umožňují nacházet řídicí mutace v nádorové tkáni nemocných s NSCLC. V současnosti jsou běžně vyšetřovány neskvamózní typy karcinomů, především adenokarcinomy a nemalobuněčné blíže nespecifikovatelné karcinomy [1–3]. Cílená terapie specifickými inhibitory tyrozinkináz přichází v úvahu u nemocných s nádory nesoucími některé mutace genu *EGFR* a v poslední době i u nádorů s translokacemi genu *EML-4 ALK* a jeho variant. Tzv. ALK (anaplastic lymphoma kinase) pozitivní karcinomy plic jsou citlivé k léčbě ALK cílenými inhibitory, proto je jejich diagnostika velmi důležitá. V našem sdělení hodnotíme výsledky léčby v ČR dle dat uložených v registru TULUNG v letech 2011–2017.

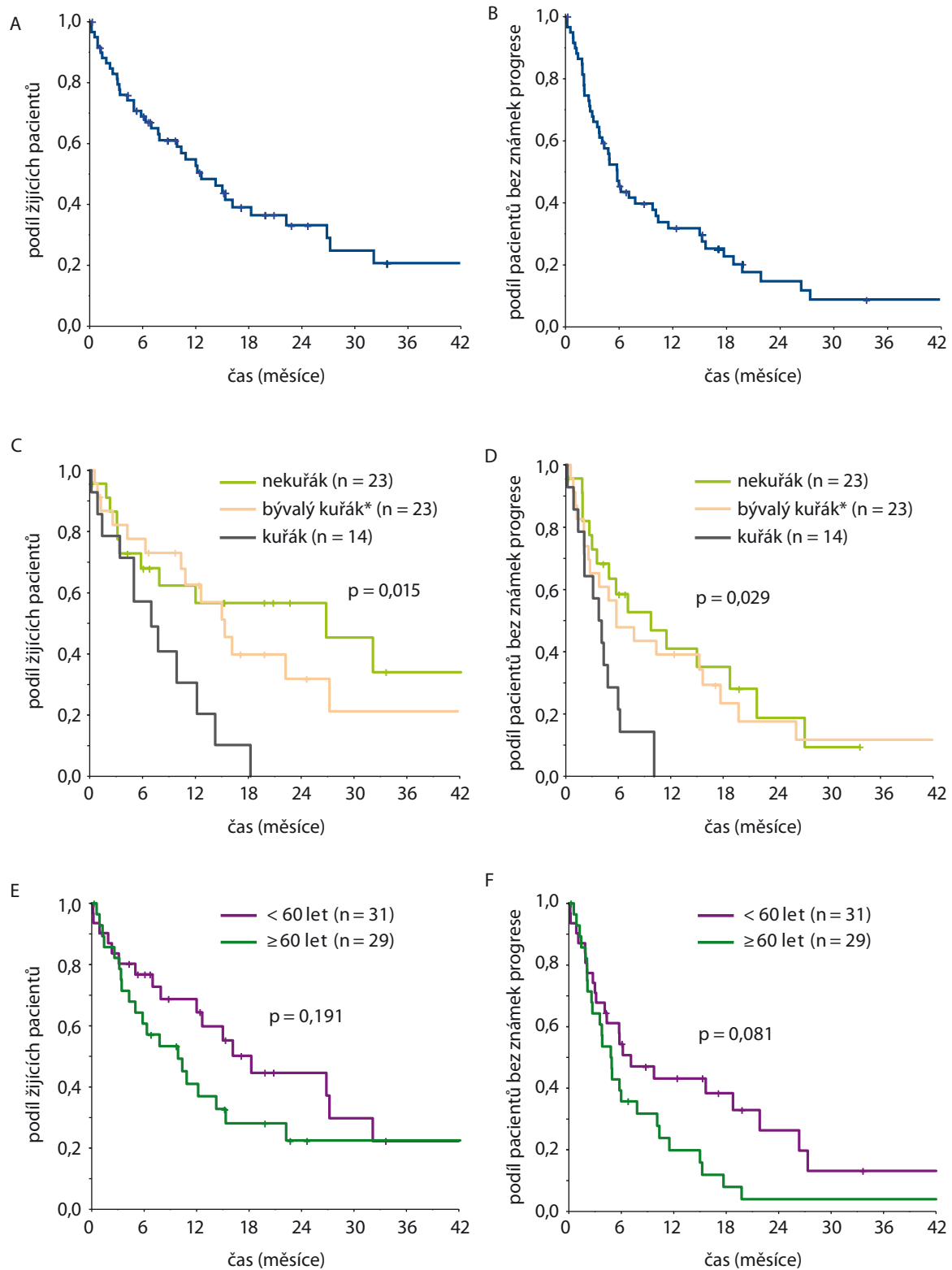
## Soubor pacientů a metody

Analyzovali jsme soubor nemocných s NSCLC s ALK translokacemi pneumoonkologických center zapojených v registru TULUNG. Nemocné jsme hodnotili podle běžných klinických dat (věk při zahájení léčby krizotinibem, pohlaví, kuřácká anamnéza, histologie a stadium nádoru, stav výkonnosti v době zahá-

Tab. 1. Výskyt nežádoucích příhod.

Nežádoucí příhody	n	%
<b>Léčba bez nežádoucích příhod</b>	48	80,0
<b>Výskyt nežádoucích příhody – libovolný grade</b>	12	20,0
<b>Typ nežádoucích příhody (libovolný grade)*</b>		
zvracení, průjem, dyspepsie	8	13,3
poruchy nervového systému	4	6,7
poruchy metabolismu a výživy	3	5,0
únava	2	3,3
pneumonitida	1	1,7
bradykardie	1	1,7
vyrážka	1	1,7
jiné	3	5,0
<b>Výskyt nežádoucích příhody grade 3 a vyšší</b>	7	11,7
<b>Typ nežádoucích příhody (grade 3 a vyšší)*</b>		
zvracení, průjem, dyspepsie	4	6,7
poruchy metabolismu a výživy	3	5,0
únava	2	3,3
poruchy nervového systému	1	1,7
pneumonitida	1	1,7
jiné	1	1,7





\* pacient přestal kouřit rok a více před diagnózou

Obr. 1. Celkové přežití (A, C, E) a přežití bez známek progresse (B, D, F) od data zahájení léčby krizotinibem pro vybrané skupiny pacientů (A + B celá kohorta, C + D dle kouření, E + F dle věku při zahájení léčby krizotinibem).

jení cílené terapie a linie léčby). Dále jsme hodnotili nejlepší dosaženou odpověď předchozí chemoterapie i cílené léčby, délku cílené léčby vč. mediánu doby po progresi (progression-free survival – PFS) a celkového přežití (overall survival – OS) pacientů, nežádoucí účinky (NÚ) krizotinibu a důvody jeho případného ukončení u cílené léčby. Statistické vyhodnocení bylo provedeno ve spolupráci s IBA Brno. Pro metody indukativní statistiky byl užíván log-rank test na zvyklé hladině významnosti  $p = 0,05$ .

## Výsledky

Bylo vyhodnoceno celkem 60 kompletních záznamů nemocných z celkem 9 pracovišť, 2 další nebyly analyzovány z důvodu neúplných údajů. Medián věku našeho souboru při zahájení léčby byl 60 let (5–95 % ve věku 37–73 let), mladších 65 let bylo 65 %.

Z celkového počtu 60 pacientů bylo 28 žen (46,7 %) a 32 mužů (53,3 %). Z toho nekuřáků 23 (38,3 %), bývalých kuřáků (přestali kouřit 1 rok a více před diagnózou) bylo 23 (38,3 %) a kuřáků 14 (23,3 %). Adenokarcinomy bez specifikace byly u 42 pacientů, adenokarcinom mucinózní u 10, adenokarcinom mucinózní u 2, nespecifikovaný NSCLC u 3, epidermoidní karcinom u 1, adenoskvamózní karcinom také u 1 a jiný blíže nespecifikovaný karcinom u 1 pacienta. Klinické stadium v době zahájení léčby krizotinibem – stadium I a II neměl žádný pacient, stadium IIIA 1 nemocný, stadium IIIB 6 nemocných a stadium IV 53 nemocných. Stav výkonnosti při zahájení léčby – PS 0 bylo u 12 pacientů (20,0 %), PS 1 u 39 (65,0 %) a PS 2 u 9 (15,0 %). Léčbu v 1. linii měl 1 pacient (1,7 %), ve 2. linii 43 pacientů (71,7 %), ve 3. linii 12 (20,0 %) a ve 4. a vyšší linii 4 nemocní (6,7 %). ALK translokace byla prokázána u všech 60 pacientů léčených krizotinibem. Výsledek FISH – % buněk s pozitivními signály – průměr 46, medián 40, min. a max. hodnota 18–100, CI 5–95% – 18–92.

Léčba platinovým doubletem (u 8 pacientů též spolu s bevacizumabem) byla před terapií krizotinibem podána u 57 nemocných (u 3 pacientů není léčba před krizotinibem blíže specifikována). Nejčastější kombinací tvořil doublet cisplatina + pemetrexed u (20 pacientů).

V 1. linii léčby kompletní remise (complete remission – CR) nedosáhl žádný nemocný, parciální odpovědi (partial response – PR) 8 pacientů (14 %), stabilizace onemocnění (stable disease – SD) 21 (36,8 %) pacientů a progresi onemocnění (progression disease – PD) byla popsána u 14 (24,6 %) pacientů, u zbylých nemocných není v registru odpověď na 1. linii chemoterapie známa.

Co se týče terapie krizotinibem, byla zdokumentována následující procenta nejlepší dosažené léčebné odpovědi – CR 6,7 %, PR 25 %, SD 21,7 %, PD 25,0 % a nehodnoceno u 21,7 % z celkem 60 nemocných.

Medián doby léčby krizotinibem dosáhl dosáhl u 46 pacientů s dokončenou léčbou hodnoty 7,8 měsíce (min.–max. 0,2–47,8 měsíce), kdy důvodem pro ukončení léčbou byla u většiny nemocných (78,7 %) progresi onemocnění, jako další příčiny byly uvedeny úmrtí pacienta (10,6 %), nežádoucí účinek léčby (6,4 %) a zhoršení stavu bez progresi onemocnění (2,1 %), u 2,1 % nebyl důvod ukončení léčby uveden. Popis nežádoucích účinků léčby je uveden v tab. 1.

Medián PFS léčby krizotinibem činil 5,8 měsíce, medián OS pak 12,6 měsíce (obr. 1 (graf A+ B) a tab. 2.). Medián OS od zahájení 1. linie léčby pak dosáhl 27,9 měsíce (95% IS 18,5–37,2 měsíce).

Analýza časů do progresi nemoci a nejlepší léčebné odpovědi ve vztahu k počtu procent barevných signálů v nádorových buňkách jednotlivých pacientů neprokázala statisticky významné rozdíly.

Následně jsme vyhodnotili parametry účinnosti léčby krizotinibem ve vztahu ke kuřácké anamnéze nemocných a k jejich věku. Výsledky jsou zachyceny na obr. 1 (graf D–F) a v tab. 1.

## Diskuze

Biologicky cílená léčba s použitím tyrozinkinázových inhibitorů významně zlepšuje kvalitu života nemocných s nejčastějšími mutacemi *EGFR*, translokací genu *EML-4 ALK* a *ROS1* [4–8]. A to i přesto, že tyto skupiny nemocných jsou zejména v kaukazoidní populaci minoritní, v souhrnu se jejich společný podíl na celkové populaci nemocných s adenokarcinomy a blíže nespecifikovanými karcinomy plic udává kolem 15 % a více.

Zatímco na začátku tohoto století se střední doba života nemocných léčených chemoterapií 1. linie blížila 12 měsícům, údaje z konsorcia mutací karcinomu plic udávají výsledky výrazně lepší [9]. U nemocných, jejichž nádory obsahují řídicí mutace, je střední doba života, pokud jsou léčeni cílenou terapií, až kolem 3,5 roku od stanovení diagnózy. Společnými rysy, které má cílená léčba inhibitory tyrozinkinázy specifickými pro dané typy řídicích mutací, je relativně vysoká frekvence léčebných odpovědi, rychlé dosažení léčebné odpovědi spojené s ústupem klinické symptomatologie, ale bohužel i vývoj rezistentních forem nádorů po předchozí klinické remisi. Indikace cílených léků se v mezinárodních doporučeních posunuly většinou do 1. linie léčby. Postupné poznávání mechanismů získané rezistence takto léčených nádorů vede k vývoji cílených léků vyšších generací, které přinášejí nemocným naději na dosažení dalších, někdy též dlouhodobých remisí nádorových onemocnění. Soubor našich nemocných s ALK pozitivní translokací je, podobně jako uvádějí jiné literární údaje [10], mladší, než odpovídá věkové struktuře pacientů s NSCLC ve stadiích III a IV podle dat Národního onkologického registru (NOR). Převažují zde nekuřáci a bývalí kuřáci, nejčastějšími morfologickými typy nádorů jsou adenokarcinomy bez specifikace a adenokarcinomy nemucinózní. V době zahájení léčby krizotinibem šlo téměř vždy o stadium IV, léčba byla podávána nejčastěji ve 2. linii za převažujícího stavu výkonnosti PS 0 a 1. Frekvence léčebných odpovědi na předchozí chemoterapii byla nízká – pouhých 14,0 % a k přechodné stabilizaci onemocnění došlo u < 1/3 nemocných. Je známo, že ALK pozitivní NSCLC mají nižší frekvenci léčebných odpovědi na pemetrexed než na ALK inhibitor, odpověď na erlotinib nebyla literárně doložena. Léčba našich nemocných byla celkem dobře tolerována, NÚ se vyskytly u 20 % léčených, z toho závažné jen u 11,7 % všech léčených, nejčastěji se vyskytovaly zvracení, průjem a dyspepsie, poruchy nervového systému a poruchy metabolismu a výživy. Léčba krizotinibem byla nejčastěji ukončena při progresi onemocnění, medián délky

Tab. 2. Celkové přežití a přežití bez známek progresu od data zahájení léčby krizotinibem pro vybrané skupiny pacientů.

	Všichni pacienti		Kouření		Věk při zahájení léčby krizotinibem		% buněk s pozitivními signály	
	nekuřák	bývalý kuřák*	kuřák	< 60 let	≥ 60 let	< 40 %	≥ 40 %	
počet pacientů	60	23	23	14	31	29	16	18
medián OS (95% IS)	12,6 měsíce (7,7–17,5)	26,8 měsíce (3,4–50,3)	15,3 měsíce (10,7–19,9)	7,0 měsíce (2,5–11,5)	18,3 měsíce (11,9–24,6)	9,9 měsíce (4,6–15,2)	–	–
6měsíční OS (%; 95% IS)	68,9 (56,9–80,8)	68 (48,4–87,6)	77,6 (60,3–94,9)	57,1 (31,2–83,1)	76,8 (61,7–91,9)	60,7 (42,6–78,8)	–	–
1leté OS (%; 95% IS)	54,8 (41,5–68,1)	62,4 (41,5–83,2)	62,6 (41,9–83,3)	30,6 (4,2–57,0)	68,7 (51,5–85,9)	41 (22,2–59,8)	–	–
p-hodnota	–	0,015			0,191		–	
medián PFS (95% IS)	5,8 měsíce (4,3–7,2)	9,7 měsíce (2,5–17,0)	5,8 měsíce (1,3–10,3)	3,8 měsíce (2,0–5,6)	7,1 měsíce (2,2–12,0)	4,8 měsíce (3,3–6,3)	9,7 měsíce (1,4–18,1)	5,8 měsíce (3,6–8,0)
6měsíční PFS (%; 95% IS)	45,4 (32,6–58,2)	58,6 (37,7–79,4)	47,8 (27,4–68,2)	21,4 (0,1–42,9)	54,3 (36,6–72,0)	35,7 (18,0–53,5)	51,9 (25,9–77,8)	44,4 (21,5–67,4)
1leté PFS (%; 95% IS)	31,8 (19,5–44,1)	41 (18,9–63,1)	39,1 (19,2–59,1)	–	43,2 (25,1–61,2)	19,8 (4,6–35,1)	31,1 (3,9–58,3)	27,8 (7,1–48,5)
p (log-rank test)	–	0,029			0,081		0,459	

\* pacient přestal kouřit rok a více před diagnózou

léčby našeho souboru nemocných činil 3,9 měsíce. Frekvence léčebných odpovědí na krizotinib byla 31,7 %, frekvence kontroly 53,4 %, u 21,7 % souboru není údaj k dispozici – léčba probíhá, nebo léčebná odpověď nebyla hodnocena/uváděna v registru. OS nemocných od zahájení léčby 1. linie činí 27,9 měsíce, 3leté přežití od zahájení léčby je prokazatelné u 32,2 % souboru. Medián PFS při léčbě krizotinibem činil 5,8 měsíce, déle než 1 rok bez progresu bylo 31,8 % souboru. Medián OS od zahájení léčby krizotinibem činil 12,6 měsíce, 1 rok při léčbě krizotinibem přežilo 54,8 % nemocných.

Frekvence léčebných odpovědí v našem souboru, stejně jako frekvence kontroly nemoci, jsou nižší, než uvádějí studie fáze III PROFILE 1007 [11] a PROFILE 1014 [12] i slovenští autoři (65–75 %) [4], v porovnání s našimi 31,7 %. Podobně nižší byly i časy do progresu i přežití od začátku léčby krizotinibem. V souboru Berzince et al byl PFS 14 měsíců, ve studiích PROFILE 1007 a 1014 pak 7,7 a 10,9 měsíce. Medián PFS našich nemocných byl pouze 5,8 měsíce.

V našem souboru je však poměrně vysoký podíl současných a bývalých kuřáků (23,3 a 38,3 %). Medián věku našich nemocných byl podobný, jako uvádějí slovenští autoři (60 vs. 56 let).

Nemocní s NSCLC s ovlivnitelnými řídicími mutacemi prokazatelně profitují z léčby molekulárně cílenými preparáty. Zatímco střední doba života nemocných léčených samotnou chemoterapií činila ještě v roce 2000 necelý 1 rok a určitý posun přinesla až histologií orientovaná biologická léčba a chemoterapie s použitím bevacizumabu nebo pemetrexedu, OS nemocných s mutacemi genu *EGFR* dosáhlo od stanovení diagnózy až 27 měsíců [2,8,9] i více. Většina studií však uvádí ve svých výsledcích pouze přežití nemocných od zahájení cílené terapie.

Možnosti léčby 2. linie po selhání 1. linie léčby u NSCLC, zaměříme-li se na adenokarcinomy, které jsou mezi nádory s translokacemi genu *ALK* zastoupeny nejčastěji, jsou v našich podmínkách aktuálně pouze dvě. Pemetrexed v monoterapii, nebyl-li již podán

v 1. linii, v úvahu přichází také docetaxel, erlotinib bývá dle současného konsenzu rezervován obvykle pro 3. linii, po selhání dvou linií systémové chemoterapie. Úhradu nemají v současnosti nintedanib v kombinaci s docetaxelem a ani imunoterapeutické preparáty nivolumab a pembrolizumab. Ty by však zřejmě přicházely v úvahu, pokud by se podařilo získat jejich úhradu od plátců, jen u nemocných s nádory s vysokou expresí PD-L1 [13]. Pemetrexed podávaný ve 2. linii má dle dat registru TULUNG čas do progresu, medián OS i pravděpodobnost 2letého přežití horší, než vycházejí naše výsledky s krizotinibem, podobně jako erlotinib.

Léčebné účinky pemetrexedu závisí dle Fialy et al [14] mimo jiné na průkazu exprese TTF1 (thyroid transcription factor 1) v nádorové tkáni, u TTF negativních adenokarcinomů je účinnost pemetrexedu významně horší než u nádorů TTF pozitivních. Efekt kombinace docetaxel + nintedanib bude zřejmě výraznější u nemocných s rychlou progresí nemoci po podání chemoterapie

1. linie [15]. Nemocní s ALK pozitivními NSCLC mohou profitovat z léčby krizotinibem v 1. i v dalších liniích léčby [11,12]. Pokud dojde k selhání léčby krizotinibem jako ALK inhibítorem 1. generace, lze s dobrou vyhlídkou na úspěch podat kromě klasické chemoterapie zejména ALK inhibitory 2. generace – ceritinib a alectinib [16–19].

Důvody menší účinnosti cílené léčby krizotinibem v našem souboru nemocných nejsou zcela zřejmé. Tolerance léčby byla podobná jako v citovaných souborech, stav výkonnosti nemocných byl v době zahájení léčby převážně velmi dobrý. Analyzovali jsme možné vlivy kuřáckých zvyklostí a věkových rozdílů nemocných. Kuřáctví by dle Aisnera et al [20] nemělo významně nepříznivě ovlivnit výsledky cílené léčby. Nicméně analýza našeho souboru nemocných, ve kterém bylo > 50 % kuřáků a kuřáku bývalých, ukázala statisticky významné rozdíly v OS i v časech do progresu ve prospěch nekuřáků a hraniční rozdíly ve frekvenci léčebných odpovědí. Nemocní s negativní kuřáckou anamnézou mají přijatelnou frekvenci léčebných odpovědí, čas do progresu nemoci 9,7 měsíce a medián OS od zahájení cílené léčby 26,8 měsíce, což odpovídá údajům publikovaným např. slovenskými autory. Vyšší frekvence léčebných odpovědí na krizotinib u nekuřáků ve srovnání s bývalými kuřáky udávají i jiní autoři [21]. Naproti tomu věk nemocných nemá statisticky doložitelné vztahy k účinnosti léčby krizotinibem. Příčinou rozdílů mezi kuřáky a nekuřáky by mohly být další řídicí mutace v nádorovém genomu pomocí sekvenování nové generace (new generation sequencing – NGS), je relativně nízká, a tudíž by výsledky léčby podobných souborů patrně neovlivnily. Otázkou by mohly být současně se vyskytující dysruptivní mutace TP 53 [20], které jsou časté u kuřáků a které efekt cílené léčby prokazatelně snižují a zatím se u kandidátů cílené terapie běžně nevyšetřují. Je otázkou, zdali u nemocných s pokročilými ALK pozitivními karcinomy plic, kteří jsou zároveň kuřáky, nezvažovat jako možnou alternativu ve 2. linii léčbu imuno-onkologickou.

## Závěr

Naše výsledky prokázaly benefit léčby krizotinibem u nemocných s ALK pozitivními pokročilými NSCLC. Léčba ve 2. a vyšších liniích byla dobře tolerována, střední doba přežití od zahájení léčby 1. linie činila 27,9 měsíce, déle než 3 roky žilo > 30 % nemocných. Třebaže frekvence léčebných odpovědí, čas do progresu i střední doba přežití nemocných od zahájení cílené léčby krizotinibem celého našeho souboru byly nižší než v cílových studiích, je tato léčba nepochybně i za těchto okolností přínosem pro nemocné s touto v naší populaci relativně vzácnou řídicí mutací, zejména jde-li o nekuřáky nebo o bývalé kuřáky. Pokládáme proto za důležité včasné a podrobné genetické vyšetření nádorové tkáně nemocných s pokročilými adenokarcinomy, karcinomy blíže nespecifikovanými a u nemocných s průkazem léčebně ovlivnitelných řídicích mutací indikovat biologicky cílenou terapii. V budoucnosti by mohly zlepšit výsledky cílené léčby ještě podrobnější a současně prováděná genetická vyšetření s eventuálním zachytem dalších řídicích mutací s negativním prognostickým významem, ale především zavedení inhibitorů tyrozinkináz vyšších generací.

## Literatura

- Barlesi F, Mazieres J, Merlio JP et al. Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet* 2016; 387(10026): 1415–1426. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00004-0.
- Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013; 8(7): 823–859. doi: 10.1097/JTO.0b013e318290868f.
- Vidal J, Clavé S, de Muga S et al. Assessment of ALK status by FISH on 1000 Spanish non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2014; 9(12): 1816–1820. doi: 10.1097/JTO.0000000000000361.
- Beržinec P, Kasan P, Plank L et al. Krizotinib v liečbe nemalobunčového karcinómu pľúc v Slovenskej republike. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2017; 77(4): 155–159.
- Camidge DR, Bang YJ, Kwak EL et al. Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol* 2012; 13(10): 1011–1019. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70344-3.
- Novello S, Barlesi F, Califano R et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27 (suppl 5): v1–v27. doi: 10.1093/annonc/mdw326.

- Park K, Tan EH, O'Byrne K et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(5): 577–589. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30033-X.
- Rosell R, Moran T, Queralt C et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 958–967. doi: 10.1056/NEJMoa0904554.
- Johnson BE, Kris MG, Berry LD et al. A multicenter effort to identify driver mutations and employ targeted therapy in patients with lung adenocarcinomas: The Lung Cancer Mutation Consortium (LCMC). *J Clin Oncol* 2013; 31 (15 suppl): 8019. doi: 10.1200/jco.2013.31.15\_suppl.8019.
- Scarpino S, Rampioni Vinciguerra GL, Di Napoli A et al. High prevalence of ALK+/ROS1+ cases in pulmonary adenocarcinoma of adolescents and young adults. *Lung Cancer* 2016; 97: 95–98. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.04.022.
- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(25): 2385–2394. doi: 10.1056/NEJMoa1214886.
- Solomon BJ, Mok T, Kim DW et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371(23): 2167–2177. doi: 10.1056/NEJMoa1408440.
- Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 373(17): 1627–1639. doi: 10.1056/NEJMoa1507643.
- Fiala O, Pesek M, Skrickova J et al. Thyroid transcription factor 1 expression is associated with outcome of patients with non-squamous non-small cell lung cancer treated with pemetrexed-based chemotherapy. *Tumour Biol* 2017; 39(2): 1010428317691186. doi: 10.1177/1010428317691186.
- Reck M, Kaiser R, Mellemegaard A et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(2): 143–155. doi: 10.1016/S1470-2045(13)70586-2.
- Kim DW, Mehra R, Tan DS et al. Activity and safety of ceritinib in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(4): 452–463. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00614-2.
- Peters S, Camidge DR, Shaw AT et al. Alectinib versus crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2017; 377(9): 829–838. doi: 10.1056/NEJMoa1704795.
- Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(2): 234–242. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00488-X.
- Shaw AT, Kim DW, Mehra R, Tan DS et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 370(13): 1189–1197. doi: 10.1056/NEJMoa1311107.
- Aisner DL, Sholl LM, Berry L et al. The impact of smoking and TP53 mutations in lung adenocarcinoma patients with targetable mutations – the lung cancer mutation consortium (LCMC2). *Clin Cancer Res* 2017; 24(5): 1038–1047. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2289.
- Yang JCH, Ignatius SH, De Petris L et al. Pooled systemic efficacy and safety data from the Pivotal Phase II Studies (NP28673 and NP28761) of alectinib in ALK-positive non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2017; 12(10): 1552–1560. doi: 10.1016/j.jtho.2017.06.070.

# Selected Genetic Polymorphisms Associated with Hypoxia and Multidrug Resistance in Monoclonal Gammopathies Patients

Vybrané genetické polymorfizmy asociované s hypoxií a multilékovou rezistencí u pacientů s monoklonálními gamapatiemi

Almasi M.<sup>1</sup>, Besse L.<sup>2</sup>, Brozova L.<sup>3</sup>, Jarkovsky J.<sup>3</sup>, Bezdekova R.<sup>1</sup>, Pour L.<sup>4</sup>, Minarik J.<sup>5</sup>, Kessler P.<sup>6</sup>, Pavlicek P.<sup>7</sup>, Roziakova L.<sup>8</sup>, Penka M.<sup>1</sup>, Hajek R.<sup>1,9</sup>, Vasku A.<sup>10</sup>, Sevcikova S.<sup>1,11</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Hematology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Oncology and Hematology, Cantonal Hospital St. Gallen, Switzerland

<sup>3</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Hematooncology, University Hospital Olomouc and Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

<sup>6</sup>Department of Hematology and Transfusion Medicine, Hospital Pelhrimov, Pelhrimov, Czech Republic

<sup>7</sup>Department for Internal Medicine and Haematology, 3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague and Faculty Hospital Kralovske Vinohrady, Prague, Czech Republic

<sup>8</sup>Department of Hematology and Transfusion Medicine, University Hospital, School of Medicine, Comenius University Bratislava, Slovak Republic

<sup>9</sup>Department of Hematooncology, University Hospital Ostrava, Ostrava, Czech Republic

<sup>10</sup>Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>11</sup>Babak Myeloma Group, Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

## Summary

**Background:** Adaptive response to hypoxia is regulated by several mechanisms and transcription factors, including hypoxia-inducible factors (HIFs). Activation of *HIF-1α* is associated with increased expression of P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer cells. In this retrospective study, we analyzed candidate single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *HIF-1α* and *HIF-1β* associated with risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) or multiple myeloma (MM). **Patients and Methods:** Genotypes of SNPs associated with hypoxia were determined in an independent cohort of monoclonal gammopathies (MG) (275 MM and 228 MGUS patients) and in 219 cancer-free controls by real time polymerase chain reaction allelic discrimination. **Results:** When MM patients were compared to controls, protective role of CG genotype compared to CC in *HIF-1β* (rs2228099) for MM development was observed (OR = 0.65; CI 0.45–0.95; p = 0.026). Even after adjustment for patients' age and body mass index (BMI), there were significantly lower odds (OR = 0.55; p = 0.045) of developing MM patients of CG genotype in comparison to CC genotype. Log-rank test confirmed association of GT haplotype (rs11549467, rs2057482) in *HIF-1α* with better overall survival (median 41.8 months; CI 35.1–48.5) for "none GT" and median 93.8 months (CI 31.3–156.4) for "at least one GT" haplotype (p = 0.0500). Further, significant associations between SNPs in *MDR1* and outcome of MM were found in 110 MM patients that underwent bortezomib-based treatment. **Conclusion:** Our study showed a genetic predisposition for risk of MG development and/or outcome of MM patients; nevertheless, further studies are needed to confirm our initial analysis.

## Key words

multiple myeloma – hypoxia – genotype – polymorphism – qPCR

This work was supported by grant of Ministry of Health, Czech Republic – Conceptual development of research organization (FNBr, 65269705).

Tato práce byla podpořena projektem MZ ČR FNBr, 65269705.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem nemají žádné komerční zájmy.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.



doc. RNDr. Sabina Sevcikova, Ph.D.

Babak Myeloma Group  
Department of Pathological  
Physiology  
Faculty of Medicine  
Masaryk University  
Kamenice 5  
Brno  
Czech Republic  
e-mail: sevcik@med.muni.cz

Submitted/Obdrženo: 19. 3. 2018

Accepted/Přijato: 24. 4. 2018

doi: 10.14735/amko2018213

## Souhrn

**Východiska:** Přirozená reakce organismu na hypoxii je regulována různými mechanizmy a transkripčními faktory, zahrnujícími hypoxii indukovatelné faktory (HIFs). Aktivace *HIF-1α* je u nádorových buněk spojována se zvýšenou expresí P-glykoproteinu a multilékovou rezistencí. V této retrospektivní analýze jsme sledovali kandidátní jednonukleotidové polymorfizmy (single-nucleotide polymorphisms – SNP) genů *HIF-1α* a *HIF-1β* a jejich spojení s rizikem vzniku onemocnění monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS) nebo mnohočetného myelomu (MM). **Soubor pacientů a metody:** Genotypy jednonukleotidových polymorfizmů spojovaných s hypoxií byly určovány pomocí real time polymerázové řetězové reakce alelické diskriminace u nezávislé skupiny pacientů s monoklonální gamapatií (MG) (275 pacientů s MM a 228 s MGUS) a u 219 kontrol bez nádorového onemocnění. **Výsledky:** Při porovnání pacientů s MM a kontrol jsme pozorovali příznivější vliv genotypu CG genu *HIF-1β* (rs2228099) oproti genotypu CC (OR 0,65; CI 0,45–0,95; p = 0,026). Obdobně i při zohlednění věku pacientů a jejich indexu tělesné hmotnosti byla signifikantně nižší šance (OR 0,55; p = 0,045) rozvoje onemocnění MM u genotypu CG oproti CC. Log-rank test potvrdil souvislost GT haplotypu (rs11549467, rs2057482) genu *HIF-1α* s lepším celkovým přežitím (medián 41,8 měsíce; CI 35,1–48,5) u haplotypu „žádné GT“ a medián 93,8 měsíce (CI 31,3–156,4) u haplotypu „nejméně jeden GT“ (p = 0,0500). Dále byla zjištěna významná souvislost mezi jednonukleotidovými polymorfizmy v genu *MDR1* a léčebným účinkem u 110 pacientů s MM léčených bortezomibem. **Závěr:** Naše studie ukázala možnou genetickou predispozici k riziku rozvoje MG a/nebo k léčebné odpovědi pacientů s MM, nicméně je třeba provést další studie k potvrzení naší počáteční analýzy.

## Klíčová slova

mnohočetný myelom – hypoxie – genotype – polymorfizmus – qPCR

## Introduction

Monoclonal gammopathies (MG) are a group of disorders characterized by proliferation of malignant monoclonal plasma cells (PCs) [1]. Multiple myeloma (MM) is a clonal PCs malignancy that accounts for more than 10% of malignant hematologic disorders [2]. MM is further characterized by presence of clonal PCs in the bone marrow (BM), monoclonal immunoglobulin (mIg, M-protein) in serum and/or urine and presence of other clinical symptoms, such as hypercalcemia (C), renal insufficiency (R), anemia (A) and bone involvement (B), commonly known as CRAB symptoms [3]. While the introduction of novel drugs, such as proteasome inhibitors (PIs) and immunomodulatory drugs (IMiDs), has improved clinical response of MM patients, MM remains a hard-to-treat disease. MM is always preceded by precancerous monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). MGUS is defined by serum M protein level lower than 3 g/dL, less than 10% of clonal PCs in the BM, and absence of end-organ damage [4].

Hypoxia is a common feature in cancer affecting important biological properties of tumor cells. Among others, it activates hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) that play an important role in MM biology. HIFs are heterodimers consisting of labile HIF- $\alpha$  subunits (*HIF-1 $\alpha$* , HIF-2 $\alpha$  or HIF-3 $\alpha$ ) and a constitutive *HIF-1 $\beta$*  subunit (also

known as aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator or ARNT) [5]. In hypoxia, *HIF-1 $\beta$*  binds *HIF-1 $\alpha$* , preventing proteasomal degradation. The complex is transported to the nucleus where it binds hypoxia-responsive elements (HREs). This way, HIFs activate genes associated with angiogenesis, osteoclast recruitment and activation, cell-cycle regulation, moreover, they also cause disease progression into active symptomatic MM [6]. Hypoxia is a critical factor in MM as interactions between MM PCs and the microenvironment play a crucial role in MM progression, dissemination, angiogenesis and drug resistance. Moreover, cancer stem cell (CSC) phenotype is a plastic state induced in cancer cells depending upon microenvironmental signals, such as hypoxia [7]. As *HIF-1 $\alpha$*  protein is highly expressed in MM cells and involved in BM angiogenesis [8], it could serve as a potential therapeutic target. In fact, the HIF-1 family is expressed in response to acute hypoxia, while HIF-2 family is expressed in response to chronic lack of oxygen [9]. Both HIFs and vascular endothelial growth factor (VEGF) are up-regulated in MM patients, strongly related to each other and linked to increased angiogenesis [10]. These findings indicate that targeting HIFs and the VEGF/receptor autocrine loop may be important in MM treatment. Furthermore, a number of studies concluded that *HIF-1 $\alpha$*  inhibition may

be a novel therapeutic strategy for MM treatment [11–15]. Activation of *HIF-1 $\alpha$*  is associated with increased expression of P-glycoprotein and multidrug resistance in cancer cells as was described in breast cancer and non-small cell lung carcinoma [16,17]. Indeed, key players in multidrug resistance are P-glycoprotein, the best-characterized drug efflux transporter system encoded by *MDR-1* (also known as *ABCB1*), and multiple drug resistance protein-1 encoded by *MRP-1* (also known as *ABCC1*). In tumor cells, high expression of P-glycoprotein decreases the effect of chemotherapy [18].

MM is a heterogeneous disease not only with respect to tumor PCs and BM microenvironment, but also regarding genetic variability of each individual patient, which can significantly affect a patient's outcome. Several familial studies support the hypothesis of a genetic predisposition for developing MG [19–24]. Evidence for inherited genetic susceptibility is provided by the two-fold increased risk of the disease observed in first-degree relatives of MM patients [25].

Therefore, in our retrospective study, we analyzed genetic variability in genes associated with hypoxia. We analyzed candidate single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in *HIF-1 $\alpha$*  (rs11549467 and rs2057482) and *HIF-1 $\beta$*  (rs2228099) associated with risk of MGUS or MM. Consequently, we evaluated assoc-

iation of SNPs in *HIF-1α*, *HIF-1β*, three SNPs and their haplotypes in *MDR1* (rs1045642, rs2032582 and rs1128503) and one in *MRP1* (rs4148356) with outcome of MM patients.

**Material and methods**

**Clinical samples and studied polymorphisms**

Altogether, 228 MGUS patients, 275 MM patients and 219 age-matched cancer-free controls were included in the hypoxia study. Two potentially functional polymorphisms in *HIF-1α* (rs11549467, rs2057482) and one in *HIF-1β* (rs2228099) were genotyped and their association with MGUS and MM risk in a case-control study was assessed. Peripheral blood (PB) samples from all patients were obtained from centers of the Czech Myeloma Group – University Hospital Brno, Faculty Hospital Kralovske Vinohrady Praha, University Hospital Olomouc, University Hospital Ostrava and Hospital Pelhrimov, Czech Republic and from University Hospital Bratislava, Slovak Republic. As a control group, cancer-free cases from the University Hospital Brno were used. Basic characteristics of MGUS and MM patients as well as controls are described in Tab. 1, and clinical characteristics of MGUS and MM patients are summarized in Tab. 2. Further, association of three SNPs and their haplotypes in *MDR1* (rs1045642, rs2032582 and rs1128503) and in *MRP1* (rs4148356) was evaluated with outcome in MM patients. In total, 110 MM patients that underwent bortezomib-based treatment (cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone – CVD regimen) were included in the evaluation of pharmacogenetic association with clinical outcome. Clinical characteristics of MM patients at the start of CVD treatment (n = 110) are shown in Table 3.

All patients were enrolled into the study only after signing the informed consent form approved by the Ethics committees of the hospitals in accordance with the current version of the Helsinki Declaration.

**SNPs analyses**

Genomic DNA (gDNA) was isolated from whole PB using MagNA Pure

**Tab. 1. Basic characteristics of MGUS and MM patients in comparison to controls (n = 722).**

Characteristics <sup>1</sup>	Controls (n = 219)	MGUS (n = 228)	MM (n = 275)
<b>sex</b>			
female	101 (46.1%)	103 (45.2%)	119 (43.3%)
male	118 (53.9%)	125 (54.8%)	156 (56.7%)
p <sup>2</sup>	–	0.841	0.527
<b>age</b>			
≤ 55	9 (4.1%)	63 (27.6%)	36 (13.1%)
56–60	20 (9.1%)	41 (18.0%)	47 (17.1%)
61–65	146 (66.7%)	33 (14.5%)	53 (19.3%)
66–70	35 (16.0%)	37 (16.2%)	61 (22.2%)
70	9 (4.1%)	54 (23.7%)	78 (28.4%)
p <sup>2</sup>	–	< 0.001	< 0.001
median (5–95%)	64.0 (57.0–71.0)	63.0 (41.0–81.0)	67.0 (51.0–81.0)
p <sup>2</sup>	–	0.069	< 0.001
<b>BMI (n = 288)</b>			
underweight (≤ 18.5)	0 (0.0%)	–	1 (1.4%)
ideal weight (18.6–25.0)	41 (19.2%)	–	22 (29.7%)
overweigh (25.1–30.0)	105 (49.1%)	–	38 (51.4%)
mild obesity (30.1–35.0)	58 (27.1%)	–	11 (14.9%)
intermediate obesity (35.1–40.0)	7 (3.3%)	–	2 (2.7%)
morbid obesity (> 40)	3 (1.4%)	–	0 (0.0%)
p <sup>2</sup>	–	–	0.064
median (5–95%)	29.0 (22.0–35.0)	–	26.1 (21.0–32.3)
p <sup>2</sup>	–	–	< 0.001

MGUS – monoclonal gammopathy of undetermined significance, MM – multiple myeloma

<sup>1</sup> absolute and relative frequency for categorical variable; median, percentiles (5–95%) for continuous variable

<sup>2</sup> p-values marked with bold are statistically significant; ML Chi square test or Mann-Whitney U test were used for comparison with the control group

DNA Isolator (Roche, Switzerland) and its concentration was measured by Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). For gene polymorphisms analyses in *HIF-1α* (rs11549467, ID: C\_34492744\_10; rs2057482, ID: C\_8549084\_20), *HIF-1β* (rs2228099, ID: C\_11846736\_20), *MDR1* (rs1045642, ID: C\_7586657\_20; rs2032582, ID: C\_11711720D\_40 and

C\_11711720C\_30; rs1128503, ID: C\_7586662\_10), and *MRP1* (rs4148356, ID: C\_25614385\_20), quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for allelic discrimination was performed. Standard TaqMan genotyping assays were used run on Step-One Real-Time PCR instrument (Applied Biosystems, CA, USA) as previously described [26]. In brief, qPCR was performed in 10 μL

**Tab. 2. Clinical characteristics of MGUS and MM patients at diagnosis (n = 722).**

Characteristics <sup>1</sup>	MGUS (n = 228)	MM (n = 275)	Characteristics <sup>1</sup>	MGUS (n = 228)	MM (n = 275)
<b>D-S stage</b>		n = 275	both Ig lower	17 (9.0%)	95 (72.0%)
I	–	46 (16.7%)	any Ig lower	40 (19.2%)	160 (81.2%)
II	–	48 (17.5%)	<b>serum M-protein quantity (g/dL)</b>	0.8 (0.0–2.5) (n = 225)	3.1 (0.0–7.5) (n = 269)
III	–	181 (65.8%)	<b>kappa/lambda ratio</b>	1.1 (0.1–17.3) (n = 208)	1.4 (0.0–736.4) (n = 171)
<b>D-S substage</b>		n = 275	<b>bone marrow infiltration (%)</b>	2.0 (0.0–8.4) (n = 215)	29.6 (11.6–72.0) (n = 218)
A	–	218 (79.3%)	<b>normal PC – CD19 (%)</b>	22.7 (1.0–80.0) (n = 170)	0.5 (0.0–53.4) (n = 153)
B	–	57 (20.7%)	<b>abnormal PC – CD56 (%)</b>	25.1 (1.5–96.8) (n = 164)	94.8 (0.3–99.7) (n = 152)
<b>ISS classification</b>		n = 275	<b>hemoglobin level (g/dL)</b>	13.5 (10.4–15.8) (n = 226)	10.7 (7.6–14.3) (n = 270)
stage 1	–	87 (33.3%)	<b>thrombocyte count (10E9/l)</b>	232.0 (137.0–374.0) (n = 226)	214.0 (91.0–386.0) (n = 270)
stage 2	–	89 (34.1%)	<b>calcium total level (mmol/l)</b>	2.3 (2.1–2.6) (n = 225)	2.4 (2.0–3.3) (n = 269)
stage 3	–	85 (32.6%)	<b>albumin level (g/dL)</b>	4.4 (3.5–4.9) (n = 223)	3.8 (2.4–4.8) (n = 268)
<b>progression of MGUS into</b>	n = 228		<b>creatinine level (umol/l)</b>	80.0 (56.0–189.0) (n = 226)	93.8 (58.0–492.0) (n = 270)
MM	17 (7.5%)	–	<b>β2 microglobulin (mg/l)</b>	1.9 (1.2–5.9) (n = 219)	3.8 (1.7–21.0) (n = 261)
other lymphoid malignancy	6 (2.6%)	–	<b>LDH (ukat/l)</b>	3.4 (2.5–6.7) (n = 220)	3.4 (2.0–7.4) (n = 269)
no progression	205 (89.9%)	–	<b>CRP (mg/l)</b>	2.9 (0.0–27.9) (n = 215)	4.3 (0.3–58.0) (n = 266)
<b>M-protein type</b>	n = 226	n = 275			
IgG	159 (70.4%)	165 (60.0%)			
IgA	26 (11.5%)	52 (18.9%)			
LC only	5 (2.2%)	42 (15.3%)			
IgM	29 (12.8%)	4 (1.5%)			
other	7 (3.1%)	12 (4.5%)			
<b>light chain type</b>	n = 227	n = 272			
kappa	129 (56.8%)	158 (58.1%)			
lambda	96 (42.3%)	113 (41.5%)			
biclonal	2 (0.9%)	1 (0.4%)			
<b>immunoparesis</b>	n = 208	n = 197			
one Ig lower	30 (15.1%)	65 (63.7%)			

MGUS – monoclonal gammopathy of undetermined significance, MM – multiple myeloma, LDH – lactate dehydrogenase, CRP – C-reactive protein

<sup>1</sup> absolute and relative frequency for categorical variable; median, percentiles (5–95%) for continuous variable

reactions containing 10 ng of gDNA, 0.5 µL of TaqMan Genotyping Assay Mix and 8 µL of PCR master mix (all Applied Biosystems, CA, USA).

**Statistical analyses**

According to the position of SNPs on chromosome, haplotypes were derived as rs11549467, rs2057482 for the *HIF-1α* and in order as rs1045642, rs2032582, rs1128503 for *MDR1*. Haplotypes were inferred in the PHASE software, ver. 2.1

[27,28]. The default setting was left and the “-x15” was added to provide 15 repetitions of algorithm and choice of the best one. To test the Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium, the package “genetics” in R software was used [29].

Basic characteristics were described by absolute and relative frequencies for categorical variables and median (5–95 percentile) for continuous variable. Comparison between groups was

performed using Maximal-Likelihood Chi-square test in case of categorical variables and Mann-Whitney U test in case of continuous variable. Association of marker with status control vs. MGUS or control vs. MM was expressed by odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) and p-value of Wald’s test. The most frequent genotypes/haplotypes for the control group were set as reference. Significant associations were adjusted by age and body mass index (BMI) as next predictors



**Tab. 3. Clinical characteristics of MM patients at the beginning of CVD treatment regimen (n = 110).**

Characteristics <sup>1</sup>	Total (n = 110)	New diagnosis (n = 47)	Relapse (n = 63)
<b>sex</b>	n = 110	n = 47	n = 63
female	49 (44.5%)	24 (51.1%)	25 (39.7%)
male	61 (55.5%)	23 (48.9%)	38 (60.3%)
age	70.0 (57.0–80.0)	70.0 (60.0–80.0)	70.0 (57.0–79.0)
<b>D–S stage</b>	n = 109	n = 47	n = 62
I	13 (11.9%)	12 (25.5%)	1 (1.6%)
II	16 (14.7%)	8 (17.0%)	8 (12.9%)
III	80 (73.4%)	27 (57.4%)	53 (85.5%)
<b>D–S substage</b>	n = 109	n = 47	n = 62
A	90 (82.6%)	38 (80.9%)	52 (83.9%)
B	19 (17.4%)	9 (19.1%)	10 (16.1%)
<b>ISS classification</b>	n = 102	n = 45	n = 57
stage 1	34 (33.3%)	12 (26.7%)	22 (38.6%)
stage 2	38 (37.3%)	19 (42.2%)	19 (33.3%)
stage 3	30 (29.4%)	14 (31.1%)	16 (28.1%)
<b>M-protein type</b>	n = 109	n = 47	n = 62
IgG	65 (59.6%)	26 (55.3%)	39 (62.9%)
IgA	18 (16.5%)	4 (8.5%)	14 (22.6%)
LC only	18 (16.5%)	11 (23.4%)	7 (11.3%)
IgM	3 (2.8%)	3 (6.4%)	0 (0.0%)
other	5 (4.5%)	3 (6.4%)	2 (3.2%)
<b>light chain type</b>	n = 86	n = 46	n = 40
kappa	48 (55.8%)	22 (47.8%)	26 (65.0%)
lambda	37 (43.0%)	23 (50.0%)	14 (35.0%)
biclonal	1 (1.2%)	1 (2.2%)	0 (0.0%)
<b>serum M-protein quantity (g/dL) (n = 108)</b>	2.4 (0.0–7.7)	2.4 (0.0–5.0)	2.5 (0.0–7.8)
<b>Bone marrow infiltration (%) (n = 98)</b>	20.4 (0.8–62.2)	15.2 (2.4–49.6)	28.8 (0.4–65.6)
<b>hemoglobin level (g/dL) (n = 109)</b>	10.8 (7.9–14.3)	10.7 (7.9–14.6)	10.8 (8.2–13.6)
<b>thrombocyte count (10E9/l) (n = 109)</b>	200.0 (75.4–353.0)	223.0 (90.0–388.0)	169.0 (45.6–312.0)
<b>calcium total level (mmol/l) (n = 109)</b>	2.3 (2.0–2.7)	2.3 (2.0–2.7)	2.3 (2.1–2.7)
<b>albumin level (g/dL) (n = 108)</b>	3.8 (2.8–4.7)	3.5 (2.5–4.5)	4.0 (3.1–4.7)
<b>creatinine level (umol/l) (n = 108)</b>	92.0 (57.0–395.0)	89.0 (53.0–366.0)	99.0 (61.0–395.0)
<b>β2 microglobulin (mg/l) (n = 101)</b>	3.7 (1.9–13.7)	3.5 (1.9–13.7)	3.8 (1.9–19.3)
<b>LDH (ukat/l) (n = 107)</b>	3.4 (2.1–6.5)	3.3 (2.5–6.5)	3.4 (2.1–6.4)
<b>CRP (mg/l) (n = 107)</b>	4.9 (1.0–111.5)	4.5 (1.0–111.5)	5.5 (0.0–63.1)

MM – multiple myeloma, CVD – cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone regimen, LDH – lactate dehydrogenase, CRP – C-reactive protein

<sup>1</sup> absolute and relative frequency for categorical variable; median, percentiles (5–95%) for continuous variable

in multiple logistic regression. Association of marker with treatment intervals was evaluated using Cox proportional

hazards model. When mentioned, overall survival (OS), time to progression (TTP), progression free survival (PFS)

were assessed within 2 years after diagnosis/treatment beginning; events after this period were set as censored. Kaplan-

**Tab. 4. Univariate and adjusted (age and BMI) association of rs2228099 (HIF-1β) with MM and control status.**

HIF-1β <sup>1</sup>	controls (n = 219)	MM (n = 275)	Univariate		Age and BMI adjusted	
			OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
<b>rs2228099</b>						
CC	87 (39.7%)	136 (49.5%)	reference			
CG	108 (49.3%)	110 (40.0%)	0.65 (0.45–0.95)	<b>0.026</b>	0.55 (0.30–0.99)	<b>0.045</b>
GG	24 (11.0%)	29 (10.5%)	0.77 (0.42–1.41)	0.403	0.51 (0.19–1.41)	0.194
CC	87 (39.7%)	136 (49.5%)	reference			
CG, GG	132 (60.3%)	139 (50.5%)	0.67 (0.47–0.97)	<b>0.031</b>	0.54 (0.31–0.95)	<b>0.032</b>

MM – multiple myeloma

<sup>1</sup>described by absolute and relative frequencies

p-values marked in bold are statistically significant

**Tab. 5. Association of rs2228099 (HIF-1β) with MM and control status separately for BMI categories (</≥ 25 kg/m<sup>2</sup>).**

HIF-1β <sup>1</sup>	BMI					
	< 25 (n = 51)			≥ 25 (n = 237)		
	controls (n = 28)	MM (n = 23)	p <sup>2</sup>	controls (n = 186)	MM (n = 51)	p <sup>2</sup>
<b>rs2228099</b>						
CC	11 (39.3%)	9 (39.1%)	0.117	75 (40.3%)	30 (58.8%)	<b>0.018</b>
CG	16 (57.1%)	9 (39.1%)		89 (47.8%)	20 (39.2%)	
GG	1 (3.6%)	5 (21.7%)		22 (11.8%)	1 (2.0%)	
CC	11 (39.3%)	9 (39.1%)	1.000	75 (40.3%)	30 (58.8%)	<b>0.025</b>
CG, GG	17 (60.7%)	14 (60.9%)		111 (59.7%)	21 (41.2%)	

MM – multiple myeloma

<sup>1</sup>described by absolute and relative frequencies

<sup>2</sup>p values marked in bold are statistically significant; obtained by ML Chi-square test

-Meier curves were plotted for significant associations. Log-rank test was used to evaluate the statistical significance of difference between the curves. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Joint prediction of *MDR1* and *HIF-1α* was evaluated using multivariate Cox proportional hazards model with treatment intervals as the dependent and all genetic markers as independent variable. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed with the binary endpoint from OS, TTP and PFS. The results include sensitivity and specificity values with p-value for the area under the curve (AUC).

Analysis was performed in the SPSS software (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were tested in R software (<http://www.r-project.org/>).

**Results**  
**SNPs in HIF-1α and HIF-1β**

Genotypes of SNPs associated with hypoxia (*HIFs*) were determined in an independent cohort of 722 samples (219 cancer-free controls, 228 MGUS and 275 MM patients).

All observed genotype frequencies in controls (n = 219) conformed to the

Hardy-Weinberg equilibrium (p = 0.304, 0.080 and 0.284 for rs2228099, rs11549467 and rs2057482, resp.). Linkage disequilibrium analysis between the two SNPs (n = 722; D′=0.970, r<sup>2</sup> = -0.053; p = 0.043 for rs11541467 vs. rs2057482) was confirmed as well. Genotype and haplotype frequencies were compared between MM and MGUS cases and controls. Frequencies of all polymorphisms in the entire cohort (n = 722) are presented in supplementary tables (Supplementary tab. 1).

Evaluation of MM patients vs. controls showed a statistically lower frequency of CG genotype in *HIF-1β* (rs2228099) in MM (40.0% in MM vs. 49.3% in controls;

OR 0.65; 95% CI 0.45–0.95;  $p = 0.026$ ) in comparison to the CC genotype. Even after adjustment for patients' age and BMI, there were significantly lower odds (OR 0.55; 95% CI 0.30–0.99;  $p = 0.045$ ) for MM development in patients with CG genotype in comparison to CC genotype. Further, significant results were observed also after recoding into CC vs. CG + GG genotype not adjusted for age and BMI (50.5% in MM vs. 60.3% in controls; OR 0.67; 95% CI 0.47–0.97;  $p = 0.031$ ) and adjusted for age and BMI (OR 0.54; 95% CI 0.31–0.95;  $p = 0.032$ ) (Table 4). However, we did not observe any significant associations for SNPs in *HIF-1 $\alpha$* .

Further, significant association of SNP in *HIF-1 $\beta$*  (rs2228099) in MM patients vs. controls for the BMI status  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> ( $p = 0.018$  for CC vs. CG vs. GG genotype;  $p = 0.025$  for CC vs. CG + GG genotype) was observed (Tab. 5).

**Association between genotypes/haplotypes and risk group of MGUS patients**

MGUS patients with available clinical parameters ( $n = 205$ ) were divided into four groups according to the previously described Mayo Clinic risk stratification model [30] as follows low risk ( $n = 74$ ), low-intermediate risk ( $n = 76$ ), high-intermediate risk ( $n = 46$ ) and high risk ( $n = 6$ ). Association between genotypes/haplotypes and risk group was evaluated. For SNP genotype rs2057482 (*HIF-1 $\alpha$* ) and *HIF-1 $\alpha$*  haplotype (rs11549467 and rs2057482), significant association with risk group was observed. When the risk groups were aggregated into "low risk" vs. "none-low risk", higher odds of "none-low risk" category for CT genotype of rs2057482 in *HIF-1 $\alpha$*  was observed (OR 2.48; 95% CI 1.15–5.35;  $p = 0.021$ ) in comparison to CC genotype. Further, comparison of "low risk" vs. "none-low risk" categories of MGUS showed higher odds of "none-low risk" category for "at least one GT" haplotype in comparison to "none GT" (OR 2.62; 95% CI 1.22–5.63;  $p = 0.014$ ). Next, higher odds of "none-low risk" category for GC/GT haplotype was observed in comparison to GC/GC haplotype (OR 2.40; 95% CI 1.10–5.21;  $p = 0.027$ ) (Tab. 6). However, there was no association between such

**Supplementary tab. 1. Frequencies for the polymorphisms and haplotypes in studied groups ( $n = 722$ ).**

	<b>Total<sup>1</sup> (n = 722)</b>	<b>Controls<sup>1</sup> (n = 219)</b>	<b>MGUS<sup>1</sup> (n = 228)</b>	<b>MM<sup>1</sup> (n = 275)</b>
<b><i>HIF-1<math>\beta</math></i> (rs2228099)</b>				
CC	325 (45.0%)	87 (39.7%)	102 (44.7%)	136 (49.5%)
CG	313 (43.4%)	108 (49.3%)	95 (41.7%)	110 (40.0%)
GG	84 (11.6%)	24 (11.0%)	31 (13.6%)	29 (10.5%)
CC	325 (45.0%)	87 (39.7%)	102 (44.7%)	136 (49.5%)
CG, GG	397 (55.0%)	132 (60.3%)	126 (55.3%)	139 (50.5%)
<b><i>HIF-1<math>\alpha</math></i> (rs11541467)</b>				
AA	2 (0.3%)	1 (0.5%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)
GA	32 (4.4%)	7 (3.2%)	10 (4.4%)	15 (5.5%)
GG	688 (95.3%)	211 (96.3%)	218 (95.6%)	259 (94.2%)
GG	688 (95.3%)	211 (96.3%)	218 (95.6%)	259 (94.2%)
GA, AA	34 (4.7%)	8 (3.7%)	10 (4.4%)	16 (5.8%)
<b><i>HIF-1<math>\alpha</math></i> (rs2057482)</b>				
CC	579 (80.2%)	176 (80.4%)	178 (78.1%)	225 (81.8%)
CT	134 (18.6%)	39 (17.8%)	48 (21.1%)	47 (17.1%)
TT	9 (1.2%)	4 (1.8%)	2 (0.9%)	3 (1.1%)
CC	579 (80.2%)	176 (80.4%)	178 (78.1%)	225 (81.8%)
CT, TT	143 (19.8%)	43 (19.6%)	50 (21.9%)	50 (18.2%)
<b><i>HIF-1<math>\alpha</math></i> haplotype (rs11549467–rs2057482)</b>				
none GC	14 (1.9%)	6 (2.7%)	4 (1.8%)	4 (1.5%)
once GC	160 (22.2%)	44 (20.1%)	54 (23.7%)	62 (22.5%)
twice GC	548 (75.9%)	169 (77.2%)	170 (74.6%)	209 (76.0%)
at least one GC	708 (98.1%)	213 (97.3%)	224 (98.2%)	271 (98.5%)
none GT	579 (80.2%)	176 (80.4%)	178 (78.1%)	225 (81.8%)
once GT	134 (18.6%)	39 (17.8%)	48 (21.1%)	47 (17.1%)
twice GT	9 (1.2%)	4 (1.8%)	2 (0.9%)	3 (1.1%)
at least one GT	143 (19.8%)	43 (19.6%)	50 (21.9%)	50 (18.2%)
none AC	688 (95.3%)	211 (96.3%)	218 (95.6%)	259 (94.2%)
once AC	32 (4.4%)	7 (3.2%)	10 (4.4%)	15 (5.5%)
twice AC	2 (0.3%)	1 (0.5%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)
at least one AC	34 (4.7%)	8 (3.7%)	10 (4.4%)	16 (5.8%)
GC/GC	548 (75.9%)	169 (77.2%)	170 (74.6%)	209 (76.0%)
GC/GT	131 (18.1%)	38 (17.4%)	46 (20.2%)	47 (17.1%)
GC/AC	29 (4.0%)	6 (2.7%)	8 (3.5%)	15 (5.5%)
other	14 (1.9%)	6 (2.7%)	4 (1.8%)	4 (1.5%)

MGUS – monoclonal gammopathy of undetermined significance, MM – multiple myeloma

<sup>1</sup> described by absolute and relative frequencies

**Tab. 6. Association of the SNPs (*HIF-1α*) and the risk stratification of MGUS patients according to MAYO model (n = 205).**

<i>HIF-1α</i> <sup>1</sup>	Risk		OR (95% CI)	p
	low (n = 74)	none low (n = 131)		
<b>rs2057482</b>				
CC	64 (86.5%)	93 (71.0%)	reference	
CT	10 (13.5%)	36 (27.5%)	2.48 (1.15–5.35)	<b>0.021</b>
TT	0 (0.0%)	2 (1.5%)	–	<b>0.516</b>
CC	64 (86.5%)	93 (71.0%)	reference	
CT, TT	10 (13.5%)	38 (29.0%)	2.62 (1.22–5.63)	<b>0.014</b>
<b>Haplotype (rs1154967–rs2057482)</b>				
none GT	64 (86.5%)	93 (71.0%)	reference	
at least one GT	10 (13.5%)	38 (29.0%)	2.62 (1.22–5.63)	<b>0.014</b>
GC/GC	62 (83.8%)	88 (67.2%)	reference	
GC/GT	10 (13.5%)	34 (26.0%)	2.40 (1.10–5.21)	<b>0.027</b>
GC/AC	2 (2.7%)	5 (3.8%)	1.76 (0.33–9.37)	0.507
other	0 (0.0%)	4 (3.1%)	–	0.149

SNPs – single-nucleotide polymorphisms, MGUS – monoclonal gammopathy of undetermined significance  
<sup>1</sup>described by absolute and relative frequencies  
 p-values marked in bold are statistically significant

**Tab. 7. Cox regression model for overall survival from diagnosis for MM patients (n = 275).**

<i>HIF-1α</i>	n	Number of deaths	Hazard ratio (95% CI)	p
<b>rs2057482</b>				
CC	225	117	reference	
CT	47	19	0.64 (0.39–1.04)	0.073
TT	3	1	0.41 (0.06–2.96)	0.379
CC	225	117	reference	
CT, TT	50	20	0.62 (0.39–1.01)	0.052
<b>haplotype (rs1154967 and rs2057482)</b>				
none GT	225	117	reference	
at least one GT	50	20	0.62 (0.39–1.01)	0.052
none GT	225	117	reference	
once GT	47	19	0.64 (0.39–1.04)	0.073
twice GT	3	1	0.41 (0.06–2.96)	0.379
GC/GC	209	109	reference	
GC/GT	47	19	0.63 (0.39–1.02)	0.062
GC/AC	15	7	0.70 (0.33–1.51)	0.368
other	4	2	0.75 (0.18–3.03)	0.682

MM – multiple myeloma

haplotypes and time to progression from MGUS into MM.

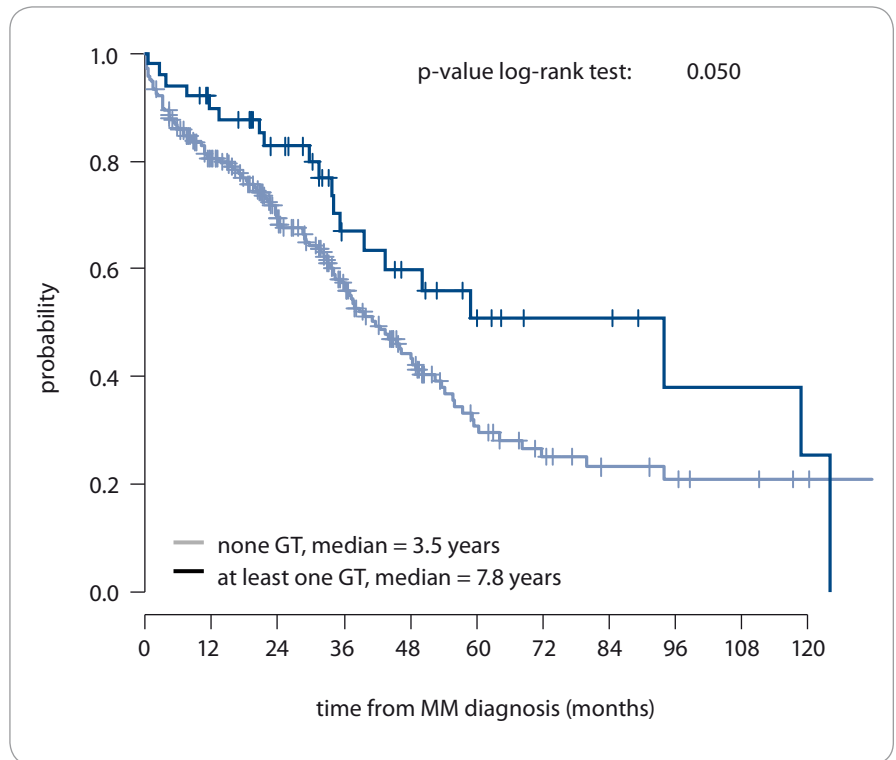
**Association of SNP in *HIF-1α* and *HIF-1β* with progression and survival**

Additionally, for MM patients, association between SNPs in *HIF-1α* and *HIF-1β* and OS or length of the treatment response were evaluated. No significant association between studied SNPs and length of treatment response was observed; however, rs2057482 SNP in *HIF-1α* and *HIF-1α* haplotype (rs11549467 and rs2057482) were associated with better OS specifically in rs2057482 CT genotype (p = 0.073); in rs11549467 and rs2057482 combination – “at least one GT haplotype” (p = 0.052), “once GT haplotype” (p = 0.073), GC/GT haplotype (p = 0.062) (Tab. 7). Log-rank test confirmed association of GT haplotype (rs11549467 and rs2057482) with better OS with median of 41.8 months (95% CI 35.1–48.5) for “none GT” and median of 93.8 months (95% CI 31.3–156.4) for “at least one GT haplotype” (p = 0.050) (Fig. 1).

**Predictive value of polymorphisms associated with hypoxia and multidrug resistance in CVD treated MM patients**

For this part of study, 110 MM patients treated with CVD regimen were included; all samples were collected prior to CVD treatment (Tab. 3). Association of three SNPs and their haplotypes in *MDR1* (rs1045642, rs2032582 and rs11203), one in *MRP1* (rs4148356), two in *HIF-1α* (rs11549467, rs2057482) and one in *HIF-1β* (rs2228099) with MM patient's outcome was evaluated.

Survival cut-off points were established based on time-dependent ROC analysis (data not shown), which showed suitable AUC for 2-year time period for outcome evaluation; the 2-year treatment intervals (OS, TTP, and PFS) were evaluated from the beginning of CVD treatment. Further, linkage disequilibrium analysis was performed also between three *MDR1* SNPs (n = 110;  $D' = 0.829$ ,  $r^2 = 0.663$ ;  $p < 0.001$  for rs1045642 and rs2032582;  $D' = 0.741$ ,  $r^2 = -0.561$ ;  $p < 0.001$  for rs1045642 and



**Fig. 1. Overall survival for GT haplotype rs11549467 and rs2057482 (*HIF-1α*) – “none GT” vs. “at least one GT” (n = 275) (10-year interval visualized).**  
MM – multiple myeloma

**Tab. 8. Cox regression model for 2-year OS, TTP and PFS (n = 110).**

MDR1 haplotypes <sup>1</sup>	Total (n = 110)		New diagnosis (n = 47)		Relapse (n = 63)	
	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
<b>TGT/CGT vs. other</b>						
OS	2.60 (1.22–5.53)	<b>0.013</b>	3.56 (1.38–9.18)	<b>0.009</b>	1.32 (0.32–5.56)	0.702
TTP	2.05 (0.93–4.49)	0.074	1.28 (0.38–4.31)	0.689	3.62 (1.26–10.41)	<b>0.017</b>
PFS	2.45 (1.26–4.76)	<b>0.008</b>	1.97 (0.81–4.79)	0.134	3.22 (1.13–9.19)	<b>0.029</b>
<b>at least one CWC vs. none CWC<sup>2</sup></b>						
OS	0.48 (0.27–0.85)	<b>0.011</b>	0.42 (0.18–0.97)	<b>0.042</b>	0.60 (0.26–1.39)	0.230
TTP	0.48 (0.29–0.79)	<b>0.004</b>	0.59 (0.27–1.31)	0.197	0.34 (0.17–0.67)	<b>0.002</b>
PFS	0.48 (0.30–0.76)	<b>0.002</b>	0.56(0.29–1.11)	0.096	0.38 (0.19–0.74)	<b>0.005</b>
<b>at least one TGT vs. none TGT</b>						
OS	1.64 (0.91–2.95)	0.098	1.83 (0.74–4.50)	0.188	1.52 (0.70–3.30)	0.291
TTP	2.07 (1.25–3.44)	<b>0.005</b>	3.27 (1.31–8.19)	<b>0.011</b>	1.50 (0.81–2.76)	0.194
PFS	1.74 (1.11–2.72)	<b>0.016</b>	2.35 (1.14–4.83)	<b>0.020</b>	1.35 (0.76–2.38)	0.305

OS – overall survival, TTP – time to progression, PFS – progression free survival

<sup>1</sup>for rs1045642, rs2032582 and rs1128503

<sup>2</sup>allele W summarises allele A or T

p-values marked in bold are statistically significant

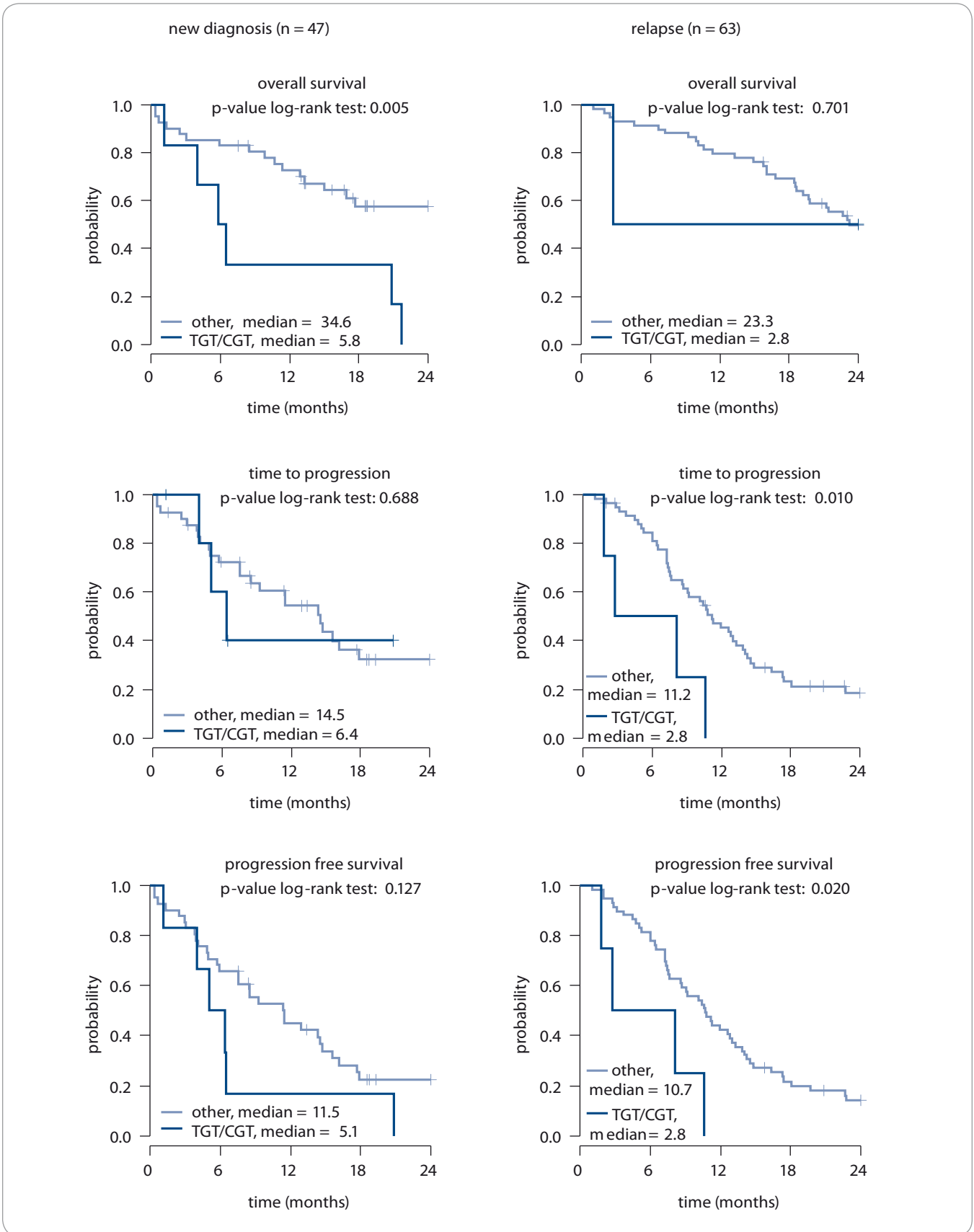


Fig. 2a. Kaplan-Meier curves for the TGT/CGT haplotype rs1045642, rs2032582 and rs1128503 (*MDR1*) which reached significance in Cox regression model.

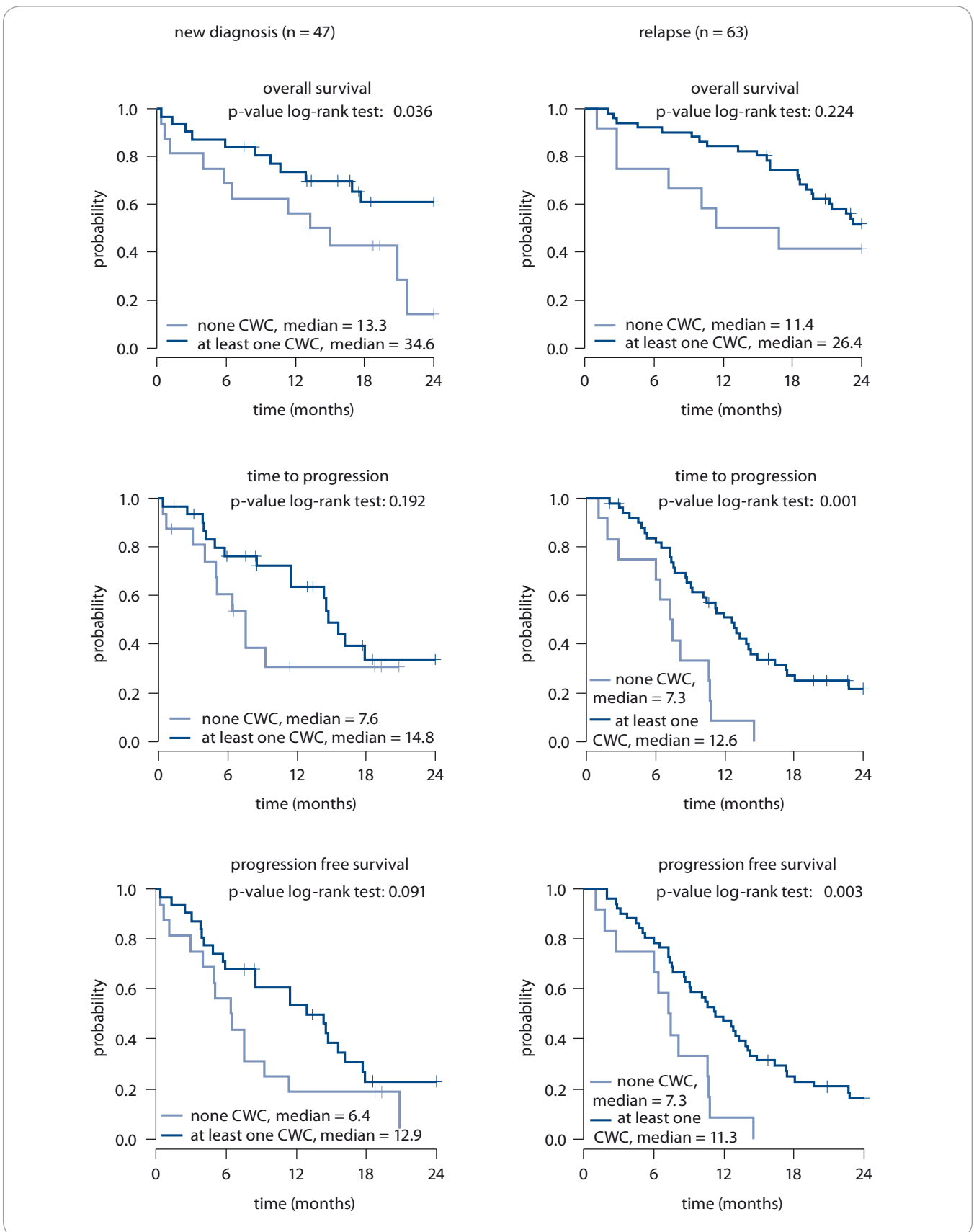


Fig. 2b. Kaplan-Meier curves for the at least one CWC haplotype rs1045642, rs2032582 and rs1128503 (*MDR1*) which reached significance in Cox regression model.

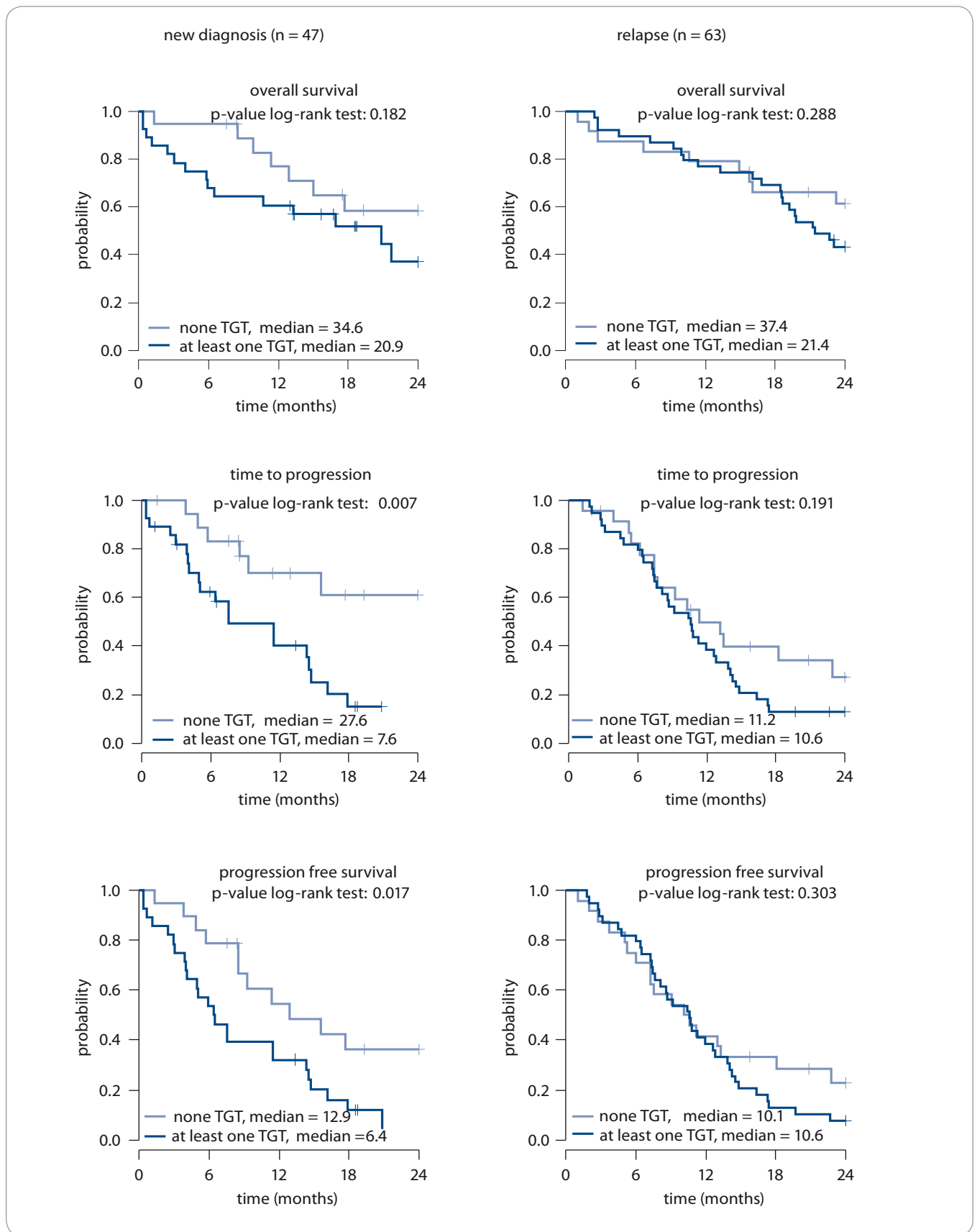


Fig. 2c. Kaplan-Meier curves for the at least one TGT haplotype rs1045642, rs2032582 and rs1128503 (*MDR1*) which reached significance in Cox regression model.



rs1128503;  $D' = 0.918$ ,  $r^2 = -0.870$ ;  $p < 0.001$  for rs2032582 and rs1128503). Frequencies for significant haplotypes of *MDR1* for patients treated with CVD treatment regimen (n = 110) are presented in Supplementary tab. 2. Since *MDR1* locus (rs2032582) has three alleles, the A and T allele were combined as W, so that this locus could be treated as two alleles.

Using multivariate Cox regression model with 2-year TTP as dependent variable and all SNPs in *HIF-1β*, *HIF-1α* (haplotype), *MRP1*, *MDR1* (haplotype) as predictors, only haplotypes of *MDR1* reached p-value lower than 0.1 (specifically “at least one CWC” with p-value 0.022 and “at least one TGT” with p-value 0.068). In case of OS and PFS, p-values lower than 0.1 were not observed.

In the univariate analysis, significant association with 2-year OS, TTP and PFS was observed for these haplotypes of three SNPs in *MDR1* (rs1045642, rs2032582 and rs1128503) – TGT/CGT vs. other, “at least one CWC” vs. “none CWC” and “at least one TGT” vs. “none TGT”. All of the analyses were performed together and separately for the categories of newly diagnosed MM (n = 47) and relapsed MM patients (n = 63) and all of the significant associations are depicted in Tab. 8. Kaplan-Meier curves for the haplotypes of three SNPs in *MDR1* that reached significance in Cox regression model are shown in Fig. 2a, b, c.

In newly diagnosed MM patients, there was a significantly worse 2-year OS for TGT/CGT (median 5.8 months; 95% CI 2.8–8.9) compared to other haplotypes (median 34.6 months; 95% CI 11.7–57.5; HR 3.56; 95% CI 1.38–9.18;  $p = 0.009$ ) (Fig. 2a). Further, in relapsed MM patients with haplotype TGT/CGT, significantly worse 2-year TTP was achieved (median 2.8 months; 95% CI 0.0–8.9) in comparison to other haplotypes (11.2 months; 95% CI = 8.6–13.7; HR 3.62; 95% CI 1.26–10.41;  $p = 0.017$ ). Similarly, for this haplotype, shorter PFS was observed (median 2.8 months; 95% CI 0.0–8.9) in comparison with other haplotypes (median 10.7 months; 95% CI 8.5–12.9; HR 3.22; 95% CI 1.13–9.19;  $p = 0.029$ ).

**Supplementary tab. 2. Frequencies for the polymorphisms and haplotypes in MM patients with CVD treatment regimen (n = 110).**

	Total <sup>1</sup> (n = 110)	New diagnosis <sup>1</sup> (n = 47)	Relapse <sup>1</sup> (n = 63)
<b>HIF-1β (rs2228099)</b>			
CC	46 (41.8%)	19 (40.4%)	27 (42.9%)
CG	53 (48.2%)	21 (44.7%)	32 (50.8%)
GG	11 (10.0%)	7 (14.9%)	4 (6.3%)
<b>HIF-1α (rs11549467)</b>			
GG	104 (94.5%)	44 (93.6%)	60 (95.2%)
GA	5 (4.5%)	2 (4.3%)	3 (4.8%)
AA	1 (0.9%)	1 (2.1%)	0 (0.0%)
<b>HIF-1α (rs2057482)</b>			
CC	88 (80.0%)	38 (80.9%)	50 (79.4%)
CT	19 (17.3%)	8 (17.0%)	11 (17.5%)
TT	3 (2.7%)	1 (2.1%)	2 (3.2%)
<b>HIF-1α haplotype (rs1154967-rs2057482)</b>			
GC/GC	82 (74.5%)	35 (74.5%)	47 (74.6%)
GC/GT	19 (17.3%)	8 (17.0%)	11 (17.5%)
at least one GC	106 (96.4%)	45 (95.7%)	61 (96.8%)
at least one GT	22 (20.0%)	9 (19.1%)	13 (20.6%)
<b>MRP1 (rs4148356)</b>			
GG	104 (94.5%)	44 (93.6%)	60 (95.2%)
AG	6 (5.5%)	3 (6.4%)	3 (4.8%)
<b>MDR1 (rs1045642)</b>			
CC	39 (35.5%)	16 (34.0%)	23 (36.5%)
CT	59 (53.6%)	25 (53.2%)	34 (54.0%)
TT	12 (10.9%)	6 (12.8%)	6 (9.5%)
<b>MDR1 (rs2032582)</b>			
WW	23 (20.9%)	10 (21.3%)	13 (20.6%)
GW	67 (60.9%)	26 (55.3%)	41 (65.1%)
GG	20 (18.2%)	11 (23.4%)	9 (14.3%)
<b>MDR1 (rs1128503)</b>			
TT	24 (21.8%)	15 (31.9%)	9 (14.3%)
CT	65 (59.1%)	22 (46.8%)	43 (68.3%)
CC	21 (19.1%)	10 (21.3%)	11 (17.5%)
<b>MDR1 haplotype (rs1045642-rs2032582-rs11285031)</b>			
TGT/CWC2	43 (39.1%)	15 (31.9%)	28 (44.4%)
CWC/CWC2	17 (15.5%)	7 (14.9%)	10 (15.9%)
CGT/CWC2	14 (12.7%)	5 (10.6%)	9 (14.3%)
TGT/CGT	10 (9.1%)	6 (12.8%)	4 (6.3%)
at least one CWC2	82 (74.5%)	31 (66.0%)	51 (81.0%)
at least one TGT	67 (60.9%)	28 (59.6%)	39 (61.9%)
at least one CGT	28 (25.5%)	14 (29.8%)	14 (22.2%)

MM – multiple myeloma, CVD – cyclophosphamide, bortezomib, dexamethasone regiment

<sup>1</sup> described by absolute and relative frequencies, <sup>2</sup> allele W summarises allele A or T

**Tab. 9. TGT haplotype (*MDR1*) in association with 2-year binary endpoints 1. death, 2. progression or death related to diagnosis, 3. progression or death (not only MM).**

At least one TGT vs.	Death <sup>1</sup>	Progression or death related to diagnosis <sup>1</sup>	Progression or death <sup>1</sup>
<b>none TGT haplotype<sup>3</sup></b>			
<b>total (n = 110)</b>			
AUC (95% CI)	0.59 (0.48–0.69)	0.67 (0.56–0.79)	0.69 (0.56–0.82)
p <sup>2</sup>	0.121	<b>0.003</b>	<b>0.008</b>
specificity % (n)	47.4% (27/57)	62.9% (22/35)	70.0% (14/20)
sensitivity % (n)	69.8% (37/53)	72.0% (54/75)	67.8% (61/90)
<b>new diagnosis (n = 47)</b>			
AUC (95% CI)	0.58 (0.42–0.75)	0.69 (0.54–0.85)	0.71 (0.53–0.89)
p <sup>2</sup>	0.343	<b>0.023</b>	<b>0.036</b>
Specificity % (N)	48.0% (12/25)	61.9% (13/21)	72.7% (8/11)
Sensitivity % (N)	68.2% (15/22)	76.9% (20/26)	69.4% (25/36)
<b>relapse (n = 63)</b>			
AUC (95% CI)	0.59 (0.45–0.73)	0.67 (0.50–0.83)	0.67 (0.47–0.86)
p <sup>2</sup>	0.224	0.056	0.112
specificity % (n)	46.9% (15/32)	64.3% (9/14)	66.7% (6/9)
sensitivity % (n)	71.0% (22/31)	69.4% (34/49)	66.7% (36/54)

MM – multiple myeloma

<sup>1</sup> events evaluated during first two years from the beginning of the treatment

<sup>2</sup> p-value of AUC (area under the curve), p values marked in bold are statistically significant

<sup>3</sup> for rs1045642, rs2032582 and rs1128503

Using 2-year time-dependent ROC analysis, the “at least one TGT” haplotype within newly diagnosed MM reached significance in TTP and PFS (data shown in Tab. 9).

The opposite association with survival was observed for CWC haplotype, as the “at least one CWC” compared to “none CWC” haplotype showed significantly better 2-year OS for newly diagnosed MM patients (median 34.6 months; 95% CI 18.0–51.1) vs. 13.3 months; 95% CI 6.7–19.8; HR 0.42; 95% CI 0.18–0.97; p = 0.042). “At least one CWC” compared to “none CWC” also showed significantly better 2-year TTP (median 12.6 months; 95% CI 10.1–15.1; vs. 7.3 months; 95% CI 5.6–9.0; HR 0.34; 95%

CI 0.17–0.67; p = 0.002) and 2-year PFS (median 11.3 months; 95% CI 8.6–13.9 vs. 7.3 months; 95% CI 5.6–9.0; HR 0.38; 95% CI 0.19–0.74; p = 0.005) in relapsed MM patients. (Figure 2b). For newly diagnosed MM patients, “at least one TGT” compared with “none TGT” haplotype was associated with significantly worse TPP (median 7.6 months; 95% CI 0.2–15.0 vs. 27.6 months; 95% CI 15.6–NA; HR 3.27; 95% CI 1.31–8.19; p = 0.011) and PFS (median 6.4 months; 95% CI 3.8–9.1 vs. 12.9 months 95% CI 4.7–21.2; HR 2.35; 95% CI 1.14–4.83; p = 0.020) (Figure 2c).

Further, the differences in clinical parameters between the cohorts of patients with different haplotypes in

a group of patients treated with CVD regimen were evaluated. The “at least one CWC” haplotype compared to “none CWC” haplotype in relapsed MM is associated with lower level of calcium (median 2.3 mmol/L; 95% CI 2.1–2.7 vs. 2.5 mmol/L 95% CI 2.2–3.6; p = 0.045). Then, “at least one TGT” haplotype compared to “none TGT” haplotype is associated with worse D–S stadium in newly diagnosed MM (p = 0.015) and also “at least one TGT” haplotype compared to “none TGT” haplotype is associated with higher levels of creatinine (median 113.0 umol/L; 95% CI 64.0–447.0 vs. median 85.0; 95% CI 60.0–170.0; p = 0.020), B2M (median 4.4 mg/L; 95% CI 1.9–19.7 vs. median 2.9; 95% CI 1.9–7.5] p = 0.013) and cytological percentage of BM infiltration by pathological PCs (median 29.6; 95% CI 0.4–72.8 vs. median 20.2; 95% CI 0.0–58.4; p = 0.071) in relapsed MM.

### Discussion

Observations from genome-wide association studies in MM [31], Hodgkin’s lymphoma [32] and chronic lymphocytic leukemia [33] suggested that genetically determined dysregulation of protooncogenes (such as MYC) may be a common mechanism underlying predisposition to hematological malignancies of the B-cell lineage. Soon after, it was elucidated that not only loci in protooncogenes, but also in other genes or parts of chromosome, such as 3p22.1 (rs1052501 in ULK4), 7p15.3 (rs4487645) and 2p23.3 (rs6746082), are associated with risk of MM, although the last one did not reach genome-wide significance [31]. The association between 3p22.1 (rs1052501) and MM was further validated and its association with MGUS was found as well [34]. Other observations led to identification of MM risk loci at 3q26.2(rs10936599),6p21.33(rs2285803, PSORS1C2), 17p11.2 (rs4273077, TNFR SF13B) and 22q13.1 (rs877529, CBX7) and provided further evidence for genetic susceptibility to MM [35].

So far, many studies assessed association between polymorphisms in genes associated with hypoxia and cancer risk. Therefore, in this study,

we focused on genetic variations in such genes and their effects on the risk of development of monoclonal gammopathy. The most commonly investigated polymorphism associated with hypoxia is C1772T (rs11549465), followed by G1790A (rs11549467), C111A and c\*191T > C (rs2057482) in *HIF-1a* [36]. C1772T (rs11549465) and G1790A (rs11549467) polymorphisms were previously associated with susceptibility to develop pancreatic cancer [37,38]. G1790A (rs11549467) polymorphism alone is associated with an increase in tumor-produced *HIF-1a* and in cancer progression [38]. Further, for C1772T (rs11549465) polymorphism, T allele was significantly associated with increased cancer risk. For G1790A (rs11549467), genotype results showed that it is significantly associated with cancers [39]. Unfortunately, in our study, we did not observe any association between these polymorphisms in *HIF-1a* and MM development. However, for c\*191T > C (rs2057482) genotype in *HIF-1a* and *HIF-1a* haplotype (rs11549467, rs2057482), we observed a significant association with higher MGUS risk group, as defined by the MAYO model. Although a previous large meta-analysis showed significant association between *HIF-1a* C1772T (rs11549465) and G1790A (rs11549467), but not c\*191T > C (rs2057482) polymorphism with increased risk of cancer [36], it can be still hypothesized that c\*191T > C (rs2057482) in *HIF-1a* is associated with progression of MG, as it had been observed to contribute to risk of cervical cancer in a Chinese population [40]. Furthermore, c\*191T > C (rs2057482) polymorphism is located in 3'UTR region of *HIF-1a*, which contains regulatory regions that post-transcriptionally influence gene expression, such as binding sites for regulatory proteins and microRNA [41]. Thus, we hypothesized that not only sequence changes, but also impaired regulation of *HIF-1a* expression is involved in susceptibility to MGUS transformation.

Moreover, our results suggest that genotype variation of rs2228099 polymorphism in *HIF-1β* is associated with increased risk of MM. Our data

support the hypothesis of protective effect of the G allele in this SNP in MM development. Further, this polymorphism is significantly associated with MM development in a group of obese MM patients. Indeed, the number of cancer cases caused by obesity is estimated to be 20% with increased risk of malignancies influenced by diet, weight change and body fat distribution together with physical activity [42]. Insulin-like growth factor I (IGF-I) produced in adipose tissue induces synthesis of *HIF-1a* [43], which together with VEGF leads to neovascularization and metastases, as was shown in a colon cancer model [44]. Interestingly, body build or nutritional status may be also involved in the development of MM by various mechanisms that still need to be elucidated [45–54].

In the second part of our study, we focused on polymorphisms in *MRP1* (R723Q, rs4148356), a gene for multiple drug resistance protein, and *MDR1* (3435C > T, rs1045642; 2677G > W, rs2032582 and 1236C > T, rs1128503) encoding P-glycoprotein. There was no significant association between SNP in *MRP1* and patients outcome, which is in discordance with other observations that showed significant association with SNP in *MRP1* (rs4148356) and time to event in 279 patients with relapsed and/or refractory disease treated with bortezomib or bortezomib with pegylated liposomal doxorubicin. In this study, patients with GG genotype had better TTP (median 330 vs. 129 days;  $p = 0.0008$ ), PFS (median 338 vs. 129 days;  $p = 0.0006$ ) and OS ( $p = 0.0045$ ) [55]. Nevertheless, we observed a significant association of patients outcome with *MDR1* haplotypes – TGT/CGT vs. “other”, “at least one CWC” vs. “none CWC”, “at least one TGT” vs. “none TGT” evaluated separately in the category of newly diagnosed MM ( $n = 47$ ) and relapsed MM ( $n = 63$ ). The “at least one CWC” compared to “none CWC” haplotype also showed significantly better 2-year TTP and PFS and is associated with lower level of calcium in relapsed MM patients. For newly diagnosed MM patients, “at least one TGT” compared with “none TGT” haplotype was associated with

significantly worse 2-year TPP and PFS and D–S stadium. Moreover, “at least one TGT” haplotype compared to “none TGT” haplotype is associated with higher level of creatinine, B2 microglobulin and cytological percentage of BM infiltration by pathological PCs in relapsed MM patients, but was not associated with significantly worse 2-year patients outcome.

In a previous study of 115 MM patients treated with DAV (dexamethasone, doxorubicin (adryamicin) and vincristine) regimen followed by autologous transplantation, patients with CT and TT genotypes in *MDR1* (rs1045642) achieved longer OS in comparison with those with CC genotype (T allele carriers would show longer OS) [56]. Subsequently, the study of the most frequent haplo/diplotypes in *MDR1* (rs1045642, rs2032582) in 110 MM patients treated with DAV regimen, followed by autologous stem cell transplantation, showed that survival probability was lower for GC/GC patients (55%) than for GC/TT and TT/TT carriers [57]. In contrast to these studies, Jamroziak et al. found comparable allele and genotype frequencies among 111 MM patients and 96 controls [58]. Moreover, patients and control groups did not differ regarding *MDR1* haplotype distribution (rs1045642, rs2032582 and rs1128503), and their results do not support major influence of *MDR1* variants on the risk of MM in Caucasians. Thus, functional importance of SNPs in *MDR1* is controversial as the association between a polymorphism (rs1045642) in *MDR1* and effect of treatment showed contradictory results so far [56–61].

Taken together, we aimed to evaluate 3 SNPs associated with hypoxia in *HIF-1a* (rs11549467, rs2057482) and *HIF-1β* genes (rs2228099) and 4 SNPs associated with multidrug resistance in *MDR1* gene (rs1045642, rs2032582 and rs1128503) and *MRP1* gene (rs4148356) in MGUS and MM patients. Although our results show promising associations, further studies are needed to confirm the usefulness of these polymorphisms in risk prediction of MG and/or outcomes of MM patients that underwent bortezomib-based treatment.

## Acknowledgements:

We would like to thank all the patients and their caregivers for participating in this study. We would also like to express our thanks to data managers of all centers of the Czech Myeloma Group.

Further, we would like to thank all technicians from the Department of Clinical Hematology, University Hospital Brno, for their technical support, and John B. Smith for proofreading the manuscript.

## References

- International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003; 121(5): 749–757.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008; 111(6): 2962–2972. doi: 10.1182/blood-2007-10-078022.
- Hajek R, Krejci M, Pour L et al. Multiple myeloma. *Klin Onkol* 2011; 24 Suppl: S10–S13.
- Kyle RA, Buadi F, Rajkumar SV. Management of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM). *Oncology (Williston Park)* 2011; 25(7): 578–586.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(12): 5510–5514.
- Martin SK, Diamond P, Gronthos S et al. The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia* 2011; 25(10): 1533–1542. doi: 10.1038/leu.2011.122.
- Hajek R, Okubote SA, Svachova H. Myeloma stem cell concept, heterogeneity and plasticity of multiple myeloma. *Br J Haematol* 2013; 163(5): 551–564. doi: 10.1111/bjh.12563.
- Colla S, Storti P, Donofrio G et al. Low bone marrow oxygen tension and hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  overexpression characterize patients with multiple myeloma: role on the transcriptional and proangiogenic profiles of CD138(+) cells. *Leukemia* 2010; 24(11): 1967–1970. doi: 10.1038/leu.2010.193.
- Martin SK, Diamond P, Williams SA et al. Hypoxia-inducible factor-2 is a novel regulator of aberrant CXCL12 expression in multiple myeloma plasma cells. *Haematologica* 2010; 95(5): 776–784. doi: 10.3324/haematol.2009.015628.
- Giatromanolaki A, Bai M, Margaritis D et al. Hypoxia and activated VEGF/receptor pathway in multiple myeloma. *Anticancer Res* 2010; 30(7): 2831–2836.
- Hu Y, Kirito K, Yoshida K et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 function enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to melphalan. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(8): 2329–2338. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-09-0150.
- Borsi E, Perrone G, Terragna C et al. Hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  as a therapeutic target in multiple myeloma. *Oncotarget* 2014; 5(7): 1779–1792. doi: 10.18632/oncotarget.1736.
- Ria R, Catacchio I, Berardi S et al. HIF-1 $\alpha$  of bone marrow endothelial cells implies relapse and drug resistance in patients with multiple myeloma and may act as a therapeutic target. *Clin Cancer Res* 2014; 20(4): 847–858. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1950.
- Storti P, Bolzoni M, Donofrio G et al. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  suppression in myeloma cells blocks tumoral growth in vivo inhibiting angiogenesis and bone destruction. *Leukemia* 2013; 27(8): 1697–1706. doi: 10.1038/leu.2013.24.
- Hu J, Van Valckenborgh E, Xu D et al. Synergistic induction of apoptosis in multiple myeloma cells by bortezomib and hypoxia-activated prodrug TH-302, in vivo and in vitro. *Mol Cancer Ther* 2013; 12(9): 1763–1773. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0123.
- Doublier S, Belisario DC, Polimeni M et al. HIF-1 activation induces doxorubicin resistance in MCF7 3-D spheroids via P-glycoprotein expression: a potential model of the chemo-resistance of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *BMC Cancer* 2012; 12: 4. doi: 10.1186/1471-2407-12-4.
- Song X, Liu X, Chi W et al. Hypoxia-induced resistance to cisplatin and doxorubicin in non-small cell lung cancer is inhibited by silencing of HIF-1 $\alpha$  gene. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58(6): 776–784. doi: 10.1007/s00280-006-0224-7.
- Zhou SF, Di YM, Chan E et al. Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. *Curr Drug Metab* 2008; 9(8): 738–784.
- Saleun JP, Vicariot M, Deroff P et al. Monoclonal gammopathies in the adult population of Finistère, France. *J Clin Pathol* 1982; 35(1): 63–68.
- Bourguet CC, Grufferman S, Delzell E et al. Multiple myeloma and family history of cancer. A case-control study. *Cancer* 1985; 56(8): 2133–2139.
- Eriksson M, Hällberg B. Familial occurrence of hematologic malignancies and other diseases in multiple myeloma: a case-control study. *Cancer Causes Control* 1992; 3(1): 63–67.
- Brown LM, Linet MS, Greenberg RS et al. Multiple myeloma and family history of cancer among blacks and whites in the U.S. *Cancer* 1999; 85(11): 2385–2390.
- Landgren O, Linet MS, McMaster ML et al. Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study. *Int J Cancer* 2006; 118(12): 3095–3098. doi: 10.1002/ijc.21745.
- Altieri A, Chen B, Bermejo JL et al. Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006; 42(11): 1661–1670. doi: 10.1016/j.ejca.2005.11.033.
- Morgan G, Johnsen HE, Goldschmidt H et al. Myeloma Genetics International Consortium. *Leuk Lymphoma* 2012; 53(5): 796–800. doi: 10.3109/10428194.2011.639881.
- Almasi M, Sevcikova S, Svachova H et al. Polymorphisms contribution to the determination of significant risk of specific toxicities in multiple myeloma. *Klin Onkol* 2011; 24 (suppl 1): S39–S42.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68(4): 978–989. doi: 10.1086/319501.
- Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation. *Am J Hum Genet* 2005; 76(3): 449–462. doi: 10.1086/428594.
- Warnes G, Gorjanc G, Leisch F. Man M (2012) genetics: Population Genetics. [online]. Available from: <http://CRAN.R-project.org/package=genetics>.
- Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM et al. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005; 106(3): 812–817. doi: 10.1182/blood-2005-03-1038.
- Broderick P, Chubb D, Johnson DC et al. Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet* 2011; 44(1): 58–61. doi: 10.1038/ng.993.
- Enciso-Mora V, Broderick P, Ma Y et al. A genome-wide association study of Hodgkin's lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16.1 (REL), 8q24.21 and 10p14 (GATA3). *Nat Genet* 2010; 42(12): 1126–1130. doi: 10.1038/ng.696.
- Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat Genet* 2010; 42(2): 132–136. doi: 10.1038/ng.510.
- Greenberg AJ, Lee AM, Serie DJ et al. Single-nucleotide polymorphism rs1052501 associated with monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Leukemia* 2013; 27(2): 515–516. doi: 10.1038/leu.2012.232.
- Chubb D, Weinhold N, Broderick P et al. Common variation at 3q26.2, 6p21.33, 17p11.2 and 22q13.1 influences multiple myeloma risk. *Nat Genet* 2013; 45(10): 1221–1225. doi: 10.1038/ng.2733.
- Hu X, Fang Y, Zheng J et al. The association between HIF-1 $\alpha$  polymorphism and cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol* 2014; 35(2): 903–916. doi: 10.1007/s13277-013-1160-x.
- Ruiz-Tovar J, Fernandez-Contreras ME, Martín-Pérez E et al. Association of thymidylate synthase and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  DNA polymorphisms with pancreatic cancer. *Tumori* 2012; 98(3): 364–369. doi: 10.1700/1125.12406.
- Wang X, Liu Y, Ren H et al. Polymorphisms in the hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene confer susceptibility to pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2011; 12(5): 383–387.
- Liu J, Zhang HX 1790 G/A polymorphism, but not 1772 C/T polymorphism, is significantly associated with cancers: an update study. *Gene* 2013; 523(1): 58–63. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.129.
- Fu SL, Miao J, Ding B et al. A polymorphism in the 3' untranslated region of Hypoxia-inducible Factor-1  $\alpha$  confers an increased risk of cervical cancer in a Chinese population. *Neoplasma* 2013; 61(1): 63–69. doi: 10.4149/neo\_2014\_002.
- Barrett LMW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(21): 3613–34. doi: 10.1007/s00018-012-0990-9.
- De Pergola G, Silvestris F. Obesity as a major risk factor for cancer. *J Obes* 2013; 2013: 291546. doi: 10.1155/2013/291546.
- Héron-Milhavet L, LeRoith D. Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. *J Biol Chem* 2002; 277(18): 15600–15606. doi: 10.1074/jbc.M111142200.
- Wu Y, Yakar S, Zhao L et al. Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 2002; 62(4): 1030–1035.
- Friedman GD, Herrinton LJ. Obesity and multiple myeloma. *Cancer Causes Control* 1994; 5(5): 479–483.
- Blair CK, Cerhan JR, Folsom AR et al. Anthropometric characteristics and risk of multiple myeloma. *Epidemiology* 2005; 16(5): 691–694.
- Cozen W, Gebregziabher M, Conti DV et al. Interleukin-6-related genotypes, body mass index, and risk of multiple myeloma and plasmacytoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(11): 2285–2291. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0446.
- Chiu BC, Gapstur SM, Greenland P et al. Body mass index, abnormal glucose metabolism, and mortality from hematopoietic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(12): 2348–2354. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0007.
- Khan MM, Mori M, Sakauchi F et al. Risk factors for multiple myeloma: evidence from the Japan Collaborative Cohort (JACC) study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2006; 7(4): 575–581.
- Birmann BM, Giovannucci E, Rosner B et al. Body mass index, physical activity, and risk of multiple myeloma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(7): 1474–1478. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-07-0143.
- Larsson SC, Wolk A. Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2007; 121(11): 2512–2516. doi: 10.1002/ijc.22968.
- Lichtman MA. Obesity and the risk for a hematological malignancy: leukemia, lymphoma, or myeloma. *Oncologist* 2010; 15(10): 1083–1101. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0206.
- Wallin A, Larsson SC. Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies.

Eur J Cancer 2011; 47(11): 1606–1615. doi: 10.1016/j.ejca.2011.01.020.

54. Hofmann JN, Moore SC, Lim U et al. Body mass index and physical activity at different ages and risk of multiple myeloma in the NIH-AARP diet and health study. *Am J Epidemiol* 2013; 177(8): 776–786. doi: 10.1093/aje/kws295.

55. Buda G, Ricci D, Huang CC et al. Polymorphisms in the multiple drug resistance protein 1 and in P-glycoprotein 1 are associated with time to event outcomes in patients with advanced multiple myeloma treated with bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin. *Ann Hematol* 2010; 89(11): 1133–1140. doi: 10.1007/s00277-010-0992-3.

56. Buda G, Maggini V, Galimberti S et al. MDR1 polymorphism influences the outcome of multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2007; 137(5): 454–456. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06605.x.

57. Maggini V, Buda G, Martino A et al. MDR1 diplotypes as prognostic markers in multiple myeloma. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18(5): 383–389. doi: 10.1097/FGC.0b013e3282f82297.

58. Jamrozik K, Balcerzak E, Calka K et al. Polymorphisms and haplotypes in the multidrug resistance 1 gene (MDR1/ABCB1) and risk of multiple myeloma. *Leuk Res* 2009; 33(2): 332–335. doi: 10.1016/j.leukres.2008.06.008.

59. Drain S, Catherwood MA, Orr N et al. ABCB1 (MDR1) rs1045642 is associated with increased overall survival in plasma cell myeloma. *Leuk Lymphoma* 2009; 50(4): 566–570. doi: 10.1080/10428190902853144.

60. Drain S, Flannely L, Drake MB et al. Multidrug resistance gene expression and ABCB1 SNPs in plasma cell myeloma. *Leuk Res* 2011; 35(11): 1457–1463. doi: 10.1016/j.leukres.2011.05.033.

61. Drain S, Catherwood MA, Bjourson AJ et al. Neither P-gp SNP variants, P-gp expression nor functional P-gp activity predicts MDR in a preliminary study of plasma cell myeloma. *Cytometry B Clin Cytom* 2012; 82(4): 229–237. doi: 10.1002/cyto.b.21018.

# Resekce sarkomu dutiny břišní, pánve a retroperitonea

## Resection of Abdominal, Pelvic and Retroperitoneal Tumors

Šimůnek R.<sup>3</sup>, Adámková-Krákorová D.<sup>2</sup>, Šefr R.<sup>1,3</sup>, Fait V.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Oddělení chirurgické onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup> Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>3</sup> Klinika operační onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Mezenchymální malignity jsou relativně vzácným typem nádorů, které mají specifické chování. Nedílnou součástí terapie těchto nádorů je chirurgické řešení, které v některých případech nelze standardizovat, řešení je zvláště při intraperitoneálním a retroperitoneálním umístění velmi často vysoce individuální. **Případ:** Popisujeme dvě kazuistiky intraperitoneálních a retroperitoneálních sarkomů léčených v našem komplexním onkologickém centru. První pacient, 36letý muž s primárně diagnostikovaným tumorem subrenálního prostoru velikosti 95 × 90 × 140 mm, v těsném kontaktu s dolní dutou žilou a s pravou ledvinou, se samostatným krevním zásobením horního pólu ledviny. Primárně byl nádor hodnocen jako schwannom, pacient byl došetřen, resekce proběhla se zachováním pravé ledviny. Definitivní histologický nálezy byly ganglioneuroblastom. Po resekci proběhla adjuvantní radioterapie na lůžko tumoru. Pacient je rok po resekci bez známek onemocnění. Druhý pacient byl 52letý muž, s diagnózou liposarkomu retroperitonea velikosti 50 × 36 × 15 cm, po resekci váhy 14 kg. Při resekci bylo nutno odstranit levou ledvinu a nadledvinu. Byla podána adjuvantní chemoterapie IFO/ADM. Celkem 31 měsíců po primární resekci byla resekována lokální recidiva v lůžku tumoru a po dalších 18 měsících byl pacient opět revidován a byla odstraněna další 3 ložiska v retroperitoneu. Po dalších 6 měsících se objevil a byl resekován další relaps v levém semenném provazci. Pacient je nyní 3 měsíce bez známek relapsu. **Závěr:** Terapie měkkotkáňových sarkomů vyžaduje komplexní přístup a léčbu, pokud možno od začátku v komplexním onkologickém centru. Nutností je vždy předoperační biopsie.

### Klíčová slova

sarkom – resekce

### Summary

**Background:** Mesenchymal malignancies are relatively rare tumors with distinct behaviors that are usually surgically removal. However, it is sometimes impossible to perform such surgery according to standardized procedures. In particular, surgical removal of intraperitoneal and retroperitoneal tumors differs among individuals. **Case reports:** We present two cases with intra-abdominal and retroperitoneal sarcomas who were treated at our comprehensive oncology center. The first patient was a 36-year-old male who was initially diagnosed with a tumor in the subrenal space that measured 95 × 90 × 140 mm, contacted the inferior vena cava and right kidney, and had the same blood supply as the upper pole of the right kidney. Primary histological analysis indicated that the tumor was a schwannoma. After further examinations, the tumor was removed and the right kidney was preserved. A ganglioneuroblastoma was diagnosed based on definitive histological analysis. Adjuvant radiotherapy was administered to the tumor bed. The patient is disease-free at 1 year after resection. The second patient was a 52-year-old male who was diagnosed with a liposarcoma in the retroperitoneal space that measured 50 × 36 × 15 cm and weighed 14 kg upon resection. Resection involved left-side nephrectomy and adrenalectomy. Adjuvant chemotherapy with IFO/ADM was administered. A recurrence in the tumor bed was resected 31 months after the primary resection. Three new foci appeared in the retroperitoneal space after another 18 months and were removed. Another recurrence in the left funiculus was removed after a further 6 months. The patient has been disease-free for 3 months. **Conclusions:** Treatment of soft tissue sarcoma is complex and should be performed at a comprehensive oncology center if possible. Preoperative biopsy is essential.

### Key words

sarcoma – surgical procedures

Podpořeno MZ ČR-RVO (MOÚ,00209805).

Supported by MZ ČR-RVO (MOÚ,00209805).

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 zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. MUDr. Vuk Fait, CSc.

Oddělení chirurgické onkologie

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: inbox@vukfait.com

Obdrženo/Submitted: 6. 3. 2018

Přijato/Accepted: 20. 3. 2018

doi: 10.14735/amko2018230

## Úvod

Sarkomy jsou v rámci malignit v ČR vzácná onemocnění, představují 0,78 % ze všech zhoubných nádorů. Roční incidence tohoto onemocnění je 4–5 pacientů na 100 000 obyvatel. Z výsledků Národního onkologického registru (NOR) vyplývá, že pacienti s nově diagnostikovaným sarkomem jsou primárně operováni na pracovištích komplexních onkologických center (KOC) pouze v 53,9 %.

Sarkomy jsou značně heterogenní skupinou nádorů, u kterých je ve většině případů radikální chirurgické řešení metodou první volby, kdy je sarkom resekován s bezpečnostním lemem do zdravé tkáně [1]. Sarkomy bývají často ohraničeny pseudopouzdem, které je tvořeno odtlačenou vazivovou tkání. V okolí tohoto pseudopouzdra pak můžeme nalézt satelitní ložiska. Indikována je široká excize, v ideálním případě odstranění celého kompartmentu. Existence satelitních ložisek v okolí pseudopouzdra sarkomu závisí rovněž na histologické povaze nádoru. U nízké maligních nádorů bývá indikováno odstranění tumoru s neporušeným pseudopouzdem. Tento postup ale není dostatečný u agresivních (high-grade) nádorů. Zde nemusí být bezpečný ani lem 1 cm „makroskopicky zdravé“ tukové tkáně [2].

Dalším problémem, který u pacientů se sarkomy pozorujeme, je výskyt skip ložisek. Jsou to mikroskopická či makroskopická ložiska, která nacházíme ve stejném či protilehlém kompartmentu. Typickým příkladem je nálezy recidivy perirenálního liposarkomu u kontralaterální ledviny.

Dosažení dostatečného bezpečnostního lemu je v retroperitoneu mnohdy technicky náročné dodržet vzhledem k časté lokalizaci nádorů u magistralních cév a dalších orgánů, což může ústít v R1, v horším případě R2 resekce.

Je třeba zmínit výjimky, kdy je primárně indikovaná nechirurgická léčba. Sem patří především Ewingův sarkom a rhabdomyosarkom, kdy je primárně indikována indukční chemoterapie.

Velmi častým problémem v léčbě sarkomů dutiny břišní, pánve a retroperitonea je jejich relativně pozdní diagnostika. To přirozeně nastává v důsledku časté nepřítomnosti klinických příznaků u pacientů s tímto onemocněním. Sarkomy bývají mnohdy diagnostikovány až ve značně pokročilém stadiu onemocnění či až dosáhnou enormních rozměrů [3].

V Masarykově onkologickém ústavu (MOÚ) jsme mnohdy nuceni do rerekceci recidiv sarkomů po předchozích

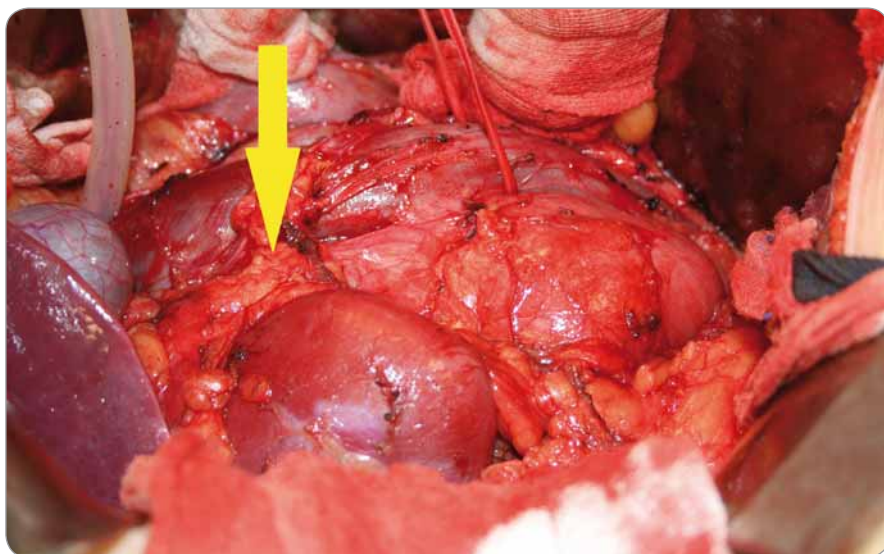
onkologicky neradikálních resekcích, které velmi často proběhly bez předchozí histologické verifikace. Tyto rerekce jsou technicky možné, ale velmi náročné kvůli nepřehlednosti operačního pole po předchozí revizi a častému prorůstání do okolních orgánů. Dosažení R0 resekce je pak složitější, což má pro další osud pacienta zcela zásadní význam [4,5]. Přesto i opakované resekce sarkomů jsou technicky možné, pokud to dovoluje lokalizace recidivy a klinický stav pacienta. Jsou pacienti, kteří z opakovaných chirurgických intervencí jednoznačně profitují. Pacientů, kterým byl na jiném pracovišti diagnostikován sarkom a kteří byli následně odesláni k primárnímu řešení do MOÚ, je menšina. Přitom právě tito pacienti nejvíce profitují ze správně vedené léčby.

## Kazuistika 1

Pacient (36 let) se dostavil na chirurgickou ambulanci spádové nemocnice pro bolesti v bederní krajině. Po klinickém vyšetření bylo doplněno ultrazvukové vyšetření břicha, kde byla popsána expanze 9 × 10 cm v pravém subrenálním prostoru. Na základě ultrazvukového nálezu bylo doplněno CT (obr. 1). Zde byl nalezen tumor pravého retroperitonea mezi ledvinou, páteří a dolní dutou žilou



**Obr. 1.** CT snímky pacienta s primárně diagnostikovaným ganglioneuroblastomem retroperitonea vpravo. Pacient podstoupil nejprve biopsii z retroperitoneálního tumoru a následně dle výsledku histologie byla indikována chirurgická resekce.

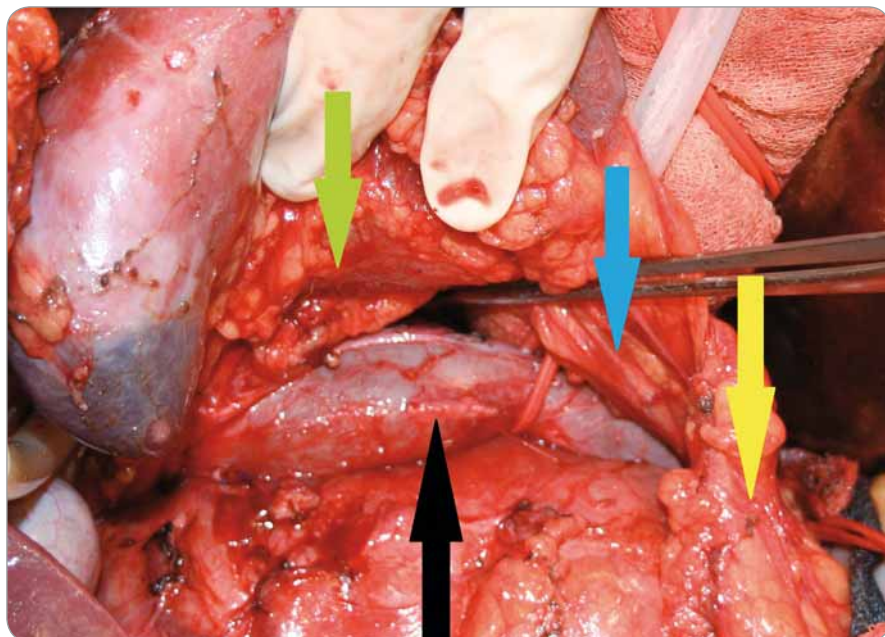


**Obr. 2.** Peroperační nálezy u pacienta s ganglioneuroblastomem retroperitonea. Na snímku je patrná lokalizace tumoru za pravou ledvinou, mediální porce nádoru zasahuje za zadní stěnu dolní duté žíly v celém jejím infrarenálním průběhu, je vypreparovaný aberrantní cévní svazek k dolnímu pólu pravé ledviny, který je uložen překaválně (na snímku označený žlutou šipkou).

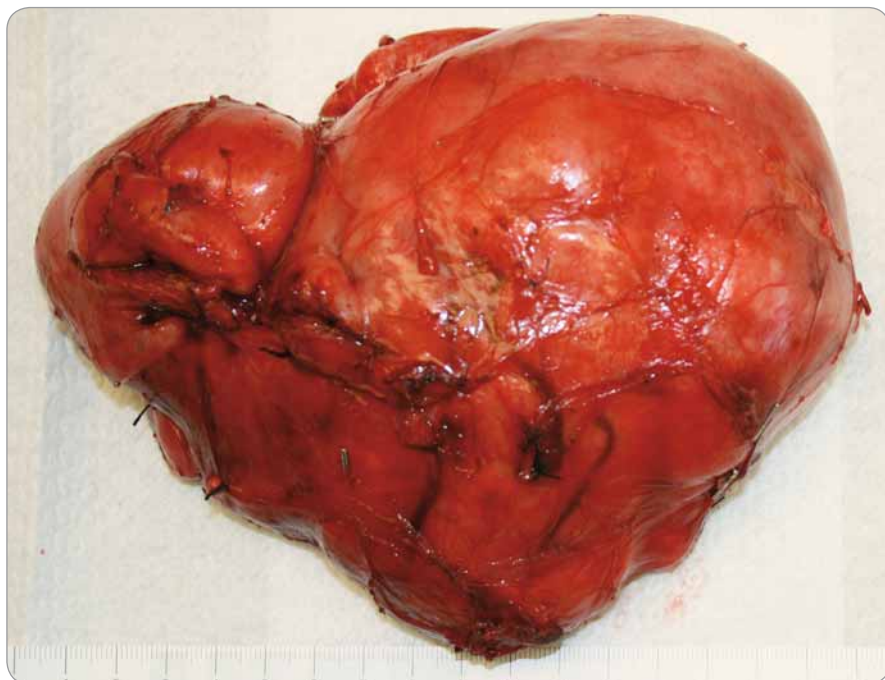
s rozměry 95 × 90 × 140 mm. Nádor náležal na dolní dutou žílu, splýval s mucus psoas maior a byl v těsném kontaktu s pravou ledvinou. S těmito výsledky byl pacient odeslán na konziliární ambulanci MOÚ. Případ byl probrán v komisi pro měkkotkáňové sarkomy. Bylo doplněno CT mediastina a plic, kde nebyl shledán patologický nálezy, a provedena histologická verifikace, která proběhla cestou punkční biopsie pod CT kontrolou s výsledkem schwannom. Byla indikována chirurgická revize, před níž byla doplněna funkční scintigrafie ledvin (FSL) a MRI vyšetření distální hrudní a bederní páteře k vyloučení dalších, byť i drobných schwannomů. Na FSL byla funkce ledvin v normě, podíl na celkové funkci byl 51 : 49 % ve prospěch levé ledviny. Na MRI vyšetření nebyla popsána žádná další tumorózní rezistence paravertebrálně, samotný tumor pak byl lokalizován v retroperitoneu prevertebrálně, retrokaválně vpravo od Th12 po L4 s menší porcí nádoru jdoucí retroaortálně těsně pod odstupem renálních cév. Při samotné operaci byla nejprve od tumoru odpreparována pravá ledvina. Ledvina měla aberantní cévní zásobení dolního pólu, cévní svazek byl lokalizován prekaválně. Arteria renalis pak měla zvyklý retrokavální průběh (obr. 2, 3). Následně byl resekován tumor se zachováním pravé ledviny, vena cava inferior byla v celém infrarenálním průběhu odpreparována od tumoru, byly přerušeny přímé spojky jdoucí z tumoru do zadní stěny dolní duté žíly a kompletně zresekován retroaortální výběžek nádoru (obr. 4). V dorzální části nádor denně adheroval k druhému a třetímu bedernímu obratli. Definitivní histologie potvrdila ganglioneuroblastom. Vzhledem k těsným okrajům resekátu v jeho dorzální části u těl L2 a L3 byla indikována pooperační radioterapie na rizikovou oblast lůžka po resekci nádoru. Následně je pacient dispenzarizován. Na posledním CT, které proběhlo rok od operace, je pacient bez známek recidivy onemocnění.

### Kazuistika 2

Pacient (52 let) se dostavil na chirurgickou ambulanci sektorové nemocnice pro bolesti břicha, zvýšenou plynatost



Obr. 3. Na snímku je patrná pravá ledvina odpreparovaná od tumoru, je vidět cévní svazek arteria renalis jdoucí retrokaválně (zelená šipka), rovněž i aberantní cévní svazek pro dolní pól ledviny jdoucí prekaválně (modrá šipka). Samotný tumor se zatím nachází ve své mediální porci za dolní dutou žílou (černá šipka). Ureter je označený žlutou šipkou.



Obr. 4. Stav po resekci tumoru se zachováním pravé ledviny, vena cava inferior byla v celém infrarenálním průběhu odpreparována od tumoru, byly přerušeny přímé spojky jdoucí z tumoru do zadní stěny dolní duté žíly a zresekována retroaortální porce nádoru.

a zvětšování obvodu břicha. Už při klinickém vyšetření byla hmatná masivní tumorózní rezistence. Bylo doplněno akutně CT vyšetření břicha (obr. 5). Zde byla popsána enormní tumorózní rezistence

30 × 40 × 15 cm vyplňující kompletně levé retroperitoneum, levou část peritoneální dutiny a pravý podbříšek, infiltrující levou ledvinu. Levá nadledvina byla do tumoru zavzata částečně





Obr. 5. CT snímky pacienta s enormním liposarkomem retroperitonea.

a levá polovina tlustého střeva byla odtlačena ventrálně. Pacient byl odeslán na konziliární ambulanci MOÚ.

Případ byl probrán na komisi pro měkkotkáňové sarkomy. Byla doplněna biopsie pod CT kontrolou a doplněno CT mediastina a plic. Nález na CT plic byl negativní, výsledek histologie z punkční biopsie byl liposarkom retroperitonea. Bylo doplněno FSL, kde levá ledvina byla hypofunkční, podíl na celkové funkci byl 77 : 23 % ve prospěch pravé

ledviny. Nádor se i přes svou enormní velikost nejevil inoperabilní, bylo indikováno chirurgické řešení. Nádor byl resekován *in toto* s levostrannou nefrektomií a adrenalectomií, levá polovina tlustého střeva vč. jeho cévního zásobení nebyla nádorem infiltrována a bylo ji možné od nádoru odpreparovat (obr. 6, 7). Celkové rozměry nádoru byly 50 × 36 × 15 cm a nádor vážil 14 kg. Celý nádor byl kryt neporušeným jemným vazivovým pouzdrmem, histologie potvrdila původní diagnózu G2 liposarkomu retroperitonea.

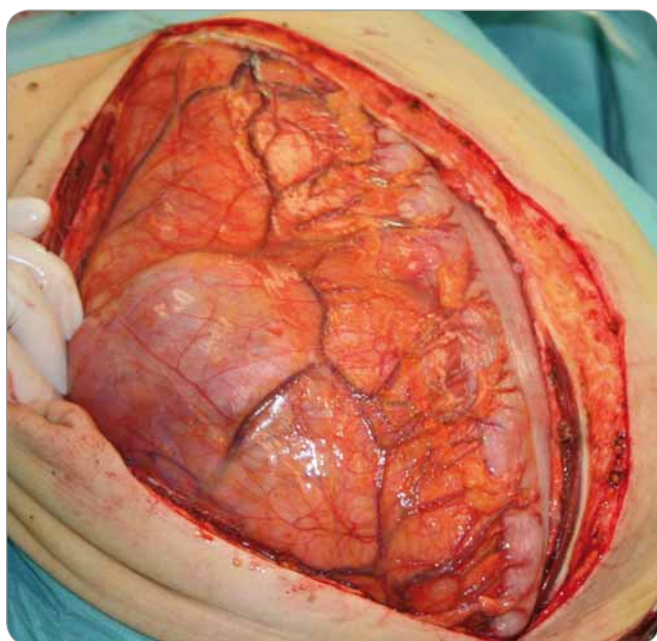
Na časném kontrolním CT vyšetření břicha byl nález suspektní recidivy onemocnění, pro které byla indikována paliativní chemoterapie režimem IFO/ADM (ifosfamid s doxorubicinem). Pooperační radioterapie nebyla indikována vzhledem k enormnímu rozsahu ozařovaného pooperačního pole a možné lézi klíček tenkého střeva. Dále probíhaly pravidelné kontroly. Po 31 měsících od operace byla na kontrolním CT vyšetření nalezena recidiva onemocnění v lůžku po nefrektomii velikosti 16 × 12 × 18 cm. Doplnující CT mediastina a plic bylo bez známek recidivy onemocnění. Byla indikována operační revize.

Při revizi byla resekována recidiva sarkomu v retroperitoneu vlevo a zresekovány 4 další drobné satelity, které ne-

byly na CT patrné. Všechny tumory byly kryty jemným neporušeným pseudo-pouzdrmem a výsledná histologie potvrdila předchozí diagnózu G2 liposarkomu retroperitonea. Další chemoterapie nebyla indikována.

Celkem 18 měsíců od této operace byla na CT břicha nalezena další recidiva. Po vyloučení diseminace onemocnění do plic byla resekována tři nová ložiska liposarkomu. Jedna porce nádoru byla v oblasti Treitzova vazy, další v oblasti musculus psoas maior vlevo a další ve vstupu do tříselného kanálu. Výsledná histologie byla identická s předchozími – G2 liposarkom retroperitonea, nádor byl kryt neporušeným pouzdrmem, resekce byla stejně jako všechny předchozí R0. Pooperační chemoterapie nebyla indikována.

A konečně 6 měsíců od poslední operace byla na CT zjištěna další recidiva v oblasti semenného provazce vlevo. Po vyloučení diseminace do plic byla zresekována recidiva onemocnění a odebrána diagnostická excize z okolní „makroskopicky zdravé“ tukové tkáně. Obě výsledné histologie prokazují G2 liposarkom retroperitonea. Dále bylo indikováno sledování pacienta. Na časném CT 3 měsíce od poslední operace nejsou známky CT verifikovatelné recidivy onemocnění.



Obr. 6. Pooperační nález po provedení laparotomie.



Obr. 7. Přerušování cévního svazku levé ledviny staplerem.

## Diskuze

V péči o pacienty s histologicky verifikovaným sarkomem či u pacientů, u kterých bylo vysloveno podezření na toto onemocnění, je pro pacienta zcela zásadní multioborová spolupráce. Vzhledem ke komplexnosti problematiky a raritnímu výskytu tohoto onemocnění je nutné léčbu těchto pacientů soustředit v onkologických centrech. Jen tak je možné zlepšení prognózy těchto pacientů. MOÚ má status sarkomového centra při EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer).

Každý pacient s diagnostikovaným sarkomem či jeho recidivou by měl být projednán specializovanou komisí, jejímiž členy jsou chirurg znalý problematiky tohoto onemocnění, klinický onkolog, patolog, radioterapeut, radiolog, hrudní chirurg, ortoped a lékaři dalších specializací v souvislosti s lokalizací tumoru, v neposlední řadě i psycholog.

Je nutné opakovaně zdůraznit, že u každé tumorózní léze nejasné etiologie je primárně indikována biopsie k histologické verifikaci, pokud je technicky možná. Přesněji je biopsie indikována u každé povrchové léze větší než 5 cm a u hluboce uložené léze jakékoliv velikosti, tedy u všech nitrobřišních mas. Najdou se i zcela výjimečné případy, při kterých je biopsie retroperitoneálního tumoru kontraindikována. Jako příklad uvádíme pacientku, která byla do našeho ústavu odeslána k operaci pro cystický tumor retroperitonea. Pomocí neinvazivních metod jsme u pacientky diagnostikovali rozsáhlou echinokokovou retroperitoneální cystu a pacientku předali do péče infekcionista. Proto je velmi vhodné předat pacienta s nově diagnostikovanou lézí nejasné etiologie, kde bylo vysloveno podezření na sarkom (ať už se nachází na končetinách, v retroperitoneu, v pánvi, hrudníku či na krku), na specializované pracoviště, kde mají s diagnostikou a léčbou této raritní diagnózy v rámci naší malé země co možná největší zkušenosti.

I samotná histologická verifikace s sebou nese riziko možných komplikací. Rozsah těchto komplikací, způsob jejich řešení a jejich následné ovlivnění léčby pacienta přesahuje rámec tohoto sdělení.

Nebyla-li patologická diagnóza stanovena v rámci některého z KOC, pak je vhodné požadovat druhé čtení histologie patologem specializujícím se na sarkomy.

Až na výjimky je v léčbě měkkotkáňových sarkomů radikální chirurgické řešení léčbou první volby, jde o jedinou metodu s kurativním potenciálem. Naprosto zásadní je pro pacienta dosažení R0 resekce. Výkony v dutině břišní a retroperitoneu si často vyžadují kooperaci chirurga, cévního chirurga, gynekologa a urologa. V některých případech, které vycházejí z velikosti tumoru, jeho lokalizace a histologie, je před samotné operační řešení předřazena neadjuvantní chemoterapie či radioterapie [6]. Cílem je dosažení bezpečné R0 resekce. Často jsou však sarkomy verifikovány, až dosáhnou extrémní velikosti/hmotnosti. Jejich odstranění pak vyžaduje složité multiviscerální resekce, jejichž rozsah je dán velikostí tumoru a především jeho lokalizací. Dosažení R0 resekce je mnohdy technicky značně problematické vzhledem k těsnému kontaktu s magistralními cévami a nervovými plexy [7]. Po provedené resekci zůstává v dutině břišní a retroperitoneu resekční plocha enormních rozměrů, ze které hrozí pooperační krvácení. Jedná se o náročné zákroky, které i přes pokroky v perioperační péči zůstávají zatíženy vyšší morbiditou a mortalitou, nejčastěji v důsledku krvácení, sepse až multiorgánového selhání. V širších souvislostech pak mohou vyšší krevní ztráty negativně ovlivnit i samotnou prognózu zhoubného onemocnění. Mají i negativní ekonomické dopady vč. prodloužení doby hospitalizace. Pro minimalizaci rizika peroperačního a pooperačního krvácení používáme kombinace přístrojů a technik umožňující dosažení co nejlepší hemostázy. Standardně používáme na krytí resekční plochy hemostyptika na bázi oxidované celulózy. Nejčastějším námi používaným hemostyptikem v této indikaci je Traumacel FAM vzhledem k jeho ověřeným účinkům, biologickým vlastnostem, snadné dostupnosti v různých velikostech i ekonomické výhodnosti ve srovnání s dalšími materiály.

## Závěr

Jedná se o raritní onemocnění, které ale v poslední době vykazuje stoupající in-

cidenci. Dílem je to v důsledku výskytu sekundárních poradiačních sarkomů u pacientů, kteří v minulosti prodělali radioterapii pro jiné nádorové onemocnění. Tento nárůst vedl již v minulosti ke změně ozařovacích technik. V léčbě sarkomů stále narážíme na případy, kdy bylo primárně přistoupeno k chirurgické resekci nádoru bez předchozí histologické verifikace či řádného dalšího došetření. Výsledkem jsou pak mnohdy neradikální resekce R1 v lepším případě či v horším R2. Tito pacienti pak bývají předáváni do onkologických center k další terapii, která je pak značně problematická. Právě primární radikální resekce R0 po předchozí histologické verifikaci je pro osud pacientů zcela zásadní. Někdy je technicky možná R0 resekce, jindy pak přistupujeme až k resekci recidivy. Nejčastějším limitujícím faktorem při operacích sarkomů dutiny břišní, pánve a retroperitonea je těsná afinita či prorůstání tumoru do okolních orgánů či magistralních cév. Vzhledem k raritě tohoto onemocnění je vhodné předat pacienty se sarkomy do několika málo center v naší republice specializujících se na léčbu sarkomů, která se nyní ustanovují.

## Literatura

1. Singer S, Antonescu CR, Riedel E et al. Histologic subtype and margin of resection predict pattern of recurrence and survival for retroperitoneal liposarcoma. *Ann Surg* 2003; 238(3): 358–370. doi: 10.1097/01.sla.0000086542.11899.38.
2. Tan MC, Yoon SS. Surgical management of retroperitoneal and pelvic sarcomas. *J Surg Oncol* 2015; 111(5): 553–561. doi: 10.1002/jso.23840.
3. Bonvalot S, Raut CP, Pollock RE et al. Technical considerations in surgery for retroperitoneal sarcomas: position paper from ESurge, a master class in sarcoma surgery, and EORTC-STBSG. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(9): 2981–2991. doi: 10.1245/s10434-012-2342-2.
4. Gyorki DE, Brennan MF. Management of recurrent retroperitoneal sarcoma. *J Surg Oncol* 2014; 109(1): 53–59. doi: 10.1002/jso.23463.
5. van Dalen T, Hoekstra HJ, van Geel AN et al. Locoregional recurrence of retroperitoneal soft tissue sarcoma: second chance of cure for selected patients. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27(6): 564–568. doi: 10.1053/ejso.2001.1166.
6. Gronchi A, De Paoli A, Dani C et al. Preoperative chemoradiation therapy for localised retroperitoneal sarcoma: a phase III study from the Italian Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2014; 50(4): 784–792. doi: 10.1016/j.ejca.2013.11.021.
7. Bonvalot S, Rivoire M, Castaing M et al. Primary retroperitoneal sarcomas: a multivariate analysis of surgical factors associated with local control. *J Clin Oncol* 2009; 27: 31–37. doi: 10.1200/JCO.2008.18.0802.

# Aktuality z odborného tisku

## Cancer Immunotherapy Efficacy and Patients' Sex: A Systematic Review and Meta-analysis

Conforti F, Pala L, Bagnardi V et al.

*Lancet Oncol* 2018. pii: S1470-2045(18)30261-4. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30261-4.



Navzdory uznávanému dimorfizmu pohlaví, je málo dostupných dat týkajících se odpovědi imunitního systému a účinnosti checkpoint inhibitorů u mužů a žen. V této analýze autoři publikují systematický přehled hodnocení heterogenity efektu těchto inhibitorů mezi jednotlivými pohlavími, který byl získán prohledáváním databází PubMed, MEDLINE, Embase a Scopus do 30. listopadu 2017. Byly analyzovány randomizované kontrolované studie inhibitorů kontrolního bodu (inhibitory PD-1, CTLA-4 nebo obojí), které měly dostupné údaje poměru rizik (hazard ratio – HR) pro úmrtí podle pohlaví pacienta. Současně byla vyhodnocena i abstrakta a prezentace ze všech významných konferencí, vyřazeny byly nerandomizované studie. Primárním cílovým ukazatelem bylo vyhodnocení rozdílu v účinnosti checkpoint inhibitorů mezi muži a ženami. Ze 7 133 studií bylo 20 způsobilých randomizovaných kontrolovaných studií s léky ipilimumab, tremelimumab, nivolumab nebo pembrolizumab, které uváděly celkové přežití (overall survival – OS) podle pohlaví pacienta. Celkově bylo do analýzy zahrnuto 11 351 pacientů s pokročilým nebo metastatickým karcinomem (7 646 (67 %) mužů a 3 705 (33 %) žen). Nejčastějšími typy onemocnění byly melanom (3 632 (32 %)) a nemalobuněčný karcinom plic (non-small-cell lung cancer – NSCLC) (3 482 (31 %)). HR pro souhrnnou celkovou dobu přežití byl 0,75 (95% CI 0,65–0,79) u mužských pacientů léčených checkpoint inhibitory ve srovnání s muži léčenými v kontrolních skupinách. U žen byl HR OS ve srovnání s kontrolními skupinami 0,86 (95% CI 0,79–0,93). Rozdíl v účinnosti mezi muži a ženami léčenými checkpoint inhibitory byl statisticky významný ( $p = 0,0019$ ). Inhibitory kontrolních bodů mohou zlepšit OS u pacientů s pokročilým onkologickým onemocněním, jako je melanom a NSCLC, ale zdá se, že velikost přínosu závisí na pohlaví. Analýza zjistila ještě další skutečnost, a to je poměrně malý počet žen zařazených do studií s těmito léky, které tvoří asi 1/3 ze všech zařazených nemocných. Budoucí výzkum by měl vést k většímu zapojení žen do studií a soustředit se na zlepšení účinnosti imunoterapie u žen zkoumáním různých imunoterapeutických přístupů u obou pohlaví.

## Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma

Eggermont AM, Blank CU, Mandala M et al.

*N Engl J Med* 2018; 378(19): 1789–1801. doi: 10.1056/NEJMoa1802357.



Pembrolizumab prodlužuje přežití bez progresu a celkové přežití u pacientů s pokročilým maligním melanomem. V této dvojité zaslepené studii fáze III byl hodnocen efekt pembrolizumabu jako adjuvantní léčby u pacientů s resektabilním vysoce rizikovým melanomem stadia III. Pacienti s kompletně resektovaným melanomem stadia III byli randomizováni do ramene s podáním 200 mg pembrolizumabu (514 pacientů) nebo placeba (505 pacientů) intravenózně každé 3 týdny celkem 18 dávek (přibližně 1 rok) nebo do progresu či nepřijatelné toxicity. Při mediánu sledování 15 měsíců byl pembrolizumab spojen se signifikantně delším přežíváním bez známek recidivy než placebo (1letá míra přežití bez recidivy 75,4 % (95% CI 71,3–78,9) vs. 61,0 % (95% CI 56,5–65,1;  $p < 0,001$ ). U PD-L1-pozitivních nádorů bylo přežití bez známek recidivy také vyšší ve skupině s pembrolizumabem proti placebu (1letá míra přežití bez recidivy 77,1 % (95% CI 72,7–80,9) ve skupině s pembrolizumabem a 62,6 % (95% CI 57,7–67,0) ( $p < 0,001$ ) ve skupině s placebem. Nežádoucí účinky stupňů 3–5, byly hlášeny u 14,7 % pacientů ve skupině s pembrolizumabem a u 3,4 % pacientů ve skupině s placebem. U skupiny s pembrolizumabem bylo zaznamenáno jedno úmrtí související s léčbou v důsledku myozitidy. U pacientů s vysoce rizikovým melanomem prokázal pembrolizumab v adjuvantním podání delší přežití bez známek recidivy proti placebu.

## Postoperative Concurrent Chemoradiotherapy Versus Postoperative Radiotherapy in High-risk Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: The Randomized Phase III TROG 05.01 Trial

Porceddu SV, Bressel M, Poulsen MG et al.

*J Clin Oncol* 2018; 36(13): 1275–1283. doi: 10.1200/JCO.2017.77.0941.



Cílem analýzy bylo zjistit, zda přidání souběžné chemoterapie k pooperační radioterapii zlepšilo lokoregionální kontrolu u pacientů s vysoce rizikovým skvamózním karcinomem hlavy a krku. Do studie byly randomizováni pacienti po kurativním zákroku a následné radioterapii v dávce mezi 60 až 66 Gy (6–6,5 týdne) s nebo bez týdenního podání karboplatiny (AUC 2).

Celkem 310 pacientů bylo léčeno radioterapií z toho pouze radioterapií 157, kombinací s chemoterapií 153 nemocných. Medián sledování byl 60 měsíců. Míra lokoregionálních relapsů ve 2 a 5 letech byla 88 % (95% CI 83–93) a 83 % (95% CI 77–90) pro pacienty s radioterapií a 89 % (95% CI 84–94) a 87 % (95% CI 81–93; HR 0,84; 95% CI 0,46–1,55;  $p = 0,58$ ) u pacientů léčených i chemoterapií. Nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v čase do progresu a celkovém přežití. Léčba byla dobře tolerována v obou ramenech, bez pozorovaného zvýšení toxicity radioterapie s karboplatinou. Závěrem autoři uvádí, že nebyl pozorován žádný přínos přidáním týdenní karboplatiny k radioterapii u pacientů po chirurgickém výkonu pro vysoce rizikový spinocelulární karcinom hlavy a krku.

### Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-sensitive Prostate Cancer: Long-term Survival Analysis of the Randomized Phase III E3805 CHARTED Trial

Kyriakopoulos CE, Chen YH, Carducci MA et al.

*J Clin Oncol* 2018; 36(11): 1080–1087. doi: 10.1200/JCO.2017.75.3657.



Docetaxel přidáný k androgen deprivaci (androgen deprivation therapy – ADT) významně prodlužuje celkové přežití (overall survival – OS) některých pacientů s metastatickým hormonálně citlivým karcinomem prostaty. V této analýze jsou hodnoceny výsledky studie CHARTED, zaměřené na objem vlastního nádoru. Ve studii bylo analyzováno 790 pacientů s metastazujícím hormonálně senzitivním karcinomem prostaty a randomizováno k léčbě ADT v kombinaci s docetaxelem 75 mg/m<sup>2</sup> do šesti cyklů nebo k samotnému podání ADT. Primárním cílem studie bylo OS. Průměrná doba OS byla 57,7 měsíce pro rameno chemohormonální terapie oproti 47,2 měsíce pro samotnou ADT (HR 0,72; 95% CI 0,59–0,89;  $p = 0,0018$ ). U pacientů s vysokým objemem onemocnění ( $n = 513$ ) byl medián OS 51,2 měsíce s chemohormonální terapií oproti 34,4 měsíce s ADT samotnou (HR 0,63; 95% CI 0,50–0,79;  $p < 0,001$ ). U osob s malým objemem onemocnění ( $n = 277$ ) nebyl pozorován žádný přínos v OS (HR 1,04; 95% CI 0,70–1,55;  $p = 0,86$ ). Závěrem lze tedy říci, že klinický přínos chemohormonální léčby při prodloužení OS byl potvrzen u pacientů s velkým objemem onemocnění, u pacientů s malým objemem onemocnění však žádný přínos v OS nebyl zjištěn.

### PERSEPHONE: 6 Versus 12 Months (m) of Adjuvant Trastuzumab in Patients (pts) with HER2 Positive (+) Early Breast Cancer (EBC): Randomised Phase 3 Non-inferiority Trial with Definitive 4-year (yr) Disease-free Survival (DFS) Results

Earl HM, Hiller L, Vallier AL et al.

*J Clin Oncol* 2018; 36 (Suppl): abstr. 506.



Adjuvantní podání trastuzumabu prokázalo efekt u pacientek s časným HER2 pozitivním karcinomem prsu, podávání v délce 12 měsíců však bylo empiricky přijato z klíčových registračních studií. Kratší doba podávání by mohla snížit toxicitu a náklady a zároveň poskytnout podobnou účinnost. PERSEPHONE je randomizovaná studie fáze III porovnávající 6- a 12měsíční podání trastuzumabu u pacientek s HER2 pozitivním časným karcinomem prsu testující non-inferioritu 6měsíčního podání, do níž bylo randomizováno 4 089 nemocných v období říjen 2007 až červenec 2015. ER pozitivních bylo 69 % pacientek, chemoterapií na bázi antracyklinů bylo léčeno 41 %, kombinací léčby antracyklin a taxan 49 %, 10 % pacientek dostávalo chemoterapii na bázi taxanů, adjuvantní chemoterapii absolvovalo celkem 85 % nemocných a sekvenční trastuzumab 54 %. Při mediánu sledování 4,9 roku bylo zaznamenáno 319 (8 %) úmrtí a 500 (12 %) recidiv. Při 4letém DFS ve výši 89 % (95% CI 88–91) byl v obou ramenech limit non-inferiority poměru rizika (hazard ratio – HR) nastaven na 1,29. Výpočet HR byl 1,05 (95% CI 0,88–1,25, 95. percentil = 1,22) demonstrující non-inferioritu (HR < 1,29) 6měsíčního podání trastuzumabu ( $p = 0,01$ ). Počet srdečních příhod byl snížen při 6měsíčním podávání (4 vs. 8 % při 12měsíční aplikaci;  $p < 0,0001$ ). Studie PERSEPHONE prokázala, že 6 měsíců podání trastuzumabu je non-inferiorní vůči 12měsíční aplikaci. Tyto výsledky tak podporují možnost snížení standardního trvání léčby adjuvantním trastuzumabem na dobu 6 měsíců.

Články vybrala a komentovala

MUDr. Jana Halámková, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

Redakce časopisu **Klinická onkologie** vypisuje

# SOUTĚŽ O NEJLEPŠÍ PRÁCI

v kategoriích:

**Původní práce**  
**Přehled**  
**Kazuistika**

## **Podmínky soutěže:**

1. Do soutěže budou automaticky zařazeny všechny práce publikované v řádných číslech v roce 2018.
2. Práce budou hodnoceny členy redakční rady.
3. Hlavními kritérii hodnocení budou odborná úroveň, originalita a přínos zveřejněných údajů.
4. Výsledky soutěže budou vyhlášeny v časopise *Klinická onkologie* 1/2019.

**Nejlepší práce v každé kategorii bude oceněna částkou 10 000 Kč.**

Instrukce pro autory naleznete na internetových stránkách České onkologické společnosti ČLS JEP [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz) nebo na stránkách [www.klinickaonkologie.cz](http://www.klinickaonkologie.cz).  
Dotazy můžete zasílat na adresu [klinickaonkologie@mou.cz](mailto:klinickaonkologie@mou.cz) a své příspěvky vkládat do redakčního systému časopisu *Klinická onkologie* <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>.

## **Proč publikovat v časopise *Klinická onkologie*?**

Vaše práce budou dohledatelné ve 4 renomovaných světových bibliografických databázích MEDLINE/PubMed, EMBASE/Excerpta Medica, SCOPUS, Index Copernicus a tuzemské databázi Bibliographia medica čechoslovaca.

Vaše práce budou uznávány při hodnocení grantů, pro obhajoby doktorského studia a pro habilitační a profesorské řízení.

Vaše práce budou čteny. Časopis *Klinická onkologie* patří k nejčtenějším onkologickým časopisům!

Partner



# KLINICKÁ ONKOLOGIE

Časopis České onkologické společnosti a Slovenskej onkologickej spoločnosti  
The Journal of the Czech and Slovak Oncological Societies

## REDAKČNÍ RADA

### Výkonná redakční rada (Brno)

#### vedoucí redaktor

doc. MUDr. Vuk Fait, CSc.

MUDr. Petr Čoupek  
doc. MUDr. Lenka Foretová, Ph.D.  
prof. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.

#### výkonný redaktor

doc. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

MUDr. Ivo Kocák, Ph.D.  
MUDr. Rudolf Nenutil, CSc.  
MUDr. Jiří Novák

doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.  
doc. RNDr. Sabina Ševčíková, Ph.D.  
prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.

### Širší redakční rada

prof. MUDr. Zdeněk Adam, CSc., Brno  
doc. MUDr. Igor Andrašina, CSc., Košice  
doc. MUDr. Soňa Balogová, Ph.D., Bratislava  
MUDr. Otakar Bednařík, Brno  
doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D., Praha  
prof. MUDr. David Cibula, CSc., Praha  
MUDr. Karel Cwiertka, Ph.D., Olomouc  
doc. MUDr. Luboš Drgoňa, CSc., Bratislava  
doc. MUDr. Ladislav Dušek, Ph.D., Brno  
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc., Praha  
doc. MUDr. David Feltl, Ph.D., Ostrava  
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Olomouc  
prof. MUDr. Roman Hájek, CSc., Ostrava  
MUDr. Jana Halámková, Ph.D., Brno

prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., Praha  
doc. MUDr. Alexandra Kolenová, Ph.D., Bratislava  
assoc. prof. Jeong Eon Lee, M.D., Ph.D., Seoul  
prof. MUDr. Jiří Mayer, CSc., Brno  
prof. MUDr. Michal Mego, DrSc., Bratislava  
prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D., Olomouc  
prof. MUDr. Beata Mladosičová, CSc., Bratislava  
doc. MUDr. Jan Novotný, Ph.D., Praha  
prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc., Bratislava  
doc. RNDr. Martina Ondrušová, Ph.D., MPH, Bratislava  
prof. Yeon Hee Park, M.D., Ph.D., Seoul  
prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc., Praha  
prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D., Brno  
doc. MUDr. Luděk Pour, Ph.D., Brno

doc. MUDr. Igor Puzanov, Nashville  
prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc., Praha  
prof. MUDr. Miroslav Ryska, CSc., Praha  
prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D., Hradec Králové  
prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc., Brno  
prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D., Brno  
MUDr. Tomáš Svoboda, Ph.D., Plzeň  
MUDr. Tomáš Šálek, Bratislava  
prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D., Brno  
doc. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D., Brno  
prof. MUDr. Anna Vašků, CSc., Brno  
prof. MUDr. Jiří Vorlíček, CSc., dr. h. c., Brno  
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc., Brno  
doc. MUDr. Mária Wagnerová, CSc., Košice

### Čestní členové redakční rady

prof. MUDr. Josef Bilder, CSc., Brno  
prof. Sándor Eckhardt, Budapešť  
prof. MUDr. Ludovít Jurga, DrSc., Trnava  
doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc., Bratislava

prof. Jan Klasterský, Brusel  
prof. MUDr. Josef Koutecký, DrSc., Praha  
prof. RNDr. Jan Kovařík, DrSc., Brno  
prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc., Bratislava

doc. MUDr. Jozef Mardiak, CSc., Bratislava  
prof. MUDr. Zdeněk Mechl, CSc., Brno  
MUDr. Jaroslav Němec, CSc., Brno  
MUDr. Viliam Ujházy, DrSc., Bratislava

© Česká lékařská společnost Jana Evangelisty Purkyně, Praha 2018

## KLINICKÁ ONKOLOGIE

Vydává Česká lékařská společnost J. E. Purkyně.

Registrační značka MK ČR 5158. ISSN 0862-495X. ISSN pro on-line přístup 1802-5307.

On-line verze je přístupná na adrese [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz) nebo [www.klinickaonkologie.cz](http://www.klinickaonkologie.cz).

Časopis Klinická onkologie je uveden na Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR, schváleném Radou pro výzkum a vývoj vlády ČR.

Nakladatel: Ambit Media, a. s., Klicperova 604/8, 150 00 Praha 5-Smíchov, tel./fax: +420 222 352 573/572.

Odpovědná redaktorka: Mgr. Veronika Hrabalová, e-mail: [veronika.hrabalova@ambitmedia.cz](mailto:veronika.hrabalova@ambitmedia.cz).

Adresa redakce: Ambit Media, a. s., Media Hall, Bidláky 20, 639 00 Brno.

Grafická úprava: Karel Zlevor. Jazyková korektura: Mgr. Ivana Dachary.

Vychází 6krát ročně. Předplatné na rok 2017 činí 540 Kč (22 eur).

Informace o předplatném a objednávky předplatitelů: [www.centram.cz](http://www.centram.cz)

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá: Pavel Doležal, e-mail: [pavel.dolezal@ambitmedia.cz](mailto:pavel.dolezal@ambitmedia.cz), tel.: +420 602 632 349.

Rukopisy vkládejte do redakčního systému: <http://redakce.ambitmedia.cz/ko>; případně dotazy směřujte na e-mail [klinickaonkologie@mou.cz](mailto:klinickaonkologie@mou.cz)  
Redakce časopisu Klinická onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, e-mail: [klinickaonkologie@mou.cz](mailto:klinickaonkologie@mou.cz).

Pokyny pro autory naleznete na [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz) v sekci časopisu nebo na [www.klinickaonkologie.cz](http://www.klinickaonkologie.cz).

Toto číslo vychází 14. 6. 2018.

pro pacienty  
s HER2+ časným karcinomem prsu<sup>1</sup>

**JEDNA ŠANCE. VAŠE VOLBA.**

**JEJÍ BUDOUCNOST.**

**HERCEPTIN® 150 mg Základní informace o přípravku**

**Účinná látka:** trastuzumabum. **Držitel registračního rozhodnutí:** Roche Registration GmbH, Grenzach-Wyhlen Německo. **Registrační číslo:** EU/1/00/145/001.

**Indikace:** Léčba metastazujícího karcinomu prsu u pacientek, jejichž nádory ve zvýšené míře exprimují HER2 (human epidermal receptor 2): a) v monoterapii u pacientek, kteří byli pro své metastazující nádorové onemocnění již léčeni nejméně 2 chemoterapeutickými režimy; b) v kombinaci s paklitaxelem k léčbě pacientek, kteří nedostávali předchozí chemoterapii k léčbě metastatického nádorového onemocnění a pro něž léčba antracyklinem není vhodná; c) v kombinaci s docetaxelem k léčbě pacientek, kteří nedostávali předchozí chemoterapii k léčbě metastatického nádorového onemocnění; d) v kombinaci s inhibitory aromatázy k léčbě postmenopauzálních pacientek s metastatickým karcinomem prsu s pozitivitou hormonálních receptorů, dosud neléčených trastuzumabem. Léčba pacientek s HER2 pozitivním časným karcinomem prsu: a) po chirurgickém zákroku, chemoterapii (neoadjuvantní nebo adjuvantní) a radioterapii (pokud je to relevantní); b) po adjuvantní chemoterapii s doxorubicinem a cyklofosfamidem v kombinaci s paklitaxelem nebo docetaxelem; c) v kombinaci s adjuvantní chemoterapií obsahující docetaxel a karboplatinu; d) v kombinaci s neoadjuvantní chemoterapií s následným podáním přípravku Herceptin v adjuvantní léčbě při lokálně pokročilém onemocnění nebo nádoru >2 cm v průměru. Herceptin v kombinaci s kapecitabinem nebo 5-fluorouracilem a cisplatinou je indikován k léčbě nemocných s HER2-pozitivním metastazujícím adenokarcinomem žaludku nebo gastro-esofageálního spojení, kteří dosud nebyli léčeni pro metastazující onemocnění. **Kontraindikace:** Pacienti se známou přecitlivělostí na trastuzumab, myší proteiny nebo na některou z pomocných látek. Pacienti, kteří z důvodu komplikací spojených s pokročilým onkologickým onemocněním trpí klidovou dušností nebo vyžadují podpůrnou kyslíkovou terapii. **Upozornění:** Stanovení HER2 musí být provedeno ve specializované laboratoři při zajištění dostatečné validace testovacích postupů. Užití samotného Herceptinu je spojeno s určitým rizikem kardiotoxicity, současné podávání přípravku v kombinaci s antracykliny toto riziko zvyšuje. U nemocných, kterým byly antracykliny podávány v minulosti, je riziko kardiotoxicity nižší než při současném podávání. Bezpečnost pokračování léčby nebo opětovného zahájení léčby přípravkem u pacientů s projevy kardiotoxicity nebyla prospektivně hodnocena. Nicméně u většiny pacientů, u kterých došlo v pilotních studiích s přípravkem k rozvoji srdečního selhání, se klinický stav zlepšil po podání standardní léčby. U většiny pacientů se srdečními příznaky a prokázaným prospěchem z léčby se pokračovalo v týdenní terapii přípravkem Herceptin bez dalších klinických srdečních příhod. **Těhotenství:** Pokud pacientka otěhotní během léčby přípravkem Herceptin nebo během 7 měsíců po podání poslední dávky, nahláste prosím okamžitě těhotenství na kontakt Roche pro hlášení nežádoucích účinků czech\_republic.pa\_susar@roche.com či na 602 298 181. V průběhu těhotenství, při kterém byl plod vystaven účinku Herceptinu a během prvního roku života kojenice, budete požádáni o poskytnutí doplňujících informací. To umožní společnosti Roche lépe porozumět bezpečnostnímu profilu Herceptinu a poskytnout příslušné informace regulačním autoritám (SÚKL), zdravotnickým pracovníkům a dalším pacientům. **Klinicky významné interakce:** Studie lékových interakcí u lidí nebyly s přípravkem Herceptin prováděny. Riziko vzniku interakcí se současně užívanými přípravky proto nemůže být vyloučeno. Hlavní klinicky významné nežádoucí účinky při léčbě Herceptinem v monoterapii nebo v kombinaci s paklitaxelem byly příznaky hlášené ve spojení s podáním infuzí (obvykle po první infuzi přípravku) následující - hlavně horečka a/nebo třesavka, méně často nauzea, zvracení, bolest, ztuhlost, bolest hlavy, kašel, závratě, vyrážka, astenie, dušnost; zřídka hypotenze, hypertenze, bronchospasmus, tachykardie, dechová tíseň, angioedém; alergické a hypersenzitivní reakce. Některé z těchto reakcí mohou být závažné. Dalšími častějšími nežádoucími účinky byly bolesti břicha, astenie, bolest na hrudi, třesavka, horečka, bolest hlavy, nespecifikovaná bolest; průjem, nauzea, zvracení; artralgie, myalgie, vyrážka, vypadávání vlasů. Byly zaznamenány izolované případy závažných plicních příhod, které u několika případech vedly k úmrtí pacienta. Tyto příhody mohou být součástí reakcí spojených s podáním infuze nebo k jejich výskytu může dojít později po podání přípravku. U nemocných léčených přípravkem Herceptin byly zaznamenány některé projevy srdeční toxicity jako snížení ejekční frakce a příznaky srdečního selhání, např. dušnost, ortopnoe, zvýšený kašel, plicní edém a třetí srdeční ozva. **Dávkování a způsob podání:** Dle platného souhrnu údajů o přípravku. **Dostupná balení přípravku:** Herceptin 150 mg, prášek pro koncentrát pro přípravu infuzního roztoku v injekční lahvičce. **Podmínky uchovávání:** Při teplotě 2 °C až 8 °C. Po rekonstituci se sterilní vodou na injekce je rekonstituovaný roztok fyzikálně a chemicky stabilní po dobu 48 hodin při teplotě 2 °C až 8 °C. **Datum poslední revize textu:** 6. 4. 2018. Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis. Léčivý přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Další informace o přípravku získáte z platného Souhrnu údajů o přípravku Herceptin nebo na adrese: **Roche s.r.o., Futurama Business Park Bld F, Sokolovská 685/136f, 186 00 Praha 8, telefon 220 382 111.** Podrobné informace o tomto přípravku jsou uveřejněny na webových stránkách Evropské lékové agentury (EMA) [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu).

**Těhotenství:** Pokud pacientka otěhotní během léčby přípravkem Herceptin nebo během 7 měsíců po podání poslední dávky, nahláste prosím okamžitě těhotenství na kontakt Roche pro hlášení nežádoucích účinků czech\_republic.pa\_susar@roche.com či na 602 298 181. V průběhu těhotenství, při kterém byl plod vystaven účinku Herceptinu a během prvního roku života kojenice, budete požádáni o poskytnutí doplňujících informací. To umožní společnosti Roche lépe porozumět bezpečnostnímu profilu Herceptinu a poskytnout příslušné informace regulačním autoritám (SÚKL), zdravotnickým pracovníkům a dalším pacientům.

Podrobné informace o tomto přípravku jsou uveřejněny na webových stránkách Evropské lékové agentury (EMA) [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu).

**Reference: 1.** Souhrn údajů o přípravku Herceptin (datum poslední revize textu 6. 4. 2018)



Your partner for her future

OPDIVO®  
dává šanci více pacientům

**OPDIVO**  
(nivolumab)



NOVĚ

## OPDIVO – nové dávkovací schéma<sup>1</sup>

NOVĚ

Dávkování 480 mg každé 4 týdny

NEBO

Dávkování 240 mg každé 2 týdny

480 mg



**Doporučené dávky a doba trvání infuze**  
480 mg každé 4 týdny po dobu 60 minut

**Pouze pro vybrané indikace:**

Melanom  
Renální karcinom

240 mg



**Doporučené dávky a doba trvání infuze**  
240 mg každé 2 týdny po dobu 30 minut

**Pro indikace:**

Melanom  
Renální karcinom  
Nemalobuněčný karcinom plic  
Klasický Hodgkinův lymfom  
Skvamózní karcinom hlavy a krku  
Uroteliální karcinom

▼ Tento léčivý přípravek podléhá dalšímu sledování.

### ZKrácená informace o přípravku

**Název přípravku:** OPDIVO 10 mg/ml koncentrát pro infuzní roztok.

**Kvalitativní a kvantitativní složení:** Nivolumabum 10 mg v 1 ml koncentrátu. **Indikace:**\* Melanom: v monoterapii/kombinaci s ipilimumabem u pokročilého (neresekovatelného nebo metastatického) melanomu u dospělých. Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC): monoterapie lokálně pokročilého nebo metastatického NSCLC po předchozí chemoterapii u dospělých. Renální karcinom (RCC): monoterapie pokročilého RCC po předchozí terapii u dospělých. Klasický Hodgkinův lymfom (cHL): monoterapie recidivujícího nebo rezistentního cHL po autologní transplantaci kmenových buněk (ASCT) a léčbě brentuximab vedotinem. Skvamózní karcinom hlavy a krku (SCCHN): monoterapie SCCHN progresujícího při nebo po léčbě platinovými deriváty u dospělých. Uroteliální karcinom (UC): monoterapie lokálně pokročilého neresekovatelného nebo metastazujícího UC u dospělých po selhání léčby platinovými deriváty. **Dávkování:**\* Monoterapie: buď 240 mg každé 2 týdny (všechny indikace) nebo 480 mg každé 4 týdny (pouze indikace melanom a renální karcinom), kombinace s ipilimumabem: 1 mg/kg nivolumabu i.v. infuzí (30 min) s ipilimumabem 3 mg/kg i.v. infuzí (90 min) každé 3 týdny u prvních 4 dávek, dále nivolumab i.v. infuzí 240 mg každé 2 týdny (30 min) nebo 480 mg každé 4 týdny (60 min), první dávka za 3 týdny (240 mg) resp. 6 týdnů (480 mg), a pak dále každé 2 týdny, resp. 4 týdny. Léčba pokračuje, dokud je pozorován klinický přínos nebo dokud ji pacient snáší. Další podrobnosti viz SPC. **Způsob podání:**\* Pouze jako i.v. infuze (dávka 240 mg v délce 30 min, dávka 480 mg v délce 60 min). **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku. **Zvláštní upozornění:**\* Nivolumab je spojen s imunitně podmíněnými nežádoucími účinky. Pacienti mají být průběžně sledováni (min. do 5 měsíců po poslední dávce). Podle závažnosti NÚ se nivolumab vysadí a podají se kortikosteroidy. Po zlepšení se musí dávka kortikosteroidů snižovat postupně po dobu min. 1 měsíce. V případě závažných, opakujících se nebo jakýchkoli život ohrožujících imunitně podmíněných NÚ musí být nivolumab trvale vysazen. U pacientů s výchozím ECOG  $\geq 2$ , s aktivními mozgovými metastázami, očním melanomem, autoimunitním onemocněním, symptomatickým intersticiálním plicním onemocněním a u pacientů, kteří již užívali systémová imunosupresiva, je třeba přípravek používat jen s opatrností. **Interakce:** Nivolumab je humánní monoklonální protilátka, a nepředpokládá se, že inhibice nebo indukce enzymů cytochromu P450 (CYP) nebo jiných enzymů metabolizujících léky současně podávanými přípravky bude mít dopad na jeho farmakokinetiku. Vzhledem k potenciální interferenci systémových kortikosteroidů nebo jiných imunosupresiv s farmakodynamikou nivolumabu je třeba se jejich podávání na počátku, před zahájením léčby, vyhnout. Lze je nicméně použít k léčbě imunitně podmíněných nežádoucích účinků. **Těhotenství a kojení:** Nivolumab se nedoporučuje během těhotenství a fertilitní ženám, které nepoužívají účinnou antikoncepci, pokud klinický přínos nepřevyšuje možné riziko. Není známo, zda se nivolumab vylučuje do mateřského mléka. **Nežádoucí účinky:**\* **Velmi časté:** neutropenie, únava, vyrážka, svědění, průjem a nauzea, zvýšení AST, ALT, alkalické fosfatázy, lipázy, amylázy, kreatininu, hyperglykémie, hypokalcémie, lymfopenie, leukopenie, trombocytopenie, anémie, hyperkalcémie, hyperkalemie, hypokalemie, hypomagnezémie, hyponatremie, v kombinaci s ipilimumabem i hypotyreóza, bolest hlavy, dyspnoe, kolitida, zvracení, bolest břicha, artralgie, horečka, hypoglykémie a zvýšený celkový bilirubin. Další podrobnosti k NÚ, zvláště imunitně podmíněným, viz SPC. **Předávkování:** Pacienti musí být pečlivě monitorováni s ohledem na příznaky nežádoucích účinků a zahájena vhodná symptomatická léčba. **Uchovávání:** Uchovávejte v chladničce (2 °C - 8 °C) v původním obalu, aby byl přípravek chráněn před světlem. Chraňte před mrazem. **Balení:** 4 ml nebo 10 ml koncentrátu v 10ml injekční lahvičce s uzávěrem a tmavě modrým, resp. šedým odklápěcím uzávěrem. **Velikost balení:** 1 injekční lahvička. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Bristol-Myers Squibb EEIG, Bristol-Myers Squibb House, Uxbridge Business Park, Sanderson Road, Uxbridge, Middlesex UB8 3DH, Velká Británie. **Registrační číslo:** EU/1/15/1014/001-002. **Datum první registrace:** 19. 6. 2015. **Datum poslední revize textu:** duben 2018.

Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis. Přípravek je hrazen z veřejného zdravotního pojištění v indikaci pokročilý melanom v monoterapii, pokročilý renální karcinom a s účinností od 1. 4. 2018 také v indikaci skvamózní nemalobuněčný karcinom plic. Podrobné informace o tomto přípravku jsou dostupné na adrese zástupce držitele rozhodnutí o registraci v ČR: Bristol-Myers Squibb spol. s r.o., Budějovická 778/3, 140 00 Praha 4, www.b-m-s.cz. Před předepsáním se seznáme s úplnou informací o přípravku.

\*Všimněte si, prosím, změn v Souhrnu údajů o přípravku.

**Reference:** 1. Opdivo® Souhrn údajů o přípravku, duben 2018.

1506CZ1802536-01, datum schválení 7. 5. 2018.