

# KLINICKÁ ONKOLOGIE

Z obsahu:

Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)

Metastáza do lymfatických uzlín na krku pri neznámom primárnom tumore

Malígne melanómy kože vyrastajúce na nohe



- 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 **Positivní 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>



GIOTRIF®

**významně zlepšil  
příznaky**

**a kvalitu života** ve srovnání  
s chemoterapií v 1. linii léčby pacientů s EGFR M+<sup>9,10</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; TTD = doba do zhoršení; EORTC QLQ-C30 = Dotazník kvality života QLQ-C30 Evropské organizace pro výzkum a léčbu nádorů; EORTC QLQ-LC13 = Dotazník kvality života specifický pro nádor plic QLQ-LC13 Evropské organizace pro výzkum a léčbu nádorů; cis/pem = cisplatin/pemetrexed.

#### 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.-7.6.2016. 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-Arez 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. Fukooka M et al. *J Clin Oncol.* 2011;29:2866-2874. 16. Khozin S et al. *Oncologist.* 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), 2018. 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 dimaleas). **Indikace:** Giotrif je indikován jako monoterapie k léčbě dospělých pacientů • dospělých pacientů s lokálně pokročilým nebo metastazujícím nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) s aktivními mutacemi receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) dosud neléčených EGFR TKI; • s lokálně pokročilým nebo metastazujícím 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 jídla. Jídlo nesmí být konzumováno nejméně 3 hodiny před užitím přípravku a nejméně 1 hodinu po něm. V léčbě 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 dávka je třeba zvyšovat až k nejvyšší schválené doporučené dávce. Antiidiaroiika musí mít pacienti pohotové k dispozici tak, aby bylo možno léčbu zahájit při prvních známkách průjmu a pokračovat v ní, dokud průměrovité 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 s objevenými zprávami 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 induktory 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 rifonaviru, cyklosporinu A, ketokonazolu, itrakonazolu, erythromycinu, verapamilu, chinidinu, takrolimu, neflavinu, sachinaviru, amiodaronu a dalších) střídavě, nejlépe 6 hodin nebo 12 hodin od podání přípravku Giotrif. Silné induktory P-gp (včetně rifampicinu, karbamazepinu, fenytoinu, fenobarbitalu nebo těžceky tečkované a dalších) mohou snížit expozici 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 ve vztahu ke kůži (vyrážka, akneiformní dermatitida, pruritus, suchá kůže), dále stomatitida, paronchie, pokles chuti k jídlu a epistaxe. Mezi časté nežádoucí reakce patřily cystitida, dehydratace, hypokalemie, dysgeuzie, konjunktivitida, suché oči, rinorea, dyspepsie, cheilitida, zvýšení alanin- a spartátaminotransferázy, 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 uchovávání:** Uchovávat v původním obalu, chránit před vlhkostí a světlem. Datum poslední revize textu: 16/05/2018. Držitel rozhodnutí o registraci: Boehringer Ingelheim International GmbH, Ingelheim am Rhein, Německo. Registrační č.: Giotrif 20 mg U/11/13/879/003; Giotrif 30 mg EU/11/13/879/006; Giotrif 40 mg EU/11/13/879/009; Giotrif 50 mg EU/11/13/879/012. Výdej pouze na lékařský předpis. Přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění. Před podáním se seznáme s úplnou informací o přípravku.

▼ Tento léčivý přípravek podléhá dalšímu sledování. Před podáním se seznáme 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

## Precizovaná onkologie

Máme zde zase nový módní termín, který v poslední době semílají onkologické kongresy a konference, firemní materiály, kurzy ideových onkocinů, a dokonce i tuzemské grantové projekty. Využívá významovou jemnost češtiny, budu to lépe než jako „precizní“ překládat adjektivem „precizovaná“. To vzhledem k nedokonalosti ideje preciznosti v nejbližším tisíciletí. Úplně precizní lidská činnost nikdy nebyla ani nebude, tím spíše ne v biologických vědách, celoplošně a ekválně.

Na druhé straně, kdo z onkologů by nechtěl být lepším a preciznějším. A kdo by to nechtěl aspoň deklarovat. Nelze nezpomenout verbálních aspirací minulých let a desetiletí, které také zůstaly nenaplněny, leč v něčem nás vždy posunuly. Třeba i v poznání rozdílu mezi právním a skutečností.

Před desetiletími jsme s entuziasmem toxikomanů zavedli termín kurativní chemoterapie, přestože u solidních nádorů byla kurativní zřídka, tedy že by sama vyléčila pokročilé onemocnění. Ale občas se to zadařilo, třeba s příchodem platiny u pokročilých nádorů varlat, takže tak úplně se s onou kurativní ideou zase nelhalo. Jenom trošku většinou. Kurativní chemoterapii říkáme nyní u solidních nádorů pro jistotu paliativní chemoterapie. Asi neškodí znát precizně možnosti i limity jakékoli léčby a precizně se postarat o trvale nevyléčitelné i jinak je jistě vítané. Často na to pouhá nabídka farmaprůmyslu nestačí.

Také jsme zde měli modlu radikality onkochirurgie, což nezřídka i máme. Radikality anatomické, méně už biologické. Radikality rozsahem, nikoli dopadem výkonu. Mnozí už to pochopili a hovoříme raději o operacích adekvátních, přiměřených situaci než snově radikálních. Chlubíme se minimální invazivitou tam, kde je to patřičné. Zajímají nás více resekční okraje a parametr R než váha resekátů nebo počet blokově odstraněných orgánů. I to je občas nutné, ale radikální to i ve své radikalitě často není. Když se naopak radikality zvrhne, zůstane radikali-

zmus a leccos bývá zbytečně poničeno. Na těle i na duchu.

Let's make excision with some precision, komentoval žertem před mnoha lety své operování můj oblíbený manchesterský učitel, chirurg Mr. Phil Scofield, když ukrajoval rektum těsně pod tumorem hluboko v pánvi tak, aby mohl ještě našít anastomózu a vyhnul se trvalé kolostomii, leč bez rizika lokální recidivy. Proto se vždy více zaměřoval na radiální šíření nádoru a precizní excizi mezorekta ještě léta předtím, než to uvedl ve známost jako operační standard profesor Heald v roce 1986. Asi je dobré precizně vědět, kam a proč řežeme. Často na to pouhé oko nestačí. Čeká nás precizace chirurgie obrazem, tedy že budeme lépe vědět, do čeho jdeme z více metod a také ve 3D.

Byla zde také první nadšená éra imunoterapie. Rosenbergovy prestimulované lymfocyty si samy našly nádorové buňky a obdivuhodně je ničily. V kulturách a modelech. V reálném nádoru není zpravidla oněch akčních efektorů dostatek. Pět či padesát motivovaných rozhodně padesátitisícový dav nerozežene, leda tak poplašnou zprávou, že se chystá něco většího. Asi bude třeba precizně vědět, jak ty efekторы v dostatečném počtu a kvalitě do nádoru dostat.

Byla zde i další nadšená éra imunoterapie pomocí cytokinů. Někdo by řekl nespecifická imunostimulace a měl by pravdy více. Energetický nápoj řidiče povzbudí, nechá vzplanout mysl, ale náklad neodveze a směr ani cíl neukáže. Asi je dobré precizně vědět, co a proč zatím dost neprecizně stimulujeme, resp. dráždíme.

Paul Ehrlich kdysi označil protilátky za magické střely, které trefí a poničí cíl, je-li znám. Už po 100 letech od této predikce na nás dopadla nová éra biologické léčby. Optimisté jí říkají cílená léčba, realisté selektivní vazba preparátu na receptor. Už zdaleka nejde jen o protilátky, „those Y-shape funny things“, jak je označoval před lety již zmíněný Mr. Scofield, ale o stovky nových molekul, které mají

dvě společné vlastnosti, relativní specifčnost vazby a neúměrně vysokou cenu. Leč vazby se dále precizují a o udržitelnosti cen už také hovoří precizněji. Jde o další precizování cílené onkoterapie a budoucnosti cílených preparátů v organizmu jednotlivém, ovšem i společenském, má-li to být uhrazeno.

Jde hlavně o člověka, tvrdí skoro všichni představitelé oborů, odvětví, institucí a vlád. Nedávno i k nám dorazila vize individualizované či personalizované medicíny, potažmo onkoléčby. Je přitažlivá, logická, žádaná. „Nejsem zrnko písku v kvádru betonu, jsem individuum, resp. persona,“ zní sebeuvědoměním lépe, „a tak by se se mnou mělo zacházet také u doktora,“ řekne si leckdo právem. Vlastně se tak odedávna činilo, než se medicína počala oborově štěpit, byrokraticky odlišťovat a politicky ekvalizovat. Tradiční kultury znají model – jeden šaman, jeden nemocný, jedna chýše. Skupinové seance jen občas kolem ohně při oslavách nebo společném ohrožení. Jenže ona individualizace biologická, genetická a molekulární jaksí nejde dohromady se stavem našeho poznání a současným absolutním statistickým požadavkem na evidence-based medicine. Evidence vzniká z četnosti, mnohosti, organizovaných souborů, analýz, megaanalýz a metaanalýz. Ty pak paradoxně postihnou konkrétní osud paní Novákové opět jen pravděpodobnostně, někdy málo a nejistě, což paní Nováková je, nebo není ochotna akceptovat jako základ pro individuální přístup právě k ní. Takzvaná individualizace je v naší realitě jen mírně zlepšenou stratifikací obecné skupinové léčby, individuálně upravované podle snášenlivosti, možnosti a dalších okolností. Je asi dobré precizněji vnímat, co na individualizované léčbě individualizované skutečně je a co není a co je individuálně precizní.

Dorazila k nám už i třetí vlna nadšené imunoterapie, která proměňuje onkologii. Pomocí několika molekul umíme inhibovat několik molekul, aby nezlobily

a nechaly se imunitě samotné vyrovnat s nádorem a nejlépe napořád. Regulujeme check-pointy, tedy kontrolní body, nebo si to aspoň myslíme. Občas se dostaví překvapující úspěch, často nikoli. Hledáme a provádíme imunostaging z toho, co zatím umíme. Komplexnost imunitního systému se tím naneštěstí i naštěstí zaskočit nedá a otáčí se v tom po svém. Často ignoruje a toleruje nádor i nás. Nelze nevzpomenout také pana Prehna ze 70. let, který vztah našich imunitních buněk k buňkám nádorovým nevnímal jen jako nepřátelský, ale zhusta i jako přátelský a podpůrný. A pak se v tom vyznejte. Nezbyvá než precizovat poznání a tlumit nadšení z konečného precizního vítězství.

Z fyzikálního náhledu občana je málo preciznější než paprsek, tedy záření elektromagnetické nebo částicové. Laserový paprsek přesně trefí mikrodrážku v céděčku populárního zpěváka, světelný paprsek vykreslí na filmu i věci nevykreslitelné krásy či bizarnosti. Záření je

asi precizní od přírody, ale lze ho zaměřovat a dávkovat, tudíž precizovat. Což se děje, a tak máme IGRT (image-guided radiation therapy), IMRT (intensity modulated radiotherapy), VMAT (volumetric modulated arc therapy), radiochirurgii, tedy několik zvládnutých a nezvládnutých metod radioterapie. V ČR se třeba precizováním radioterapie nakonec zjistí, jak provozně vytížit a uživit ono šťastné pražské protonové pracoviště, které se v kontextu doby a událostí stalo nešťastným a prošlo již ohněm médií, reklamy a soudů, aby zapalovalo naděje i vášně. Zdá se, že mezinárodně nyní zdůrazňovanou precizací onkologie v tuzemsku využijeme také pro pořádek v indikacích a úhradách.

Precizováním onkologie neumím být nenadšen. Jen si tak postupně ujasňuji, co ta nová vize či ideologie v praxi znamená a jak dlouho nám ten termín vydrží. Neboť precizovat budeme muset napořád. V chirurgii, abychom řádně odstranili vše nezbytné a rozpoznali to od

zbytného, v radioterapii, abychom cílili do nezdravého a zdravé ochránili, v medikamentózní léčbě, abychom individuálně dále precizovali orientaci v biologicky precizní heterogenitě nádorů.

Lze to vidět i tak, že evoluci tvoří mnoho malých revolucí. Zda rychlejší střídání malých revolucí evoluci urychluje, nebo brzdí, není příliš jasné. Jasné však je, že pouhý nadšený výkřik revoluci neznamená.

Co tedy bude precizovaná onkologie? Zahrnuje zřejmě všechno, co už tady bylo a co postupně bude. Klasik by radil – precizovat, precizovat, precizovat! Ovšem i v organizaci onkologické péče a všelidové informovanosti. Tam to také nemálo vážně a zdá se, že i sám internet to spíše zašmodrchává, než řeší.

I v nové době precizované onkologie nás čeká hlavně aktivní trpělivost a facilitovaná evoluce oboru.

*prof. MUDr. Jan Žaloudík, CSc.  
ředitel Masarykova onkologického ústavu*

# Obsah | Contents

## Editorial

### Precizovaná onkologie

243

## PŘEHLEDY | REVIEWS

### Využití mikroRNA ve slinách pro diagnostiku nádorových onemocnění

Use of Salivary MicroRNAs for Diagnosis of Solid Cancers

Kubičková A., Slabý O.

249

### Expression Analysis of *OIP5-AS1* in Non-Small Cell Lung Cancer

Expresní analýza *OIP5-AS1* u nemalobuněčného karcinomu plic

Esfandi F., Kholghi Oskooei V., Taheri F., Kiani A., Taheri M., Ghafouri-Fard S.

260

### A Combined Bioinformatics and Literature Based Approach for Identification of Long Non-coding RNAs That Modulate Vitamin D Receptor Signaling in Breast Cancer

Kombinovaný bioinformatický a literární přístup k identifikaci dlouhých nekódujících molekul RNA, které modulují signalizaci přes receptor pro vitamín D u karcinomu prsu

Kholghi Oskooei V., Ghafouri-Fard S., Omrani MD.

264

### Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)

Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS)

Sandecká V., Pour L., Adam Z., Krejčí M., Štork M., Ševčíková S., Král Z.

270

## PŮVODNÍ PRÁCE | ORIGINAL ARTICLES

### Metastáza do lymfatických uzlín na krku pri neznámom primárnom tumore

Carcinoma of Unknown Primary in Head and Neck Region

Uhliarová B., Navrátilová M., Čalkovský V., Hajtman A.

277

### Výskyt a antibiotická rezistence enterobakterií izolovaných z klinického materiálu od pacientů s akutní leukemií

Occurrence and Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae

in Acute Leukemia Patients

Zatloukalová S., Holý O., Petrželová J., Mlynářčík P., Vlčková J., Röderová M., Horáková D., Kollárová H.

282

## KAZUISTIKY | CASE REPORTS

### Malígne melanómy kože vyrastajúce na nohe

Malignant Melanomas of the Skin Arising on the Feet

Bartoš V., Kullová M.

289

### Metastases of a Breast Cancer to Skull Base

Metastázy karcinomu prsu do baze lebni

Horakova Z., Slavik M., Vesely K., Binkova H., Smilek P.

293

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 progredujícího 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 přípravku 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 přípravku 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 fertilitním 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, anemie, hyperkalcémie, hyperkalemie, hypokalemie, hypomagnezémie, hyponatremie; u kombinace 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. **Uchovávaní:** 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 koncentráty v 10ml injekční lahvičce s uzávěrem a tmavě modrým, resp. šedým odklápacím uzávěrem; 24 ml koncentráty ve 24 ml injekční lahvičce s uzávěrem a červeným odklápacím 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 1DH, Velká Británie. **Registrační číslo:** EU/1/15/1014/001-002. **Datum první registrace:** 19. 6. 2015. **Datum poslední revize textu:** květen 2018.

Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis. Přípravek je hrazen z veřejného zdravotního pojištění v indikaci pokročilý maligní melanom v monoterapii, pokročilý renální karcinom, skvamózní nemalobuněčný karcinom plic a s účinností od 1. 8. 2018 také v indikaci neskvamózní 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-ms.cz. Před předepsáním se seznamte s úplnou informací o přípravku.

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

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

1506CZ1803601-01, datum schválení 19. 6. 2018

<b>Primary Branchiogenic Carcinoma</b>	<b>296</b>
Primární branchiogenní karcinom Horakova Z., Velecky L., Pazourkova M., Urbankova P., Smilek P.	
<b>Fludarabín v léčbě indolentního lymfómu s chylothoraxom</b>	<b>301</b>
Use of Fludarabine for the Treatment of Indolent Lymphoma with Chylothorax Wild A., Holasová J., Králíková E.	
<b>SDĚLENÍ   SHORT COMMUNICATION</b>	
<b>The Therapeutic Effects of Specific CDK4/6-inhibitors in Treating HR-positive, HER2-negative Advanced Breast Cancer</b>	<b>305</b>
Terapeutické účinky specifických inhibitorů CDK4/6 při léčbě pokročilých HR-positivních a HER2-negativních pokročilých karcinomů prsu Mendoza L.	
<b>RŮZNÉ   VARIOUS</b>	
<b>Onkologie v obrazech</b>	<b>309</b>
Nové techniky IGRT – sledování povrchu těla pacienta (SIGRT) Šimoničová L., Procházka T.	

# Podpořte činnost České onkologické společnosti!

„Fond České onkologické společnosti ČLS JEP pro vědu, vzdělávání a propagaci“ byl založen výborem ČOS ČLS JEP za účelem získávání finančních prostředků pro:

1

Podpora vydávání a distribuce doporučených postupů „Modrá kniha ČOS“, časopisu Klinická onkologie a provozu internetových stránek ČOS „www.linkos.cz“.

2

Podpora a propagace Národního onkologického programu ČR.

3

Podpora a propagace vzdělávání a výzkumu v onkologii (včetně akademických klinických studií) v ČR.

Fond existuje v podobě samostatného nákladového střediska České onkologické společnosti v rámci účetnictví České lékařské společnosti ČLS JEP, které je ČOS ČLS JEP organizační součástí. To zaručuje maximální transparentnost a kontrolu hospodaření fondu a současně nevytváří žádné dodatečné náklady na provoz. O použití finančních prostředků rozhoduje Výbor ČOS ČLS JEP.

Finanční prostředky na tento Fond lze poukázat nejlépe cestou darovací smlouvy, přičemž účel použití darovaných prostředků může být přesně specifikován, nad rámec uvedený výše.



Bankovní spojení: ČSOB, číslo účtu: 500 617 613/0300  
Variabilní symbol Fondu ČOS pro vědu, vzdělávání a propagaci: 503002

## Děkujeme!

doc. MUDr. Jana Prausová, Ph.D., MBA  
předsedkyně ČOS ČLS JEP

MUDr. Tomáš Svoboda, Ph.D.  
pokladník ČOS ČLS JEP

[www.linkos.cz](http://www.linkos.cz)

Česká  
onkologická  
společnost ČLS JEP



# Využití mikroRNA ve slinách pro diagnostiku nádorových onemocnění

## Use of Salivary MicroRNAs for Diagnosis of Solid Cancers

Kubíčková A.<sup>1</sup>, Slabý O.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

<sup>2</sup> Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Jedním z moderních přístupů identifikace biomarkerů nádorových onemocnění, a to jak na tkáňové úrovni, tak i v tělních tekutinách, je profilování exprese mikroRNA (miRNA). miRNA tvoří skupinu téměř 3 000 krátkých, 18–25 nukleotidů dlouhých nekódujících RNA. Slouží jako regulační prvky, které řídí expresi genů na posttranskripční úrovni, tj. na úrovni molekul mRNA. Schopnost miRNA inhibovat translaci či indukovat degradaci onkogenů a nádorových supresorů je podstatou jejich zapojení do procesů kancerogeneze. Důkazů o funkcích miRNA v regulaci procesů, jako jsou apoptóza, buněčná proliferace, diferenciace či invazivita, neustále přibývá. Analýza expresních profilů miRNA je proto stále častěji využívána pro účely molekulární diagnostiky nádorových onemocnění, analogicky jako je tomu u studií založených na profilování kódujících RNA. Z hlediska analytického využití je podstatná skutečnost, že miRNA jsou vysoce stabilní v tělních tekutinách vč. slin a vyskytují se zde v relativně vysokých hladinách. miRNA ve slinách již byly pro diagnostické účely úspěšně testovány u řady nádorových onemocnění, přičemž hlavní výhodou slin jako biologického materiálu je skutečnost, že jsou získatelné zcela neinvazivně. **Cíl:** Cílem přehledového článku je shrnout dosavadní míru poznání z oblasti cirkulujících miRNA u nádorových onemocnění se zaměřením na využití miRNA ve slinách pro účely onkologické diagnostiky.

### Klíčová slova

mikroRNA – sliny – diagnostika – nádorové onemocnění

### Summary

**Background:** A modern approach to identify biomarkers of solid cancers in tissues and body fluids is based on microRNA (miRNA) expression profiling. miRNAs are a group of approximately 3.000 short noncoding RNAs containing 18–25 nucleotides that regulate gene expression at the post-transcriptional (mRNA) level. The abilities of miRNAs to inhibit the translation or induce degradation of oncogenes and tumor suppressors indicate that they are involved in carcinogenesis. There is increasing evidence that miRNAs regulate apoptosis, cell proliferation, differentiation, and invasion. miRNA expression profiles are therefore often analyzed for molecular diagnostics of solid cancers, similar to analyses based on mRNA profiling. It is important that miRNAs are highly stable and present at high levels in body fluids, including saliva, for analytic usage. miRNAs in saliva have been successfully tested as potential diagnostic biomarkers of many solid cancers. The main advantage of these miRNAs is that saliva samples can be collected non-invasively. **Aim:** This review aims to summarize current knowledge of circulating miRNAs in solid cancers, with a focus on the use of miRNAs in saliva for oncology diagnostics.

### Key words

microRNA – saliva – diagnosis – cancer

Výsledky tohoto výzkumu byly získány v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601) za finančního příspěví Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci účelové podpory z prostředků Národního programu udržitelnosti II.

The results of this research have been acquired within CEITEC 2020 (LQ1601) project with financial contribution made by the Ministry of Education, Youths and Sports of the Czech Republic within special support paid from the National Programme for Sustainability II funds.

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.



prof. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.  
Masarykův onkologický ústav  
Žlutý kopec 7  
656 53 Brno  
e-mail: on.slaby@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 8. 3. 2018

Přijato/Accepted: 15. 5. 2018

doi: 10.14735/amko2018249

## Úvod

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující molekuly RNA o délce 18–25 nukleotidů, které posttranskripčně regulují genovou expresi. miRNA byly popsány teprve na začátku 90. let 20. století a od té doby bylo zjištěno, že se v organizmech účastní biologických dějů, jako je např. proliferace, buněčný cyklus, apoptóza, diferenciaci či invazivita. Význam miRNA v diagnostice a prognostikaci nádorových onemocnění proto neustále narůstá. Téměř polovina současného výzkumu v oblasti miRNA je zaměřena na studium deregulace miRNA u nádorových onemocnění. Včasná diagnostika mnoha nádorových onemocnění zvyšuje pravděpodobnost úspěšné léčby, jedním z hlavních cílů výzkumu miRNA v onkologii je proto také nalézení nových neinvazivních diagnostických biomarkerů.

miRNA vyskytující se v tělních tekutinách jako tzv. cirkulující miRNA byly popsány v krvi, a to v plazmě i séru, moči, mateřském mléku, slzách a slinách. Tělní tekutiny představují snáze dostupná diagnostická média, než jsou např. vzorky tkání, a proto sledování pozměněných hladin miRNA v tělních tekutinách u různých onemocnění nabízí velmi zajímavé možnosti využití.

V tomto přehledovém článku je věnována pozornost miRNA ve slinách, které vykazují odlišné hladiny u pacientů s nádorovým onemocněním v porovnání se zdravými kontrolami, případně mezi pacienty v různých stádiích onemocnění. Až do současnosti byly popsány odlišné hladiny miRNA ve slinách u nádorů hlavy a krku, jícnu, slinivky břišní, tlustého střeva a konečníku.

## Sliny – využití v diagnostice

Sliny představují jednoduše dostupné diagnostické médium, neboť slinné žlázy jsou obklopeny krevními kapilárami a pro jejich vzájemnou vysokou propustnost může docházet k výměně molekul. Biomarkery původem z krve se proto mohou vylučovat do slin, jejichž odběr za účelem diagnostiky různých patologických stavů je jednoduchý a neinvazivní [1]. Sliny jsou oproti krvi médiem, které lze odebrat bez rizika i u zvláštních skupin pacientů, jako

jsou děti, hemofilci nebo osoby užívající intravenózně narkotika [2].

Termín „salivaomics“ lze volně přeložit jako přístup založený na vysokokapacitních metodách zabývajících se studiem molekul přítomných ve slinách s cílem odhalit potenciál těchto molekul v diagnostice různých patologických stavů. V současnosti tento termín zahrnuje studium šesti typů molekul, a to DNA (tedy genom a epigenom v případě metylovaných genů), mRNA a miRNA (transkriptom), metabolických látek (metabolom), proteinů (proteom) a mikrobů (mikrobiom) [3,4]. Využití slin v diagnostice bylo hojně popisováno i ve 20. století [5,6] a ve 21. století tento trend stále sílí. Mezi onemocnění, u kterých bylo popsáno využití slinných biomarkerů, patří např. onemocnění periodontu [7], riziko zubního kazu [8], nádorové bujení [9,10], autoimunitní choroby, jako je Sjörgenův syndrom [11] či celiakie [12], kardiovaskulární choroby [13], metabolické choroby [14] či infekční onemocnění [15].

Genom ve slinách člověka je tvořen jak lidskou, tak mikrobiální DNA. Genetické a epigenetické změny při patologických procesech mohou být tedy sledovány i ve slinách. Kupříkladu byly stanoveny odlišné stupně metylace promotorů ve slinách u pacientů s karcinomem dutiny ústní [16]. Proteom ve slinách je tvořen přibližně z 3 000 proteinů vykonávajících různé biologické funkce [17]. Proteiny jako biomarkery byly popsány v mnoha studiích, např. u sledování odpovědi pacientek na terapii karcinomu prsu [18] nebo u pacientů s periodontitidou [19]. Metabolom je soubor všech metabolitů, které také mohou být využívány jako biomarkery onemocnění. Například studie z roku 2010 popsala odlišné profily metabolitů u pacientů s nádory dutiny ústní, prsu a pankreatu [20], dále byl identifikován metabolom pacientů s neurodegenerativní demencí [21]. Mikrobiom představuje mikroorganismy kolonizující dutinu ústní, kterých bylo identifikováno přes 600 druhů [22]. Existuje ale i studie zvyšující toto číslo na 10 000 druhů [23]. Sliny mohou být použity k diagnostice infekčních chorob nejen kultivačními, ale i molekulárními metodami [24,25]. Navíc bylo popsáno specifické složení mikrobiomu u nein-

fekčních onemocnění, jako je např. karcinom pankreatu [26], nebo dokonce obezita [27]. Transkriptom (mRNA) ve slinách byl popsán roku 2004 [28] a od té doby bylo publikováno několik studií zabývajících se mRNA biomarkery u nádorových a jiných systémových onemocnění. Specifický transkriptom byl popsán u karcinomu pankreatu [29] či plic [30], dále například u Sjörgenova syndromu [11].

miRNA ve slinách byly prokázány roku 2009, a to v souvislosti s dlaždicobuněčným karcinomem dutiny ústní (oral squamous cell carcinoma – OSCC) [31]. Zájem o deregulaci těchto krátkých nekódujících RNA ve slinách u různých onemocnění poté narostl. Deregulace miRNA ve slinách byla popsána u pacientů s autismem [32], se Sjörgenovým syndromem [33], a dokonce bylo navrženo, že by mohla souviset se stárnutím [34]. Nejvíce studií v dané oblasti ale sleduje deregulace miRNA v souvislosti s nádorovými onemocněními, o kterých také pojednává tento přehledový článek.

## MikroRNA

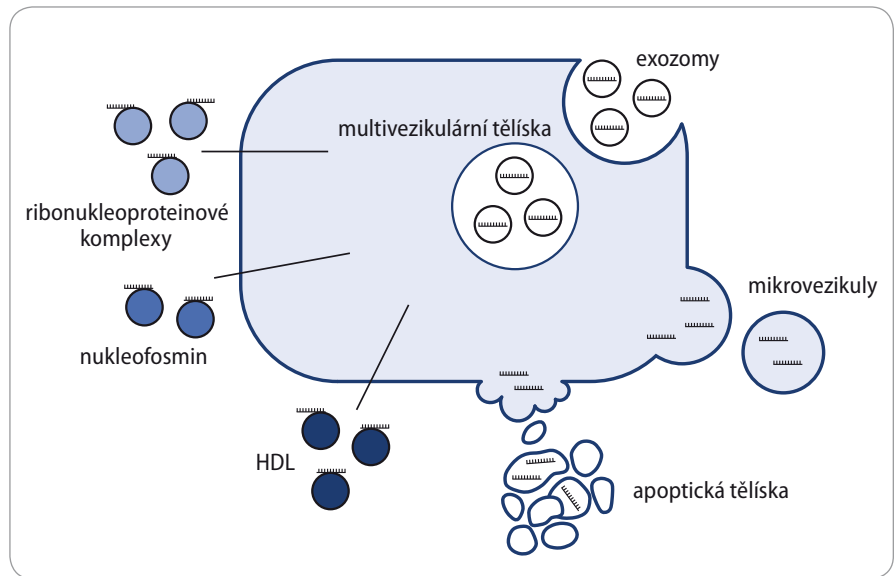
miRNA jsou krátké nekódující molekuly RNA o délce 18–25 nukleotidů vznikající v buňce dvoustupňovým procesem. Poprvé byly miRNA popsány roku 1993 u *Caenorhabditis elegans*. Bylo zjištěno, že jeden ze zkoumaných genů, *lin-4*, nekóduje žádný protein, ale pouze transkripty o přibližné délce 22 nukleotidů [35], které jsou díky komplementárním sekvencím k opakovaným sekvencím v nepřekládané oblasti na 3' konci (3'untranslated region – 3'UTR) oblasti genu *lin-14* schopny regulovat jeho expresi [36]. Roku 2000 bylo objeveno, že i gen *let-7* u *C. elegans* kóduje 21-nukleotidové RNA komplementární k elementům v 3'UTR genu *lin-41*, které regulují expresi tohoto genu [37]. Záhy bylo zjištěno, že gen *let-7* se nachází i u dalších organismů vč. člověka a bylo navrženo, že jeho transkripty, tedy přibližně 21 nukleotidové RNA, mají původ v prekurzorech vlásenkovitých struktur [38]. Název mikroRNA (se zkratkou miRNA nebo miR) vznikl roku 2001, kdy byly ve třech laboratořích identifikovány další druhy těchto krátkých molekul [39–41].

Význam miRNA v nádorové transformaci u člověka jako první popsali Carlo

Croce a George Calin, kteří zkoumali delecii na chromozomu v oblasti 13q14, která se vyskytuje u více než poloviny pacientů s chronickou lymfocytární leukémií. Zjistili, že v dané oblasti se nacházejí geny *mir-15* a *mir-16*, jejichž snížená exprese by mohla vést ke vzniku leukémie [42]. Brzy poté byly identifikovány snížené hladiny miR-143 a miR-145 u pacientů s kolorektálním karcinomem (colorectal cancer – CRC) [43], nižší exprese *let-7* byla zaznamenána u pacientů s rakovinou plic [44] a další miRNA se změněnou expresí byly popsány u glioblastomu [45] a u rakoviny prsu [46].

Od té doby až do současnosti bylo dle databáze miRBase popsáno 2 588 lidských miRNA (miRBase Sequence Database, Release 21, dostupná online na [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) [47], přičemž jejich význam při vzniku rakoviny neustále narůstá. Díky profilování miRNA a hlubokému sekvenování [47,48] přibývá důkazů o možnostech využití miRNA v diagnostice, prognostikaci, a dokonce terapii nádorových onemocnění [49–51].

Biogeneze miRNA je proces, kdy jsou geny *mir* přepisovány a překládány v tzv. primární miRNA (pri-miRNA), které jsou následně upraveny v tzv. prekurzorové miRNA (pre-miRNA) a poté ve zralé miRNA za účasti ribonukleáz a dalších proteinů [52–55]. Zralé jednořetězcové miRNA jsou vázány do umlčujícího komplexu indukovaného RNA (RNA-induced silencing complex – RISC), který je schopen regulace genové exprese na posttranskripční úrovni [56–58]. Regulace probíhá dvojím způsobem v závislosti na komplementaritě mezi miRNA a cílovou mRNA. Je-li komplementarita úplná nebo téměř úplná, dochází k degradaci cílové mRNA, kde se uplatňuje princip RNA interference [59–61]. Pokud je komplementarita pouze částečná, dochází k represii translace vazbou na 3'UTR cílové mRNA [36]. Hlavní biologické funkce miRNA zahrnují regulaci diferenciaci a proliferaci buněk [35], apoptózy [62], metabolismu lipidů [63] a glukózy [64] či odpověď na stres [63]. Dysregulace a porušená funkce miRNA mohou tedy vést ke vzniku různých onemocnění, jako jsou např. kardiovaskulární [65], neurologické choroby [66]



Obr. 1. Vznik a formy cirkulujících miRNA [86].

a převážně onemocnění nádorová [42], kde miRNA fungují jako onkogeny i jako nádorové supresory [67].

### Cirkulující miRNA

Roku 2008 bylo poprvé popsáno, že se miRNA vyskytují v tělních tekutinách, konkrétně v plazmě a séru, ve vysoce stabilní formě [68,69]. Navíc byly toho roku detekovány zvýšené hladiny miRNA v séru pacientů s nádorovými onemocněními, jako je difuzní velkobuněčný B lymfom [70] a karcinom prostaty [71]. Přítomnost miRNA byla v následujících letech popsána i v dalších tělních tekutinách, a to ve slinách [31,72], moči [73], slzách či mateřském mléce [74,75]. Sekrece miRNA do tělních tekutin probíhá dvěma hlavními způsoby. Sekrece může být buď pasivní, kdy se miRNA uvolňují do cirkulace z poškozených buněk či tkání [69,71,76], např. při metastázování či chronických zánětech nebo z krátce žijících krevních buněk, jako jsou trombocyty a monocyty [77]. Druhým způsobem je aktivní sekrece. miRNA mohou být uvolňovány v extracelulárních vezikulech, jako jsou mikrovezikuly [78,79], mezi které se řadí i exozomy [80]. Další vezikuly obsahující cirkulující miRNA jsou apoptická tělíska [81]. Bylo zjištěno, že se miRNA mohou vyskytovat i mimo vezikuly, a to ve vazbě na proteiny Ago2 [82] a Ago1, Ago3, Ago4 [83], nukleofosmin 1 [84] a HDL [85]. Jednot-

livé formy cirkulujících miRNA popisuje obr. 1 [86].

Cirkulující miRNA vykazují vysoký stupeň stability. Hladiny miRNA se nemění při inkubaci při pokojové teplotě [71], při 4 °C a uchovávání při –70 °C [87], zůstávají stabilní po mnoha cyklech zamrazování a rozmrazování, po varu a po působení vysokých a nízkých hodnot pH [69]. Odolávají působení RNáz, které jsou přítomny v krvi [69,71,88]. Předpokládá se, že stabilita miRNA v tělních tekutinách je zajištěna uzavřením v mikrovezikulech [78–80] a vazbou na proteiny [82,84,85]. Mikrovezikuly se zdají být odolnější proti působení RNáz než miRNA v komplexu s proteiny [89]. Byla také vyslovena hypotéza, že cirkulující miRNA může být chráněna modifikacemi. Mezi obecné modifikace miRNA patří metylace [90], adenylace [91] a uridylyace [92]. Vychází se z předpokladu, že tatáž miRNA je odolnější vůči působení RNáz v cirkulaci než v tkáni či buňce, a proto je možné, že je tato odolnost zajištěna právě zmíněnými modifikacemi. Nicméně modifikované cirkulující miRNA ještě nebyly prokázány [77].

### miRNA jako hormony

V souvislosti s objevem cirkulujících miRNA bylo navrženo, že miRNA mohou fungovat jako hormony, tedy jako signální molekuly přenášející informace

**Tab. 1. Metodické aspekty ovlivňující diagnostické využití miRNA ve slinách.**

Postup	Aspekty	Reference	
nakládání se vzorkem	kontaminace slin buněčnými miRNA (epiteliální buňky, leukocyty, trombocyty)	[78,99,100] [101,102]	
	způsob odběru vzorku,	[103]	
	čas do zpracování a způsob zpracování vzorku	[104]	
	podmínky a délka archivace	[105–107]	
izolace RNA	přítomnost vysokých hladin proteinů	[108]	
	nízká koncentrace miRNA	[109]	
	různé postupy izolace RNA	[110,111]	
kvantifikace miRNA	PCR	vysoká senzitivita a přesnost	[112]
		nízkokapacitní metoda	
		optimální pro detekci 1 miRNA u více vzorků	
	hybridizační čipy	nízká cena na vzorek	
		nižší senzitivita a specifická	
		vysokokapacitní metoda	
	sekvenování nové generace	detekce velkého množství miRNA ve vzorku	
		vysoká cena na vzorek	
	vysokokapacitní metoda		
	necílená detekce všech miRNA ve vzorku		
	vysoká cena na vzorek		

PCR – polymerázová řetězová reakce

mezi donorovými a recipientními buňkami či tkáněmi. První důkaz o této funkci miRNA byl podán ve studii z roku 2007, kdy bylo zjištěno, že miRNA jsou transportovány v exozomech a že tyto exozomy jsou předávány mezi buňkami [80]. Koncept cirkulujících miRNA jako hormonů byl popsán v mnoha studiích, počínaje rokem 2008, kdy Hunter et al prokázali přítomnost miRNA v mikrovzikulech v periferní krvi u zdravých jedinců a navrhli, že by tyto miRNA mohly regulovat homeostázu krevních buněk a jejich metabolické dráhy [78]. Následně Skog et al pozorovali mikrovzikuly pocházející z glioblastomu. Tyto mikrovzikuly obsahovaly proteiny, mRNA a miRNA a byly transformovány normálními buňkami v signály podporující nádorové bujení [93]. miRNA se v cirkulaci vyskytují i v apoptických tělíscích. Tento objev přinesl také zjištění, že se konkrétně miR-126 může podílet na inhibici rozvoje aterosklerózy u myší [81] a v souladu s tímto zjištěním byly pozoro-

rovány nižší hladiny miR-126 u pacientů s koronární aterosklerózou [94].

Další možností transportu miRNA v cirkulaci je vazba na proteiny. Tyto miRNA jsou cílovými buňkami z cirkulace zachycovány pomocí receptorů, které rozeznávají proteiny vázající RNA [85,95]. Zatím bylo popsáno působení miRNA jako hormonu pouze v komplexu s HDL, kdy po přijetí takového komplexu recipientní buňkou došlo k posttranskripční regulaci příslušné mRNA [85].

Mnoho dalších studií se zabývá mezi-buněčnou komunikací pomocí cirkulujících miRNA, a to především ve vezikulech, neboť tyto miRNA by mohly být potenciálně využity k terapeutickým účelům [96]. Tyto objevy značí, že cirkulující miRNA významně ovlivňují buňky a tkáně v různých částech těla, a to dvojím způsobem – mohou napomáhat progresi onemocnění (destruktivní efekt), nebo před poškozením organismu chránit (protektivní efekt) [97]. Tyto poznatky představují nové možnosti využití cirkulujících miRNA, a proto je v této oblasti veden intenzivní výzkum.

lujících miRNA, a proto je v této oblasti veden intenzivní výzkum.

### Metodické aspekty detekce cirkulujících miRNA

I přes značné výhody cirkulujících miRNA zůstává jejich detekce náročná. Pro významné rozdíly ve výsledcích izolace, měření a kvantifikace miRNA prováděných různými metodami neexistuje jednotný postup, který by byl aplikovatelný pro klinické využití cirkulujících miRNA jako biomarkerů. Tyto rozdíly jsou dány především odlišným zpracováním vzorků, neefektivní izolací, hemolýzou ve vzorcích krve, ne vždy spolehlivou účinností reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR), které se ke kvantifikaci miRNA užívají, či nejednotností v používání referenčních genů [96,98].

Prvním krokem v detekci miRNA z tělních tekutin je nakládání se samotným vzorkem. V případě krevních vzorků je situace komplikována skutečností,

že trombocyty, leukocyty [78,99] i erytrocyty [100] obsahují vlastní miRNA, a je proto možné, že uměle zvyšují hladiny extracelulárních miRNA. Bylo dokázáno, že koncentrace miRNA se měnily při dlouhodobém uchovávání trombocytů [101] i erytrocytů [102] při pokojové teplotě a že hladiny miRNA ovlivňuje i hemolýza erytrocytů [103]. Zvyšování počtů krevních elementů při některých patologických podmínkách může také měnit koncentrace extracelulárních miRNA [104], stejně jako se miRNA mohou vyplavovat z trombocytů při srážení krve za účelem získání séra [105]. S tím se pojí i výběr samotného koagulačního činidla. Bylo zjištěno, že nejlepší volbou je kyselina ethylendiamintetraocetová (ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA), neboť citrát i heparin, které se pro koagulaci také využívají, mohou inhibovat kvantitativní PCR (qPCR) [106,107]. Faktory jako např. hemolýza nejsou v případě slin relevantní, nicméně kontaminace vzorku miRNA pocházejícími z buněčných elementů slin (např. epiteliální buňky dutiny ústní, leukocyty či trombocyty) problém představuje.

Izolaci miRNA z tělních tekutin, konkrétně z plazmy a séra, komplikuje více faktorů. Je mezi nimi i přítomnost proteinů, které mohou zhoršit výtěžnost izolace a následně i ovlivnit průběh PCR [108]. miRNA se také v tělních tekutinách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích [109]. Pro izolaci miRNA se používají různé komerční kity, jejichž vhodnost porovnávalo již mnoho studií. Jednotlivé kity se v úspěšnosti izolace extracelulární RNA odlišují [110,111].

Dalším krokem je kvantifikace izolované miRNA, která probíhá nejčastěji třemi způsoby. Nejvíce používanou metodou je qPCR, dále sekvenování nové generace či hybridizační metody s použitím mikročipů. Každá z těchto metod poskytuje jisté výhody i nevýhody, jako jsou např. rozdíly v senzitivitě a specifitě, kapacitě přístrojů či ceně [112]. Faktory ovlivňující detekci volných miRNA ve slinách jsou shrnuty v tab. 1.

### Diagnostické využití miRNA ve slinách

miRNA byly poprvé ve slinách detekovány roku 2009, kdy byla prokázána

přítomnost miRNA ve slinách i ve slinném supernatantu [31]. miRNA byly následně ve slinách detekovány v exozomech [72], přičemž bylo zjištěno, že v této formě se vyskytují nejvíce [113]. Bylo navrženo, že by miRNA ve slinách mohly sloužit jako biomarkery nádorových a jiných onemocnění, především z oblasti hlavy a krku. Ideální biomarkery by měly být senzitivní a specifické, stabilní, měly by být produktem drah zapojených přímo do vzniku onemocnění, neovlivnitelné potravou, měřitelné v mezích detekce [114], dostupné neinvazivními metodami, specifické pro danou chorobu, měly by chorobu předpovídat ještě před nástupem klinických příznaků a biomarkery nalezené u modelových organismů by měly být použitelné i u člověka [74]. Mezi RNA biomarkery řadíme i miRNA, a to tkáňové i extracelulární neboli cirkulující. V mnoha studiích byla popsána deregulace exprese miRNA při různých onemocněních vč. nádorových [115]. miRNA ve slinách se řadí mezi cirkulující miRNA. Tyto miRNA jsou vhodnými biomarkery nádorových onemocnění z mnoha důvodů. Jsou to méně komplexní molekuly bez posttranskripčních modifikací, jejich detekce a amplifikace je snadná a jejich sekvence jsou konzervované u člověka a u dalších modelových organismů [74]. Změny jejich exprese se snadno detekují a jejich expresní profily jsou pro danou tělní tekutinu specifické [69]. miRNA ve slinách tyto podmínky splňují. Vyskytují se ve vysoce stabilní formě [116] a jejich exprese je u nádorových onemocnění deregulována [31]. Sliny samy o sobě jsou vhodným médiem pro využití v diagnostice onemocnění. Odběr slin je nenáročný, neinvazivní, vzorky se jednoduše zpracovávají, transportují i uchovávají [117].

Následující podkapitoly popisují jednotlivé studie zabývající se výskytem miRNA ve slinách ve spojitosti s nádorovými onemocněními. Souhrn všech deregulovaných miRNA poskytuje tab. 2.

### Nádory hlavy a krku

Nádory hlavy a krku zahrnují nádory dutiny ústní, faryngu (konkrétně nasofaryngu, orofaryngu a hypofaryngu), laryngu, dutiny nosní a vedlejších dutin nosních, velkých a malých

slinných žláz [118]. Jedná se o velmi časté nádorové onemocnění, ročně je na celém světě diagnostikováno kolem 900 000 nových případů [119]. Nejčastějším buněčným typem je dlaždicobuněčný (spinoelulární) karcinom, který tvoří až 90 % všech nádorů hlavy a krku. Postihuje nejčastěji rty, dutinu ústní, hltan i hrtan [120]. Jedná se o maligní nádor vyvíjející se z dlaždicových buněk, které lemují dýchací a trávicí trakt a který může metastazovat lymfatickými cévami [121]. Protože je míra přežití dlaždicobuněčného karcinomu (squamous cell carcinoma – SCC) velice nízká [120], hledají se nové způsoby časně detekce onemocnění a úspěšné léčby.

Spojitosť mezi dlaždicobuněčným karcinomem hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) a miRNA byla objevena roku 2008, kdy byla tkáňová miR-21 analyzována jako onkogen podporující růst nádoru. Pro studii byli vybráni pacienti s nádory orofaryngu, dutiny ústní, laryngu a hypofaryngu [122]. miRNA ve slinách byla objevena o rok později, a to u pacientů s OSCC [31]. Od tohoto objevu se výzkumné týmy zaměřily na využití miRNA ve slinách jako biomarkerů pro diagnostiku HNSCC, zvláště pro OSCC, v jehož případě se sliny zdají být vhodnějším médiem než plazma či vzorky tkání, neboť karcinom přímo omývají [123]. Navíc ve slinách byly již pro diagnostiku OSCC biomarkery popsány, a to biomarkery proteinové [124], mRNA biomarkery [9] a DNA biomarkery [125].

OSCC tvoří až 90 % všech nádorů dutiny ústní. Jedná se o agresivní karcinom s vysokou mortalitou, nicméně při časně detekci onemocnění se míra přežití zvyšuje až na 90 % [126]. Při porovnání pacientů s OSCC se zdravými kontrolami byla poprvé zaznamenána odlišná exprese miRNA ve slinách roku 2009. Jednalo se o snížení hladin miR-200a a miR-125 u pacientů s OSCC. Bylo tedy navrženo, že by se tyto dvě miRNA mohly užívat jako neinvazivní a rychlé diagnostické markery v diagnostice OSCC [31]. Wiklund et al následně pozorovali aberantní expresi miR-375 a metylaci miR-200c-141 u OSCC jak ve tkáních, tak ve slinách [127].

OSCC se většinou vyvíjí z prekanceróz, mezi které patří např. leukoplakie.

**Tab. 2. Přehled deregulovaných miRNA ve slinách u pacientů s nádorovými onemocněními.**

miRNA	↓↑	Počet pacientů	Počet kontrol	p	Senzitivita a specifita	AUC	Patologie	Reference
miR-125a	↓	50	50	0,03	–	0,62	OSCC	[31]
miR-200a	↓			0,01		0,65		
miR-375	↓	15	7	–	–	–	OSCC	[127]
miR-31	↑	45	24	< 0,0001	–	0,82	OSCC	[132]
miR-21	↑	32	16	0,003	84,4 %, 62,5 %	0,762	nádory jícnu	[141]
miR-15b	↑	39 maligní 29 benigní	–	0,0019	69 %, 95 %	0,9	maligní vs. benigní nádory příušní žlázy	[138]
miR-132				0,003				
miR-140-5p				0,0003				
miR-223				0,0542				
miR-10b-3p	↑			0,001	89,7 %, 57,6 %	0,762	nádory jícnu (sliny)	
miR-144				0,012	92,3 %, 47,4 %	0,706		
miR-451				0,002	84,6 %, 57,9 %	0,705		
miR-10b	↑	39	19	0,013	79,5 %, 57,9 %	0,702	nádory jícnu (supernatant slin)	[142]
miR-21				0,015	89,7 %, 47,4 %	0,698		
miR-144				0,036	43,6 %, 89,5 %	0,671		
miR-451				0,006	51,3 %, 84,2 %	0,725		
miR-10b	↑	45	7	0,008	–	–	orální leukoplakie (progresivní vs. neprogresivní)	[129]
miR-708	↑			0,0028				
miR-99b	↓			0,0118				
miR-145	↓			0,034				
miR-181c	↓			0,028				
miR-27b	↑	9 OSCC, 8 OSCC v remisi, 8 OLP	9	0,027	85,7 %, 100 %	0,96	OSCC vs. kontroly OSCC vs. OSCC v remisi OSCC vs. orální lichen planus	[133]
				0,038	85,7 %, 83,3 %	0,88		
				0,016	85,7 %, 100 %	0,98		
miR-136	↓			0,021	88,9 %, 100 %	0,97	OSCC vs. kontroly OSCC vs. OSCC v remisi	
				0,004	88,9 %, 85,7 %	0,9		
miR-9	↑	56	56	< 0,0001	–	0,85	HNSCC	[134]
miR-134	↓			< 0,0001		0,98		
miR-191	↑			< 0,001		0,74		
miR-21	↑	7 maligní, 4 pan- kreatitis	4	0,012	71,4 %, 100 %	–	nádory pankreatu vs. kontroly	[146]
miR-23a				0,001	85,7 %, 100 %			
miR-23b				0,014	85,7 %, 100 %			
miR-29c				0,03	57 %, 100 %			
miR-216	↑			0,024	50 %, 100 %	–	nádory pankreatu vs. pankreatitis	
miR-211	↑	46	14	< 0,001	91 %, 86 %	0,94	nádory příušní žlázy	[139]
miR-1233								
miR-3679-5p	↓	40 maligní 20 benigní	40	0,008	82,5 %, 45 %	0,673	maligní nádory pankreatu vs. kontroly maligní vs. benigní nádory pankreatu	[150]
miR-940	↑			0,006	90 %, 40 %	0,68		
				0,007	90 %, 45 %	0,716		
				0,004	62,5 %, 75 %	0,729		
miR-372					pokles po resekci tumoru		HNSCC	[135]

Tab. 2 – pokračování. Přehled deregulovaných miRNA ve slinách u pacientů s nádorovými onemocněními.

miRNA	↓↑	Počet pacientů	Počet kontrol	p	Senzitivita a specifita	AUC	Patologie	Reference
miR-21	↑	80	20	< 0,001	65 %, 65 %	0,73	maligní transformace orálních prekanceróz	[130]
miR-145	↓				70 %, 60 %	0,68		
miR-184	↑				75 %, 80 %	0,86		
miR-139-5p	↓	25	25	0,006	–	0,805	TSCC	[137]
miR-21	↑	20	24	< 0,01	–	0,74	orální prekancerózy	[131]
miR-31	↑					0,76		
miR-1246	↑	12	13	0,008	66,7 %, 100 %	0,814	nádory pankreato-biliárního traktu	[153]
miR-4644				0,026	75 %, 76,9 %	0,763		
miR-21	↑	31	34	–	97 %, 91 %	–	CRC	[154]
miR-196a	↑	5	5	0,007	–	–	ESCC	[143]

AUC – plocha pod křivkou, OSCC – dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní, OLP – orální lichen planus, HNSCC – dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku, TSCC – dlaždicobuněčný karcinom jazyka, CRC – kolorektální karcinom, ESCC – dlaždicobuněčný karcinom jícnu

↓↑ – snížená či zvýšená exprese

Časná detekce prekanceróz snižuje riziko rozvoje nádoru [128]. Byla proto zkoumána exprese miRNA ve slinách u prekanceróz dutiny ústní. První studie porovnávala deregulaci exprese miRNA ve slinách u progresivní a neprogresivní orální leukoplakie. Byla prokázána odlišná exprese 25 miRNA, přičemž signifikantní rozdíly mezi progresivními a neprogresivními leukoplakii vykazovaly miR-10b, miR-145, miR-708, miR-181c a miR-99b. Byla také srovnávána exprese miRNA ve tkáni pacientů s podobnými leukoplakii s expresí miRNA ve slinách a byla detekována deregulovaná exprese stejných miRNA, ačkoli hladiny miRNA ve slinách byly nižší [129]. Ve druhé studii bylo zjištěno, že zvýšená exprese miR-21, miR-145 a miR-184 může napomáhat časně diagnostice prekanceróz, které se maligně transformují v OSCC, přičemž pouze v případě miR-184 existuje statisticky signifikantní korelace [130]. Hung et al o rok později popsali, že hladiny miR-21 a miR-31 jsou zvýšeny u pacientů s prekancerózami dutiny ústní [131], což je v souladu s výsledky studie z roku 2012, kdy byly zvýšené hladiny miR-31 ve slinách popsány u OSCC. V této studii bylo navíc pozorováno, že po excizi karcinomu hladiny miR-31 prudce poklesly [132].

Další poznatky poskytla rozsáhlá studie, ve které byly porovnávány vzorky slin od pacientů s OSCC, OSCC v remisi, orálním lichen planus a od zdravých kontrol. Nejdůležitějším nálezem byly zvýšené hladiny miR-27b u pacientů s OSCC oproti všem ostatním skupinám, což z miR-27b činí důležitý biomarker tohoto onemocnění. Byly pozorovány i snížené hladiny miR-136 u OSCC oproti zdravým kontrolám i OSCC v remisi [133].

Mezi další miRNA, které byly navrženy jako nové neinvazivní markery HNSCC, patří i miR-9, miR-191 a miR-134. Navíc byla popsána metoda pro izolaci velkého množství miRNA i z malého objemu slin [134]. Dále bylo objeveno, že miR-372 podporuje rozvoj HNSCC a že její hladiny po resekci tumoru klesly [135].

Mezi HNSCC, resp. OSCC, se řadí i dlaždicobuněčný karcinom jazyka (tongue squamous cell carcinoma – TSCC). Jazyk bývá postižen karcinomem ve 41 % případů karcinomu dutiny ústní [136]. Duz et al popsali snížené hladiny miR-193-5p u pacientů s TSCC oproti zdravým kontrolám. Nadto zjistili, že ve vzorcích slin odebraných po operaci tumoru se hladiny této miR vrátily k normálu, což by z miR-193-5p mohlo činit marker specifický pro TSCC [137].

První studie zkoumající deregulaci exprese miRNA ve slinách pacientů s kar-

cinomy slinných žláz se zaměřila na karcinom příušní žlázy. V této studii byly popsány rozdíly exprese miRNA u benigních a maligních nádorů příušní žlázy. Největší specifitu, a tedy i možnost klinického využití, vykazovala kombinace navrhovaných markerů miR-140, miR-223, miR-15b a miR-132 [138]. Stejní autoři také sledovali rozdíly v expresi miRNA ve slinách u pacientů s různými histologickými typy nádorů příušní žlázy, a to benigními i maligními. Ve výsledku identifikovali sedm miRNA s vyšší expresí u pacientů s nádorem, z toho vybrali dvě miRNA, miR-1233 a miR-211, jako biomarkery nádorů příušní žlázy s 91% senzitivitou a 86% specifitou. V této studii bylo také zjištěno, že pět ze sedmi miRNA, které vykazovaly odlišnou expresi u pacientů s nádorem a u zdravých kontrol, nebylo exprimováno ve slinách získaných přímo z příušní žlázy. Z toho plyne, že by tyto miRNA neměly být specificky exprimovány či vylučovány postiženou příušní žlázou [139].

### Nádory jícnu

Karcinom jícnu představoval v roce 2015 celosvětově jedenácté nejčastější nádorové onemocnění s incidencí 483 000 a šestou nejčastější příčinou úmrtí kvůli nádoru se 439 000 úmrtími za rok [119]. Nádory jícnu se dělí na dva

hlavní typy – SCC vyvíjející se z epitelových buněk, a adenokarcinom, který mívá počátek v dolní části jícnu [140]. Z důvodu hledání alternativy k invazivním vyšetřením a nutnosti časně diagnostiky onemocnění bylo zkoumáno, zda by miRNA ve slinách nemohly představovat nové biomarkery karcinomu jícnu. První studie se zabývala expresí miRNA ve slinném supernatantu pacientů. Byly pozorovány zvýšené hladiny miR-21 [141]. V další studii byly analyzovány vzorky slin i supernatantu slin. Ve slinách byla zaznamenána zvýšená exprese miR-10b\*, miR-144 a miR-451, v supernatantu kromě jmenovaných i exprese miR-21. Tyto miRNA byly tedy navrženy jako nové biomarkery karcinomu jícnu [142]. Další studie se zabývala miRNA ve slinách i tkáních u dlaždicobuněčného karcinomu jícnu (esophageal squamous cell carcinoma – ESCC). Byly pozorovány zvýšené hladiny miR-196a ve tkáních i ve slinách oproti zdravým kontrolám. Dále byla zkoumána funkce miR-196a v patogenezi ESCC. Byl vysloven názor, že se tato miRNA zapojuje do několika významných signálních drah, jako je např. regulace buněčného cyklu pomocí proteinu p53, a mohla by se proto podílet na inhibici apoptózy nádorových buněk [143].

### Nádory slinivky břišní

Nádory slinivky břišní představovaly roku 2012 sedmou nejčastější příčinu úmrtí způsobenou nádorovým onemocněním [144]. Počet nových případů za rok 2015 se pohyboval okolo 425 000 [119]. Nejčastějším typem karcinomu pankreatu je duktální adenokarcinom se zastoupením 85 % [145]. Karcinom postupuje agresivně a neexistuje efektivní screening pro jeho časnou detekci. V důsledku toho se onemocnění až v 85 % případů dostane do pokročilých stadií, kdy je chirurgická léčba možná pouze u 15 % pacientů [146]. Pozdní stadia karcinomu nelze resekovat, protože již metastazuje ve vzdálenějších částech těla či vrůstá do cév [147]. Nalezení vhodného biomarkery pro časnou detekci onemocnění by tedy mohlo zlepšit jeho prognózu.

První studie zabývající se vhodností miRNA jako biomarkery nádorů

pankreatu sledovaly a zaznamenaly změnu exprese miRNA v plazmě [148] a tkáni [149]. Pro četné výhody slin jako diagnostického média provedli Xie et al studii exprese miRNA ve slinách u pacientů s resekalibilním karcinomem pankreatu a jako biomarkery vhodné pro diagnostiku onemocnění navrhli miR-3679-5p a miR-940. Rozdílná exprese těchto miRNA byla pozorována i při porovnání maligního karcinomu pankreatu s benigním [150]. Humeau et al u pacientů s neresekabilním adenokarcinomem pankreatu zaznamenali zvýšenou expresi miR-21, miR-23a, miR-23b a miR-29c oproti zdravým kontrolám. Kromě tohoto objevu navíc popsali miR-210 a let-7c jako biomarkery pankreatitidy a miR-216 jako miRNA, jejíž exprese odlišuje pankreatitidu od karcinomu, i když v tomto případě senzitivita dosahovala pouze 50 % [146].

Další studii zabývající se miRNA ve slinách u nádorů pankreatu publikovali Machida et al. Tato studie ovšem popisuje karcinomy pankreatobiliárního traktu, který zahrnuje kromě slinivky břišní i žlučník a mimojaterní žlučové cesty. Autoři se zaměřili na exozomální miRNA, přičemž vycházeli z předpokladu, že miRNA se ve slinách vyskytují převážně v exozomech [72,113] a že již byly popsány čtyři exozomální miRNA v séru u pacientů s karcinomem slinivky. Jednalo se o miR-1246, miR-4644, miR-3976 a miR-4306 [151]. Dvě z těchto exozomálních miRNA, miR-1246 a miR-4644, vykazovaly zvýšené hladiny exprese i ve vzorcích slin pacientů s pankreatobiliárním karcinomem. Bylo tedy navrženo, že tyto exozomální miRNA mají původ v postižené tkáni, neboť zvýšené hladiny miR-1246 u pacientů s pankreatobiliárním karcinomem byly pozorovány i ve tkáních [152], ze kterých se mohou vyplavovat do krve a z krve do slin. Nicméně limitací uvedené studie je fakt, že byli vybráni pouze pacienti s pokročilými stadii karcinomu. Aby byl screening karcinomu na podkladě miRNA biomarkery efektivní, bylo by třeba provést další studie zkoumající expresní hladiny miRNA v časnějších stadiích vývoje karcinomu či u pacientů s chronickou pankreatitidou, ze které se karcinom často vyvíjí [153].

### Nádory kolorekta

CRC představuje třetí nejčastější nádorové onemocnění na světě [119]. Souvislost mezi miRNA ve slinách a CRC popisuje v současnosti v anglické literatuře jediná studie, kdy byly prokázány zvýšené hladiny miR-21 u pacientů, a to nejen ve slinách, ale i v plazmě. Nicméně miR-21 ve slinách se jeví jako vhodnější biomarker pro screening CRC díky větší senzitivitě i specifitě, navíc sliny představují technicky jednodušší diagnostické médium [154].

### Závěr

miRNA jsou důležité posttranskripční regulátory genové exprese a v tělních tekutinách, jako je krev, moč či sliny, představují důležité biomarkery stavu organismu. V mnoha studiích bylo prokázáno, že se míra exprese miRNA u různých patologických stavů a onemocnění výrazně liší, přičemž nejvíce pozornosti je věnováno expresi miRNA u pacientů s nádorovými onemocněními. Porovnáváním expresních hladin miRNA u pacientů a zdravých kontrol lze identifikovat diagnostické biomarkery, porovnáním různých skupin pacientů pak biomarkery prognostické.

Využití cirkulujících miRNA ve slinách pro časnou diagnostiku a případně stanovení prognózy u pacientů s nádorovým onemocněním má nesporný potenciál pro zlepšení kvality života pacientů. U čtyř typů nádorových onemocnění, jejichž časná diagnostika je pro terapii klíčová, byla popsána významná deregulace exprese různých slinných miRNA. Zavedením metod využívajících detekce miRNA ve slinách jako biomarkery těchto nádorových onemocnění by se tedy mohla urychlit diagnostika či příp. posoudit prognóza. Sliny navíc pro jednoduchost odběru, skladování i další zpracování představují vhodné neinvazivní diagnostické médium.

Nicméně aby slinné miRNA mohly být využívány v klinické praxi, je třeba zhodnotit vliv řady metodických aspektů způsobujících technologickou variabilitu při jejich detekci. Po nalezení optimálních analytických postupů a jejich standardizaci a po rozšíření studií na větší počet pacientů a nezávislých validacích výsledků by miRNA mohly sloužit jako užitečné biomarkery daných onemocnění.



## Literatura

1. Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci* 2016; 8(3): 133–137. doi: 10.1038/ijos.2016.38.
2. Panat SR, Agarwal N, Kishore M et al. Sialochemistry – an emerging oral diagnostic tool. *J Dent Sci Oral Rehabil* 2013; 4(1): 1–3.
3. Wong DT. Salivaomics. *J Am Dent Assoc* 2012; 143 (Suppl 10): 19S–24S.
4. Wang X, Kaczor-Urbanowicz KE, Wong DT. Salivary biomarkers in cancer detection. *Med Oncol* 2017; 34(1): 7. doi: 10.1007/s12032-016-0863-4.
5. Mandel ID. Sialochemistry in diseases and clinical situations affecting salivary glands. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1980; 12(4): 321–366. doi: 10.3109/10408368009108733.
6. Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis* 2002; 8(2): 69–76.
7. AlMoharib HS, AlMubarak A, AlRowis R et al. Oral fluid based biomarkers in periodontal disease: part 1. *Saliva. J Int Oral Health* 2014; 6(4): 95–103.
8. Baughan LW, Robertello FJ, Sarrett DC et al. Salivary mucin as related to oral Streptococcus mutans in elderly people. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15(1): 10–14.
9. Li Y, St John MA, Zhou X et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2004; 10(24): 8442–8450. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1167.
10. St. John MA, Li Y, Zhou X et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130(8): 929–935. doi: 10.1001/archotol.130.8.929.
11. Streckfus C, Bigler L, Navazesh M et al. Cytokine concentrations in stimulated whole saliva among patients with primary Sjögren's syndrome, secondary Sjögren's syndrome, and patients with primary Sjögren's syndrome receiving varying doses of interferon for symptomatic treatment of the condition: a preliminary study. *Clin Oral Investig* 2001; 5(2): 133–135.
12. Bonamico M, Nenna R, Montuori M et al. First salivary screening of celiac disease by detection of anti-transglutaminase autoantibody radioimmunoassay in 5000 Italian primary school children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 52(1): 17–20. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181e6f2d0.
13. Floriano PN, Christodoulides N, Miller CS et al. Use of saliva-based nano-biochip tests for acute myocardial infarction at the point of care: a feasibility study. *Clin Chem* 2009; 55(8): 1530–1538. doi: 10.1373/clinchem.2008.117713.
14. Rao PV, Reddy AP, Lu X et al. Proteomic identification of salivary biomarkers of type-2 diabetes. *J Proteome Res* 2009; 8(1): 239–245. doi: 10.1021/pr8003776.
15. Amado LA, Villar LM, de Paula VS et al. Detection of hepatitis A, B, and C virus-specific antibodies using oral fluid for epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(2): 149–155.
16. Viet CT, Schmidt BL. Methylation array analysis of preoperative and postoperative saliva DNA in oral cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(12): 3603–3611. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0507.
17. Sivadasan P, Gupta MK, Sathe GJ et al. Human salivary proteome—a resource of potential biomarkers for oral cancer. *J Proteomics* 2015; 127(Pt A): 89–95. doi: 10.1016/j.jprot.2015.05.039.
18. Bigler LR, Streckfus CF, Copeland L et al. The potential use of saliva to detect recurrence of disease in women with breast carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002; 31(7): 421–431.
19. Wu Y, Shu R, Luo LJ et al. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodontol Res* 2009; 44(5): 636–644. doi: 10.1111/j.1600-0765.2008.01172.x.
20. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A et al. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010; 6(1): 78–95. doi: 10.1007/s11306-009-0178-y.
21. Tsuruoka M, Hara J, Hirayama A et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients. *Electrophoresis* 2013; 34(19): 2865–2872. doi: 10.1002/elps.201300019.
22. Dewhirst FE, Chen T, Izard J et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010; 192(19): 5002–5017. doi: 10.1128/JB.00542-10.
23. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 2008; 87(11): 1016–1020. doi: 10.1177/154405910808701104.
24. Liou TC, Chang TT, Young KC et al. Detection of HCV RNA in saliva, urine, seminal fluid, and ascites. *J Med Virol* 1992; 37(3): 197–202.
25. Lazarevic V, Whiteson K, Gaïa N et al. Analysis of the salivary microbiome using culture-independent techniques. *J Clin Bioinforma* 2012; 2: 4. doi: 10.1186/2043-9113-2-4.
26. Farrell JJ, Zhang L, Zhou H et al. Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut* 2012; 61(4): 582–588. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300784.
27. Goodson JM, Groppo D, Halem S et al. Is obesity an oral bacterial disease? *J Dent Res* 2009; 88(6): 519–523. doi: 10.1177/0022034509338353.
28. Li Y, Zhou X, St. John MA et al. RNA profiling of cell-free saliva using microarray technology. *J Dent Res* 2004; 83(3): 199–203. doi: 10.1177/154405910408300303.
29. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(3): 949–957. e1–e7. doi: 10.1053/j.gastro.2009.11.010.
30. Zhang L, Xiao H, Zhou H et al. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69(19): 3341–3350. doi: 10.1007/s00018-012-1027-0.
31. Park NJ, Zhou H, Elashoff D et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2009; 15(17): 5473–5477. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0736.
32. Hicks SD, Ignacio C, Gentile K et al. Salivary miRNA profiles identify children with autism spectrum disorder, correlate with adaptive behavior, and implicate ASD candidate genes involved in neurodevelopment. *BMC Pediatr* 2016; 16: 52. doi: 10.1186/s12887-016-0586-x.
33. Alevizos I, Alexander S, Turner RJ et al. MicroRNA expression profiles as biomarkers of minor salivary gland inflammation and dysfunction in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2011; 63(2): 535–544. doi: 10.1002/art.30131.
34. Machida T, Tomofuji T, Ekuni D et al. MicroRNAs in salivary exosome as potential biomarkers of aging. *Int J Mol Sci* 2015; 16(9): 21294–21309. doi: 10.3390/ijms160921294.
35. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843–854.
36. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75(5): 855–862.
37. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M et al. The 21 nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403(6772): 901–906. doi: 10.1038/35002607.
38. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408(6808): 86–89. doi: 10.1038/35040556.
39. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294(5543): 853–858. doi: 10.1126/science.1064921.
40. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 858–862. doi: 10.1126/science.1065329.
41. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294(5543): 862–864. doi: 10.1126/science.1065329.
42. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M et al. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes *miR15* and *miR16* in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(24): 15524–15529. doi: 10.1073/pnas.242606799.
43. Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG et al. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003; 1(12): 882–891.
44. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K et al. Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64(11): 3753–3756. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0637.
45. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65(14): 6029–6033. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0137.
46. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65(16): 7065–7070. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1783.
47. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014; 42(Database issue): D68–D73. doi: 10.1093/nar/gkt1181.
48. Lu J, Getz G, Miska EA et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435(7043): 834–838. doi: 10.1038/nature03702.
49. Calin GA, Liu CG, Sevignani C et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(32): 11755–11760. doi: 10.1073/pnas.0404432101.
50. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353(17): 1793–1801. doi: 10.1056/NEJMoa050995.
51. Christopher AF, Kaur RP, Kaur G et al. MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspect Clin Res* 2016; 7(2): 68–74. doi: 10.4103/2229-3485.179431.
52. Lee Y, Jeon K, Lee JT et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21(17): 4663–4670.
53. Lee Y, Ahn C, Han J et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425(6956): 415–419. doi: 10.1038/nature01957.
54. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432(7014): 231–235. doi: 10.1038/nature03049.
55. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001; 106(1): 23–34.
56. Hammond SM, Bernstein E, Beach D et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404(6675): 293–296. doi: 10.1038/35005107.
57. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297(5589): 2056–2060. doi: 10.1126/science.1073827.
58. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(17): 9779–9784. doi: 10.1073/pnas.1630797100.

59. Fire A, Xu S, Montgomery MK et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806–811. doi: 10.1038/35888.
60. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15(2): 188–200.
61. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; 15(2): 185–197. doi: 10.1016/j.molcel.2004.07.007.
62. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 2003; 113(1): 25–36.
63. Xu P, Vernooy SY, Guo M et al. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Curr Biol* 2003; 13(9): 790–795.
64. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432(7014): 226–230. doi: 10.1038/nature03076.
65. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(48): 18255–18260. doi: 10.1073/pnas.0608791103.
66. Caudy AA, Myers M, Hannon GJ et al. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* 2002; 16(19): 2491–2496. doi: 10.1101/gad.1025202.
67. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(9): 2999–3004. doi: 10.1073/pnas.0307323101.
68. Chim SS, Shing TK, Hung EC et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 2008; 54(3): 482–490. doi: 10.1373/clinchem.2007.097972.
69. Chen X, Ba Y, Ma L et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18(10): 997–1006. doi: 10.1038/cr.2008.282.
70. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141(5): 672–675. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07077.x.
71. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(30): 10513–10518. doi: 10.1073/pnas.0804549105.
72. Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 2010; 16(1): 34–38. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01604.x.
73. Hanke M, Hoefig K, Merz H et al. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol Oncol* 2010; 28(6): 655–661. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.01.027.
74. Weber JA, Baxter DH, Zhang S et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56(11): 1733–1741. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.
75. Kosaka N, Izumi H, Sekine K et al. MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 2010; 1(1): 7. doi: 10.1186/1758-907X-1-7.
76. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engle PW et al. Plasma microRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem* 2009; 55(11): 1977–1983. doi: 10.1373/clinchem.2009.131797.
77. Chen X, Zhang J, Zen K et al. MicroRNAs as blood-based biomarkers of cancer. In: Cho WCS (eds). *MicroRNAs in Cancer Translational Research*. Dordrecht: Springer Netherlands 2011: 499–532.
78. Hunter MP, Ismail N, Zhang X et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3(11): e3694. doi: 10.1371/journal.pone.0003694.
79. Zhang Y, Liu D, Chen X et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010; 39(1): 133–144. doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.010.
80. Valadi H, Ekström K, Bossios A et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9(6): 654–659. doi: 10.1038/ncb1596.
81. Zerneck A, Bidzhekov K, Noels H et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009; 2(100): ra81. doi: 10.1126/scisignal.2000610.
82. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(12): 5003–5008. doi: 10.1073/pnas.1019055108.
83. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A et al. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(16): 7223–7233. doi: 10.1093/nar/gkr254.
84. Wang K, Zhang S, Weber J et al. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(20): 7248–7259. doi: 10.1093/nar/gkq601.
85. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; 13(4): 423–433. doi: 10.1038/ncb2210.
86. Fendler A, Stephan C, Yousef GM et al. The translational potential of microRNAs as biofluid markers of urological tumours. *Nat Rev Urol* 2016; 13(12): 734–752. doi: 10.1038/nrurol.2016.193.
87. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110(1): 13–21. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.04.033.
88. Tsui NB, Ng EK, Lo YM. Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 2002; 48(10): 1647–1653.
89. Köberle V, Pleli T, Schmithals C et al. Differential stability of cell-free circulating microRNAs: implications for their utilization as biomarkers. *PLoS One* 2013; 8(9): e75184. doi: 10.1371/journal.pone.0075184.
90. Yu B, Yang Z, Li J et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 2005; 307(5711): 932–935. doi: 10.1126/science.1107130.
91. Katoh T, Sakaguchi Y, Miyauchi K et al. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev* 2009; 23(4): 433–438. doi: 10.1101/gad.1761509.
92. Jones MR, Quinton LJ, Blahna MT et al. Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression. *Nat Cell Biol* 2009; 11(9): 1157–1163. doi: 10.1038/ncb1931.
93. Skog J, Würdinger T, van Rijn S et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10(12): 1470–1476. doi: 10.1038/ncb1800.
94. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010; 107(5): 677–684. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.215566.
95. Chen X, Liang H, Zhang J et al. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol* 2012; 22(3): 125–132. doi: 10.1016/j.tcb.2011.12.001.
96. Hruštinová A, Votavová H, Dostálová Merkerová M. Circulating microRNAs: methodological aspects in detection of these biomarkers. *Folia Biol* 2015; 61(6): 203–218.
97. Shah MY, Calin GA. The mix of two worlds: non-coding RNAs and hormones. *Nucleic Acid Ther* 2013; 23(1): 2–8. doi: 10.1089/nat.2012.0375.
98. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J et al. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 2014; 18(3): 371–390. doi: 10.1111/jcmm.12236.
99. Landry P, Plante I, Ouellet DL et al. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(9): 961–966. doi: 10.1038/nsmb.1651.
100. Chen SY, Wang Y, Telen MJ et al. The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One* 2008; 3(6): e2360. doi: 10.1371/journal.pone.0002360.
101. Kannan M, Mohan KV, Kulkarni S et al. Membrane array-based differential profiling of platelets during storage for 52 miRNAs associated with apoptosis. *Transfusion* 2009; 49(7): 1443–1450. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02140.x.
102. Kannan M, Atreya C. Differential profiling of human red blood cells during storage for 52 selected microRNAs. *Transfusion* 2010; 50(7): 1581–1588. doi: 10.1111/j.1537-2995.2010.02585.x.
103. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ et al. Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* 2011; 6(9): e24145. doi: 10.1371/journal.pone.0024145.
104. Pritchard CC, Kroh E, Wood B et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res* 2012; 5(3): 492–497. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370.
105. Wang K, Yuan Y, Cho JH et al. Comparing the microRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 2012; 7(7): e41561. doi: 10.1371/journal.pone.0041561.
106. Holodniy M, Kim S, Katzenstein D et al. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 1991; 29(4): 676–679.
107. García ME, Blanco JL, Caballero J et al. Anticoagulants interfere with PCR used to diagnose invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4): 1567–1568.
108. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50(4): 298–301. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.032.
109. Andreasen D, Fog JU, Biggs W et al. Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples. *Methods* 2010; 50(4): 56–59. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.006.
110. Brunet-Vega A, Pericay C, Quílez ME et al. Variability in microRNA recovery from plasma: comparison of five commercial kits. *Anal Biochem* 2015; 488: 28–35. doi: 10.1016/j.ab.2015.07.018.
111. Guo Y, Vickers K, Xiong Y et al. Comprehensive evaluation of extracellular small RNA isolation methods from serum in high throughput sequencing. *BMC Genomics* 2017; 18(1): 50. doi: 10.1186/s12864-016-3470-z.
112. Chen M, Calin GA, Meng QH. Circulating microRNAs as promising tumor biomarkers. *Adv Clin Chem* 2014; 67: 189–214. doi: 10.1016/bs.acc.2014.09.007.
113. Gallo A, Tandon M, Alevizos I et al. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One* 2012; 7(3): e30679. doi: 10.1371/journal.pone.0030679.
114. Griffiths HR, Møller L, Bartosz G et al. Biomarkers. *Mol Aspects Med* 2002; 23(1–3): 101–208.
115. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4(3): 143–159. doi: 10.1002/emmm.201100209.
116. Patel RS, Jakymiw A, Yao B et al. High resolution of microRNA signatures in human whole saliva. *Arch Oral*

- Biol 2011; 56(12): 1506–1513. doi: 10.1016/j.archoral-bio.2011.05.015.
117. Yoshizawa JM, Wong DT. Salivary microRNAs and oral cancer detection. *Methods Mol Biol* 2013; 936: 313–324. doi: 10.1007/978-1-62703-083-0\_24.
118. Rothenberg SM, Ellisen LW. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* 2012; 122(6): 1951–1957.
119. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncol* 2017; 3(4): 524–548. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.5688.
120. Cooper JS, Porter K, Mallin K et al. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck* 2009; 31(6): 748–758. doi: 10.1002/hed.21022.
121. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(1): 9–22. doi: 10.1038/nrc2982.
122. Chang SS, Jiang WW, Smith I et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123(12): 2791–2797. doi: 10.1002/ijc.23831.
123. Korostoff A, Reder L, Masood R et al. The role of salivary cytokine biomarkers in tongue cancer invasion and mortality. *Oral Oncol* 2011; 47(4): 282–287. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.02.006.
124. Warnakulasuriya S, Soussi T, Maher R et al. Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. *J Pathol* 2000; 192(1): 52–57. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH669>3.0.CO;2-C.
125. Liao PH, Chang YC, Huang MF et al. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000; 36(3): 272–276.
126. Radhika T, Jeddy N, Nithya S et al. Salivary biomarkers in oral squamous cell carcinoma – an insight. *J Oral Biol Craniofac Res* 2016; 6 (Suppl 1): S51–S54. doi: 10.1016/j.jobcr.2016.07.003.
127. Wiklund ED, Gao S, Hulf T et al. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2011; 6(11): e27840. doi: 10.1371/journal.pone.0027840.
128. George A, Sreenivasan BS, Sunil S et al. Potentially malignant disorders of oral cavity. *J Oral Maxillofac Pathol* 2011; 2(1): 95–100.
129. Yang Y, Li YX, Yang X et al. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. *BMC Cancer* 2013; 13: 129. doi: 10.1186/1471-2407-13-129.
130. Zahran F, Ghalwash D, Shaker O et al. Salivary microRNAs in oral cancer. *Oral Dis* 2015; 21(6): 739–747. doi: 10.1111/odi.12340.
131. Hung KF, Liu CJ, Chiu PC et al. MicroRNA-31 upregulation predicts increased risk of progression of oral potentially malignant disorder. *Oral Oncol* 2016; 53: 42–47. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.11.017.
132. Liu CJ, Lin SC, Yang CC et al. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2012; 34(2): 219–224. doi: 10.1002/hed.21713.
133. Momen-Heravi F, Trachtenberg AJ, Kuo WP et al. Genomewide study of salivary microRNAs for detection of oral cancer. *J Dent Res* 2014; 93 (Suppl 7): 865–935. doi: 10.1177/0022034514531018.
134. Salazar C, Nagadia R, Pandit P et al. A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell Oncol* 2014; 37(5): 331–338. doi: 10.1007/s13402-014-0188-2.
135. Yeh LY, Liu CJ, Wong YK et al. miR-372 inhibits p62 in head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2015; 6(8): 6062–6075. doi: 10.18632/oncotarget.3340.
136. Patel RS, Clark JR, Dirven R et al. Prognostic factors in the surgical treatment of patients with oral carcinoma. *ANZ J Surg* 2009; 79(1–2): 19–22. doi: 10.1111/j.1445-2197.2008.04791.x.
137. Duz MB, Karatas OF, Guzel E et al. Identification of miR-139-5p as a saliva biomarker for tongue squamous cell carcinoma: a pilot study. *Cell Oncol* 2016; 39(2): 187–193. doi: 10.1007/s13402-015-0259-z.
138. Matse JH, Yoshizawa J, Wang X et al. Discovery and prevalidation of salivary extracellular microRNA biomarkers panel for the noninvasive detection of benign and malignant parotid gland tumors. *Clin Cancer Res* 2013; 19(11): 3032–3038. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3505.
139. Matse JH, Yoshizawa J, Wang X et al. Human salivary micro-RNA in patients with parotid salivary gland neoplasms. *PLoS One* 2015; 10(11): e0142264. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3505.
140. David S, Meltzer S. MicroRNA involvement in esophageal carcinogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11(6): 612–616. doi: 10.1016/j.coph.2011.09.006.
141. Xie ZJ, Chen G, Zhang XC et al. Saliva supernatant miR-21: a novel potential biomarker for esophageal cancer detection. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(12): 6145–6149.
142. Xie Z, Chen G, Zhang X et al. Salivary microRNAs as promising biomarkers for detection of esophageal cancer. *PLoS One* 2013; 8(4): e57502. doi: 10.1371/journal.pone.0057502.
143. Fendereski M, Zia MF, Shafiee M et al. MicroRNA-196a as a potential diagnostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2017; 35(2): 78–84. doi: 10.1080/07357907.2016.1254228.
144. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359–386. doi: 10.1002/ijc.29210.
145. Howlader N, Noone AM, Krapcho M (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2013. [online]. Available from: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2013/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/).
146. Humeau M, Vignolle-Vidoni A, Sicard F et al. Salivary microRNA in pancreatic cancer patients. *PLoS One* 2015; 10(6): e0130996. doi: 10.1371/journal.pone.0130996.
147. Callery MP, Chang KJ, Fishman EK et al. Pretreatment assessment of resectable and borderline resectable pancreatic cancer: expert consensus statement. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(7): 1727–1733. doi: 10.1245/s10434-009-0408-6.
148. Wang J, Chen J, Chang P et al. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res* 2009; 2(9): 807–813. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-09-0094.
149. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006; 24(29): 4677–4684. doi: 10.1200/JCO.2005.05.5194.
150. Xie Z, Yin X, Gong B et al. Salivary microRNAs show potential as a noninvasive biomarker for detecting resectable pancreatic cancer. *Cancer Prev Res* 2015; 8(2): 165–173. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0192.
151. Madhavan B, Yue S, Galli U et al. Combined evaluation of a panel of protein and miRNA serum-exosome biomarkers for pancreatic cancer diagnosis increases sensitivity and specificity. *Int J Cancer* 2015; 136(11): 2616–2627. doi: 10.1002/ijc.29324.
152. Ali S, Saleh H, Sethi S et al. MicroRNA profiling of diagnostic needle aspirates from patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2012; 107(8): 1354–1360. doi: 10.1038/bjc.2012.383.
153. Machida T, Tomofuji T, Maruyama T et al. miR 1246 and miR 4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreatobiliary tract cancer. *Oncol Rep* 2016; 36(4): 2375–2381. doi: 10.3892/or.2016.5021.
154. Sazanov AA, Kiselyova EV, Zakharenko AA et al. Plasma and saliva miR-21 expression in colorectal cancer patients. *J Appl Genet* 2017; 58(2): 231–237. doi: 10.1007/s13353-016-0379-9.

# Expression Analysis of *OIP5-AS1* in Non-Small Cell Lung Cancer

## Expresní analýza *OIP5-AS1* u nemalobuněčného karcinomu plic

Esfandi F.<sup>1,2</sup>, Kholghi Oskooei V.<sup>1</sup>, Taheri F.<sup>2</sup>, Kiani A.<sup>3</sup>, Taheri M.<sup>1,4</sup>, Ghafouri-Fard S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Genetics, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> GenIran Lab, Tashkhis Gene Pajohesh, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Tracheal Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Urogenital Stem Cell Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Summary

**Background:** Lung cancer as the most fatal cancer of men has prompted researchers to find biomarkers for early detection and prognosis. Among the possible biomarkers are a group of non-coding transcripts with sizes more than 200 nucleotides called long non-coding RNAs (lncRNAs). **Aims:** In the present study, we evaluated the expression levels of the lncRNA *OIP5 antisense RNA 1 (OIP5-AS1)* in 32 non-small cell lung cancer (NSCLC) samples compared with their corresponding adjacent non-cancerous tissue (ANCTs) by means of real-time polymerase chain reaction. The samples were obtained from patients who were admitted at Labbafi-Nejad Hospital during 2015 and 2016. **Results:** *OIP5-AS* expression levels was significantly decreased in tumoral tissues compared with ANCTs in total samples and in male subgroup. However, no association was found between relative expression of *OIP5-AS1* and clinicopathological data of patients or history of smoking. Expression levels of this lncRNA were not correlated with patients' age. **Conclusions:** This lncRNA is possibly a novel biomarker of NSCLC in Iranian patients. Future studies are needed to confirm the results of our study in larger sample sizes. Moreover, based on the difference in lung cancer associated risk factors in different populations, population-based studies are needed to explore the role of this lncRNA in the pathogenesis of cancers in each region to design appropriate targeted therapies for each population.

### Key words

lung cancer – *OIP5-AS* – lncRNA – long non-coding RNA

### Souhrn

**Úvod:** Karcinom plic jako nejvíce fatální nádor mužů přiměl výzkumníky ke hledání biomarkerů pro včasnou detekci a prognózu. Mezi možné biomarkery patří skupina nekódujících transkriptů o velikosti více než 200 nukleotidů nazývaná dlouhé nekódující RNA (lncRNA). **Cíle:** V této studii jsme vyhodnotili hladiny exprese *OIP5 antisense RNA 1 (OIP5-AS1)* u 32 vzorků nemalobuněčného karcinomu plic (non-small cell lung cancer – NSCLC) ve srovnání s odpovídající sousedící nenádorovou tkání (adjacent non-cancerous tissue – ANCT) pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Vzorky byly získány od pacientů, kteří byli přijati v nemocnici Labbafi-Nejad v letech 2015 a 2016. **Výsledky:** Úroveň exprese *OIP5-AS* byly významně sníženy v nádorových tkáních ve srovnání s ANCT v celkových vzorcích a v podskupině mužů. Nebyla však zjištěna žádná souvislost mezi relativní expesí *OIP5-AS1* a klinicko-patologickými daty pacientů nebo historií kouření. Expresní hladiny této lncRNA nebyly korelovány s věkem pacientů. **Závěry:** Tato lncRNA je možný nový biomarker NSCLC u iránských pacientů. K potvrzení výsledků naší studie jsou potřebné budoucí studie u větších počtů pacientů. Navíc na základě rozdílů v rizikových faktorech spojených s rakovinou plic v různých populacích jsou studie založené na populaci potřebné k prozkoumání role této lncRNA v patogenezi onkologických onemocnění v každé oblasti za účelem navržení vhodných cílených terapií pro každou populaci.

### Klíčová slova

karcinom plic – *OIP5-AS* – lncRNA – dlouhé nekódující RNA

The current study was supported by a grant from Shahid Beheshti University of Medical Sciences (grant number: 12810).

Studie byla podpořena grantem Univerzity lékařských věd Shahid Beheshti (č. 12810).

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 studie 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.



Soudeh Ghafouri-Fard, MD, PhD

Department of Medical Genetics  
Shahid Beheshti University of Medical Sciences

Bldg No.2 SBUMS

Arabi Ave, Daneshjoo Blvd, Velenjak  
Tehran, Iran

e-mail: s.ghafourifard@sbmu.ac.ir

Mohammad Taheri, MD

GenIran Lab  
Tashkhis Gene Pajohesh  
89 Mofateh Street, no.2

Tehran, Iran

e-mail: mohammad\_823@yahoo.com

Submitted/Obdrženo: 25. 4. 2018

Accepted/Přijato: 27. 5. 2018

doi: 10.14735/amko2018260

**Background**

Lung cancer has been regarded as the most fatal cancer in men and women worldwide and in distinct regions, resp. [1]. Analysis of data provided by the Iranian National Pathology Based Cancer Registry (INPBCR) estimated the 5-year prevalence to be 4.21 (95% uncertainty level – 3.37–5.38) per 100,000 adults, with a male – female ratio of 2.01 [2]. The most common type of lung cancer is non-small cell lung cancer (NSCLC) which accounts for approximately 85% of all cases and is further categorized into three types – squamous-cell carcinoma, adenocarcinoma, and large-cell carcinoma [3]. The cure rate of patients is disappointingly low [4] possibly due to extensive disease burden, unsuitable performance condition, several comorbidities, deprived socio-economic status and malnutrition [5]. Identification of proper biomarkers for early detection of lung cancer is expected to enhance patients’ outcomes. Among putative biomarkers for lung cancer are long non-coding RNAs (lncRNAs). These heterogeneous types of transcripts have various fundamental functions in gene regulation and are involved in the pathogenesis of human cancers [6–11]. A comprehensive study to find the lncRNA and mRNA signature in lung adenocarcinoma samples and normal tissues has identified more than two thousands lncRNAs with differential expression in these two sets of samples [12]. More recently, the lncRNA opa interacting protein 5-antisense 1

(OIP5-AS1) has been shown to be involved in the pathogenesis of lung adenocarcinoma through sponging miR-448 and indirectly altering the expression of *Bcl-2* [13]. The present study aimed to assess the expression level of *OIP5-AS1* in NSCLC samples compared with their corresponding adjacent non-cancerous tissues (ANCTs). We hypothesized that the expression level of this lncRNA is higher in cancerous tissues compared with ANCTs in association with patients’ clinical data.

**Methods**

**Patients’ samples**

A total of 32 patients with definite diagnosis of NSCLC who were admitted at Labbafi-Nejad Hospital during 2015 and 2016 entered the study. Lung cancer tissues and the corresponding ANCTs were removed during surgery and snap-frozen in liquid nitrogen instantly. All patients signed the informed consent forms. The study protocol was approved by the ethics committee of Shahid Beheshti University of Medical Sciences (IR.SBMU.MSP.REC.1395.525).

**Sampling and RNA extraction**

Total RNA was isolated from cancerous tissues and ANCTs using the TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) based on the protocol provided by the company except for inclusion of a DNase I treatment step. RNA concentration was assessed by 260/280 nM absorbance

using Nanodrop equipment (Thermo Scientific).

**cDNA synthesis and quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)**

Applied Biosystems High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits was used for cDNA synthesis based on the manufacturer’s instructions. Afterwards, synthesized cDNAs were stocked at –20 °C until PCR was performed. Primers and probes used for PCR were designed using the allele ID 7 for x64 Windows software (Premier Biosoft, Palo Alto, USA). *HPRT1* was chosen as the reference gene. The primers and probes sequences and PCR product length are shown in Tab. 1. All experiments were performed on the rotor gene 6000 corbett RT-PCR System. Applied Biosystems TaqMan® Universal PCR Master Mix was used for quantification of relative levels of transcripts. PCR program included a denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 10 sec and 60 °C for 60 sec. The final extension step was performed at 72 °C for 5 min.

**Statistical analysis**

SPSS version 18 (Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis. Relative expression of *OIP5-AS1* in tumoral tissues compared with ANCTs was assessed using Ln [Efficiency<sup>Δ</sup>ΔCT] values. The association between *OIP5-AS1* relative expressions and clinicopathologic data of patients was estimated using Chi-square test. Spearman correlation coefficient was calculated to assess the correlation between *OIP5-AS1* transcript levels and patient’s age. To test the significance of difference in means of transcript levels between tumor and ANCT groups we used Kruschke’s Bayesian estimation to fit two-sample Bayesian paired t-test. P values less than 0.05 were considered significant.

**Results**

**Relative expression of OIP5-AS in lung cancer tissues compared with ANCTs**

*OIP5-AS1* expression levels were significantly decreased in tumor tissues compared with ANCTs in total samples and in male subgroup (Tab. 2).

**Tab. 1. The primers and probes sequences and PCR product length.**

Gene name	Primer and probe sequence	Primer and probe length	Product length
<i>HPRT1</i>	F: AGCCTAAGATGAGAGTTC	18	88
	R: CACAGAACTAGAACATTGATA	21	
	FAM -CATCTGGAGTCCTATTGACATCGC- TAMRA	24	
<i>OIP5-AS1</i>	F: TCAGCCTCCAAGTAGCTAGG	20	77
	R: GTCCAGCCTTTTCAGCCTAG	21	
	FAM- CGCACCACCAGCTCAGCCTGATT- TAMRA	24	

PCR – polymerase chain reaction

**Tab. 2. Relative expression of *OIP5-AS1* in lung cancer samples compared with ANCTs in age- and sex-based subgroups of patients (HDI – 95% credible interval based on Bayesian approach).**

<i>OIP5-AS1</i> expression		Sample number	Relative expression	SD	Effect size	p	95% HDI
total		32	-2.815	0.73	-0.721	< 0.0001	-4.28, -1.37
male		24	-2.976	0.9191	-0.718	0.016	-4.75, -1.11
female		8	-2.385	1.6	-0.667	0.101	-5.52, 0.78
< 60	male	15	-4.201	1.462	-0.947	0.006	-7.06, -1.24
	female	5	-1.668	5.15	-0.385	0.406	-10.15, 7.24
≥ 60	male	9	-1.774	1.288	-0.456	0.12	-4.35, 0.75
	female	3	-2.975	5.533	-0.703	0.223	-11.89, 6.55

ANCT – adjacent non-cancerous tissue, HDI – human development index, SD – standard deviation

**Association study of *OIP5-AS1* expression and clinicopathological data of patients**

No association was found between relative expression of *OIP5-AS1* and clinicopathological data of patients (Tab. 3).

**Assessment of correlation between *OIP5-AS1* expression and patient's age**

There was no correlation between patient's age and relative expression of *OIP5-AS1* either in tumor tissues or in ANCTs (Graph 1).

**Discussion**

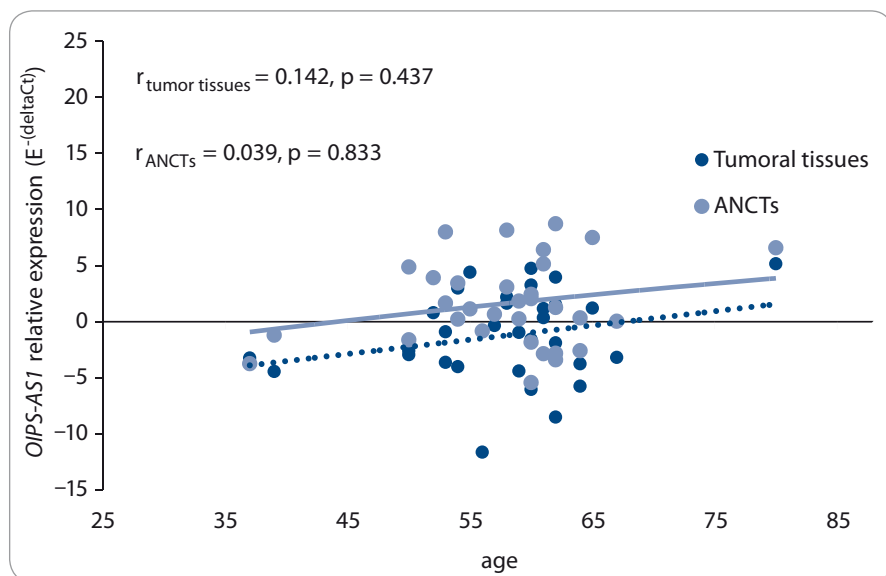
The critical roles of lncRNAs in regulation of genes involved in DNA repair [14], induction of epithelial to mesenchymal transition (EMT) [15,16], inhibition of tumor suppressors [17,18], control of apoptosis and cellular metabolism [19] and regulation of nuclear receptors function [20] potentiate them as molecular markers of cancer. Expression levels of several lncRNAs have been assessed in lung cancer specimens and cell lines. For instance, the metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (*MALAT1*) has been recognized as a predictive marker of metastatic capacity of lung cancer cells which acts through modulation of expression of several metastasis-associated genes [21]. The maternally expressed gene 3 (*MEG3*) has also been involved in the EMT in lung cancer cells [22]. The oncogenic effects of *OIP5-AS1* have also been clarified in

**Tab. 3. Association study of *OIP5-AS1* expression and clinicopathological data of patients.**

	<i>OIP5-AS1</i> up-regulation	<i>OIP5-AS1</i> down-regulation	Total number	p
<b>Age</b>				
< 60 years	7 (43.8%)	9 (56.3%)	16	0.723
≥ 60 years	8 (50%)	8 (50%)	16	
<b>Gender</b>				
male	12 (50%)	12 (50%)	24	0.691
female	3 (37.5%)	5 (62.5%)	8	
<b>Smoking</b>				
yes	12 (48%)	13 (52%)	25	1
no	3 (42.9%)	4 (57.1%)	7	
<b>Stage</b>				
I	6 (85.7%)	1 (14.3%)	7	0.068
II	3 (27.3%)	8 (72.7%)	11	
III	6 (42.9%)	8 (57.1%)	14	
<b>Subtype</b>				
adenocarcinoma	7 (38.9%)	11 (61.1%)	18	0.305
squamous cell carcinoma	8 (57.1%)	6 (42.9%)	14	

lung adenocarcinoma recently [13]. This lncRNA is transcribed in the antisense direction from the *OIP5* gene, an oncogene overexpressed in numerous malignancies [23]. While *OIP5-AS1* plays oncogenic roles in lung cancer [13], in HeLa cells, it inhibits cell proliferation

possibly through interaction with the RNA-binding protein of human antigen (RBP HuR) and decreasing its readiness to target mRNAs of cyclins A and D1 (*CCNA2* and *CCND1*) and *SIRT1* [24]. In an effort to validate the results of the previous study on the role of *OIP5-AS1*



**Graph. 1. Correlation between patient’s age and OIP5-AS1 relative expression in tumoral tissues as well as ANCTs ( $E - \text{efficiency, } \Delta Ct = Ct_{OIP5-AS1} - Ct_{HPRT}$ ). ANCT – adjacent non-cancerous tissue**

in lung cancer [13] and assess its potential as a biomarker in these patients, we evaluated the expression levels of this lncRNA in NSCLC samples from Iranian patients compared with the corresponding ANCTs. However, contrary to Deng et al. we detected down-regulation of its expression levels in tumor tissues compared with ANCTs. Nevertheless, our study is in line with Deng et al., study regarding the lack of association between OIP5-AS1 expression levels and patient’s age. We also assessed the association between its expression levels and history of smoking in patients as well as disease stage and found no associations. The latter parameters were not evaluated in Deng et al. study. The discrepancy between the results of our current study and those of Deng et al. [13] can be explained by the heterogeneity of samples in our study (comprising both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma) or the inherent difference in the pathogenesis of lung cancer due to geographic-related dissimilarities or hazards exposures. A previous study revealed geography-related patterns in the methylation profiles of NSCLC tumors [25]. Moreover, exposure to inorganic dusts, heavy metals and chemical compounds has been associated with lung cancer risk in Iranian patients [26]. Thus, the

possibility of specific geographic-based hazards and their possible effects on gene expression signature cannot be ignored. Consequently, population-based studies are needed to explore the role of lncRNAs in the pathogenesis of cancers in each region to design appropriate targeted therapies for each population.

**References**

1. Didkowska J, Wojciechowska U, Manczuk M et al. Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med* 2016; 4(8): 150. doi: 10.21037/atm.2016.03.11.
2. Vardanjani HM, Zeinali M, Radmerikhi S et al. Lung cancer prevalence in Iran by histologic subtypes. *Adv Biomed Res* 2017; 6: 111. doi: 10.4103/2277-9175.213881.
3. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Trans Lung Cancer Res* 2016; 5(3): 288–300. doi: 10.21037/tlcr.2016.06.07.
4. Zhou CC, Wu YL, Chen GY et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011; 12(8): 735–742. doi: 10.1016/S1470-2045(11)70184-X.
5. Pathy S, Roy S, Malik PS et al. Treatment compliance and outcome in geriatric patients with locally advanced non-small cell lung cancer: experience from India. *Iranian Journal of Cancer Prevention* 2016; 9(6): e5481. doi: 10.17795/ijcp-5481.
6. Dianatpour A, Faramarzi S, Geranpayeh L et al. Expression analysis of AFAP1-AS1 and AFAP1 in breast cancer. *Cancer Biomark* 2018; 22(1): 49–54. doi: 10.3233/CBM-170831.
7. Taheri M, Omrani MD, Ghafouri-Fard S. Long non-coding RNA expression in bladder cancer. *Biophys Res* 2017. doi: 10.1007/s12551-017-0379-y.
8. Taheri M, Pouresmaeili F, Omrani MD et al. Association of ANRIL gene polymorphisms with prostate cancer and ben-

9. Nikipayam E, Tasharofi B, Sarrafzadeh S et al. The role of long non-coding RNAs in ovarian cancer. *Iran Biomed J* 2017; 21(1): 3–15. doi: 10.6091/21.1.24.
10. Soudyab M, Iranpour M, Ghafouri-Fard S. The role of long non-coding RNAs in breast cancer. *Arch Iran Med* 2016; 19(7): 508–517. doi: 0161907/AIM.0011.
11. Taheri M, Omrani MD, Ghafouri-Fard S. Long non-coding RNAs expression in renal cell carcinoma. *Journal of Biology and Today’s World* 2017; 6(12): 240–247. doi: 10.15412/JJBTW.01061201.
12. Xu G, Chen J, Pan QS et al. Long non-coding RNA expression profiles of lung adenocarcinoma ascertained by microarray analysis. *PLoS One* 2014; 9(8): e104044. doi: 10.1371/journal.pone.0104044.
13. Deng J, Deng H, Liu C et al. Long non-coding RNA OIP5-AS1 functions as an oncogene in lung adenocarcinoma through targeting miR-448/Bcl-2. *Biomed Pharmacother* 2018; 98: 102–110. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.031.
14. Dianatpour A, Ghafouri-Fard S. The role of long non coding RNAs in the repair of DNA double strand breaks. *Int J Mol Cell Med* 2017; 6(1): 1–12.
15. Dianatpour A, Ghafouri-Fard S. Long non coding RNA expression intersecting cancer and spermatogenesis: a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(10): 2601–2610. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.10.2601.
16. Nikipayam E, Soudyab M, Tasharofi B et al. Expression analysis of long non-coding ATB and its putative target in breast cancer. *Breast Dis* 2017; 37(1): 11–20. doi: 10.3233/BD-160264.
17. Khorshidi HR, Taheri M, Noroozi R et al. ANRIL genetic variants in Iranian breast cancer patients. *Cell J* 2017; 19 (Suppl 1): 72–78. doi: 10.22074/cellj.2017.4496.
18. Iranpour M, Soudyab M, Geranpayeh L et al. Expression analysis of four long noncoding RNAs in breast cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(3): 2933–2940. doi: 10.1007/s13277-015-4135-2.
19. Taheri M, Habibi M, Noroozi R et al. HOTAIR genetic variants are associated with prostate cancer and benign prostate hyperplasia in an Iranian population. *Gene* 2017; 613: 20–24. doi: 10.1016/j.gene.2017.02.031.
20. Faramarzi S, Dianatpour A, Ghafouri-Fard S. Discovering the role of long non-coding RNAs in regulation of steroid receptors signaling in cancer. *Journal of Biology and Today’s World* 2017; 6(12): 248–258. doi: 10.15412/J. JBTW.01061202.
21. Gutschner T, Hammerle M, Eissmann M et al. The non-coding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer research* 2013; 73(3): 1180–1189. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2850.
22. Terashima M, Tange S, Ishimura A et al. MEG3 long noncoding RNA contributes to the epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines. *J Biol Chem* 2017; 292(1): 82–99. doi: 10.1074/jbc.M116.750950.
23. Kim J, Noh JH, Lee SK et al. LncRNA OIP5-AS1/cyranos suppresses GAK expression to control mitosis. *Oncotarget* 2017; 8(30): 49409–49420. doi: 10.18632/oncotarget.17219.
24. Kim J, Abdelmohsen K, Yang XL et al. LncRNA OIP5-AS1/cyranos sponges RNA-binding protein HuR. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(5): 2378–2392. doi: 10.1093/nar/gkw017.
25. Toyooka S, Maruyama R, Toyooka KO et al. Smoke exposure, histologic type and geography-related differences in the methylation profiles of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 103(2): 153–160. doi: 10.1002/ijc.10787.
26. Hosseini M, Naghan PA, Karimi S et al. Environmental risk factors for lung cancer in Iran: a case-control study. *Int J Epidemiol* 2009; 38(4): 989–996. doi: 10.1093/ije/dyp218.

# A Combined Bioinformatics and Literature Based Approach for Identification of Long Non-coding RNAs That Modulate Vitamin D Receptor Signaling in Breast Cancer

Kombinovaný bioinformatický a literární přístup k identifikaci dlouhých nekódujících molekul RNA, které modulují signalizaci přes receptor vitamínu D u karcinomu prsu

Kholghi Oskooei V., Ghafouri-Fard S., Omrani MD

Department of Medical Genetics, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

## Summary

**Background:** Long non-coding RNAs (lncRNAs) as an important fraction of human transcriptome have been shown to exert fundamental role in regulation of signaling pathways implicated in carcinogenesis. Among them is vitamin D receptor (VDR) signaling whose participation in various cancers including breast cancer (BC) is evident. In spite of the presence of several evidences for participation of lncRNAs as well as VDR signaling in BC pathogenesis, no comprehensive study has evaluated the link between lncRNA dysregulation and VDR signaling in BC. **Aim:** To introduce a bioinformatics approach for identification of lncRNAs that modulate VDR signaling in BC. This approach includes co-expression analysis, in silico identification of lncRNAs that target VDR and literature search. **Conclusions:** Tens of lncRNAs are predicted to affect VDR signaling. Among them are some lncRNAs such as *MALAT1* which has prominent role in BC pathogenesis. Identification of the lncRNAs that influence VDR gene expression is possible through in silico analysis. Considering the prominent role of VDR in BC pathogenesis as well as availability of VDR modulating agents, evaluation of VDR signaling pathway and related networks are of practical significance and bioinformatics tools are expected to facilitate such action.

## Key words

vitamin D receptor – long non-coding RNAs – co-expression – bioinformatics – calcitriol receptor – computational biology

This article has been extracted from the thesis written by Vahid Kholghi Oskooei in School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences (Registration No: 46).

Tento článek je výňatkem z práce Vahida Kholghi Oskooei z Lékařské fakulty, Univerzity Shahid Beheshti (registrační číslo 46).

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 studie 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.



Soudeh Ghafouri-Fard, MD, PhD  
Department of Medical Genetics  
Shahid Beheshti University of Medical Sciences  
Bldg No.2 SBUMS  
Arabi Ave, Daneshjoo Blvd, Velenjak  
Tehran, Iran  
e-mail: s.ghafourifard@sbmu.ac.ir

Submitted/Obdrženo: 17. 3. 2018

Accepted/Přijato: 6. 5. 2018

doi: 10.14735/amko2018264



## Souhrn

**Úvod:** Bylo prokázáno, že dlouhé nekódující RNA (lncRNA) jako důležitá frakce lidského transkriptomu hrají zásadní roli při regulaci signálních drah, které se podílejí na karcinogenezi. Mezi nimi je signalizace receptoru vitamínu D (VDR), jejíž účast na různých nádorech vč. nádoru prsu (breast cancer – BC) je patrná. Navzdory přítomnosti několika důkazů účasti lncRNA, stejně jako signalizace VDR v patogenezi BC, žádná souhrnná studie nehodnotila vztah mezi dysregulací lncRNA a signalizací VDR u BC. **Cíl:** Zavést bioinformatický přístup k identifikaci lncRNA, které modulují signalizaci VDR u BC. Tento přístup zahrnuje koexpresní analýzu, *in silico* identifikaci lncRNAs, které jsou zaměřeny na VDR a literární vyhledávání. **Závěr:** Předpokládá se, že desítky lncRNA ovlivní signalizaci VDR. Mezi nimi jsou některé lncRNA, jako je *MALAT1*, který má významnou roli v patogenezi BC. Identifikace lncRNA, které ovlivňují expresi genu VDR, je možná pomocí *in silico* analýzy. Vzhledem k prominentní roli VDR v patogenezi BC a dostupnosti modulačních činitelů VDR je hodnocení VDR signalizační dráhy a souvisejících sítí praktického významu a nástroje bioinformatiky by měly usnadnit tuto činnost.

## Key words

receptor vitamínu D – dlouhé nekódující molekuly RNA – koexprese – bioinformatika – receptor kalcitriolu – výpočetní biologie

## Introduction

Breast cancer (BC) as the most common women's malignancy is regarded as an important health problem [1]. Several researchers have identified biomarkers for early detection or prognosis evaluation of BC patients [2–4]. Among pathways which involvement in BC pathogenesis has been well studied is vitamin D receptor (VDR) signaling pathway. The VDR is a member of the nuclear class II receptor family and a ligand transcription factor that facilitates the roles of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in cell growth and differentiation [5]. In BC samples, VDR expression has been negatively associated with aggressive tumor features, such as large tumor size, hormonal receptor negativity, and triple-negative subtype [6]. In addition, elevated expression of VDR in breast tumors has been associated with a lower risk of cancer-associated mortality [7,8]. The protective effect of vitamin D against other types of human cancers, such as skin cancer, has also been documented [9]. Such effect has been associated with alterations in the expression of certain transcripts including long non-coding RNAs (lncRNAs) in a way that these lncRNAs have been suggested as skin cancer biomarkers which are secreted into the blood or urine via exosomes [10]. In general, lncRNAs comprise an important portion of human transcriptome with fundamental roles in virtually every aspect of cell physiology [11]; their aberrant expression has been associated with pathologic conditions such as cancer [12–18]. More specifically, VDR-

regulated lncRNAs has been shown to participate in imprinting, tumor suppression and invasion/metastasis which implies their involvement in the protective effect of VDR signaling against skin cancer [10]. lncRNAs expression in skin cells changes in response to vitamin D in a way that diminishes their oncogenic activity while increasing their tumor suppressive role [9]. In BC, there is also evidence for the presence of a link between VDR signaling and lncRNAs. For instance, *H19* has been shown to be up-regulated in a significant proportion of BC tissues [19]. On the other hand, *H19* has been shown to suppress VDR expression via microRNA 675-5p (miR-675-5p) in colon cancer. Besides, *H19* up-regulation leads to vitamin D resistance both *in vitro* and *in vivo* [20]. Recently, we have introduced a bioinformatics approach for identification of miRNAs implicated in BC [21].

In spite of the presence of evidence supporting the individual role of lncRNAs as well as VDR signaling in BC pathogenesis, no comprehensive study has evaluated the link between lncRNA dysregulation and VDR signaling in BC. Consequently, in the present study, we introduce a bioinformatics approach for identification of lncRNAs that modulate VDR signaling in BC.

## Material and Methods

### Co-expression analysis

In order to find lncRNAs, which are co-expressed in breast tissues with VDR, we used co-lncRNA. This web-based computational tool facilitates detection of Gene ontology (GO) annotations

and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways that are influenced by co-expressed protein-coding genes and lncRNAs. Co-expression pattern of lncRNAs and protein-coding genes has been retrieved from publicly available human RNA-Seq datasets, comprising 241 datasets from 6 560 total datasets which exemplify 28 tissue types/cell lines. Subsequently, lncRNA combinatorial influence on particular GO annotations or KEGG pathways is analyzed [22]. Spearman rank order correlation analysis was used to define the relationship between expression of VDR and certain lncRNAs. For such purpose, a Spearman correlation rank order correlation coefficient higher than 0.5 and p value less than 0.001 were regarded as statistically significant.

### In silico identification of lncRNAs that target VDR

lncRNA2Target tool was used for identification of lncRNAs that function upstream of VDR. This database provides the list of lncRNA targets, which have been identified through lncRNA knockdown or overexpression experiments [23].

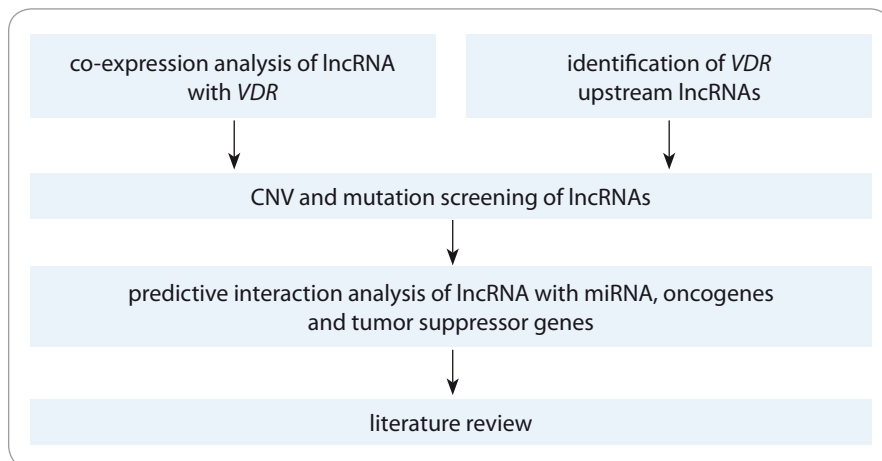
### Identification of lncRNAs with genomic changes in breast cancer

Subsequently, we used the cBioPortal for Cancer Genomics tool and the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) to find lncRNAs that harbor genomic alteration in BC tissues. The cBioPortal for Cancer Genomics facilitates discovering, envisioning, and analyzing multidimensional cancer

**Tab. 1. Summary of lncRNAs that possibly regulate VDR signaling in breast cancer.**

lncRNA	Somatic Copy number alterations	Transcriptional regulator	Interaction with tumor suppressors or oncogenes	Interaction with tumor suppressor or oncogene miRNAs	Disease name
<i>PVT1</i>	amplification (14–26%)	GATA3, cMYC, ZNF217,	TP53, FGFR1, TTN		breast cancer [29], colorectal cancer [30], melanoma [31], gastric cancer [32]
<i>FAM66A</i>	deletion (0.5–6%)				
<i>FAM66B</i>	deletion (1.2–5.8%)		TP53		
<i>FAM83 H-AS1</i>	amplification (20%)	cMYC, ZNF217			breast cancer [33], colorectal cancer [34]
<i>FLG-AS1</i>	amplification (20%)		ERBB2		squamous cell carcinoma [35]
<i>LGALS8-AS1</i>	amplification (4–23%)		FGFR1, ERBB2		
<i>SMG7-AS1</i>	amplification (3–21%)		TP53, FGFR, ERBB2		
<i>LINC00672</i>	amplification (3–8%)		ERBB2		endometrial cancer [36]
<i>LINC00968</i>	amplification (4–13%)		ERBB2		non-small cell lung cancer [37]
<i>LINC01132</i>	amplification (4–24%)	GATA3, cMYC, ZNF217	TP53, FGFR, ERBB2, cMYC	mir-31	
<i>MIR205HG</i>	amplification (5–26%)		TP53, PTEN, FGFR1, TTN		
<i>PRSS51</i>	deletion (5%)				
<i>ZFH4-AS1</i>	deletion (6–17%)		FGFR1		
<i>WFDC21P</i>	amplification (9%)				
<i>RGS5</i>	amplification (4–23%)				lung cancer [38], hepatocellular carcinoma [39]
<i>OVAAL</i>	amplification (20%)	cMYC, GATA3, ZNF217	ERBB2, FGFR1, MU16		endometrial cancer [40]
<i>RUSC1-AS1</i>	amplification (6–21%)		PTEN		
<i>C1ORF220</i>	amplification (3–21%)				
<i>FAM157C</i>	deletion (2%)		ERBB2		
<i>FAM66E</i>	deletion (1–6%)				
<i>LINC01588</i>	amplification (2%)		cMYC, ERBB2, FGFR1, TTN, GATA3		
<i>LINC00346</i>	deletion (1%), amplification (2–5%)				breast cancer [41], bladder cancer [42], hepatocellular carcinoma [43]
<i>LINC00511</i>	amplification (4–25%)	cMYC, GATA3, ZNF217	PTEN		breast cancer [44], non-small cell lung cancer [45]
<i>SNHG6</i>	amplification (6–15%)	cMYC	PTEN, TP53		gastric cancer [46], hepatocellular carcinoma [47]
<i>MALAT1</i>	deletion (1%), amplification (0.4–3%)	cMYC, GATA3		mir-155	breast cancer [48], gastric cancer [49]
<i>SNHG16</i>	amplification (6–11%)		PTEN, TP53	mir-31	breast cancer [50], colorectal cancer [51], bladder cancer [52], neuroblastoma [53]

lncRNA – long non-coding RNA, VDR – vitamin D receptor,



**Schema 1. The pipeline used for identification of VDR related lncRNAs in breast cancer.**

VDR – vitamin D receptor, lncRNA – long non-coding RNA, CNV – copy number variation

genomics data at genetic, epigenetic, gene expression, and proteomic levels [24]. COSMIC is regarded as the most all-inclusive source for discovering the effect of somatic mutations in human cancer [25].

#### **In silico functional analysis of lncRNAs**

The functional interactions of selected lncRNAs with tumor suppressor and oncogenes (including both mRNA coding and miRNA genes) which are implicated in BC have been evaluated using two online tools. AnnoLnc is an online tool which provides lncRNAs annotations including their interactions with miRNA and proteins [26]. The miRcode has provided a map of possible miRNA target sites across the complete GENCODE annotated transcriptome, including more than 10 000 lncRNA genes so facilitates the identification of miRNA-lncRNA interactions [27]. Schema 1 shows the pipeline used for identification of VDR related lncRNAs in BC.

#### **Network construction**

Pathway studio software [28] was used for construction of a network among VDR, miRNAs lncRNAs and mRNA coding genes.

#### **Results**

By using co-lncRNA tool, we could identify 304 lncRNAs which are co-

expressed with VDR in BC tissues. Then, we used LncRNA2Target tool to identify VDR upstream lncRNAs which led to identification of four lncRNAs including metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (*MALAT1*), *lincFOXF1*, *lincTNS1* and *DA125942*. Application of cBioPortal and COSMIC resulted in identification of 26 lncRNAs among total 304 lncRNAs which have been the subjects of amplification, deletion or mutation in BC tissues. Finally, we have shown that these lncRNAs have interactions with transcription factors, such as *MYC*, *GATA3*, *ZNF217*, *TP53* and *ESR1* as well as BC related tumor suppressors or oncogenes (*RB1*, *PTEN*, *CCND1*, *ERBB2*, *FGFR1*, *MAP3K1*, *MUC16*, *PIK3CA* and *TTN*). In addition, the interactions of the selected lncRNAs with oncomiRs (miR-125b, miR-205, miR-17-92, miR-206, miR-200, miR-146b, miR-126, miR-335 and miR-31) as well as tumor suppressor miRNAs (miR-10b, miR-21, miR-155, miR-373 and miR-520c) have been demonstrated. Tab. 1 shows the summary of lncRNAs that possibly regulate VDR signaling in BC. Using Pathway studio, we designed a network among VDR, miRNAs, lncRNAs and mRNA coding genes. By using “regulation”, “direct regulation”, “binding”, “promoter binding” and “expression” filters, 829 genes (including mRNA coding, lncRNAs and miRNAs) were retrieved that interact with VDR. Subsequently, we narrowed the search

by exclusive inclusion of cancer related genes which led to construction of the desired network.

#### **Discussion**

In addition to protein coding mRNAs which have been documented to be regulated by VDR through application of microarray based methods, miRNAs and lncRNAs have been shown to be regulated by this signaling pathway as well. Several patterns of co-expression, co-regulation and interactions have been revealed through integrated analyses of mRNA, miRNAs and lncRNAs [54]. Animal studies have shown the effect of VDR on lncRNA expression in a way that in VDR null mouse epidermis, *mHOTAIR*, *MALAT1* and *SRA* are up-regulated while *Foxn2-as*, *Gtl2-as* and *H19-as* are down-regulated [55]. However, VDR transcriptome puzzle has many gaps which is mostly originated from the scarcity of RNA-Seq data focused on VDR function [54]. With the purpose of filling such knowledge gap, in the present study, we aimed at identification of the complex network between lncRNA expression, VDR signaling and BC using a novel bioinformatics approach. Previously, several bioinformatics approaches have been suggested for identification of disease or phenotype related VDR downstream networks – combination of VDR and chromatin immunoprecipitation (ChIP)-Seq studies with genome-wide association studies or combination of VDR ChIP-Seq with Cancer Genome Atlas (TCGA) data to evaluate the influence of VDR target genes in tumorigenesis process [56]. In the present study, using co-lncRNA tool, we assessed lncRNAs that are co-expressed with VDR in BC tissues. To find more clinically relevant candidates, we used other tools to identify those with genomic alterations in BC tissues and assess their interactions with known tumor suppressor genes and oncogenes. The final lncRNA list provided by this approach offers researchers potential candidates for functional or expression analyses. Finally, we demonstrated the interaction network between mRNA coding genes, lncRNAs and VDR. As demonstrated in this network, *LINC00261*

is among lncRNAs which bind to VDR. *LINC00261* is a tumor suppressor which decreases the stability of Slug proteins leading to inhibition of epithelial-mesenchymal transition [57]. SLUG has been previously shown to bind to the E2-box sequences of the VDR gene promoter leading to suppression of VDR gene expression through chromatin remodeling [58]. *MALAT1* as a well-known lncRNA in VDR signaling pathway has been demonstrated to interact with several genes in this network. However, due to scarcity of experimental data regarding the interactions between lncRNAs and VDR, this network does not include many of putative lncRNAs. Future experimental studies would help in enrichment of this network.

Identification of the lncRNAs that influence VDR gene expression is possible through genome-wide or individual gene expression analysis following silencing or overexpressing each lncRNA. However, such experiments are time-consuming and need prior identification of potential candidates which are expected to influence or be influenced by VDR signaling pathway. Considering the prominent role of VDR in BC pathogenesis as well as availability of VDR modulating agents, evaluation of VDR signaling pathway and related networks are of practical significance and bioinformatics tools are expected to facilitate such action.

## References

- Dianatpour M, Mehdipour P, Nayernia K et al. Expression of testis specific genes TSGA10, TEX101 and ODF3 in breast cancer. *Iran Red Crescent Med J* 2012; 14(11): 722–726. doi: 10.5812/ircmj.3611.
- Sarrafzadeh S, Geranpayeh L, Ghafouri-Fard S. Expression analysis of long non-coding PCAT-1 in breast cancer. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res* 2017; 11(3): 185–191.
- Seifi-Alan M, Shamsi R, Ghafouri-Fard S et al. Expression analysis of two cancer-testis genes, FBXO39 and TDRD4, in breast cancer tissues and cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 14(11): 6625–6629.
- Kazemi-Oula G, Ghafouri-Fard S, Mobasheri MB et al. Upregulation of RHOXF2 and ODF4 expression in breast cancer tissues. *Cell J* 2015; 17(3): 471–477.
- Ditsch N, Toth B, Mayr D et al. The Association between vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 2012; 60(2): 121–129. doi: 10.1369/0022155411429155.
- Al-Azhri J, Zhang YL, Bshara W et al. Tumor expression of vitamin D receptor and breast cancer histopathological characteristics and prognosis. *Clin Cancer Res* 2017; 23(1): 97–103. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0075.
- Almlof JC, Lundmark P, Lundmark A et al. Single nucleotide polymorphisms with cis-regulatory effects on long non-coding transcripts in human primary monocytes. *PLoS One* 2014; 9(7): e102612. doi: 10.1371/journal.pone.0102612.
- Ditsch N, Toth B, Mayr D et al. The association between vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 2012; 60(2): 121–129. doi: 10.1369/0022155411429155.
- Bikle DD, Jiang Y. The protective role of vitamin D signaling in non-melanoma skin cancer. *Cancers* 2013; 5(4): 1426–1438. doi: 10.3390/cancers5041426.
- Jiang YJ, Bikle DD. LncRNA: a new player in 1 $\alpha$ , 25 (OH) 2 vitamin D3/VDR protection against skin cancer formation. *Exp Dermatol* 2014; 23(3): 147–150. doi: 10.1111/exd.12341.
- Dianatpour A, Ghafouri-Fard S. The role of long non coding RNAs in the repair of DNA double strand breaks. *Int J Mol* 2017; 6(1): 1–12.
- Dianatpour A, Ghafouri-Fard S. Long non coding RNA expression intersecting cancer and spermatogenesis: a systematic review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(10): 2601–2610. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.10.2601.
- Nikpayam E, Soudyab M, Tasharrofi B et al. Expression analysis of long non-coding ATB and its putative target in breast cancer. *Breast Dis* 2017; 37(1): 11–20. doi: 10.3233/BD-160264.
- Sarrafzadeh S, Geranpayeh L, Tasharrofi B et al. Expression study and clinical correlations of MYC and CCAT2 in breast cancer patients. *Iran Biomed J* 2017; 21(5): 303–311.
- Iranpour M, Soudyab M, Geranpayeh L et al. Expression analysis of four long noncoding RNAs in breast cancer. *Tumour Biol* 2016; 37(3): 2933–2940. doi: 10.1007/s13277-015-4135-2.
- Soudyab M, Iranpour M, Ghafouri-Fard S. The role of long non-coding RNAs in breast cancer. *Arch Iran Med* 2016; 19(7): 508–517. doi: 0161907/AIM.0011.
- Nikpayam E, Tasharrofi B, Sarrafzadeh S et al. The role of long non-coding RNAs in ovarian cancer. *Iranian biomedical journal* 2017; 21(1): 3–15. doi: 10.1002/cbf.3230.
- Tasharrofi B, Soudyab M, Nikpayam E et al. Comparative expression analysis of hypoxia-inducible factor- $\alpha$  and its natural occurring antisense in breast cancer tissues and adjacent noncancerous tissues. *Cell Biochem Funct* 2016; 34(8): 572–578. doi: 10.1002/cbf.3230.
- Collette J, Le Bourhis X, Adriaenssens E. Regulation of human breast cancer by the long non-coding RNA H19. *Int J Mol Sci* 2017; 18(11): pii: E2319. doi: 10.3390/ijms18112319.
- Chen S, Bu D, Ma Y et al. H19 Overexpression induces resistance to 1, 25 (OH) D3 by targeting VDR through miR-675-5p in colon cancer cells. *Neoplasia* 2017; 19(3): 226–236. doi: 10.1016/j.neo.2016.10.007.
- Shamsi R, Seifi-Alan M, Behmanesh A et al. A bioinformatics approach for identification of miR-100 targets implicated in breast cancer. *Cell Mol Biol* 2017; 63(10): 99–105. doi: 10.14715/cmb/2017.63.10.16.
- Zhao Z, Bai J, Wu A et al. Co-LncRNA: investigating the lncRNA combinatorial effects in GO annotations and KEGG pathways based on human RNA-Seq data. *Database* 2015; 2015. pii: bav082. doi: 10.1093/database/bav082.
- Jiang Q, Wang J, Wu X et al. LncRNA2Target: a database for differentially expressed genes after lncRNA knockdown or overexpression. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: D193–D196. doi: 10.1093/nar/gku1173.
- Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U et al. Integrative analysis of complex cancer geneomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013; 6(269): pl1. doi: 10.1126/scisignal.2004088.
- Forbes SA, Beare D, Boutselakis H et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* 2017; 45(D1): D777–D83. doi: 10.1093/nar/gkw1121.
- Hou M, Tang X, Tian F et al. AnnoLnc: a web server for systematically annotating novel human lncRNAs. *BMC Genomics* 2016; 17(1): 931. doi: 10.1186/s12864-016-3287-9.
- Jeggari A, Marks DS, Larsson E. miRcode: a map of putative microRNA target sites in the long non-coding transcriptome. *Bioinformatics* 2012; 28(15): 2062–2063. doi: 10.1093/bioinformatics/bts344.
- Nikitin A, Egorov S, Daraselia N et al. Pathway studio--the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics* 2003; 19(16): 2155–2157.
- Conte F, Fisco G, Chiara M et al. Role of the long non-coding RNA PVT1 in the dysregulation of the ceRNA-ceRNA network in human breast cancer. *PLoS One* 2017; 12(2): e0171661. doi: 10.1371/journal.pone.0171661.
- Guo K, Yao J, Yu Q et al. The expression pattern of long non-coding RNA PVT1 in tumor tissues and in extracellular vesicles of colorectal cancer correlates with cancer progression. *Tumour Biol* 2017; 39(4): 1010428317699122. doi: 10.1177/1010428317699122.
- Chen X, Gao G, Liu S et al. Long noncoding RNA PVT1 as a novel diagnostic biomarker and therapeutic target for melanoma. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 7038579. doi: 10.1155/2017/7038579.
- Zhang XW, Bu P, Liu L et al. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 462(3): 227–232. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.121.
- Zhang J, Feng S, Su W et al. Overexpression of FAM83H-AS1 indicates poor patient survival and knockdown impairs cell proliferation and invasion via MET/EGFR signaling in lung cancer. *Sci Rep* 2017; 7: 42819. doi: 10.1038/srep42819.
- Yang L, Xu L, Wang Q et al. Dysregulation of long non-coding RNA profiles in human colorectal cancer and its association with overall survival. *Oncol Lett* 2016; 12(5): 4068–4074. doi: 10.3892/ol.2016.5138.
- Feng L, Houck JR, Lohavanichbutr P et al. Transcriptome analysis reveals differentially expressed lncRNAs between oral squamous cell carcinoma and healthy oral mucosa. *Oncotarget* 2017; 8(19): 31521–31531. doi: 10.18632/oncotarget.16358.
- Li W, Li H, Zhang L et al. Long non-coding RNA LINC00672 contributes to p53 protein-mediated gene suppression and promotes endometrial cancer chemosensitivity. *J Biol Chem* 2017; 292(14): 5801–5813. doi: 10.1074/jbc.M116.758508.
- Wang Y, Zhou J, Xu YJ et al. Long non-coding RNA LINC00968 acts as oncogene in NSCLC by activating the Wnt signaling pathway. *J Cell Physiol* 2018; 233(4): 3397–3406. doi: 10.1002/jcp.26186.
- Huang G, Song H, Wang R et al. The relationship between RG55 expression and cancer differentiation and metastasis in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2012; 105(4): 420–424. doi: 10.1002/jso.22033.
- Hu M, Chen X, Zhang J et al. Overexpression of regulator of G protein signaling 5 promotes tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells. *J Surg Oncol* 2013; 108(3): 192–196. doi: 10.1002/jso.23367.
- Takenaka K, Chen BJ, Modesitt SC et al. The emerging role of long non-coding RNAs in endometrial cancer. *Cancer Genet* 2016; 209(10): 445–455. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.09.005.
- Liu H, Li J, Koirala P et al. Long non-coding RNAs as prognostic markers in human breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7(15): 20584–20596. doi: 10.18632/oncotarget.7828.
- Ye T, Ding W, Wang N et al. Long noncoding RNA linc00346 promotes the malignant phenotypes of bladder cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 491(1): 79–84. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.045.
- Zhang J, Fan D, Jian Z et al. Cancer specific long noncoding RNAs show differential expression patterns

- and competing endogenous RNA potential in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2015; 10(10): e0141042. doi: 10.1371/journal.pone.0141042.
44. Cabanski CR, White NM, Dang HX et al. Pan-cancer transcriptome analysis reveals long noncoding RNAs with conserved function. *RNA Biol* 2015; 12(6): 628–642. doi: 10.1080/15476286.2015.1038012.
45. Sun CC, Li SJ, Li G et al. Long intergenic noncoding RNA 00511 acts as an oncogene in non-small-cell lung cancer by binding to EZH2 and suppressing p57. *Mol Ther Nucleic Acids* 2016; 5(11): e385. doi: 10.1038/mtna.2016.94.
46. Yan K, Tian J, Shi W et al. LncRNA SNHG6 is associated with poor prognosis of gastric cancer and promotes cell proliferation and EMT through epigenetically silencing p27 and sponging miR-101-3p. *Cell Physiol Biochem* 2017; 42(3): 999–1012. doi: 10.1159/000478682.
47. Birgani MT, Hajjari M, Shahrisa A et al. Long non-coding RNA SNHG6 as a potential biomarker for hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2018; 24(2): 329–337. doi: 10.1007/s12253-017-0241-3.
48. Jadaliha M, Zong X, Malakar P et al. Functional and prognostic significance of long non-coding RNA MALAT1 as a metastasis driver in ER negative lymph node negative breast cancer. *Oncotarget* 2016; 7(26): 40418–40436. doi: 10.18632/oncotarget.9622.
49. Li J, Gao J, Tian W et al. Long non-coding RNA MALAT1 drives gastric cancer progression by regulating HMGB2 modulating the miR-1297. *Cancer Cell Int* 2017; 17: 44. doi: 10.1186/s12935-017-0408-8.
50. Cai C, Huo Q, Wang X et al. SNHG16 contributes to breast cancer cell migration by competitively binding miR-98 with E2F5. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 485(2): 272–278. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.094.
51. Christensen LL, True K, Hamilton MP et al. SNHG16 is regulated by the Wnt pathway in colorectal cancer and affects genes involved in lipid metabolism. *Mol Oncol* 2016; 10(8): 1266–1282. doi: 10.1016/j.molonc.2016.06.003.
52. Zhu Y, Yu M, Li Z et al. ncRAN, a newly identified long noncoding RNA, enhances human bladder tumor growth, invasion, and survival. *Urology* 2011; 77(2): 510 e1–e5. doi: 10.1016/j.urology.2010.09.022.
53. Yu M, Ohira M, Li Y et al. High expression of ncRAN, a novel non-coding RNA mapped to chromosome 17q25.1, is associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Int J Oncol* 2009; 34(4): 931–938.
54. Campbell MJ. Vitamin D and the RNA transcriptome: more than mRNA regulation. *Front Physiol* 2014; 5.
55. Jiang YJ, Bikle DD. LncRNA profiling reveals new mechanism for VDR protection against skin cancer formation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 144 Pt A: 87–90. doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.11.018.
56. Campbell MJ. Bioinformatic approaches to interrogating vitamin D receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 453: 3–13. doi: 10.1016/j.mce.2017.03.011.
57. Yu Y, Li L, Zheng Z et al. Long non-coding RNA linc00261 suppresses gastric cancer progression via promoting Slug degradation. *J Cell Mol Med* 2017; 21(5): 955–967. doi: 10.1111/jcmm.13035.
58. Mittal MK, Myers JN, Misra S et al. Chaudhuri G. In vivo binding to and functional repression of the VDR gene promoter by SLUG in human breast cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372(1): 30–34. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.187.

# Monoklonální gamapatie nejasného významu (MGUS)

## Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS)

Sandecká V.<sup>1</sup>, Pour L.<sup>1</sup>, Adam Z.<sup>1</sup>, Krejčí M.<sup>1</sup>, Štork M.<sup>1</sup>, Ševčíková S.<sup>2</sup>, Král Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Interní hematologická a onkologická klinika LF MU a FN Brno

<sup>2</sup> Babákova myelomová skupina, Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno

### Souhrn

**Východiska:** Monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS) patří mezi nejčastější premaligní stavy. Riziko maligní transformace je přibližně 1 % za rok. MGUS typu IgG a IgA jsou prekurzory pro mnohočetný myelom (MM), MGUS z lehkých řetězců (light-chain MGUS) pro MM z lehkých řetězců. IgM MGUS je prekurzor pro Morbus Waldenström (MW), nebo jiné lymfoproliferativní onemocnění. **Cíl:** Klinický průběh pacientů s asymptomatickou monoklonální gamapatií (MG) závisí na několika klíčových biomarkerech, mezi které patří – koncentrace a typ sérového paraproteinu (M proteinu) v séru, poměr volných lehkých řetězců v séru (free light chain ratio – FLC), infiltrace kostní dřeni plazmocyty, pokles jednoho nebo dvou polyklonálních imunoglobulinů (imunoparéza), stabilita koncentrace sérového M proteinu v čase (evolving a non-evolving typ MGUS), poměr fenotypové normálních a abnormálních populací plazmocyty v kostní dřeni za pomoci flowcytometrické analýzy a přítomnost cirkulujících plazmocyty v periferní krvi. V současné době jsou známy tři rizikové stratifikační modely predikce transformace MGUS do maligní formy monoklonální gamapatie – MAYO, PETHEMA a CMG model. Cílem všech tří modelů je správná identifikace prognostických markerů, na základě kterých lze MGUS pacienty rozdělit na pacienty s nízkým rizikem progresse (low-risk MGUS) a vysokým rizikem progresse (high-risk MGUS). **Závěr:** Tento přehledový článek přináší pohled na definici, patogenezi, diagnostický algoritmus, klinický význam a stratifikaci pacientů s MGUS s následným doporučením intervalů dispenzarizací podle rizikovosti pacienta.

### Klíčová slova

monoklonální gamapatie nejasného významu – mnohočetný myelom – progresse – rizikové faktory

### Summary

**Background:** Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) is one of the most prevalent premalignant conditions associated with a risk of malignant transformation to multiple myeloma (MM) or other forms of lymphoproliferative disorders with risk of progression of approximately 1% per year. IgG and IgA MGUS are precursor conditions of multiple myeloma (MM), whereas light-chain MGUS is a precursor condition of light chain MM. IgM MGUS is a precursor condition of Waldenström macroglobulinemia (MW) or other lymphoproliferative diseases. **Aim:** Assessment of the risk of progression of patients with asymptomatic monoclonal gammopathies (MG) is based on various factors, including the serum paraprotein (M protein) concentration, isotype of M protein, serum free light chain ratio, infiltration of bone marrow plasmocytes, reduction of one or two non-involved immunoglobulin subtype levels (immunoparesis), evolving and non-evolving subtype of MGUS, ratio of normal/abnormal plasma cells in bone marrow identified by multiparametric flow cytometry techniques and number of circulating plasma cells in peripheral blood. Three risk stratification models have been constructed that are useful in daily practice for predicting risk of progression of MGUS into malignant forms of monoclonal gammopathy – MAYO, PETHEMA and CMG model. The goal of all three models is to identify correctly prognostic markers that can divide patients into low-risk MGUS and high-risk MGUS groups. **Conclusion:** This review provides a look at the definition, pathogenesis, diagnostic algorithm, clinical significance and stratification of MGUS patients, followed by recommendations for patient risk dispensarisation intervals.

### Keywords

monoclonal gammopathy of undetermined significance – multiple myeloma – progression – risk factors

Tato práce byla podpořena grantem MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705).

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

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. Viera Sandecká, Ph.D.  
Interní hematologická a onkologická klinika  
LF MU a FN Brno  
Jihlavská 20  
625 00 Brno  
e-mail: vsandecka@fnbrno.cz

Obdrženo/Submitted: 28. 3. 2018

Přijato/Accepted: 11. 6. 2018

doi: 10.14735/amko2018270

## Úvod

Termín monoklonální gamapatie nejasného významu (monoclonal gammopathy of undetermined significance – MGUS) je definován na základě přítomnosti monoklonálního proteinu (M proteinu), který lze detekovat v séru nebo v moči pacienta, a současně nejsou splněna diagnostická kritéria mnohočetného myelomu (MM), Waldenströmovy makroglobulinemie (WM), primární AL amyloidózy (AL) či jiného maligního lymfoproliferativního onemocnění [1]. V podstatě jde o klinicky němý, bezpříznakový stav vyznačující se pozvolnou klonální a nezhoubnou proliferací plazmatických buněk produkujících M protein, který je ale potenciálně maligní [2]. Každému MM předchází vývojové stadium MGUS [3]. Název MGUS byl zaveden v roce 1976 Kylem. Jde o nejčastěji se vyskytující MG [4]. V současné době jsou popsány dva druhy MGUS – lymfoidní typ (nebo lymfoplazmocytární typ) a plazmocytární typ. Přibližně 15–20 % pacientů z celkového počtu MGUS produkuje IgM typ M proteinu a má lymfoidní nebo lymfoplazmocytární fenotyp. Naopak většina non IgM pacientů s MGUS má plazmocytární fenotyp. Incidence M proteinu klesá následovně – IgG > IgA > Ig z lehkých řetězců > IgD > IgE. Osoby s plazmocytárním typem MGUS mají vyšší riziko progresu do MM nebo jiných plazmocelulárních nemocí. Osoby s lymfoidním typem MGUS mohou progredovat do MW, lymfomů nebo jiných maligních lymfoproliferativních nemocí [3,5].

## Epidemiologie MGUS

Výskyt MGUS je rozdílný u různých etnických skupin. U černochů je vyšší nežli u bělochů, nejméně se vyskytuje u Japonců, což potvrzuje klinická studie, kde výskyt M proteinu byl u 8,6 % černochů z 916 osob ve srovnání s 3,6 % u bělochů a 2,7 % u Japonců [6]. Rozdílná se jeví i prevalence MGUS v souvislosti s věkem. U černochů v ghanské populaci je prevalence stejná, s věkem se nezvyšuje (5,33 % v 50–54 letech, 5,38 % v 70–74 letech), na rozdíl od obyvatelů USA (běloši i Afroameričané), kde prevalence MGUS s věkem stoupá [3]. U osob mladších 50 let se vyskytuje

v 0,2 %, nad 50 let v 1–1,7 %, nad 70 let již v 3 % a v období nad 80 let dokonce ve 4–5 % [7]. Nemaou úlohu v incidenci MGUS sehrávají genetické změny. Genetická predispozice pro výskyt MGUS je opřena o skutečnost, že u příbuzných 1. linie osob s MGUS je výskyt MM 3,7× častější než u běžné populace. Nicméně typická mendelovská dědičnost není známa [8].

## Patogeneze MGUS

Základní biologické, molekulární a genetické mechanismy vzniku MGUS nejsou zatím plně objasněny. Vliv životního prostředí, fyzikálních a chemických faktorů (expozice azbestu, hnojivům, minerálním olejům, pesticidům, radiaci, obezita) zřejmě souvisí s vývojem MGUS a MM [9]. Podobně časté nebo chronické infekce, autoimunitní onemocnění mohou také souviset s patogenezí onemocnění a jsou spojované s vyšší frekvencí jak u MGUS, tak u MM. Malik et al uvádí, že u 39 (66 %) z 59 pacientů diagnóze MGUS předcházela infekce *Helicobacter pylori* [10]. Studie s menším počtem pacientů z Olmsted County naopak neidentifikovala vyšší výskyt *Helicobacter pylori* u pacientů s MGUS [11].

Řada studií prokázala, že stejně jako jiné nádorové choroby je i MM typický výskytem specifických genetických odchylek. Podstatnými nálezy jsou především chromozomové aberace, a to translokace zahrnující gen pro těžký řetězec Ig (immunoglobulin heavy chain – IGH), početné chromozomové změny rozděluje pacienty na hyperdiploidní (HD) a non-HD (NHD) skupinu či delece zahrnující tumor-supresorové geny *RB1* a *TP53*. Cílené vyšetření těchto chromozomových změn je doporučováno v rámci rutinních analýz při stanovení diagnózy a je také součástí rizikové stratifikace pacientů s MM [12,13]. Díky prokázané biologické příbuznosti MGUS a MM není překvapivé, že stejné chromozomové aberace jsou detekovány i u pacientů s MGUS. Zatímco u MM jsou tyto abnormality spojeny se známou prognostickou či prediktivní hodnotou, význam jejich přítomnosti ve stadiu MGUS zůstává nejistý. Výskyt genových mutací a jejich prognostický význam je u diagnózy MGUS stejně neprobádanou

oblastí jako v případě chromozomových aberací [14].

## Diagnostika MGUS

### Elektroforéza bílkovin

Analýza séra a moči je nezbytná u všech paraproteinemií. Nejlepším laboratorním screeningem pro průkaz M proteinu v séru a v moči zůstává kvalitní elektroforéza bílkovin. Jako dělicí médium (nosič) se nejčastěji využívá agaróza a acetylovaná celulóza. V posledních letech proniká do velkých rutinních laboratoří klinické biochemie kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis – CE). Současné elektroforetické metody jsou velmi citlivé a dokážou zachytit M-gradienty kolem 0,5 g/l [15].

### Imunofixace

Při průkazu M-gradientu nebo podezření na jeho přítomnost v elektroforeogramu by pro potvrzení nebo vyloučení M proteinu měla následovat imunofixační elektroforéza séra nebo moči. Imunofixace je nezbytná pro určení imunoglobulinové třídy M proteinu a pro určení antigenního typu lehkých řetězců Ig (immunoglobulin light chain – IGL) [16].

### Stanovení volných lehkých řetězců

Denní produkce polyklonálních volných lehkých řetězců Ig (free light chains – FLC) u zdravých jedinců je asi 500 mg. Tyto lehké řetězce jsou vylučovány glomeruly a prakticky kompletně absorbovány v proximálních tubulech, takže denně je vylučováno močí asi 1–10 mg FLC. Zvýšené hodnoty polyklonálních FLC mohou být spojeny s autoimunitními onemocněními. Zvýšené hodnoty monoklonálních FLC a jejich indexu K/L bývají spojeny s maligní proliferací plazmatických buněk, AL amyloidózou a nemocí z lehkých řetězců. Vysoká citlivost metody na stanovení koncentrace FLC v séru i v moči umožňuje jinak obtížnou diagnostiku tzv. nesekrečního myelomu. U těchto nemocných a dále i u MM z lehkých řetězců a u AL amyloidózy se jeví jako výhodné sledování koncentrace FLC v séru, případně v moči. Metoda používá protilátku zaměřenou na vnitřní epitop lehkého řetězce, a tak odliší FLC od vázaných. Jde o citlivou metodu, která stanoví koncentraci FLC od 2 mg/l [17–19].

### Vyšetření párů těžkých/lehkých řetězců imunoglobulinu (Hevylite™ assay)

Hevylite (heavy/light chain – HLC) je analytická metoda rozšiřující dosavadní možnosti diagnostiky, typizace a monitorování průběhu maligních MG a dalších B buněčných lymfoproliferativních stavů vč. primární systémové AL amyloidózy, primární MW a potenciálně i non-hodgkinských lymfomů. Jsou popsána východiska této nové techniky a metodické aspekty automatizované kvantitativní imunochemické analýzy využívající vysoce specifické avidní polyklonální ovčí HLC protilátky s významným potlačením zkřížené reaktivity, jejichž terčem jsou unikátní junkční epitopy umístěné mezi konstantními doménami molekul IGH a IGL. Tato nová metoda poskytuje reproductibilní výsledky i v případě nízké hodnoty Mlg a FLC v séru nebo i v situaci „překrytí“ M proteinu např. transferinem, haptoglobinem nebo C3 složkou komplementu v rámci standardní elektroforézy bílkovin séra. Vyšetření HLC rozšiřuje dosavadní možnosti nejen v oblasti diagnostiky, ale i ve sféře monitorování průběhu maligních MG s možností včasné detekce remise, relapsu či progresu nemoci a nepostrádá ani prognostický potenciál. Skutečné postavení HLC metody ovšem vyplyne teprve z výsledků dalších prospektivních randomizovaných studií a ze zkušeností reálné klinické praxe [20,21].

### Fenotypová charakteristika nádorových plazmatických buněk a možnosti jejich separace

Plazmatické buňky (plasma cells – PC) vystavují na svém povrchu charakteristické typy antigenů, které slouží k jejich identifikaci. Základním znakem všech PC je vysoká exprese antigenu CD38 [22]. Nádorově změněné PC však mohou tento antigen exprimovat velmi slabě [23]. Pro rozpoznání PC u MG je proto vhodnější antigen CD138, který je exprimován na fyziologických i patologických PC [24]. Pro rozlišení normálních (normal plasma cells – nPC) a nádorově změněných (antigen plasma cells – aPC) plazmatických buněk se využívají antigeny CD19 a CD56 [25]. Pomocí průtokové cytometrie je u MG možné odlišit dvě základní

buněčné populace – nPC (CD138+ CD19+ CD56–) a aPC (CD138+ CD19– CD56+/-). Využití protilátek proti známým charakteristickým fenotypovým rysům PC pak umožňuje separovat PC do samostatné suspenze. Tyto protilátky mohou být konjugovány buď s magnetickými částicemi (magnetic activated cell sorting – MACS)), nebo s fluorochromy (fluorescenčně aktivovaná separace buněk (fluorescence activated cell sorting – FACS)) [26,27]. Právě separace PC technikou FACS je v současnosti nejdokonalejším postupem v izolaci nádorových buněk u pacientů s MGUS. Naše výzkumná skupina prokázala, že u vzorků s nízkou vstupní infiltrací PC dosahuje FACS ve srovnání s MACS vyšší čistoty neboli vyššího výstupního zastoupení PC v získané buněčné suspenzi [28]. Navíc FACS umožňuje separaci dle více povrchových buněčných markerů, a tedy pomocí různě fluorescenčně značených protilátek proti CD138, CD19 a CD56 oddělení frakce aPC a nPC. Bylo zjištěno, že nPC tvoří u pacientů s MGUS významnější podíl všech PC než u pacientů s MM [29]. Přítomnost nPC při nedostatečné separaci může pak významně podhodnocovat výsledky následných molekulárních analýz.

### Klasické cytogenetické metody

Klasické cytogenetické vyšetření karyotypu založené na analýze metafázních chromozomů je zlatým standardem u mnoha hematologických malignit, avšak u MG je obecně problematické. Abnormální klon PC má v časných stadiích MG často nízkou proliferační aktivitu a většina kultivací získaných hodnotitelných metafází pochází z jiných buněk kostní dřeně. I když má tedy klasická cytogenetická analýza u MM své specifické místo a je často součástí rutinní diagnostiky v řadě laboratoří, aplikace tohoto postupu u celkově malého, pomalu se dělícího klonu PC u pacientů s MGUS není v souvislosti s jejich prognózou příliš vypovídající [30].

### Vyšetření specifických chromozomových aberací pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Metoda I-FISH je u MG v současnosti nejrozšířenější molekulárně-cytogenetickou

technikou umožňující cílené testování specifických chromozomových aberací [12]. Pomocí metody I-FISH je u pacientů s MM možné zachytit chromozomové abnormality až v 90 % případů [31].

### Stanovení diagnózy MGUS

Diagnóza MGUS se stanovuje „per exclusionem“, tzn. na podkladě splnění všech vytyčených laboratorních kritérií a po vyloučení jiné MG, příp. jiného zhoubného B lymfoproliferativního onemocnění [2]. Diagnostická kritéria byla dle International Myeloma Working Group (IMWG) aktualizována v roce 2016. Hodnota M proteinu v séru (non-IgM typ) musí být pod 30 g/l, počet klonálních plazmocytů (PCs) v kostní dřeni nesmí přesáhnout hodnotu 10 %, u MGUS z lehkých řetězců musí být přítomná abnormální hodnota FLC poměru (< 0,26 nebo > 1,65) a nejsou známky orgánového poškození (CRAB symptomy), které by souvisely s plazmocelulárním onemocněním (tab. 1) [32].

### Prognostické faktory maligní transformace MGUS

Riziko maligní transformace MGUS do MM nebo jiných asociovaných nemocí je přibližně 1 % ročně [33,34]. Pro MGUS typu IgM je riziko maligní transformace 1,5 % ročně [35]. V minulosti již byla publikována řada studií popisujících různé potenciálně rizikové faktory maligní transformace MGUS. Jako významné prognostické faktory byly prokázány především následující parametry:

- koncentrace sérového Mlg [36,37];
- stabilita koncentrace sérového Mlg v čase (evolving a non-evolving typ MGUS) [38];
- izotyp těžkého řetězce Mlg [36,37];
- poměr FLC v séru (FLC ratio) [39];
- přítomnost B-J proteinurie [36];
- infiltrace kostní dřeně PC [14,36,38];
- imunoparéza neklonálních Ig [36,40,41];
- poměr fenotypově normálních a abnormálních populací PC za pomoci flowcytometrické analýzy [42];
- přítomnost cirkulujících PC v periferní krvi [43];
- stanovení IGH metodikou hevylite [20,21];



Tab. 1. Diagnostická kritéria MGUS, upraveno podle [32].

	Non IgM MGUS	IgM MGUS	Light chain MGUS
<b>M protein</b>	< 30 g/l	< 30 g/l	<b>sérum</b> – 0 g/l negativní imunofixace moč < 500 mg/24 hod
<b>FLC poměr</b>	–	–	< 0,26 nebo > 1,65
<b>Infiltrace KD PC</b>	< 10 % klonálních PC	< 10 % lymfoplazmocytů	< 10 % klonálních PC
<b>Orgánové postižení</b>	<b>nepřítomnost</b> <b>C:</b> S/Ca < 2,75 mmol/l <b>R:</b> S/kreatinin < 177 μmol/l nebo CrCL < 40 ml/min <b>A:</b> Hb > 100 g/l <b>B:</b> osteolytických lézí/ osteoporózy a kompresivních fraktur	<b>nepřítomnost</b> anémie hyperviskozita hepatosplenomegalie lymfadenopatie	<b>nepřítomnost</b> <b>C:</b> S/Ca < 2,75 mmol/l <b>R:</b> S/kreatinin < 177 μmol/l nebo CrCL < 40 ml/min <b>A:</b> Hb > 100 g/l <b>B:</b> osteolytických lézí/ osteoporózy a kompresivních fraktur

MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu, M protein – monoklonální protein, FLC – free light chains poměr, KD – kostní dřeň, PC – plazmocyty, CRAB (orgánové postižení při mnohočetném myelomu – C – calcium, R – renální insuficience, A – anémie, B – bone lesions), Ca – kalcium (mmol/l), CrCL – klírens kreatininu (ml/min), Hb – hemoglobin (g/l)

- DNA aneuploidia a cytogenetické změny [30,31].

Ze zobrazovacích vyšetření mají své místo v predikci rizika maligní transformace vyšetření MRI a vyšetření pozitronová emisní tomografie (PET/CT) [44,45]. Naneštěstí však žádný z doposud známých prognostických markerů nedokáže zcela samostatně a jednoznačně individuální prognózu jedince s MGUS stanovit.

### Rizikové modely maligní transformace MGUS

#### MAYO model

V roce 2005 byl Mayo klinikou navržen první rizikové stratifikační model (MAYO model) predikce maligního zvratu MGUS. Tento model byl založen na detekci tří rizikových faktorů – koncentrace sérového Mlg  $\geq 15$  g/l, non-IgG izotyp těžkého řetězce Mlg a abnormální (< 0,26 nebo > 1,65) poměr FLC v séru. Bylo zjištěno, že 58 % pacientů s těmito třemi faktory v rizikových hodnotách progreduje během 20 let od stanovení diagnózy [39].

#### PETHEMA model

V roce 2007 byl Pethema skupinou publikován rizikové stratifikační model (PETHEMA model) maligní transformace

pacientů s MGUS založený na stanovení procenta fenotypově abnormálních PC aPC v rámci všech PC kostní dřeně a aneuploidní změny (tzv. DNA index) pomocí průtokové cytometrie [42]. Autoři této studie zjistili, že pacienti s MGUS, u nichž je  $\geq 95$  % PC kostní dřeně abnormálního fenotypu a zároveň je přítomna aneuploidie, mají 46% riziko maligního zvratu v nadcházejících 5 letech sledování.

O 3 roky později publikovala tatáž výzkumná skupina podobný rizikové stratifikační model progresu pacientů s MGUS, který zahrnoval analýzu proporce aPC, stejně jako předchozí model a kontinuální hodnocení stability množství sérového M proteinu v čase. Vyvíjející se MGUS, tzv. „evolving“, byl definován jako minimálně 10% zvýšení koncentrace M proteinu v séru během 3 let, jež bylo potvrzeno dvěma následujícími měřeními po nejméně 1 měsíci. Bylo popsáno, že 72 % pacientů s MGUS s  $\geq 95$ % proporcí aPC v rámci všech PC v kostní dřeni a „evolving“ charakterem progreduje během následujících 7 let od stanovení diagnózy [46], viz tab. 2.

#### CMG model

V roce 2017 byl Českou myelomovou skupinou navržen třetí rizikové stratifi-

kační model (CMG model) predikce maligního zvratu MGUS do MM nebo jiné hematologické malignity. Model byl postaven na pěti rizikových faktorech – koncentrace M proteinu v séru  $\geq 15$  g/l, patologický poměr FLC < 0,26 nebo > 1,65, infiltrace kostní dřeně plazmocyty (bone marrow plasma cell – BMPC) > 5 %, imunoparéza a hodnota sérového hemoglobinu < 120 g/l. Riziko progresu při 10letém sledování bylo 1,6 % pro skupinu bez rizikového faktoru; 16,9 % pro skupinu s 1 rizikovým faktorem; 22,9 % pro skupinu se 2 rizikovými faktory; 39,4 % pro skupinu se 3 rizikovými faktory a 52,3 %, pokud bylo přítomno 4–5 rizikových faktorů ( $p < 0,001$ ). MGUS skupina, která měla 4–5 rizikových faktorů, měla 63x vyšší riziko progresu při porovnání s referenční skupinou ( $p < 0,001$ ), viz tab. 2 [47].

### Diagnostický algoritmus MGUS

Správné určení diagnózy MGUS vyžaduje nejenom odlišení od iniciálních forem maligních MG, ale i od MG asociovaných s B lymfoproliferativními nebo jinými nemaligními nemocemi. V průběhu sledování osoby s MGUS je doporučen standardní panel vyšetření (krevní obraz, základní biochemické vy-

**Tab. 2. Srovnání rizika maligní transformace MGUS do MM nebo jiné hematologické malignity v různých modelech, upraveno podle [39,42,46,47].**

Počet rizikových faktorů	MAYO model (2005) riziko progresse ve 20 letech (%)	PETHEMA model (2007) riziko progresse v 5 letech (%)	PETHEMA model (2010) riziko progresse v 7 letech (%)	CMG model (2017) riziko progresse v 10 letech (%)
low-risk MGUS	5	2	2	1,6
low-intermediate MGUS	21	10	16	17
high-intermediate MGUS	37	46	72	23
high-risk MGUS	58	–	–	39
ultra high-risk MGUS	–	–	–	52

**MAYO model (2005)** – čtyři rizikové skupiny pacientů s MGUS definovány na základě přítomnosti 0–3 rizikových faktorů:  $\geq 15$  g/l koncentrace sérového MIG, non-IgG izotyp těžkého řetězce Mlg a abnormální poměr FLC v séru. **PETHEMA model (2007)** – dvě rizikové skupiny pacientů s MGUS definovány na základě 0–2 rizikových faktorů:  $\geq 95\%$  proporce aPC v rámci všech PC v kostní dřeni a aneuploidie DNA. **PETHEMA model (2010)** – tři rizikové skupiny pacientů s MGUS definovány na základě 0–2 rizikových faktorů:  $\geq 95\%$  proporce aPC v rámci všech PC v kostní dřeni a „evolving“ povaha sérového MIG. **CMG model (2017)** – pět rizikových skupin pacientů s MGUS definovány na základě přítomnosti 0–5 rizikových faktorů: koncentrace M proteinu v séru  $\geq 15$  g/l, patologický poměr FLC  $< 0,26$  or  $> 1,65$ , infiltrace kostní dřene plasmocytu (BMPC)  $> 5\%$ , imunoparéza a hodnota sérového hemoglobinu  $< 120$  g/l.

MGUS – monoklonální gamapatie nejasného významu, MM – mnohočetný myelom, Mlg – monoklonální imunoglobulin, aPC – nádorově změněné plazmatické buňky

šetření zahrnující vyšetření urey, kreatinu, vápníku, celkové bílkoviny, C reaktivního proteinu, B2 mikroglobulinu, albuminu, laktát dehydrogenázy, jaterních enzymů, glukózy, kvantitativní stanovení Ig, FLC vyšetření, imunoelktroforézy séra a moči). Vyšetření kostní dřene není nutné u asymptomatických pacientů se zjevným IgG MGUS, jestliže sérový M protein je  $\leq 15$  g/l a nejsou známky orgánového poškození. Na druhé straně vyšetření kostní dřene by mělo být součástí diagnostického algoritmu pro všechny pacienty s MGUS typu IgA a IgM. Zobrazovací vyšetření není běžně doporučováno u pacientů s M proteinem typu IgG  $\leq 15$  g/l a při M proteinu typu IgA  $\leq 10$  g/l bez kostních bolestí. U všech ostatních pacientů je vhodné provedení RTG celého skeletu, celotělové MRI, PET/CT nebo PET/MRI vyšetření [14].

### Dispenzarizace MGUS pacientů

Vzhledem k tomu, že u pacientů s MGUS s délkou sledování nedochází ke snížení rizika progresse, je doporučeno jejich celoživotní sledování. V prvním roce sledování je doporučeno upřesnit dynamiku nárůstu M proteinu (např. pravidelné vyšetření à 2., 4., 7. a 12. měsíc v 1 roce) pro určení dynamiky MGUS. Pacienti s nízkým

rizikem by měli být sledováni po 6 měsících, a pokud jde o stabilní stav bez známek progresse, pak stačí kontrola již pouze každé 2–3 roky. Všichni ostatní pacienti s MGUS by měli být kontrolováni v intervalu po 4–6 měsících, a pokud jde o stabilní stav, pak jednou ročně [14,47]. Obecně platí, že s délkou sledování při stabilním MGUS může klesat počet kontrol. Minimální interval 1 roku mezi kontrolami se zdá z praktického hlediska optimální dobou, neboť při větším rozvolnění intervalů se pacienti častěji ztrácejí ze systému dispenzarizace.

### MGUS a jiné nemoci

Správné určení diagnózy MGUS vyžaduje odlišení od iniciálních forem maligních MG, ale i od MG asociovaných s B lymfoproliferativními nebo jinými nemaligními nemocemi. Poměrně často je M protein přítomen u nonhodgkinských lymfomů a chronické lymfatické leukemie. U nenádorových krevních onemocnění byla přítomnost M proteinu ve zvýšené míře pozorována u von Willebrandovy a Gaucherovy nemoci a u perniciozní anémie [48,49]. Přítomnost M proteinu je poměrně často asociována s periferní neuropatií a s nemocemi pojiva, zejména revmatoidní artritidou, lupus erythematodus, ankylozující spon-

dylitidou a revmatickou polymyalgií. Asociace M proteinu s kožními nemocemi je známá. I když M proteiny se ve většině případů nevážou na žádné tělu vlastní antigeny, existují stavy, kdy navázání M proteinu (IgA typu) v epidermis na tělu vlastní antigen způsobí poškození imunitního mechanismu s výsledkem vezikulopustulózního kožního onemocnění s názvem IgA pemphigus, který je podobný subkorneální pustulární dermatóze [50]. Mezi další kožní nemoci asociované s MG patří nemoci ze skupiny mucinóz typu skleredému a skleromyxedému [51]. Chronická kopřivka a přítomnost M proteinu jsou příznaky systémové nemoci zvané Schnitzlerův syndrom [52]. S výskytem M proteinu, někdy jenom přechodným, je třeba počítat u imunodeficientních stavů, např. pro transplantaci ledvin či jater [2].

### Závěr

Včasná a správná identifikace vysoce rizikových MGUS pacientů, u kterých hrozí maligní transformace do MM nebo vznik jiných hematologických malignit, je nevyhnutelná. Rizikově stratifikační modely vč. CMG modelu přinášejí jasnou identifikaci rizikových faktorů, na základě kterých můžeme MGUS pacienty rozdělit do rizikových

skupin. Všichni pacienti by měli podléhat dispenzarizaci ve specializovaných hematologických centrech, k čemuž by měl pomoci Registr monoklonálních gamapatií (RMG), představený Českou myelomovou skupinou roku 2007 [54]. Z uvedeného plyne, že problematika kolem diagnózy MGUS je aktuální a živá a že nové znalosti v identifikaci rizikových faktorů by mohly MGUS pacientům přinést prospěch z hlediska oddálení, popř. až zabránění maligní transformace.

### Poděkování

Děkují všem pracovníkům hematologických center ČR za sběr klinických dat v rámci Registru monoklonálních gamapatií a jejich poskytnutí pro účely analýz. Také děkují statistikům za pomoc při zpracovávání a interpretaci výsledků.

### Literatura

- Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005;18(4): 689–707. doi: 10.1016/j.beha.2005.01.025.
- Krízalkovicová V, Maisnar V, Pour L et al. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Klin Onkol* 2008; 21(4): 160–164.
- Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* 2009; 113(22): 5412–5417. doi: 10.1182/blood-2008-12-194241.
- Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS). *Baillieres Clin Haematol* 1995; 8(4): 761–781.
- Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood* 2011; 117(21): 5573–5581. doi: 10.1182/blood-2011-01-270140.
- Cohen HJ, Crawford J, Rao MK et al. Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly. *Am J Med* 1998; 104(5): 439–444.
- Therneau TM, Kyle RA, Melton LJ 3rd et al. Incidence of monoclonal gammopathy of undetermined significance and estimation of duration before first clinical recognition. *Mayo Clin Proc* 2012; 87(11): 1071–1079. doi: 10.1016/j.mayocp.2012.06.014.
- Davis FE, Dring AM, Li C et al. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood* 2003; 102(13): 4504–4511.
- Bladé J. Clinical practice. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 355(26): 2765–2770.
- Malik AA, Ganti AK, Potti A et al. Role of *Helicobacter pylori* infection in the incidence and clinical course of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(6): 1371–1374.
- Rajkumar SV, Kyle RA, Plevak MF et al. *Helicobacter pylori* infection and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 2002; 119(3): 706–708.
- Ross FM, Avet-Loiseau H, Amez G et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2012; 97(8): 1272–1277.
- Mikhael JR, Dingli D, Roy V et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc* 2013; 88(4): 360–376. doi: 10.1016/j.mayocp.2013.01.019.
- van de Donk NW, Palumbo A, Johnsen HE et al. The clinical relevance and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance and related disorders: recommendations from the European Myeloma Network. *Haematologica* 2014; 99(6): 984–996. doi: 10.3324/haematol.2013.100552.
- Tichý M, Maisnar V. Laboratorní průkaz monoklonálních imunoglobulinů. *Vnitř Lék* 2006; 52 (Suppl 2): 41–45.
- Tichý M, Friedecký B, Vávrová J et al. Standardizace biochemických laboratorních vyšetření u mnohočetného myelomu. *Klin Biochem Metab* 2006; 14(35): 8–13.
- Radocha J, Pour L, Pika T et al. Multicentered patient-based evidence of the role of free light chain ratio normalization in multiple myeloma disease relapse. *Eur J Haematol* 2016; 96(2): 119–127. doi: 10.1111/ejh.12556.
- Ščudla V, Minařík J, Schneiderka P et al. Význam sérových hladin volných lehkých řetězců imunoglobulinu v diagnostice a hodnocení aktivity mnohočetného myelomu z vybraných monoklonálních gamapatií. *Vnitř Lék* 2005; 51(11): 1249–1259.
- Pika T, Minařík J, Lochman P et al. Přinos vyšetření sérových hladin volných lehkých řetězců pro subklasifikaci nesekretorické formy mnohočetného myelomu. *Klin Biochem Metab* 2010; 18(39): 77–79.
- Radocha J. HevyLite™ – nová metoda detekce monoklonálních imunoglobulinů – editorial. *Vnitř Lék* 2015; 61(1): 13–14.
- Ščudla V, Pika T, Heřmanová Z. Hevylite – nová analytická metoda v diagnostice a hodnocení průběhu monoklonálních gamapatií. *Klin Biochem Metab* 2010; 18(39): 62–68.
- Jackson N, Ling NR, Ball J et al. An analysis of myeloma plasma cell phenotype using antibodies defined at the III<sup>rd</sup> International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens. *Clin Exp Immunol* 1988; 72(3): 351–356.
- Lima M, Teixeira Mdos A, Fonseca S et al. Immunophenotypic aberrations, DNA content, and cell cycle analysis of plasma cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathies. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26(6): 634–645.
- Maisnar V, Tusková M, Tichý M et al. The significance of soluble CD138 in diagnosis of monoclonal gammopathies. *Neoplasma* 2006; 53(1): 26–29.
- Bataille R, Jégo G, Robillard N et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of „many and multiple myelomas“ and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006; 91(9): 1234–1240.
- Miltenyi S, Müller W, Weichel W et al. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11(2): 231–238.
- Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B et al. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 2002; 48(10): 1819–1827.
- Buresova I, Cumova J, Kovarova L et al. Bone marrow plasma cell separation – validation of separation algorithm. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50(6): 1139–1140. doi: 10.1515/cclm-2012-8837.
- Kovarova L, Buresova I, Buchler T et al. Phenotype of plasma cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Neoplasma* 2009; 56(6): 526–532.
- Seong C, Delasalle K, Hayes K et al. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998; 101(1): 189–194.
- Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood* 2007; 109(8): 3489–3495.
- Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2016; 91(7): 719–734. doi: 10.1002/ajh.24402.
- Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346(8): 564–569.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. *Br J Haematol* 2007; 139(5): 730–743.
- Kyle RA, Rajkumar SV, Therneau TM et al. Prognostic factors and predictors of outcome of immunoglobulin M monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Clin Lymphoma* 2005; 5(4): 257–260.
- Cesana C, Klersy C, Barbarano L et al. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002; 20(6): 1625–1634.
- Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV et al. Long-term follow-up of 241 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance: the original Mayo Clinic series 25 years later. *Mayo Clin Proc* 2004; 79(7): 859–866.
- Rosiñol L, Cibeira MT, Montoto S et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: predictors of malignant transformation and recognition of an evolving type characterized by a progressive increase in M protein size. *Mayo Clin Proc* 2007; 82(4): 428–434.
- 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.
- Pika T, Lochman P, Sandecka V et al. Immunoparesis in MGUS – Relationship of uninvolved immunoglobulin pair suppression and polyclonal immunoglobulin levels to MGUS risk categories. *Neoplasma* 2015; 62(5): 827–832. doi: 10.4149/neo\_2015\_100.
- Katzmann JA, Clark R, Kyle RA et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia* 2013; 27(1): 208–212. doi: 10.1038/leu.2012.189.
- Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007; 110(7): 2586–2592.
- Kumar S, Rajkumar SV, Kyle RA et al. Prognostic value of circulating plasma cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Oncol* 2005; 23(24): 5668–5674.
- Hillengass J, Weber MA, Kilik K et al. Prognostic significance of whole-body MRI in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 2014; 28(1): 174–178. doi: 10.1038/leu.2013.244.
- Heuck C, Sexton R, Dhodapkar MV et al. SWOG S0120 observational trial for MGUS and asymptomatic multiple myeloma (AMM): imaging predictors of progression for patients treated at UAMS. *Blood* 2011; 118: 3955.
- Pérez-Persona E, Mateo G, García-Sanz R et al. Risk of progression in smoldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: compara-

tive analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br J Haematol* 2010; 148(1): 110–114. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07929.x.

47. Sandecká V, Hájek R, Pour L et al. A first Czech analysis of 1887 cases with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Eur J Haematol* 2017; 99(1): 80–90. doi: 10.1111/ejh.12894.

48. Alexanian R. Monoclonal gammopathy in lymphoma. *Arch Intern Med* 1975; 135(1): 62–66.

49. Lambole V, Zabraniecki L, Sie P et al. Myeloma and monoclonal gammopathy of uncertain significance associated with acquired von Willebrand's syndrome. Seven new cases with a literature review. *Joint Bone Spine* 2002; 69(1): 62–67.

50. Ropper AH, Gorson KC. Neuropathies associated with paraproteinemia. *N Engl J Med* 1998; 338(22): 1601–1607.

51. Adam Z, Feit J, Krejčí M et al. IgA pemphigus a monoklonální gamapatie, je zde souvislost? *Dermatol praxi* 2010; 4(4): 221–224.

52. Viktorinová M, Ditrichová D. Kožní projevy interních chorob. *Int Med* 2005; 7(5) 242–249.

53. Adam Z, Šedivá H, Koukalová R et al. Schnitzlerové syndrom: Diferenciální diagnostika, přehled léčebných možností a popis 5 případů léčených anakinrou. *Vnitř Lék* 2016; 62(9): 491–499.

54. Myeloma.cz. Česká myelomové skupina. [online]. Dostupné na: <http://www.myeloma.cz/index.php?pg=registr-rmg-registry-of-monoclonal-gammopathies>.

# Metastáza do lymfatických uzlín na krku pri neznámom primárnom tumore

## Carcinoma of Unknown Primary in Head and Neck Region

Uhliarová B.<sup>1</sup>, Navrátilová M.<sup>1</sup>, Čalkovský V.<sup>2</sup>, Hajtman A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Oddelenie otorinolaryngológie FNŠP FD Roosevelta, Banská Bystrica

<sup>2</sup>Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku, UK JLF a UNM Martin

### Súhrn

**Úvod:** Metastáza (MTS) do lymfatických uzlín (LU) na krku pri neznámom primárnom tumore sa diagnostikuje u 5 % pacientov s maligným nádorom hlavy a krku. V manažmente pacientov s MTS do LU na krku je vždy potrebné komplexné pátranie po okultnom nádore. Detekcia origa umožňuje cieľnú špecifickú liečbu, čo výrazne zlepšuje prognózu choroby. **Materiál a metodika:** Retrospektívna analýza pacientov, ktorí boli hospitalizovaní na Klinike otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku UK JLF a UNM v Martine od januára 2012 do septembra 2017 pre MTS do LU krku pri neznámom primárnom tumore. Zamerali sme sa na diagnostický postup a úspešnosť detekcie primárneho tumoru. **Výsledky:** V súbore bolo 40 pacientov, priemerný vek  $59,4 \pm 1,5$  rokov (35–78 rokov). CT vyšetrenie aj panendoskopické vyšetrenie v celkovej anestézii sa vykonalo u všetkých pacientov. Ipsilaterálna tonzilektómia (TE) sa realizovala u 34 (80 %). U zvyšných 6 sa TE neindikovala – u 2 sa zistilo origo pri panendoskopickom vyšetrení a u 4 bola vykonaná TE v minulosti. Odber slepých vzoriek z nosohltana, koreňa jazyka a piriformného recesu na histopatologické vyšetrenie sa vykonalo u 38 pacientov (95 %). PET/CT vyšetrenie sa indikovalo u 12 pacientov (30 %). Primárny nádor sa nezobrazil ani u jedného z nich. Po realizovaných vyšetreniach sa origo diagnostikovalo u 21 (52,5 %). U 16 (40 %) sa primárny nádor našiel v hornom aerodigestívom trakte, u 5 (12,5 %) sa primárny nádor nachádzal mimo ORL oblasť. U 19 (47,5 %) sa nepodarilo origo identifikovať. **Záver:** Aj napriek využitiu dostupných zobrazovacích a endoskopických metód nie je možné primárny tumor vždy identifikovať.

### Kľúčové slová

metastáza do lymfatických uzlín na krku – neznámy primárny tumor – diagnostika – PET/CT – panendoskopia

### Summary

**Introduction:** Carcinoma of unknown primary (CUP) in head and neck region is diagnosed in 5% of patients with malignant tumour of head and neck. In the management of patients with CUP, complex investigation to diagnose the occult tumour is always necessary. Detection of origin allows targeted specific treatment that significantly improves the prognosis of the disease. **Material and methods:** Retrospective analysis of patients treated at the Department of Otorhinolaryngology and Head and Neck Surgery of the UK JLF and UNM in Martin between January 2012 until September 2017 for CUP in head and neck region. Diagnostic procedure and success of primary tumour detection were evaluated. **Results:** In study group, there were 40 patients with average age  $59.4 \pm 1.5$  years (35–78 years). CT scan and panendoscopic examination in general anaesthesia were performed in all patients. Ipsilateral tonsillectomy (TE) was performed in 34 patients (80%). For the remaining 6 patients, TE was not indicated – 2 found originally in the panendoscopic examination and in 4 TE was performed in the past. Blinded samples from the nasopharynx, the base of the tongue and the pyriform recess were taken in 38 patients (95%). PET/CT screening was indicated in 12 patients (30%). The primary tumour did not detect the primary tumour in any of them. Primary tumour was diagnosed in 21 cases (52.5%). In 16 patients (40%), the primary tumour was found in the upper aerodigestive tract, in 5 patients (12.5%) the primary tumour was located outside the ENT region. The primary tumour was not identified in 19 cases (47.5%). **Conclusion:** Despite the modern imaging and endoscopic methods, the primary tumour cannot always be identified.

### Keywords

metastasis into cervical lymph nodes – carcinoma of unknown primary – diagnosis – PET/CT – panendoscopy

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. Barbora Uhliarová, Ph.D.  
Oddelenie otorinolaryngológie  
FNŠP FD Roosevelta  
Kollárova 2  
036 59 Martin  
e-mail: b.uhliarova@gmail.com

Obdržané/Submitted: 3. 1. 2018

Prijaté/Accepted: 18. 6. 2018

doi: 10.14735/amko2018277

**Úvod**

Nádory hlavy a krku tvoria 3–5 % zo všetkých novodiagnostikovaných malignít ročne. Najčastejšie sa diagnostikuje spinocelulárny karcinóm horného aerodigestívneho traktu (t. j. dutina ústna, orofarynx, hypofarynx a larynx) [1]. Pre tieto tumory je charakteristické skoré metastázovanie (MTS) do regionálnych lymfatických uzlín (LU) na krku [2]. U časti pacientov s metastatickým postihnutím LU krku sa však primárny proces, z ktorého MTS pochádza, nezistí – ide o MTS pri neznámom primárnom tumore.

MTS do krčných LU pri neznámom primárnom tumore, synonymá – okultný karcinóm hlavy a krku, MTS ad NL colli e loco ignoto, MTS ad NL colli origo incerta, v anglosaskej literatúre označovaná ako „carcinoma of unknown primary“ (CUP), je definovaná ako histologicky alebo cytologicky dokázaná MTS do LU krku bez nálezu primárneho nádoru. V tejto problematike sa nejedná o lymfómy a karcinómy štítnej žľazy [3].

Patofyziologický mechanizmus vzniku MTS do LU pri neznámom primárnom tumore nie je dokonale vysvetlený. MTS

nemôže vzniknúť *de novo*. Existujú 3 teórie vzniku:

1. primárny nádor existuje, ale nebol detegovaný;
2. primárny nádor existoval, ale bol eliminovaný imunitným systémom;
3. malignizovaná epiteliálna výstelka kongenitálnej cysty [4]

**Materiál a metodika**

V práci sme retrospektívne analyzovali pacientov, ktorí boli hospitalizovaní na Klinike ORL a ChHaK UK JLF a UNM v Martine od januára 2012 do septembra 2017 pre MTS do LU krku pri neznámom primárnom tumore. Sledovali sme demografické údaje (pohlavie, vek), rizikové faktory (fajčenie, alkohol), dĺžku trvania symptómov, lateralitu, veľkosť, výsledok histopatologického vyšetrenia MTS. Zamerali sme sa na diagnostický postup a úspešnosť detekcie primárneho tumoru.

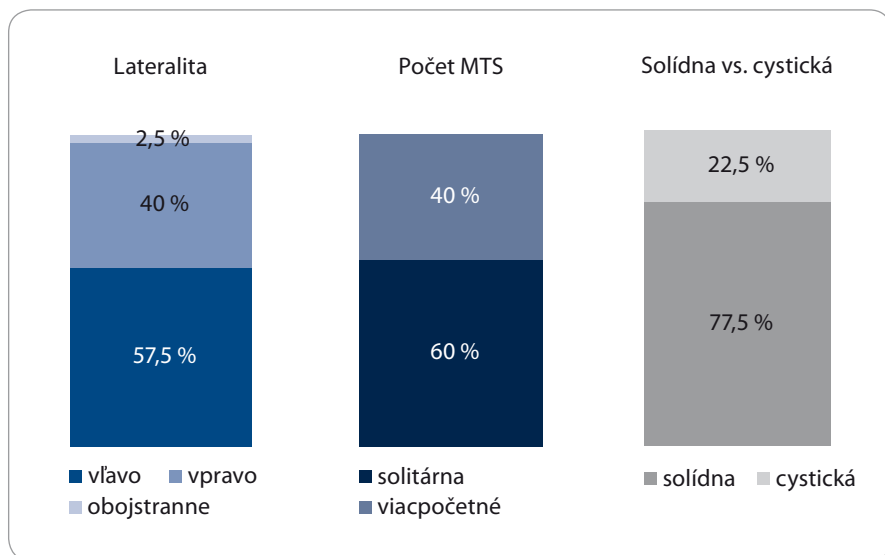
Charakteristiku súboru pacientov a sledované dáta sme vyhodnotili pomocou frekvenčnej sumarizácie a deskriptívnej štatistiky – priemer, medián, smerodajná odchýlka, kvartil minima a maxima. Rozdiely medzi sledovanými parametrami sme vyhodnotili štandardnými neparametrickými testami – Pearsonov c2-test s Yatesovou koreláciou a Mannovým-Whitneyho U testom. Za štatisticky významné sme v rámci všetkých použitých testov považovali hodnoty hladiny významnosti  $p < 0,05$ . Na štatistickú analýzu sme použili program STATISTICA Cz 10.

**Výsledky**

Na Klinike ORL a ChHaK UK JLF a UNM v Martine bolo v období január 2012 až september 2017 liečených 40 pacientov, priemerný vek  $59,4 \pm 1,5$  rokov (35–78 rokov), pre MTS do LU na krku pri neznámom primárnom tumore. V súbore bolo 29 mužov (72,5 %) a 11 žien (27,5 %,  $p = 0,012$ ). Priemerný vek u mužov bol  $59,7 \pm 1,8$  rokov a  $58,5 \pm 2,6$  rokov u žien ( $p = 0,387$ ).

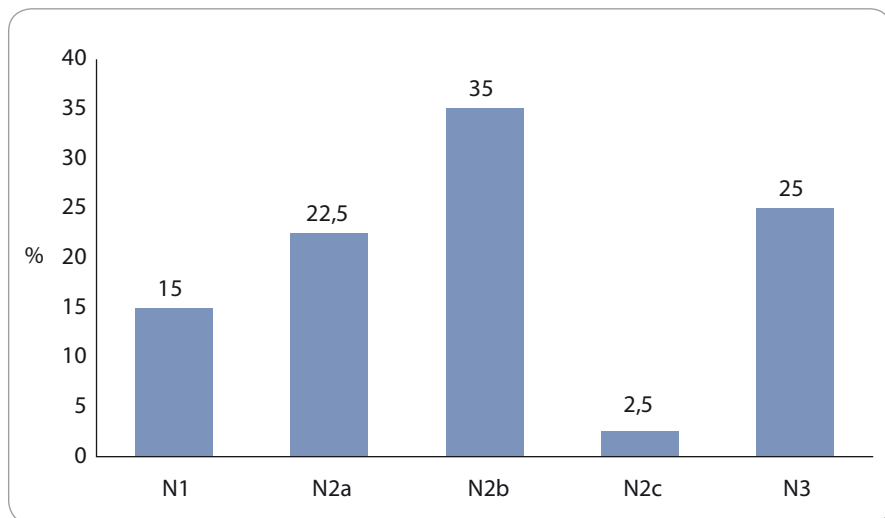
Z rizikových faktorov sme zaznamenali fajčenie u 52,6 % a alkohol u 27,1 %. Priemerná doba trvania ťažkostí bola 3 mesiace a  $1 \pm 2$  týždne.

Medián veľkosti MTS bol  $47,1 \pm 19,5$  mm (14–90 mm). MTS v LU sa častejšie diagnostikovala vpravo (23 pacientov;



Obr. 1. Charakteristika MTS do LU na krku pri neznámom primárnom tumore.

MTS – metastáza, LU – lymfatické uzliny



Graf 1. N štádium MTS do LU krku pri neznámom primárnom tumore (podľa TNM klasifikácie).

MTS – metastáza, LU – lymfatické uzliny

57,5 %;  $p = 0,037$ ). U 1 pacienta sa MTS postihnutie LU na krku detegovalo obojstranne. MTS sa častejšie zistila v 1 uzline (solitárna MTS, 24 pacientov, 60 %;  $p = 0,023$ ) v porovnaní s MTS vo viacerých LU na krku (16 pacientov, 40 %). Cystická MTS sa diagnostikovala u 9 pacientov (22,5 %;  $p = 0,002$ ) (obr. 1).

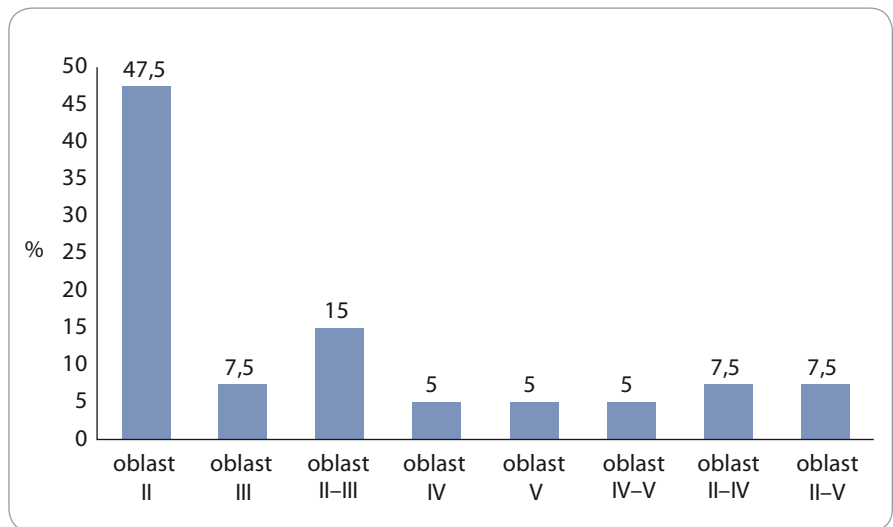
Najčastejšie sme zistili MTS v LU v štádiu N2 (60 %,  $p = 0,021$ ) (graf 1). MTS boli signifikantne častejšie postihnuté LU v hornej časti krku – level II a III (70 %;  $p = 0,018$ ) (graf 2). Histopatologickým vyšetrením sa najčastejšie diagnostikoval zle diferencovaný spinocelulárny karcinóm (40 %) a nediferencovaný karcinóm (27,5 %) (graf 3).

U všetkých pacientov bola MTS v LU potvrdená histopatologickým vyšetrením – z predchádzajúcej excízie, exstirpácie LU alebo na základe peroperačnej histológie. CT vyšetrenie sa realizovalo u všetkých pacientov, a to u 90 % pred panendoskopickým vyšetrením v celkovej anestézii. Samotné ultrasonografia krku predoperačne bolo realizované u 10 %, týmto sa následne doplnilo aj CT vyšetrenie krku.

Panendoskopické vyšetrenie v celkovej anestézii sa vykonalo u všetkých pacientov. Ipsilaterálna tonzilektómia (TE) sa realizovala u 34 (80 %). U zvyšných 6 sa TE neindikovala – u 2 sa zistilo origo pri panendoskopickom vyšetrení a u 4 bola vykonaná TE v minulosti. Odber slepých vzoriek z nosohltana, koreňa jazyka a piriformného recesu na histopatologické vyšetrenie sa vykonával u 38 pacientov (95 %).

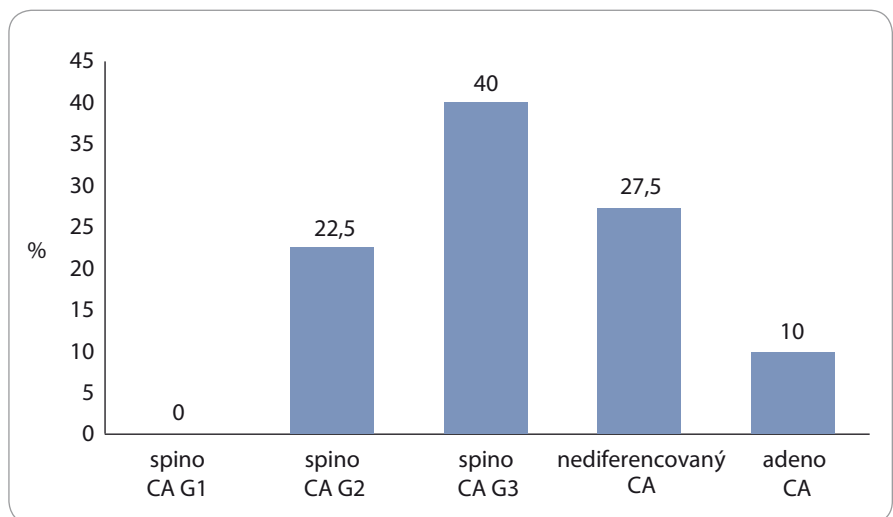
PET/CT vyšetrenie sa indikovalo u 12 pacientov (30 %). U 3 pacientov (7,5 %) sa PET/CT vykonalo ešte pred panendoskopickým vyšetrením v celkovej anestézii. Ani jednom prípade sa PET/CT vyšetrením origo nezobrazilo. Po panendoskopickom vyšetrení v celkovej anestézii so slepými excíziami a ipsilaterálnou TE sa detegovalo origo u 2 z nich (tonzila a koreň jazyka). U zvyšných 9 pacientov (22,5 %) sa PET/CT realizovalo až po panendoskopickom vyšetrení. Primárny nádor sa nenašiel ani u jedného z nich.

Pacienti boli následne odoslaní na konzultáciu onkológom. Pri nami nedetegovanom origo bolo doplnené pľúcne, gastroenterologické a gynekologické/urologické vyšetrenie.



Graf 2. Lokalizácia MTS na krku.

MTS – metastáza



Graf 3. Výsledok histopatologického vyšetrenia z MTS.

MTS – metastáza, CA – karcinóm

Po realizovaných vyšetreniach sme z pôvodného súboru 40 pacientov diagnostikovali origo u 21 (52,5 %). U 16 (40 %) sa primárny nádor našiel v hornom aerodigestívnom trakte, u 5 (12,5 %) sa primárny nádor nachádzal mimo ORL oblastí. U 19 (47,5 %) sa nepodarilo origo identifikovať (obr. 2).

U žien sa primárny nádor detegoval najčastejšie v ORL oblasti (54,5 %,  $p = 0,027$ ), u väčšiny mužov sa origo nezistilo (55,2 %,  $p = 0,034$ ). MTS lokalizovaná v hornej časti krku (level II, III) bola spojená s detekciou origa v ORL oblasti (45,1 %) prípadne sa origo nezistilo (48,4 %). Pri MTS lokalizovanej

v dolnej časti krku sa najčastejšie diagnostikoval primárny tumor mimo ORL oblastí (66,7 %,  $p = 0,009$ ). Pri MTS adenokarcinómu sa origo zistilo mimo ORL oblastí u 90 % ( $p = 0,0001$ ). Pri MTS epidermoidného karcinómu či nediferencovaného karcinómu sa primárny tumor častejšie diagnostikoval v ORL oblasti. Pri cystickej MTS sa signifikantne častejšie origo detegovalo v ORL oblasti (66,7 %,  $p = 0,009$ ) (tab. 1).

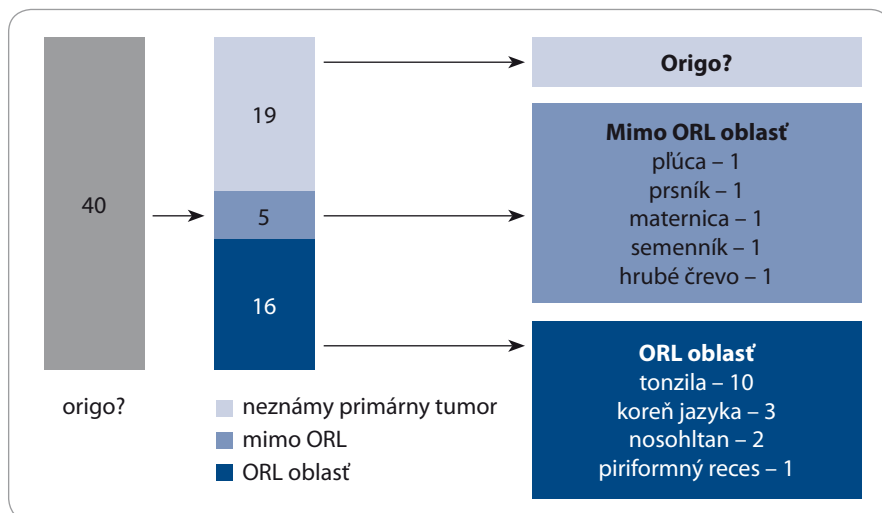
### Diskusia

MTS do LU krku pri neznámom primárnom tumore sa zistí u 5 % pacientov s malígnym tumorom hlavy a krku. In-

Tab. 1. Detekcia primárneho tumoru v sledovanom súbore.

	ORL oblasť (%)	mimo ORL oblasť (%)	neznáme origo (%)	p
<b>muži</b>	34,5	10,3	55,2	0,034
<b>ženy</b>	54,5	27,3	18,2	0,027
oblasť II–III	45,1	6,5	48,4	0,007
oblasť IV–V	0,0	66,7	33,3	0,009
<b>spino CA G2</b>	57,1	14,3	28,6	0,021
<b>spino CA G3</b>	50,0	50,0	0,0	0,467
<b>nediferencovaný CA</b>	46,2	13,3	40,5	0,012
<b>adeno CA</b>	0,0	90,0	10,0	0,0001
cystická MTS	66,7	0,0	33,3	0,009
solídna MTS	32,3	16,1	51,6	0,036

spino CA – spinocelulárny karcinóm, G2 – stredne diferencovaný, G3 – zle diferencovaný, adeno CA – adenokarcinóm, MTS – metastáza



Obr. 2. Detekcia primárneho tumoru v sledovanom súbore.

cidencia je 0,34/100 000 obyvateľov za rok. Častejšie sa vyskytuje u mužov (80 %), priemerný vek je 60 rokov [3,5]. Podobné výsledky sme zaznamenali aj v našej štúdii.

Histologicky sa najčastejšie diagnostikuje MTS epidermoidného karcinómu (75 %), menej často MTS nediferencovaného karcinómu a MTS adenokarcinómu [3,6]. Aj v našom súbore sa najčastejšie detegovala MTS zle diferencovaného spinocelulárneho karcinómu (40 %) a nediferencovaného karcinómu (27,5 %).

V etiopatogenéze sa tak ako aj pri ostatných malígných nádoroch horného

aerodigestívneho traktu uplatňuje alkohol, fajčenie, malnutriícia, hypovitaminóza a infekcia ľudského papilomavírusu (human papilloma virus – HPV) [7,8]. Tieto údaje sa potvrdili aj u našich pacientov. Z rizikových faktorov sme zaznamenali fajčenie u 52,6 % a alkohol u 27,1 %. V manažmente pacientov s MTS do LU na krku je vždy potrebné komplexné pátranie po okultnom nádore. Detekcia origa umožňuje cieľnú špecifickú liečbu, zlepšuje prognózu, znižuje morbiditu asociovanú s externou rádioterapiou aj skorú diagnostiku prípadnej lokoregionálnej recidívy. Po ukončení liečby je potrebná

dlhodobá dôsledná dispenzarizácia, pretože origo sa v priebehu dispenzarizácie zistí u 10–50 %, najčastejšie v orofaryngu, epifaryngu a hypofaryngu [3]. V diagnostickom postupe má dôležitú úlohu klinické ambulantné vyšetrenie. To zahŕňa celú ORL oblasť vrátane vlasatej časti hlavy, kože tváre a vonkajšieho zvukovodu. Potrebné je detailné vyšetrenie dutiny ústnej a hltana spolu s digitálnou palpáciou tonzíl a koreňa jazyka. Súčasťou je endoskopické vyšetrenie nosovej dutiny, nosohltana, hypofaryngu a hrtana. Zvýšenú pozornosť treba venovať typickým lokalitám výskytu okultného karcinómu – nosohltan, koreň jazyka, podnebné mandle a piriformné recesy [3,5,6]. MTS v LU na krku je najčastejšie v oblasti II a III. Lokalizácia MTS pomáha v pátraní po primárnom tumore. Lymfadenopatia v oblasti II a III naznačuje možné origo v podnebnnej mandli, koreni jazyka, hypofaryngu a supraglotickej časti hrtana. Na druhej strane lymfadenopatia v dolnej časti krku (level IV a Vb) svedčí skôr o primárnom tumore mimo ORL oblasť (gastrointestinálny trakt, pľúca, prsník, urogenitálny trakt) [4,6]. Tieto výsledky sa potvrdili aj v našom súbore.

Pozornosť treba venovať aj nálezu cystickej MTS, ktorá sa najčastejšie nachádza v oblasti II a je typická pre primárny nádor podnebnnej mandle a koreňa jazyka. Veľké cystické MTS sú charakteristické aj pre HPV pozitívne nádory hlavy a krku. Typicky ide o malé karcinómy (T1, event. neznáme origo) orofaryngu (podnebná mandľa, koreň jazyka) u mladších pacientov (do 60 rokov) s negatívnou fajčiarskou anamnézou. Histologicky sa zistí nízko diferencovaný nekeratinizujúci karcinóm, bazaloidný typ [7–9].

Dôležitou súčasťou diagnostického algoritmu sú zobrazovacie vyšetrenia, ktoré sa odporúča realizovať pred invazívnym chirurgickým výkonom, aby sa zabránilo falošnej interpretácii výsledkov. Metódou voľby je CT vyšetrenie, ktoré podáva detailné morfológické informácie, avšak detekcia origa sa zistí iba u 10–20 %. MRI vyšetrenie má vyššiu rozlišovaciu schopnosť jednotlivých tkanív. Pomocou MRI je možné detegovať origo u 30 % [3,6]. Pri CT/MRI je potrebné zobrazovať aj prínosové dutiny, aby sa vylúčilo prípadné origo v tejto oblasti.



PET je moderná vyšetrovacia metóda, ktorá umožňuje neinvazívne určenie metabolických pochodov *in vivo*. V súčasnosti sa takmer výhradne používa spolu s CT vyšetrením (PET/CT). Toto vyšetrenie je schopné odhaľovať metabolické zmeny, ktoré predchádzajú zmeny anatomické (štrukturálne), zobraziteľné inými diagnostickými metódami. Tak je možné prispieť k lepšej diagnostike nádorových chorôb a detegovať aj existujúce vzdialené MTS [10]. Detekcia okultného karcinómu pomocou PET/CT sa udáva u 30–50 % [11]. Nevýhodou PET/CT je nižšia senzitivita v diagnostike okultných karcinómov Waldayerovho lymfatického okruhu, ako aj falošná pozitivita tohto vyšetrenia spôsobená fyziologicky zvýšeným metabolizmom lymfoepitelového tkaniva horného aerodigestívneho traktu. Nevýhodou je taktiež výrazne vyššia radiačná záťaž (5–7 mSv pri CT vs. 23–25 mSv pri PET/CT). Toto vyšetrenie je tiež cenovo drahšie a menej dostupné v porovnaní s CT a MRI vyšetrením [10].

V nami sledovanom súbore sa pomocou PET/CT vyšetrenia nediagnostikoval primárny tumor ani u jedného pacienta. Falošnú negativitu sme zaznamenali u dvoch, ktorým sa PET/CT vyšetrením primárny nádor nezobrazil, avšak pri panendoskopickom vyšetrení sa origo našlo.

Na našom pracovisku je štandardom CT vyšetrenie, ktoré indikujeme pred invazívnym výkonom v celkovej anestézii. PET/CT vyšetrenie v rámci diagnostického algoritmu u pacientov s MTS do LU na krku pri neznámom primárnom neodporúčame ako primárne vyšetrenie. Toto vyšetrenie by malo byť rezervované pre pacientov, ktorým nebolo konvenčnými zobrazovacími metódami ani panendoskopickým vyšetrením detegované origo, alebo u pacientov, u ktorých predpokladáme lokalitu primárneho tumoru mimo ORL oblastí.

Výsledok cytologického alebo histologického vyšetrenia MTS určí ďalší postup. Adenokarcinóm dovoľuje suponovať origo mimo ORL oblastí, kdežto u chorého so spinocelulárnym či nediferencovaným karcinómom sa primárny nádor s najväčšou pravdepodobnosťou nachádza v hornom aerodigestívnom trakte a je indikované panendoskopické vyšetrenie v celkovej anestézii. Toto vyšetrenie sa považuje za najdô-

ležitejšiu súčasť diagnostického algoritmu pacientov s MTS do LU krku s neznámym primárnym tumorom. Ide o kompletne endoskopické vyšetrenie prehltačích a dýchacích orgánov v celkovej anestézii – zahŕňa rinoskópiu, epifaryngoskópiu, laryngoskópiu, hypofaryngoskópiu a ezofagoskópiu. Súčasťou je palpačné vyšetrenie koreňa jazyka. Vykonáva sa odber vzoriek zo suspektných potenciálnych primárnych ložísk – nodozita, slizničná hyperplázia, infiltrácia, sliznica krvácajúca na dotyk. Pri negatívnom náleze, t. j. fyziologickom náleze v hornom aerodigestívnom trakte sa odoberajú probatórne „slepé“ excízie zo sliznice nosohltana, koreňa jazyka a piriformného recesu. Následne sa vykoná ipsilaterálna TE, ktorá diagnostikuje okultný nádor až u 25 %. Probatória excízia z povrchu tonzily je nedostatočná, udáva sa detekcia origa u 3 %. Aj u pacientov po TE v minulosti je možný vznik okultného karcinómu v reziduu tonzilárneho tkaniva, preto je potrebná aj kompletná exstirpácia rezidua po TE [3,12]. Niektorí autori indikujú obojstrannú TE [12–14].

V súlade s literárnymi údajmi postupujeme aj na našom pracovisku. Cytologické vyšetrenie neindikujeme. U pacientov s histologicky verifikovanou MTS do LU krku vykonávame panendoskopické vyšetrenie v celkovej anestézii s ipsilaterálnou TE a odberom slepých excízií z nosohltana, koreňa jazyka a piriformného recesu.

Na základe uvedených diagnostických postupov sme diagnostikovali primárny tumor u 52,5 %. Najčastejšie sa origo zistilo v podnebnnej mandli (25 %).

## Záver

MTS do LU na krku pri neznámom tumoru je často lokalizovaná v hornej časti krku (level II a III) a jej pôvod je najčastejšie zle diferencovaný spinocelulárny karcinóm alebo nediferencovaný karcinóm.

V manažmente pacientov s touto chorobou je nevyhnutná interdisciplinárna spolupráca viacerých odborníkov. Identifikácia origa pri MTS v LU je dôležitá pre cieľnú liečbu a tým aj zlepšenie prognózy ochorenia.

V rámci zobrazovacích metód je štandardom CT vyšetrenie. PET/CT vyšetrenie je schopné odhaľovať metabolické zmeny, ktoré predchádzajú zmeny anatomické (štrukturálne) zobraziteľné

inými diagnostickými metódami. V ORL oblasti má však určité limity, dané predovšetkým fyziologicky zvýšeným metabolizmom v bunkách Waldayerovho lymfatického okruhu, čo vysvetľuje nižšiu senzitivitu a špecifitu tohto vyšetrenia v detekcii okultných karcinómov.

V diagnostickom algoritme je najdôležitejšie panendoskopické vyšetrenie, ipsilaterálna TE a odber „slepých“ vzoriek z kritických oblastí – nosohltana, koreňa jazyka a hruškovitého záľivu.

Aj napriek exaktnému použitiu dostupných zobrazovacích a endoskopických metód nie je možné primárny tumor u mnohých pacientov identifikovať.

## Literatúra

- Gočárová K, Špánik S. Zriedkavé nádory hlavy a krku. *Onkológia* 2013; 8(2): 78–82.
- Kozhanov LG, Shatskaia NK, Luchikhin LA. Principles of early diagnosis of malignant neoplasms in ENT organs. *Vestn Otorinolaringol* 2008; 5: 7–10.
- Čelakovský P, Plzák J, Betka J (eds). Krční metastázy. *Tobiáš* 2012: 328.
- Chernock RD, Lewis JS. Approach to metastatic carcinoma of unknown primary in the head and neck: squamous cell carcinoma and beyond. *Head Neck Pathol* 2015; 9(1): 6–15. doi: 10.1007/s12105-015-0616-2.
- Zdražil B, Profant M, Povinec P. Prínos PET/CT vyšetrenia do diagnostiky neznámeho primárneho tumoru s metastázovaním do krčných lymfatických uzlín – naše skúsenosti. *Otorinolaryng a Foniat* 2012; 61(1): 53–56.
- Issing WJ, Taleban B, Tauber S. Diagnosis and management of carcinoma of unknown primary in the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260(8): 436–443. doi: 10.1007/s00405-003-0585-z.
- Binková H, Horáková Z, Kostřička R et al. Narůstající incidence HPV pozitivních orofaryngeálních karcinómů. *Otorinolaryng a Foniat* 2015; 64(4): 205–212.
- Boscolo-Rizzo P, Schroeder L, Romeo S et al. The prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of unknown primary site metastatic to neck lymph nodes: a systematic review. *Clin Exp Metastasis* 2015; 32(8): 835–845. doi: 10.1007/s10585-015-9744-z.
- Švajdler M, Laco J, Ondič O et al. HPV-asociované karcinómy hlavy a krku: Aktualizácia poznatkov a odporúčania pre prax. *Cesk slov Patol* 2016; 52(3): 130–138.
- Uhlárová B, Švec M. Využitie PET/CT v otorinolaryngológii. *Slov lek* 2017; 9-10: 18-24.
- Abouzied MM, Fathala A, Alsugair A et al. Role of fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography in the evaluation of head and neck carcinoma. *World J Nucl Med* 2017; 16(4): 257–265. doi: 10.4103/wjnm.WJNM\_40\_17.
- Mackenzie K, Watson M, Jankowska P et al. Investigation and management of the unknown primary with metastatic neck disease: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* 2016; 130 (Suppl 2): S170–S175. doi: 10.1017/S0022215116000591.
- Byrd JK, Smith KJ, de Almeida JR et al. Transoral robotic surgery and the unknown primary: a cost-effectiveness analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014; 150(6): 976–982. doi: 10.1177/0194599814525746.
- Theodoraki MN, Veit JA, Hoffmann TK et al. Synchronous bilateral tonsil carcinoma: case presentation and review of the literature. *Infect Agent Cancer* 2017; 12: 38. doi: 10.1186/s13027-017-0146-5.

# Výskyt a antibiotická rezistence enterobakterií izolovaných z klinického materiálu od pacientů s akutní leukemií

## Occurrence and Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae in Acute Leukemia Patients

Zatloukalová S.<sup>1</sup>, Holý O.<sup>1</sup>, Petrželová J.<sup>2</sup>, Mlynářčík P.<sup>2</sup>, Vlčková J.<sup>1</sup>, Röderová M.<sup>2</sup>, Horáková D.<sup>1</sup>, Kollárová H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav preventivního lékařství, LF UP v Olomouci

<sup>2</sup>Ústav mikrobiologie, LF UP v Olomouci

### Souhrn

**Východiska:** Akutní leukemie (AL) je heterogenní skupina maligních onemocnění hematopoézy, rozděluje se na dva základní typy, a to akutní myeloidní leukemie (AML) a akutní lymfoidní leukemie (ALL). Pacienti s těmito onemocněními patří mezi těžce imunosuprimované a je u nich velké riziko vzniku závažných infekcí. Cílem studie bylo sledování výskytu enterobakterií – původců těchto infekcí – u pacientů s AL hospitalizovaných na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice v Olomouci a zjištění jejich antibiotické rezistence. **Materiál a metodika:** Do studie bylo zapojeno 49 pacientů s AL, z toho 37 s AML (16 žen a 21 mužů) a 12 s ALL (6 žen a 6 mužů); průměrný věk pacientů byl 50,5 roku. V průběhu 12 měsíců (od září 2015 do srpna 2016) by od těchto pacientů získávány vzorky klinického materiálu, které byly podrobeny základnímu mikrobiologickému vyšetření. Bakteriální kmeny byly identifikovány pomocí MALDI-TOF MS. Citlivost na antibiotika byla stanovena pomocí mikrodiluční metody. **Výsledky:** Celkově bylo od pacientů s AL získáno 292 vzorků, které byly dále podrobeny selekci na základě několika kritérií, aby bylo zamezeno zahrnutí identických kmenů získaných od téhož pacienta. Výsledkem byl výběr 146 klinických vzorků z 9 typů klinických materiálů (47× výtěr z krku, 40× stolice, 33× moč, 11× hemokultura, 5× výtěr z dutiny ústní, 4× perianální stěr, 3× stěr z rány, 2× sputum, 1× punktát). Nejvíce prevalentní enterobakterií byla *Escherichia coli* (42×), dále zástupci *Klebsiella* spp. (46×), a to *Klebsiella pneumoniae* (34×) a *Klebsiella oxytoca* (12×), a *Enterobacter cloacae* (19×). Mnohé izoláty vykazovaly rezistenci na testovaná antibiotika. **Závěr:** Pacienti s hematoonkologickými onemocněními jsou kolonizováni rezistentními enterobakteriemi, což pro ně představuje potenciální nebezpečí vzniku závažných infekcí. Obecně je výskyt těchto rezistentních zástupců z čeledi *Enterobacteriaceae* v dnešní době závažným problémem se zvyšujícím se výskytem. Tato fakta a vysoká imunosuprese jsou faktory, které hematoonkologické pacienty řadí do zvláště ohrožené skupiny, v níž je aktivní surveillance naprosto klíčová.

### Klíčová slova

leukemie – enterobakterie – bakteriální léková rezistence – infekce spojené se zdravotní péčí

Studie byla podpořena „Research Support Foundation Vaduz – Comprehensive Study at the Issue of Oncological Diseases“ a IGA\_LF\_UP\_2016\_022.

This study was supported by „Research Support Foundation Vaduz – Comprehensive Study at the Issue of Oncological Diseases“ a IGA\_LF\_UP\_2016\_022.

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.



RNDr. Ondřej Holý, Ph.D.

Ústav preventivního lékařství  
LF UP v Olomouci  
Hněvotínská 3  
775 15 Olomouc  
e-mail: holy.ondrej@seznam.cz

Obdrženo/Submitted: 28. 11. 2017

Přijato/Accepted: 28. 5. 2018

doi: 10.14735/amko2018282

## Summary

**Background:** Acute leukemia (AL) is a heterogeneous group of malignant hematopoietic diseases and is divided into two basic types: acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL). Patients with these diseases are highly immunosuppressed and therefore at a high risk of serious infections. This study aimed to perform active surveillance of enterobacteria, which cause these infections, and to determine their antibiotic resistance in patients with AL who were hospitalized at the Hemato-Oncology Center of University Hospital Olomouc. **Materials and methods:** This study involved 49 patients with AL, of whom 37 had AML (16 women and 21 men) and 12 had ALL (6 women and 6 men). The mean age of the patients was 50.5 years. Samples of clinical material were obtained over 12 months (September 2015 to August 2016) and subjected to standard microbiological examinations. Bacterial strains were identified by MALDI-TOF MS, and their antibiotic susceptibility was established by microdilution method. **Results:** A total of 292 samples were obtained from patients with AL. Some of these samples were excluded from analysis to prevent the inclusion of identical strains from the same patient. Consequently, 146 clinical samples obtained from the following nine types of clinical materials were analyzed – throat swabs (n = 47), stools (n = 40), urine (n = 33), hemocultures (n = 11), buccal swabs (n = 5), perianal swabs (n = 4), wound swabs (n = 3), sputum (n = 2), and puncture fluid (n = 1). The most prevalent enterobacteria was *Escherichia coli* (n = 42), followed by *Klebsiella* spp. (n = 46), specifically *Klebsiella pneumoniae* (n = 34) and *Klebsiella oxytoca* (n = 12), and *Enterobacter cloacae* (n = 19). The most of enterobacteria were highly resistant to many tested antibiotics. **Conclusions:** Antibiotic-resistant enterobacteria colonize patients with hemato-oncological diseases and can cause serious infections. These antibiotic-resistant microorganisms are a serious and frequent problem. These findings together with the high level of immunosuppression mean that patients with hemato-oncological diseases are at a high risk of developing serious infections and consequently active surveillance is crucial.

## Keywords

leukemia – Enterobacteriaceae – antibacterial drug resistance – cross infections

## Východiska

Akutní leukemie (AL) je heterogenní skupina maligních hematologických onemocnění vyznačujících se různorodým klinickým a laboratorním nálezem. Hlavní charakteristikou tohoto onemocnění je přítomnost blastů v kostní dřeni – dle příslušnosti těchto nezralých buněk k myeloidní či lymfoidní linii se AL dělí na akutní myeloidní (AML) a akutní lymfoblastickou leukemii (ALL) [1,2].

V roce 2015 bylo v ČR celkem 8 547 pacientů s leukemickým onemocněním (zahrnuje diagnózy C91–C95, prevalence je 81/100 tisíc obyvatel), incidence byla 1 353 pacientů [3]. ALL tvoří pouze 20 % všech AL a jedná se o nejčastější nádorové onemocnění u dětí – objevuje se především mezi 2. a 5. rokem života a následně u dospělých starších 50 let [4,5]. Oproti tomu AML je nejčastější AL vůbec a její výskyt roste s věkem [2,6]. Prognóza je pro AML i ALL značně různorodá – odvíjí se od diagnózy, věku pacienta, přidružených onemocnění a dalších faktorů [5–7]; mezi mírami přežití mužů a žen nejsou výrazné rozdíly [8,9]. Za poslední dvě dekády zaznamenáváme zvyšování incidence i prevalence leukemických onemocnění, zároveň ale pozorujeme příznivý vývoj v přežívání pacientů i v mortalitě na leukemická onemocnění v Evropě – toho bylo dosaženo především díky pokro-

kům v moderní léčbě hematologických malignit [9,10].

Daní za vysokou účinnost této léčby je ale vysoký výskyt opakujících se akutních infekčních komplikací. Infekce u pacientů vznikají na podkladě vysoké imunodeprese dané dlouhodobou neutropenií a komplexní léčbou vyžadující časté hospitalizace (systémová chemoterapie, radioterapie, transplantace krvetvorných buněk). Často mají proměnlivý a velmi chudý klinický obraz vyznačující se pouze zvýšenou teplotou – tento stav je pak označován jako febrilní neutropenie nebo také horečka neznámého původu. Mají různorodou etiologii a navzdory všem stupňům jejich prevalence se tento problém zatím nedaří eliminovat [2,5,11–15].

Jedněmi z nejčastějších původců infekcí získaných právě na hematoonkologických klinikách jsou enterobakterie – to dokumentuje např. Kolář et al ve studii, která zahrnovala dvanáct českých a slovenských hematologických center, v nichž celých 60 % všech izolátů u pacientů s bakteriemi představovaly enterobakterie spolu s *Pseudomonas aeruginosa* [16]. Hematoonkologická oddělení jsou navíc typická svým výrazným selekčním tlakem na veškeré mikroorganismy vedoucím ke vzniku rezistence. Tyto rezistentní enterobakterie jsou celosvětově rozšířené a čím dál tím častěji se vyskytují ve zdravotnických za-

řízeních, kde vyvolávají outbreaky onemocnění mezi pacienty [17].

Cílem studie bylo sledovat u pacientů s ALM a ALL výskyt enterobakterií, které právě u těchto imunodeprimovaných jedinců mohou být příčinou vzniku závažných infekcí, jejich četnost a antibiotické rezistence.

## Materiál a metody

### Sběr vzorků

V rámci projektu Comprehensive study at the issue of oncological diseases, který probíhal na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Olomouci, byly pacientům s AML a ALL hospitalizovaným na Hemato-onkologické klinice (HOK) Fakultní nemocnice Olomouc odebírány vzorky klinického materiálu. Sběr vzorků začal v září v roce 2015 a byl ukončen v srpnu roku 2016. Všichni pacienti před zahájením odběrů vzorků podepsali informovaný souhlas. Odběr vzorků probíhal v pravidelných intervalech v závislosti na tom, jak se jednotliví pacienti dostavovali na HOK. V rámci pravidelného screeningu jim byly prováděny výtěry z krku a odebírány vzorky moči a stolice (formou rektálního výtěru), další klinický materiál byl odebírán v případě zhoršení zdravotního stavu v důsledku onemocnění. Vzorky byly následně zpracovány klasickými mikrobiologickými metodami, a to podle typu odebraného materiálu.

### Kultivace

Při kultivaci bylo využito standardních mikrobiologických metod. Klinický materiál byl vyočkován na pevné kultivační půdy, kultivace probíhala při zvýšené tenzi CO<sub>2</sub> při teplotě 35 ± 1 °C po dobu 18–24 hod. Hemokultury byly vloženy do hemokultivačního systému BACTEC a kultivace probíhala po dobu 5 dnů při teplotě 35 ± 1 °C. Vzorky krve s pozitivním nálezem byly vyočkovány na pevné půdy a opět kultivovány při teplotě 35 ± 1 °C po dobu 18–24 hod.

### Identifikace pomocí MALDI-TOF

Při nálezů signifikantního patogenu byla provedena identifikace kmene metodou MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) pomocí přístroje IVD MALDI biotyper. Příprava vzorků, samotná identifikace a analýza dat probíhala dle Sauer et al [18].

### Stanovení citlivosti enterobakterií k vybraným antibiotikům pomocí mikrodiluční metody

Stanovení kvantitativní citlivosti na antibiotika bylo provedeno mikrodiluční metodou pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (minimum inhibitory concentration – MIC). Bylo použito 18 antibiotik řaděných v mikrotitrační destičce dvojnásobnou geometrickou řadou – ampicilin, ampicilin/sulbaktam, cefuroxim, gentamycin, kotrimoxazol, kolistin, ofloxacin, aztreonam, piperacilin, piperacilin/tazobaktam, cefotaxim, ceftazidim, cefepim, meropenem, ciprofloxacin, tigecyklin, tobramycin a amikacin. Po naočkování byly destičky kultivovány 18–24 hod při teplotě 35 ± 1 °C, výsledky byly vyhodnoceny podle testovacích kritérií EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) 2016.

### Výsledky

#### Vyšetřovaný soubor

Rozdělení vyšetřovaného souboru dle věku, pohlaví a diagnózy ukazuje tab. 1 – jednalo se o celkem 49 pacientů, z toho 12 pacientů mělo diagnózu ALL (24,5 %; z toho 6 žen a 6 mužů), a 37 pacientů mělo diagnózu AML (75,5 %; z toho 16 žen a 21 mužů). Procentuální zastoupení AML

Tab. 1. Distribuce pacientů v souboru dle věku, diagnózy a pohlaví.

	ALL		AML	
	ženy AML	ženy ALL	muži AML	muži ALL
< 29 let	1	0	1	1
30–39 let	1	1	1	1
40–49 let	5	0	5	1
50–59 let	6	3	4	0
60–69 let	2	1	7	2
> 70 let	1	1	3	1

ALL – akutní lymfoidní leukemie, AML – akutní myeloidní leukemie

a ALL ve studovaném souboru kopíruje současný trend ve výskytu AL [1].

Průměrný věk pacientů byl 50,5 roku. Počet pacientů s AML se zvyšoval spolu s věkem, jak je pro toto onemocnění typické. Charakteristické zvýšení výskytu ALL ve dvou vlnách (v nízkém věku a ve věku nad 50 let) pozorováno nebylo, což je možné přisoudit nízkému počtu pacientů s ALL ve studii.

#### Výběr vzorků

Celkem bylo od 49 pacientů získáno 292 vzorků (průměrně 6 vzorků od 1 pacienta – nejvíce 22, nejméně 1). Nejčastěji to byly výtěry z krku (104x), stolice (90x), moč (53x), hemokultura (16x) a výtěr z dutiny ústní (12x), minoritně byly zastoupeny další klinické materiály – perianální stěr 7x, stěr z rány 5x, sputum 3x, punktát 1x a výtěr z nosu 1x.

Po vykonání všech analýz byly vzorky dále podrobeny selekci na základě několika kritérií, aby bylo zamezeno zahrnutí identických kmenů získaných od téhož pacienta. V potaz byly brány klinický materiál, popř. místo, z něž byl vzorek odebrán, časový faktor a celkové výsledky fenotypové citlivosti na antibiotika. Výsledkem selekce byl výběr 146 vzorků z 9 typů klinických materiálů (47x výtěr z krku, 40x stolice, 33x moč, 11x hemokultura, 5x výtěr z dutiny ústní, 4x perianální stěr, 3x stěr z rány, 2x sputum, 1x punktát).

#### Bakteriální nález

Nejvíce prevalujícími enterobakteriemi byly *Escherichia coli* (41x), *Klebsiella pneumoniae* (34x), *Enterobacter cloacae*

(19x) a *Klebsiella oxytoca* (12x), dále pak bylo identifikováno dalších 15 druhů enterobakterií (tab. 2).

*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* a *Klebsiella oxytoca* byly nejčastějšími nálezy u pacientů s AML i u pacientů s ALL. Také distribuce těchto původců dle pohlaví (bez ohledu na diagnózu) byla, co se pořadí týče, totožná. *Escherichia coli* byla dominující enterobakterií ve stěrech z dutiny ústní, hemokulturách, močích a punktátech; ve výtěrech z krku, stěrech z perianálu a ve stolici převládala *Klebsiella pneumoniae*.

#### Rezistence na antibiotika

Přehled rezistence na antibiotika udává tab. 3. U všech čtyř hlavních původců jsou pozorovány zvýšené míry rezistence na mnohá z testovaných antibiotik. Více než polovina izolátů *Escherichia coli* byla rezistentní na peniciliny (~ 57,3 %) a na aztreonam (55,6 %); zhruba třetina pak na cefalosporiny (~ 34,7 %), fluorochinolony (~ 40,3 %) a kotrimoxazol (31,7 %); také byly nalezeny dva izoláty rezistentní na karbapenemové antibiotikum meropenem. U izolátů *Klebsiella pneumoniae* byly pozorovány nejvyšší míry rezistence vůči penicilinům (~ 72,6 %), cefalosporinům (~ 65,4 %), fluorochinolonom (~ 55,9 %) a kotrimoxazolu (82,4 %) s aztreonamem (70 %); zhruba třetina izolátů byla odolná vůči aminoglykosidům (~ 37,8 %). Více než polovina izolátů *Enterobacter cloacae* byla rezistentní vůči penicilinům (~ 68,3 %) a cefalosporinům (~ 63,8 %), nižší míry rezistence byly vůči aminoglykosidům (~ 35,0 %)

Tab. 2. Enterobakterie izolované od pacientů s akutními leukemiemi.

Nález	zkratka	Celkem		AML × ALL	
		n (%)	AML – n (%)	ALL – n (%)	
<i>Escherichia coli</i>	ESCO	42 (28,8)	30 (28,7)	11 (28,9)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KLPN	34 (23,3)	23 (21,3)	11 (28,9)	
<i>Enterobacter cloacae</i>	ENCL	19 (13,0)	14 (13,0)	5 (13,2)	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	KLOX	12 (8,3)	9 (8,3)	3 (7,9)	
<i>Enterobacter asburiae</i>	ENAS	7 (4,8)	6 (5,6)	1 (2,6)	
<i>Escherichia hermannii</i>	ESHE	6 (4,1)	4 (3,7)	2 (5,3)	
<i>Morganella morganii</i>	MOMO	5 (3,4)	4 (3,7)	1 (2,6)	
<i>Citrobacter freundii</i>	CIFR	4 (2,7)	4 (3,7)	0 (0,0)	
<i>Hafnia alvei</i>	HAAL	3 (2,1)	1 (0,9)	2 (5,3)	
<i>Serratia marcescens</i>	SEMA	3 (2,1)	3 (2,8)	0 (0,0)	
<i>Enterobacter ludwigii</i>	ENLU	2 (1,4)	2 (1,9)	0 (0,0)	
<i>Proteus mirabilis</i>	PRMI	2 (1,4)	1 (0,9)	1 (2,6)	
<i>Citrobacter koseri</i>	CIKO	1 (0,7)	1 (0,9)	0 (0,0)	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ENAE	1 (0,7)	1 (0,9)	0 (0,0)	
<i>Pantoea agglomerans</i>	PAAG	1 (0,7)	1 (0,9)	0 (0,0)	
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	RAOR	1 (0,7)	1 (0,9)	0 (0,0)	
<i>Raoultella planticola</i>	RAPL	1 (0,7)	1 (0,9)	0 (0,0)	
<i>Salmonella enterica</i>	SALM ENT	1 (0,7)	0 (0,0)	1 (2,6)	
<i>Serratia liquefaciens</i>	SELI	1 (0,7)	1 (0,9)	0 (0,0)	
total		146 (100)	108 (100)	38 (100)	

AML – akutní myeloidní leukemie, ALL – akutní lymfoidní leukemie

a aztreonamu (47,4 %) s kotrimoxazolem (40,0 %). Izoláty *Klebsiella oxytoca* vykazovaly nejvyšší míru rezistence vůči penicilinům (~ 60,4 %) a cefalosporinům (~ 50 %), dále pak vůči kotrimoxazolu (58,3 %) a aztreonamu (50,0 %); zhruba třetina byla rezistentní vůči fluorochinolonom (~ 37,5 %) a čtvrtina vůči aminoglykosidům (~ 25,0 %). Nebyly nalezeny žádné izoláty *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* a *Klebsiella oxytoca* rezistentní na meropenem.

### Diskuze

Cílem studie bylo sledovat u pacientů s AML a ALL výskyt enterobakterií, které právě u těchto imunosuprimovaných jedinců mohou být příčinou vzniku závažných infekcí, jejich prevalenci a antibiotické rezistence.

Studie potvrdila vysoký stupeň kolonizace pacientů s AL rezistentními zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*. Nejčastějšími izoláty byly *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* a *Klebsiella oxytoca* – všechny tyto mikroorganismy jsou v současné literatuře popisovány jako problém se vzrůstajícím trendem a kvůli svým rezistencím i s vysokou závažností a limitovanými možnostmi řešení. Bakteriální rezistence mikroorganismů je globálním problémem a reálnou hrozbou pro

Tab. 3. Výsledky testování MIC.

	ESCO; n = 41		KLPN; n = 34		ENCL; n = 20		KLOX; n = 12	
	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)
cefalosporiny (CRX, CTX, CTZ, CPM)	34,7	65,3	65,4	34,6	63,8	36,2	50,0	50,0
aminoglykosidy (TOB, AMI, GEN)	11,4	88,6	37,8	62,2	35,0	65,0	25,0	75,0
peniciliny (AMP, AMS, PIP, PPT)	57,3	42,7	72,6	27,4	68,3	31,7	60,4	39,6
fluorochinolony (CIP, OFL)	40,3	59,7	55,9	44,1	15,0	85,0	37,5	62,5
monobaktamy (AZT)	55,6	44,4	70,0	30,0	47,4	52,6	50,0	50,0
glycylcykliny (TIG)	14,6	85,4	14,7	85,3	5,0	95,0	8,3	91,7
pyrimidiny (COT)	31,7	68,3	82,4	17,6	40,0	60,0	58,3	41,7
polypeptidy (COL)	4,9	95,1	2,9	97,1	5,0	95,0	8,3	91,7
karbapenemy (MER)	5,0	95,0	0,0	100	0,0	100	0,0	100

MIC – minimální inhibiční koncentrace, ESCO – *Escherichia coli*, KLPN – *Klebsiella pneumoniae*, ENCL – *Enterobacter cloacae*, KLOX – *Klebsiella oxytoca*, S – senzitivní, R – rezistentní, CRX – cefuroxim, CTX – cefotaxim, CTZ – ceftazidim, CPM – cefepim, TOB – tobramycin, AMI – amikacin, GEN – gentamycin, AMP – ampicilin, AMS – ampicilin/sulbaktam, PIP – piperacilin, PPT – piperacilin/tazobaktam, CIP – ciprofloxacin, OFL – ofloxacin, AZT – aztreonam, TIG – tigecyklin, COT – kotrimoxazol, COL – kolistin, MER – meropenem

medicínu i celé lidské společnosti. Existují různé mechanismy vzniku odolnosti vůči antibiotikům – mikroorganismy produkují enzymy inaktivující antibiotika, mění permeabilitu své bakteriální stěny a cytoplazmatické membrány, modifikují cílová místa antibiotik nebo využívají tzv. bakteriálního efluxu, kterým zvýšeně vylučují antibiotika z buňky. Tyto mechanismy se vyvíjejí především na základě selekčního tlaku, který se významně uplatňuje právě na hematologických klinikách, odkud je pak hlášen vysoký výskyt mikroorganismů odolných vůči mnohým antibiotikům i onemocnění jimi způsobených [18–22].

Kolonizace pacientů s AL rezistentními mikroorganismy je tedy významným rizikovým faktorem pro vznik následných infekcí spojených se zdravotní péčí. *Escherichia coli* je enterobakterie nejčastěji izolovaná od neutropenických pacientů a způsobuje nejrůznější typy infekcí, např. infekce krevního řečiště, urogenitálního traktu nebo ran, sepse, pneumonie aj. [23–27]. Rod *Klebsiella* spp. je původcem cca 8 % všech infekcí získaných během hospitalizace v USA a v Evropě, zástupci klebsiel také patří mezi hlavní patogeny spojené se zdravotní péčí u imunosuprimovaných jedinců [28,29]. *Klebsiella pneumoniae* způsobuje infekce močového traktu, pneumonie, intraabdominální infekce, bakteriémie, infekce ran apod. u dospělých i dětských pacientů [30–32]; oproti tomu *Klebsiella oxytoca* je častým původcem bakteriémie u novorozenců [33]. *Enterobacter cloacae* je oportunní patogen s ubikvitárním výskytem, způsobuje např. bakteriémie, infekce dolních cest dýchacích, močového traktu, kůže a měkkých tkání či endokarditidy. Je možný přenos krevními deriváty a různými druhy zdravotnických pomůcek a přístrojů, např. stetoskopy, endoskopy nebo zařízeními pro měření intraarteriálního krevního tlaku [34]. Asociace mezi kolonizací a následnou infekcí není výsadní pouze pro enterobakterie – byla prokázána i u řady dalších původců, např. u enterokoků rezistentních k vankomycinu (VRE), *Pseudomonas aeruginosa* nebo *Stenotrophomonas maltophilia* [35].

Právě infekce jsou nejdůležitější preventabilní příčiny úmrtí hematookolo-

gických pacientů. Jejich riziko a závažnost se odvíjejí od stupně a délky trvání neutropenie [11,36]. Udává se, že riziko úmrtí na infekční komplikace leukemie nebo její léčby je 1–2 % u pacienta před dosažením remise a 2 % u pacienta v remisi [5]. Infekce jsou také primárními příčinami úmrtí u pacientů po transplantaci krvetvorných buněk, a to u 8 % pacientů po autologní transplantaci a u 17–20 % pacientů po alogenní transplantaci [37]. V posledních letech převažují mezi hematookologickými pacienty infekce způsobené multirezistentními gramnegativními původci [21,38], z nichž dominantními (65–80 %) jsou právě zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* [19]. Infekty jsou jak endogenní (způsobené střevní i mimostřevní mikroflórou), tak exogenní. Kolonizace představuje riziko nejen pro daného pacienta, ale také pro další hospitalizované v rámci stejného centra, kteří osídlení těmito mikroorganismy nejsou – k přenosu může dojít v případě zanedbání hygieny nebo neúčinné prevence. Dalším významným zdrojem těchto mikroorganismů může být zdravotnický personál, přenos se může uskutečnit během poskytování jakékoli zdravotní péče [14,39].

Nejzávažnějšími infekty jsou pro pacienty na hematookologiích infekce krevního řečiště, které postihují 11–38 % z nich a jejichž letalita je až 40 %. Dlouhodobě je jejich nejčastějším původcem *Escherichia coli* – způsobí až třetinu infekcí krevního řečiště, často je rezistentní na několik druhů antibiotik a obvykle je nutná léčba karbapenemy [38,40]. V této studii byla *Escherichia coli* nejvíce prevalentní enterobakterií v hemokulturách (45 %), jeden z izolátů byl navíc rezistentní k meropenemu a dalším 12 z testovaných antibiotik, citlivý byl pouze ke kotrimoxazolu, kolistinu, ciprofloxacinu a aminoglykosidům amikacinu a tobramycinu. Právě léčbu infekcí krevního řečiště aminoglykosidy (především amikacinem) doporučuje ke zvážení studie Ma et al jako možnost, jak omezit šířící se rezistenci vůči karbapenemům, širokospektrým a značně odolným rezervním antibiotikům, která se užívají jako poslední možnost léčby závažných a život ohrožujících infekcí [40].

Vznik rezistence je spojen nejen s terapeutickým, ale také s profylaktickým uží-

váním antibiotik, což je pro pacienty s AL typické. Běžnou praxí je užívání fluorochinolonů, ačkoliv proti těmto antibiotikům je v dnešní době rezistentních 35–85 % izolátů *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae* od neutropenických pacientů [21]. Podobné výsledky byly pozorovány i v tomto případě, kdy bylo rezistentních 40 % izolátů *Escherichia coli* a 56 % izolátů *Klebsiella pneumoniae*. Je dokumentováno, že třetina pacientů s touto profylaxí má střeva kolonizována mikroorganismy rezistentními vůči fluorochinolonům (nejen z čeledi *Enterobacteriaceae*), což opět představuje riziko vzniku infektu. Na druhou stranu zastavení profylaktického užívání fluorochinolonů pro zabránění zvyšující se rezistence enterobakterií je zatíženo zvýšenou mortalitou hematookologických pacientů v důsledku sepse [21,41].

V rámci této problematiky je na místě zavedení a management efektivních preventivních opatření proti přenosu rezistentních mikroorganismů, a to nejen u čeledi *Enterobacteriaceae*. Studie ukázaly, že nejefektivnější z těchto opatření je důsledná hygiena rukou vodou, mýdlem a dezinfekčními prostředky na alkoholové bázi. Je nutná dezinfekce povrchů, podlah a objektů podle nastavených klinických doporučených postupů. Další možností je umístění pacientů po transplantaci na izolační pokoje s přetlakem vyznačující se vysokým stupněm čistoty a monitoringem prostředí. V těchto místnostech je výskyt patogenních i podmíněně patogenních mikroorganismů minimální a pacient zde setrvává v době, kdy je u něj kvůli prodloužené neutropenii nejvyšší riziko vzniku infekce [11,35–37,42–44].

Je zapotřebí dobře zvažovat profylaktické i terapeutické podání antibiotik, které musí být racionální a individuální, co se týče druhu léčiva, jeho dávkování i délky užívání. Před samotným podáním je nutné provedení relevantní mikrobiologické diagnostiky, která lékaře nasměruje k výběru vhodného antibiotika. Kromě toho je zapotřebí zvažovat celkový stav pacienta – posoudit hloubku neutropenie, protinádorovou léčbu a její specifický dopad na infekci, předchozí infekční komplikace, již užitou antibakteriální profylaxi, základní stav one-

mocnění, komorbidit a další faktory. Konzultace a spolupráce s mikrobiologem je v případě rezistentních bakterií nezbytná [45].

Dále je nutná aktivní surveillance nastavená pro detekci kolonizace asymptomatických pacientů rezistentními kmeny – např. Ariza-Heredia et al uvádí, že zavedením kontrolních rektálních výtěrů v týdenních intervalech bylo významně omezeno klonální šíření vancomycin-rezistentních enterokoků [42]. Surveillance také přispívá k dobré znalosti lokální epidemiologické situace, umožňuje pozorovat její trendy a přizpůsobovat tomu preventivní i léčebná opatření užívaná v rámci daného pracoviště. Mezi další kroky patří zavedení dekolonizačních procesů u pacientů a popř. i u personálu [21] a zásady bariérové ošetrovatelské péče zahrnující užívání ochranných oděvů a pomůcek, jednorázových materiálů nebo individualizaci pomůcek [46]. Samozřejmě musí být dodržováni preventivní opatření nejen personálem, ale také pacienty samotnými a všemi osobami, které dané oddělení navštíví.

## Závěr

Studie prokázala výskyt rezistentních enterokoků mezi pacienty s AL na Hemato-onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. Nejvyšší prevalence byla pozorována u *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* a *Klebsiella oxytoca* – všechny tyto enterobakterie jsou diskutovány v odborné literatuře jako velice častí původci infekcí u všech hematoonkologických pacientů. U všech také byly pozorovány vysoké míry rezistence na mnohá z testovaných antibiotik.

Tato problematika je aktuální a významný problém moderní medicíny. Skutečnosti vycházející z této i mnohých dalších podobných studií probíhající ve světě jen podtrhují důležitost aktivní surveillance a zavedení komplexních preventivních opatření, které zabrání dalšímu přenosu těchto původců a sníží riziko infekce i předčasného úmrtí pacienta. Rezistence mikroorganismů jako taková je pak globálním problémem vyžadujícím řešení, aby lidstvo zabránilo tomu, že tak cenná léčiva, jako

jsou antibiotika, přestanou být zcela účinná. Je ale nutné si uvědomit, že rezistence mikroorganismů je velkou daní, kterou moderní medicína platí za svou stále se zvyšující úroveň a prodloužení délky života mnohých pacientů.

## Literatura

- Bulíková A. Akutní leukemie. In: Penka M, Tesařová E (eds). Hematologie a transfúzní lékařství I. Hematologie. Praha: Grada 2011: 291–314.
- Šálek C. Diagnostika a léčba akutních leukemií. Intern Med 2012; 14(10): 366–372.
- Novotvary 2015. Úřad zdravotnických informací a statistiky České republiky. [online]. Dostupné na: www: http://www.uzis.cz/publikace/novotvary-2015.
- Folber F, Hrabovský Š, Doubek M. Akutní lymfoblastická leukemie dospělých. Onkologie 2015; 9(3): 125–127.
- Starý J. Akutní leukémie u dětí. Onkologie 2010; 4(2): 120–124.
- Karas M. Akutní myeloidní leukémie u nemocných nad 60 let, možnosti její léčby a potenciální role alogenní transplantace krvetvorných buněk. Onkologie 2011; 5(2): 91–95.
- Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2008; 371(9617): 1030–1043. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60457-2.
- Lo-Coco F, Fouad TM, Ramadan SM. Acute leukaemia in women. Womens Health 2010; 6(2): 239–249. doi: 10.2217/whe.10.4.
- Bertuccio P, Bosetti C, Malvezzi M et al. Trends in mortality from leukaemia in Europe: An update to 2009 and projection to 2012. Int J Cancer 2013; 132(2): 427–436. doi: 10.1002/ijc.27624.
- Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P et al. European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias. Ann Oncol 2016; 27(4): 725–731.
- Bodey GP. Managing Infections in the Immunocompromised Patient. Clin Infect Dis 2005; 40 (Suppl 4): S239. doi: 10.1086/427328.
- Cetkovský P. Horečka neznámého původu u granulocytopenických nemocných (tzv. febrilní neutropenie). Klin Farmakol Farm 2007; 21(2): 67–73.
- Cohen J. Infection in the immunocompromised host. In: Warrel DA, Cox TM, Firth JD (eds). Oxford Textbook of Medicine [monograph on the internet]. Oxford: Oxford University Press; 2012. Available from: http://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199204854.001.1/med-9780199204854-chapter-070204.
- Cooper JD, Kethireddy S, Kumar A. Infections in the Immunosuppressed and Immunocompromised Patient. ICU Management 2015; 15(3).
- Matoušková I, Holý O. Bakteriální kontaminace vnitřního vzduchu transplantační jednotky. Epidemiol Mikrobiol Imunol 2013; 62(4): 153–159.
- Kolář M, Htoutou-Sedláková M, Hanulík V. Multirezistentní gramnegativní bakterie i hematoonkologicky nemocných. Postgrad Med 2012; 14(5): 6–10.
- Holý O, Matoušková I, Raida L. Výskyt gramnegativních bakterií v prostředí transplantační jednotky Hemato-onkologické kliniky Olomouc. Epidemiol Mikrobiol Imunol 2012; 61(4): 103–109.
- Sauer S, Friewald A, Maier T et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. PLoS One 2008; 3(7): e2843. doi: 10.1371/journal.pone.0002843.
- Abdollahi A, Hakimi F, Doomanlou M et al. Microbial and antibiotic susceptibility profile among clinical samples of patients with acute leukemia. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res 2016; 10(2): 61–69.

- Hrabák J, Chudáčková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. Clin Microbiol Rev 2013; 26 (1): 103–114. doi: 10.1128/CMR.00058-12.
- Ruhnke M, Arnold R, Gastmeier P. Infection control issues in patients with haematological malignancies in the era of multidrug-resistant bacteria. Lancet Oncol 2014; 15(13): e606–e619. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70344-4.
- Kolář M, Urbánek K, Hanulík V et al. Vliv antibiotické léčby na vývoj bakteriální rezistence. Klin Farmakol Farm 2011; 24(4): 181–183.
- Peleg AY, Hooper DC. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-negative Bacteria. N Engl J Med 2010; 362(19): 1804–1813. doi: 10.1056/NEJMra0904124.
- Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies. Asian Pac J Trop Biomed 2015; 5(7): 509–514. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.05.001.
- Madappa T. Escherichia coli (E coli) infections. [online]. Available from: https://emedicine.medscape.com/article/217485-overview.
- Taj M, Farzana T, Shah T et al. Clinical and microbiological profile of pathogens in febrile neutropenia in hematological malignancies: a single center prospective analysis. J Oncol 2015; 2015: 596504. doi: 10.1155/2015/596504.
- Chen CY, Tsay W, Tang JL et al. Epidemiology of bloodstream infections in patients with hematological malignancies with and without neutropenia. Epidemiol Infect 2010; 138(7): 1044–1051. doi: 10.1017/S0950268809991208.
- Hansen DS, Hazel MA, Abiola T et al. Recommended test panel for differentiation of klebsiella species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. J Clin Microbiol 2004; 42(8): 3665–3669. doi: 10.1128/JCM.42.8.3665-3669.2004.
- Chou HC, Lee CZ, Li-chun MA et al. Isolation of a chromosomal region of klebsiella pneumoniae associated with allantoin metabolism and liver infection. Infect Immun 2004; 72(7): 3783–3792. doi: 10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004.
- Házdíček S, Čustović A, Smajlović J et al. Distribution of nosocomial infections caused by Klebsiella pneumoniae ESBL strain. J Environ Occup Sci 2012; 1(3): 141–146. doi: 10.5455/jeos.20121205084327.
- Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998; 11(4): 589–603.
- Marra AR, Wey SB, Castelo A et al. Nosocomial bloodstream infections caused by Klebsiella pneumoniae: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. BMC Inf Dis 2006; 6: 24. doi: 10.1186/1471-2334-6-24.
- Qutreshi S. Klebsiella Infections. [online]. Available from: https://emedicine.medscape.com/article/219907-overview.
- Fraser S. Enterobacter Infections. [online]. Available from: https://emedicine.medscape.com/article/216845-overview.
- Gustinetti G, Mikulska M. Bloodstream infections in neutropenic cancer patients: A practical update. Virulence 2016; 7(3): 280–297. doi: 10.1080/21505594.2016.1156821.
- Ram R, Farbman L, Leibovici L et al. Characteristics of initial compared with subsequent bacterial infections among hospitalised haemato-oncological patients. Int J Antimicrob Agents 2012; 40(2): 123–126. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.05.001.
- Tomblyn M, Chiller T, Einsele H et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective

- recommendations. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15(10): 1143–1238. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.06.019.
38. Trecarichi EM, Pagano L, Candoni A et al. Current epidemiology and antimicrobial resistance data for bacterial bloodstream infections in patients with hematologic malignancies: an Italian multicentre prospective study. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(4): 337–343. doi: 10.1016/j.cmi.2014.11.022.
39. Matoušková I, Holý O. Monitoring of the environment at the transplant unit – hemato-oncology clinic. *Int J Environ Res Publ Health* 2014; 11(9): 9480–9490. doi: 10.3390/ijerph110909480.
40. Ma J, Ning LI, Liu YY et al. Antimicrobial resistance patterns, clinical features, and risk factors for septic shock and death of nosocomial *E. coli* bacteremia in adult patients with hematological disease: a monocenter retrospective study in China. *Medicine* 2017; 96(21): e6959. doi: 10.1097/MD.00000000000006959.
41. Bow EJ. Fluoroquinolones, antimicrobial resistance and neutropenic cancer patients. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24(6): 545–553. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834cf054.
42. Ariza-Heredia EJ, Chemaly RF. Infection control practices in patients with hematological malignancies and multidrug resistant organisms: special considerations and challenges. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014; 14 (Suppl): S104–S110. doi: 10.1016/j.clml.2014.06.021.
43. Holý O, Matoušková I. The importance of cleanrooms for the treatment of haemato-oncological patients. *Wspolczesna Onkol* 2012; 16(3): 266–272. doi: 10.5114/wo.2012.29298.
44. Matoušková I, Raida L, Holý O. Výskyt gramnegativních nefermentujících bakterií v prostředí transplantační jednotky Hemato-onkologické kliniky FN Olomouc. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2012; 61(4): 110–115.
45. Doubek M, Mayer J (eds). Postupy diagnostiky a léčby leukemií a jejich infekčních komplikací u dospělých pacientů: doporučení České leukemické skupiny – pro život (CELL) [monografie na internetu]. Česká leukemická skupina – pro život; 2013. Dostupné na: [http://www.hematology.cz/doporučení/klinika-files/guidelines\\_cell\\_2013.pdf](http://www.hematology.cz/doporučení/klinika-files/guidelines_cell_2013.pdf).
46. Kapounová G. Ošetřovatelství v intenzivní péči. Praha: Grada Publishing 2007.



# Malígne melanómy kože vyrastajúce na nohe

## Malignant Melanomas of the Skin Arising on the Feet

Bartoš V.<sup>1</sup>, Kullová M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Oddelenie patologickej anatómie FNŠP Žilina

<sup>2</sup> Dermatovenerologický stacionár FNŠP Žilina

### Súhrn

**Východiská:** U ľudí svetlej pleti sú dolné končatiny veľmi častým miestom vzniku melanómu, ale na nohe sa vyskytuje len zriedkavo. Na druhej strane u tmavej rasy je noha jednou z najčastejšie postihnutých častí tela. Autori v práci sledovali výskyt a klinicko-patologické nálezy melanómov kože lokalizovaných na nohe, ktoré boli biopticky diagnostikované počas 11-ročného obdobia. **Materiál a metódika:** Celkový súbor pozostával z 217 primárnych melanómov získaných od 210 pacientov. **Výsledky:** V sledovanej kohorte bolo registrovaných 8 prípadov (3,7 %) melanómov vyrastajúcich na nohe. Všetky predstavovali invazívne rastúcu formu malignity. Získané boli od 8 pacientov (5 žien, 3 mužov) vo vekovom rozpätí 56–85 rokov (priemerný vek 72 rokov). Prevažne išlo o lézie väčších rozmerov (priemerný rozmer 3,5 cm) s vysokým Breslowým indexom (priemerná hodnota 5,6 mm). Všetky boli ulcerované a viaceré invadovali hlboko do podkožia. Histologicky mali tri nádory črty akrálneho lentiginózneho melanómu, dva vzhľad nodulárneho melanómu a jeden vzhľad povrchovo sa šíriaceho melanómu. V dvoch prípadoch ich nebolo možné histologicky typizovať. **Záver:** Hoci u nášho etnika nie sú melanómy kože na nohe časté, väčšinou sú biopticky diagnostikované už v pokročilom štádiu. Klinicky môžu spočiatku pripomínať iné chorobné jednotky. Pri lekárskejších vyšetreniach by sa preto nemalo zabúdať ani na túto lokalitu a najmä pri nehojajúcich sa defektoch či ložiskových pigmentových zmenách na stupaji a prstoch myslieť aj na možnú diagnózu melanómu.

### Kľúčové slová

malígnny melanóm – anatomická distribúcia – noha

### Summary

**Background:** Cutaneous melanoma frequently develops on the lower limbs, but rarely on the feet, in people with light skin. By contrast, the feet are one of the most frequently affected sites in people with dark skin. This study assessed the prevalence and clinico-pathological findings of biopsy-proven skin melanomas that were diagnosed over 11 years. **Materials and methods:** The study group comprised 217 primary melanomas from 210 patients. **Results:** Eight (3.7%) melanomas were located on the feet. These were all invasive and obtained from 8 patients (5 females and 3 males) aged 56–85 years (mean age 72 years). In general, the lesions were large (mean diameter 3.5 cm) and had a high Breslow index (mean thickness 5.6 mm). They were all ulcerated, and some invaded deep into the subcutaneous tissue. Histologic analyses demonstrated that three tumors exhibited features of acral lentiginous melanoma, two were nodular melanomas, and one was a superficial spreading melanoma. Two cases could not be histologically classified. **Conclusion:** Although skin melanomas arising on the feet are relatively rare in our ethnicity, they are usually bioptically diagnosed at an advanced stage. Such melanomas may initially imitate other pathologic entities. Therefore, this location should not be overlooked during the medical workup, and melanoma should be suspected when patients present with non-healing defects or local pigmented changes on the soles of the feet or toes.

### Key words

malignant melanoma – anatomic distribution – foot

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. PhDr. Bartoš Vladimír, PhD.  
Oddelenie patologickej anatómie  
FNŠP Žilina  
Vojtecha Spanyola 43  
012 07 Žilina  
e-mail: vladim.bartos@gmail.com

Obdrženo/Submitted: 9. 2. 2018

Přijato/Accepted: 16. 5. 2018

doi: 10.14735/amko2018289

## Úvod

Malígný melanóm (ďalej len melanóm) patrí u ľudí k prognosticky najnepriaznivejším zhubným neopláziám [1]. Prevažnú väčšinu (> 96 %) prípadov predstavujú kožné lézie [2]. V súčasnosti nie je chápaný ako jedno onkologické ochorenie, ale ako skupina morfológicky podobných nádorov, ktoré sa líšia nielen svojou histológiou, charakterom a dynamikou rastu, ale aj molekulovými zmenami a signálnymi dráhami zahrnutými v patogenéze [1]. V jeho etiológii zohráva kľúčovú úlohu najmä intenzívna, prevažne intermitentná expozícia ultrafialovému žiareniu, v dôsledku čoho vzniká zvyčajne na tých častiach tela, ktoré sú

prechodne vystavené slnku [3,4]. Anatomická distribúcia melanómu kože sa však významne odlišuje v závislosti od veku, pohlavia a rasy. V kaukazskej populácii je u mužov najčastejšie postihnutý trup a u žien končatiny [3–5]. Hoci sú u ľudí svetlej pleti dolné končatiny veľmi častým miestom vzniku melanómu, postihnutie nohy (chápanej anatomicky ako časť dolnej končatiny distálne od členkov) je len zriedkavé. Na druhej strane u tmavej rasy, najmä u černochoch, ide o jednu z najčastejšie postihnutých častí tela [6–9]. Predpokladá sa [7], že etiopatogenéza melanómov kože vznikajúcich na nohe sa odlišuje od melanómov vznikajúcich na iných častiach tela. Hodno-

tenie incidencie ochorenia je však obťažne, nakoľko prevažná väčšina štúdií reportuje ich výskyt na dolnej končatine ako celku, bez bližšej topografickej špecifikácie. V predkladanej práci sme sledovali výskyt a základné klinicko-patologické nálezy u pacientov s melanómami kože lokalizovanými na nohe.

## Materiál a metodika

Súčasťou retrospektívnej štúdie boli všetky prípady primárnych melanómov kože (vrátane *in situ* foriem), ktoré boli biopticky diagnostikované na oddelení patologickej anatomie FNsP Žilina v období od 1. 1. 2007 do 31. 12. 2017. Vylúčené boli lokálne recidívy, ako aj melanómy sliznice. Celkový súbory pozostával z 217 primárnych melanómov (31 *in situ*, 186 invazívnych foriem) získaných od 210 pacientov (110 mužov, 100 žien) vo vekovom rozpätí 22–93 rokov. Lézie boli odstránené na rôznych klinických pracoviskách nemocnice. Bioptický materiál bol po predchádzajúcej fixácii v 10 % formalíne spracovávaný podľa konvenčných histologických postupov vo forme parafínových bločkov. Klinické údaje o pacientoch boli získavané zo sprievodného listu k zásielke bioptického materiálu alebo dostupnej elektronickej zdravotnej dokumentácie.

## Výsledky

Z celkového počtu 217 histologicky verifikovaných melanómov kože sme registrovali 32 lézií vyrastajúcich na dolnej končatine, z ktorých 8 prípadov bolo lokalizovaných na nohe. Noha ako anatomická časť tela zahrňovala 3,7 % všetkých diagnostikovaných melanómov.

Uvedených 8 nádorov pochádzalo od 8 pacientov (5 žien, 3 mužov) vo veku rozpätí 56–85 rokov (priemerný vek 72 rokov). Okrem jedného prípadu probatórnej biopsie boli všetky ostatné odstránené totálnou chirurgickou excíziou (v jednom prípade s pozitívnymi resekcijnými okrajmi a následnou reexcíziou) alebo amputáciou časti nohy. Všetky predstavovali invazívne rastúcu formu malignity. Išlo prevažne o lézie väčších rozmerov (priemerný horizontálny rozmer 3,5 cm) s vysokým Breslowým indexom (priemerná hodnota 5,6 mm). Všetky boli ulcerované a viaceré invado-

**Tab. 1. Prehľad základných klinických parametrov a histologických typov melanómu u jednotlivých pacientov.**

	Pohlavie	Vek	Lokalizácia	Histologický typ
č. 1	žena	73	päta ľavej nohy	ALM
č. 2	žena	63	palec ľavej nohy	NM
č. 3	žena	84	planta pravej nohy	SSM
č. 4	žena	65	ľavá noha bez bližšej špecifikácie	ALM
č. 5	muž	56	priehlavok a prsty ľavej nohy	nemožné typizovať
č. 6	muž	74	palec ľavej nohy	nemožné typizovať
č. 7	muž	85	päta ľavej nohy	ALM
č. 8	žena	76	dorzum ľavej nohy	NM

ALM – akralný lentiginózný melanóm, NM – nodulárny melanóm, SSM – povrchovo sa šíriaci melanóm

**Tab. 2. Prehľad vybraných histopatologických parametrov melanómu u jednotlivých pacientov. Pri melanóme diagnostikovaného z probatórnej biopsie (prípád č. 7) sa k niektorým nálezom nie je možné vyjadriť.**

	Rozmer lézie (cm)	Breslow (mm)	Clark	Ulcerácia	Mitózy (mm <sup>2</sup> )	pT štádium
č. 1	2,0 × 1,5	2,1	IV	áno	5/1	pT3b
č. 2	3,2 × 2,3	5,0	V	áno	8/1	pT4b
č. 3	2,8 × 2,5	5,4	IV	áno	30/1	pT4b
č. 4	1,1 × 1,0	0,8	IV	áno	1/1	pT1b
č. 5	8 × 4	15	V	áno	25/1	pT4b
č. 6	4 × 3	3,5	V	áno	20/1	pT4b
č. 7	4 × 4	?	?	áno	15/1	?
č. 8	3 × 2,5	7,5	V	áno	10/1	pT4b

vali hlboko do podkožia. Najväčší melanóm bol diagnostikovaný u 56-ročného muža na priehlavku a prstoch ľavej nohy. Rástol 3 roky, dosahoval rozmer 8 cm, hrúbku 1,5 cm a zasahoval až po kosť. Pacient zomrel na generalizáciu ochorenia 11 mesiacov po stanovení diagnózy.

Keďže väčšinou išlo o pokročilé melanómy s hlbokou infiltráciou dermy a podkožia, ich exaktná histologická typizácia bola obtiažna a v dvoch prípadoch nemožná. Tri nádory mali črty akrálného lentiginózneho melanómu (ALM), dva vzhľad nodulárneho melanómu (NM) a jeden vzhľad povrchovo sa šíriaceho melanómu (SSM). Podrobnejšie údaje o lokalizácii a histomorfologických parametroch jednotlivých nádorov sú v tab. 1 a 2. Ilustračne dopĺňujeme fotografiu melanómu na stupaji nohy u staršej ženy (obr. 1), ktorá bola počas sledovaného obdobia vyšetrená na dermatovenerologickom oddelení FNsP Žilina. Nakoľko jeho bioptická verifikácia a ďalšie klinické vyšetrenia boli realizované na iných pracoviskách, pacientka nie je súčasťou prezentovaného súboru.

### Diskusia

Výskyt melanómov kože vyrastajúcich na nohe sa veľmi líši v závislosti od jednotlivých štúdií, čo súvisí predovšetkým s rasovým etnikom v danej krajine. Ako už bolo spomenuté, keďže väčšina publikovaných prác uvádza prevalenciu melanómov na dolnej končatine súhrne,



Obr. 1. Malígny melanóm na stupaji nohy u staršej ženy. Snímok z archívu Dermatovenerologického oddelenia FNsP v Žiline.

neumožňuje to stanovenie ich výskytu na nohe. V našom príspevku sme sumarizovali výsledky niekoľkých publikácií, ktoré konkrétne definujú počet, resp. percentuálne zastúpenie melanómov kože lokalizovaných na nohe. Spolu s výsledkami nášho vlastného súboru sú prezentované v tab. 3 [3–12], z ktorej sú zjavné markantné rozdiely medzi jednotlivými svetovými regiónmi. U európeidnej rasy nepresahuje toto zastúpenie 5 %, čomu zodpovedajú aj naše

pozorovania. Práce z regiónov s tmavším etnikom demonštrujú omnoho vyšší výskyt ochorenia. V krajinách Ázie (Japonsko, Južná Kórea, Saudská Arábia) je toto zastúpenie  $\geq 40\%$  [6–8] a v Afrike (Nigéria) takmer 80 % [9]. U tmavej rasy v tejto lokalite dominuje najmä výskyt ALM, ktorý má určité špecifické klinické a patologické črty [13]. Ako vyplýva z názvu, najčastejšie vzniká na chodidlách nôh a dlaniach rúk, prípadne pod nechtami. V kontraste s ostatnými typmi jeho pa-

Tab. 3. Percentuálne zastúpenie melanómov lokalizovaných na nohe v štúdiách z rôznych krajín [3–12].

Krajina	Obdobie štúdie	Melanómy celkový počet	Melanómyna nohe (%)	Literatúra
Austrália	1987	1 272	1,6	[10]
Švajčiarsko	1995–2002	1 658	3,5	[3]
Slovensko (Žilina)	2007–2017	217	3,7	naša štúdia
Kanada (Britská Kolumbia)	1991–1992	719	2,5	[4]
Anglicko (Buckinghamshire)	2003–2005	214	5	[5]
Čile	1992–2001	575	16,9	[12]
Japonsko	1983–1985	794	39,4	[8]
Saudská Arábia (Jeddah)	1995–2011	16	43,7	[6]
Južná Kórea	2000–2015	113	46	[7]
Jamajka	1958–2007	220	51,3	[11]
Nigéria	1991–2000	54	79,6	[9]

**Tab. 4. Päť chorobných znakov na nohe (CUBED), ktorých prítomnosť by mala vzbudzovať podozrenie na zhubné nádorové ochorenie [17].**

C (coloured)	pigmentovaná lézia, ktorá nemá farbu kože
U (uncertain diagnosis)	akákoľvek lézia bez jednoznačne stanovenej diagnózy
B (bleeding)	krvácajúca lézia na nohe alebo pod nechtami
E (enlargement)	zväčšovanie lézie alebo ulkusu napriek liečbe
D (delay)	oneskorené hojenie lézie trvajúce dlhšie ako 2 mesiace

togenéza pravdepodobne nemá súvis so solárnou expozíciou [13]. Je zriedkavý u kaukazskej populácie, ale veľmi častý u černoškého a ázijského etnika. U ľudí svetlej pleti predstavuje < 3 % všetkých melanómov, ale u ľudí tmavej pleti až 29–72 % [13].

Je diskutabilné, či sa melanómy vyrastajúce na nohe a priori líšia svojim klinickým priebehom a prognózou. Niektorí autori [14] potvrdili, že noha je nezávislý negatívny prognostický faktor so signifikantne kratším prežívaním pacientov. Aj Walsh et al [15] zistili, že pacienti s melanómami na nohe a členkoch mali kratšie 5-ročné prežívanie v porovnaní s ostatnými časťami dolnej končatiny. Na druhej strane Nam et al [7] nepotvrdili rozdiely v prežívaní medzi pacientami s melanómami na nohe a na ostatných častiach tela, ani odlišnosti v ďalších klinicko-patologických parametroch. Jediný rozdiel bol v zastúpení ALM, ktorý sa na nohe vyskytoval omnoho častejšie. V našom súbore išlo väčšinou o nádory diagnostikované v pokročilom štádiu, na základe čoho možno očakávať skôr nepriaznivejšiu prognózu. Keďže sme však u viacerých pacientov nemali dostupné adekvátne údaje o ich ďalšom klinickom priebehu, k prípadným prognostickým rozdielom sa nemôžeme spoľahlivo vyjadriť.

Z praktického hľadiska je potrebné spomenúť, že oneskorenie diagnostiky ochorenia je zapríčinené viacerými faktormi. Vo veľkej miere sa na ňom podieľajú samotní pacienti dlhodobým ignorovaním klinických príznakov. Okrem toho recentná štúdia poukázala [16], že

až tretina všetkých prípadov býva spočiatku aj klinicky považovaná za inú chorobnú jednotku, napr. chronický diabetický ulkus, lokálne traumatické či ischemické zmeny. V tomto smere je pre dermatológa noha problematickou lokalitou. Dermatoskopická diagnostika ložiskových prejavov na stupajách (aj dlaniach) je odlišná od prejavov na iných častiach tela. Niektoré melanómy môžu byť amelanotické, čo ešte viac komplikuje situáciu. V prípade, že nádor postihuje necht, je diagnostika obtiažna najmä na začiatku, kedy pripadajú do úvahy skôr iné entity, ako sú névy, subunguálny hematóm, mykóza, či pigmentácie spôsobené liekmi. Navyše len malý počet dermatológov vie spraviť z nechta probatórnu excíziu. Nedávno bola navrhnutá [17] klinická pomôcka označená anglickým akronymom CUBED, ktorý na nohe definuje päť samostatných chorobných znakov (tab. 4). Ich prítomnosť by mala vždy vzbudiť podozrenie na zhubné nádorové ochorenie a indikovať ďalšie potrebné vyšetrenia.

### Záver

Hoci sú melanómy kože vyrastajúce na nohe u ľudí svetlej pleti pomerne zriedkavé, väčšinou sa biopticky diagnostikujú už v pokročilom štádiu. Klinicky môžu spočiatku pripomínať iné patologické jednotky. Pri lekárskejších vyšetreniach by sa preto nemalo zabúdať ani na túto lokalitu a najmä pri nehojaciach sa defektoch či ložiskových pigmentových zmenách na stupajach a prstoch myslieť aj na možnú diagnózu melanómu.

### Podakovanie

Autori ďakujú všetkým lekárom z oddelenia patologickej anatómie (MUDr. Olge Zacharovej, MUDr. Dušanu Pokornému, MUDr. Janě Dobosovej) a klinických pracovníkov FNŠP Žilina, ktorí sa podieľali na diagnosticko-terapeutickom procese prezentovaných pacientov.

### Literatúra

- Ryška A, Horký O, Berkovcová J et al. Maligní melanóm – od klasické histologie k molekulárné genetikému testovaniu. *Klin Onkol* 2017; 30(3): 182–189. doi: 10.14735/amko2017182.
- Jurga L, Dienerová M, Haruštiaková M et al. Atypická primárna lokalizácia a priebeh malígneho melanómu. *Klin Onkol* 2000; 13(3): 96–97.
- Bulliar JL, De Weck D, Fisch T et al. Detailed site distribution of melanoma and sunlight exposure: aetiological patterns from a Swiss series. *Ann Oncol* 2007; 18(4): 789–794. doi: 10.1093/annonc/mdl490.
- Elwood JM, Gallagher RP. Body site distribution of cutaneous malignant melanoma in relationship to patterns of sun exposure. *Int J Cancer* 1998; 78(3): 276–280. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19981029)78:3<276::AID-IJC2>3.0.CO;2-S.
- Cubitt JJ, Khan AA, Royston E et al. Melanoma in Buckinghamshire: data from the inception of the skin cancer multidisciplinary team. *J Skin Cancer* 2013; 2013: 843282. doi: 10.1155/2013/843282.
- Mufti ST. Pattern of cutaneous melanoma at King Abdulaziz University Hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *Pak J Med Sci* 2012; 28(1): 154–157.
- Nam KW, Bae YC, Nam SB et al. Characteristics and treatment of cutaneous melanoma of the foot. *Arch Plast Surg* 2016; 43(1): 59–65. doi: 10.5999/aps.2016.43.1.59.
- Kukita A, Ishihara K. Clinical features and distribution of malignant melanoma and pigmented nevi on the soles of the feet in Japan. *J Invest Dermatol* 1989; 92 (Suppl 5): 210S–213S.
- Samaila MO, Rafindadi AH. Pattern of cutaneous malignant melanoma in Zaria, Nigeria. *Ann African Med* 2006; 5(1): 16–19.
- Green A, MacLennan R, Youl P et al. Site distribution of cutaneous melanoma in Queensland. *Int J Cancer* 1993; 53(2): 232–236.
- Liburd CG, Gibson TN, Hanchard B et al. Cutaneous malignant melanoma in Jamaica, 1958 to 2007. *West Indian Med J* 2014; 63(7): 717–720. doi:10.7727/wimj.2013.265.
- Zemelman V, Roa J, Tagle SR et al. Malignant melanoma in Chile: an unusual distribution of primary sites in men from low socioeconomic strata. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31(3): 335–338. doi:10.1111/j.1365-2230.2005.02038.x.
- Juzeniene A, Baturaite Z, Moan J. Sun exposure and melanomas on sun-shielded and sun-exposed body areas. In: Reichrath J (eds). *Sunlight, vitamin D and skin cancer*. Second ed. USA: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media 2014: 375–389.
- Sanlorenzo M, Osella-Abate S, Ribero S et al. Melanoma of the lower extremities: foot site is an independent risk factor for clinical outcome. *Int J Dermatol* 2015; 54(9): 1023–1029. doi: 10.1111/ijd.12730.
- Walsh SM, Fisher SG, Sage RA. Survival of patients with primary pedal melanoma. *J Foot Ankle Surg* 2003; 42(4): 193–198. doi:10.1053/jfas.2003.50044.
- Sondermann W, Zimmer L, Schadendorf D et al. Initial misdiagnosis of melanoma located on the foot is associated with poorer prognosis. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(29): e4332. doi: 10.1097/MD.0000000000004332.
- Bristow L, Bower C. Melanoma of the foot. *Clin Podiatr Med Surg* 2016; 33(3): 409–422. doi: 10.1016/j.cpm.2016.02.008.

# Metastases of a Breast Cancer to Skull Base

## Metastázy karcinomu prsu do baze lební

Horakova Z.<sup>1</sup>, Slavik M.<sup>2</sup>, Vesely K.<sup>3</sup>, Binkova H.<sup>1</sup>, Smilek P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of otorhinolaryngology head and neck surgery, Faculty of Medicine, Masaryk University, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Clinic of radiation oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of pathology, Faculty of Medicine, Masaryk University, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

### Summary

**Background:** Breast cancer (BC) is a frequent malignant disease which tends to develop distant metastases, but only very rarely in the head and neck region. **Case report:** We present two case reports of patients with metastases of invasive BC in this area. They are of different clinical manifestation with different time relation to the primary tumor and different symptomatology. In the case of the first patient, a few years without evidence of malignant disease after treatment of primary tumor in complete remission. In the case of the second patient, as the first symptom of undiagnosed disease. Metastases were clinically observed in the skull base and maxillary sinus, manifesting neurologically with foramen jugulare syndrome and orbital symptoms, resp. In both cases, correlations between histological and clinical findings were essential for diagnosis. Palliative multimodal treatment was then employed. **Conclusion:** Metastases of BC in the head and neck region occur only very rarely. The extremely variable symptomatology depends on the location of the metastasis and the affected structures. This might be a pitfall for diagnostics, especially in cases of an unidentified primary breast tumor, which may result in a delay of correct diagnosis. In addition, the correlation between histopathological and clinical findings might be of great relevance in these cases.

### Key words

skull base metastasis – breast cancer – foramen jugulare syndrome

### Souhrn

**Východiska:** Nádor prsu patří mezi nejčastější nádorová onemocnění s tendencí ke vzdálenému metastazování, nicméně metastázy do oblasti hlavy a krku jsou výjimečné. **Pozorování:** Prezentujeme dva případy pacientek s metastázami invazivního karcinomu prsu do této oblasti. Každý je se vzájemně odlišnou klinickou manifestací. I v rozdílném čase ve vztahu k primárnímu nádoru. V prvním případě po několika letech po léčbě primárního nádoru v kompletní remisi a v druhém případě jako první příznak dosud nedignostikovaného onemocnění. Metastázy se klinicky projeví do oblasti baze lební a maxilární dutiny neurologicky syndromem „foramen jugulare“, resp. oční symptomatologií při metastáze do očnice. V obou případech byla zcela zásadní histologická diagnóza. Následovala multimodální terapie. **Závěr:** Projevy vzdálených metastáz karcinomu prsu do oblasti baze lební mohou být velmi variabilní, tím se stávají velkou diagnostickou výzvou pro klinika. Obtížná dostupnost některých lézí znesnadňuje diagnostiku, zejména v případech, kdy se jedná o první symptomatologii dosud neznámého primárního tumoru.

### Klíčová slova

metastázy do báze lební – karcinom prsu – syndrom foramen jugulare

This study was supported by the grant of the Ministry of Health of the Czech Republic AZV 16-29835 and the grant of the Grant Agency of the Czech Republic GACR 16-12454S.

Tato studie byla podpořena grantem Ministerstva zdravotnictví CR AZV 16-29835 a grantem Grantové agentury CR GACR 16-12454S

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 studie 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.



MUDr. Hana Binková, Ph.D.  
Department of otorhinolaryngology, head and neck surgery  
Faculty of Medicine  
Masaryk University  
St. Anne's University Hospital  
Pekařská 664/53  
656 91 Brno  
e-mail: binkova.ha@seznam.cz

Submitted/Obdrženo: 23. 2. 2018

Accepted/Přijato: 21. 4. 2018

doi: 10.14735/amko2018293

## Introduction

Breast cancer (BC) is the most frequent malignancy in women – 25% of all newly diagnosed tumors, with an increasing incidence. Although there is decreasing mortality, the incidence of distant metastases has been increasing in recent years, perhaps as a consequence of better treatment results and prolonged overall survival [1,2]. On the other hand, metastases to the head and neck area are still rare and occur at an advanced stage. However, some cases have been published in which symptomatology brought on by such metastases was the first symptom of a previously undiagnosed tumor.

## Case 1

A 53-year-old female with history of a former invasive ductal carcinoma of the left breast grade 2, pT2N2a (4/22) M0, (SR+, HER2-) after radical mastectomy adjuvant, adjuvant chemotherapy, radiotherapy and hormonal therapy, without evidence of disease for the last 5 years.

During follow up, she suddenly experienced mild swallowing difficulties and a foreign body sensation in the throat. Flexible laryngoscopy showed a slight impairment of vocal cord mobility. After 6 months, there was a sudden worsening of hoarseness and an attack of vertigo, accompanied by nausea, vomiting, hearing loss and tinnitus, paresthesia in the right arm and impaired movement of

the right side of the body; in 15 minutes these troubles completely subsided. The patient was preliminarily diagnosed with a cerebral transitory attack in the vertebrobasilar region by the neurologist. A CT and MRI of the brain was performed, without evidence of ischemia; however, they revealed a new skull base pathology – destruction of the pyramidal apex caused by a lesion, size 22 mm, affecting the carotid channel, protruding into the middle ear cavity, destructing the posterior cranial fossa and the jugular foramen. A jugular glomus tumor had to be excluded (Fig. 1).

Otomicroscopy revealed a dark bluish mass behind the intact eardrum. Audiometry showed sensorineural hypacusis (threshold 40–70 dB) nystagmus III. The left vocal cord was fixed paramedially. The patient was unable to extend her left arm above the horizontal (Disability no. VII, VIII, IX, X, XI).

Surgical exploration and biopsy were indicated. Tumorous tissue was removed (Fig. 2). Histology confirmed malignant tissue most likely compatible with metastasis of BC although ER-/PR-, perhaps due to an insufficient amount of representative biological material from the bony tissue.

PET detected another metastatic lesion in the scapula. Palliative radiotherapy 30 Gy in 10 fractions to the area of the skull base and left scapula was then employed. Complete remission was achieved in both involved sides. The patient remained on hormonal treatment for another 18 months when further disease progression appeared in the bones, a biopsy of which proved the metastasis of BC with ER/PR positivity.

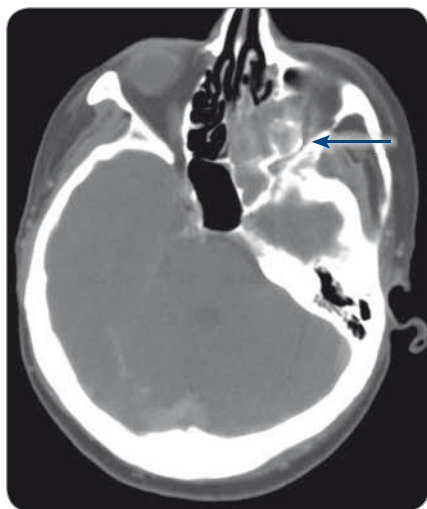


Fig. 1. CT prior to surgery with a metastasis in orbit.

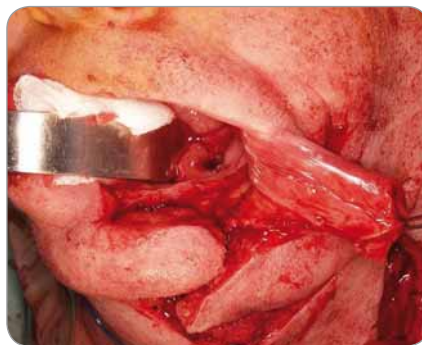


Fig. 2. Surgical access to a metastasis in skull base.

## Case 2

A 65-year-old female presented with a progressive diplopia and blurred vision over the preceding 14 days, normal sight previously. Local finding – protrusion of left eye (5–6 mm); eyelid swollen, paretic eyeball in all directions, resembling orbital cellulitis, ENT local findings were negative.

CT – left ethmoidal sinuses completely filled with dense mass, expanding to the left orbital roof with a dense tissue rim (approximately 5 mm) and to the nasal cavity, thickening of the bone of the orbital apex and multiple lymphadenopathy of the neck up to 20 mm (Fig. 3). Another unknown exulcerated tumor was revealed in the left breast, which the patient had recognized a few months earlier (of size 40 × 50 mm, with tough rim 100 × 80 mm). Other tumors were also confirmed on the CT – multiple in the lungs, mediastinal and retroperitoneal nodes, liver and bones.

A biopsy sample was taken under endoscopic control from the fragile tissue completely filling the posterior ethmoids, partly destructing the lamina papyracea.

Histology was compatible with invasive ductal breast carcinoma (HER2-, ER+) and consistent metastasis to the ethmoids. Further examination – with a kind of a “super scan” image – revealed overall disseminated disease with multiple lung, liver and bone metastases. However, the only threatening symptoms were those involving

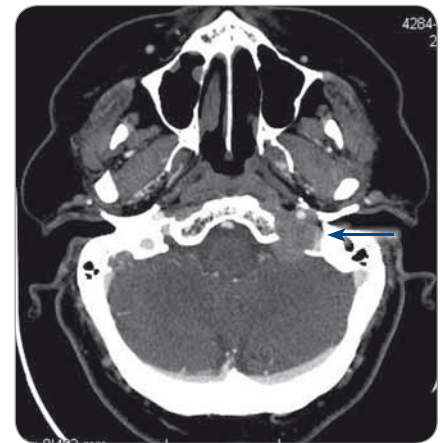


Fig. 3. CT prior to surgery with a metastasis to skull base.

the base of the skull. Systemic weekly Taxol chemotherapy was recommended and a palliative radiotherapy aimed at the ethmoid sinuses was applied with good and enduring palliative effect. The patient received no additional treatment and died after 14 months due to tumor growth and overall disease progression outside of the skull base region.

## Discussion

Here, we showed two different cases of BC with metastasis to the head and neck (specifically, the base of the skull) region. The first case described the manifestation of the rare disease after 6 years of no disease activity, and the second case showed a most apparent and mutilating disease occurrence within an otherwise completely disseminated asymptomatic disease. Both cases were locoregionally advanced with multiple nodal involvement [1].

BC often metastasizes to bones, liver, and lungs, but only very rarely, and at an advanced stage, to the head and neck region. The prognosis of these patients is poor with expected short-term survival (20–60 months). The most frequent histological type is an invasive ductal carcinoma, ER/PR+, HER2/Neu–, as it was in both of our cases.

There have been cases of metastasis to different areas of the head and neck (temporal bone, nasopharynx, larynx, parotid or paranasal sinuses) described in the literature [3,4].

In the skull base, metastases usually occur in the parasellar region, in the middle fossa (Gasserian ganglion syndrome), occipital condyles, orbit and foramen jugulare. Metastases may be clinically silent for a long time or present themselves only by discreet neuropathy [5].

Orbital lesions present with diplopia, eyeball proptosis, eyelid swelling, pain, blurred vision, and ptosis of the upper eyelid.

Foramen jugulare symptoms may present variably according to affected structures. These include Werner syn-

drome (dysphonia, dysphagia, pharyngeal pain – dysfunction of no. IX, X and XI), Jackson syndrome (dysfunction of no. X, XI and XII), Collet-Sicard syndrome (dysfunction of no. IX–XII); Villaret's syndrome (impaired cervical sympathetic, Horner syndrome), and Tapia's syndrome (dysfunction no. X and XII.).

Paranasal sinus (PNS) symptoms are non-specific, often very similar to common sinusitis (nasal obstruction, pressure and pain). More severe symptoms occur when tumor tissue infiltrates the orbit (diplopia, eyelid ptosis, blurred vision), as in our case.

More common origins of foramen jugulare syndrome (which must be excluded) are – benign tumors (paraganglioma, meningioma, and schwannoma), vascular abnormalities, congenital and inflammatory processes, cerebrovascular, infective or metabolic pathology. In case of malignant lesions, the most common are those of nodal metastases or continuously growing head and neck carcinomas. Distant metastases from the subclavicular primary tumors appear only very sparsely in above-mentioned areas.

Metastases to the skull base usually originate from the lungs or gastrointestinal or urogenital tract. Up to 15% of the cases are of an unknown primary origin [6].

In the sinonasal area, 96% of the malignant tumors are primary carcinoma. Over 70% of distant metastases originate from renal tumors, less frequently from gastrointestinal, lower respiratory tract, prostate or ovarian tumors.

Metastases from BC are very rare, occurring slightly more often in the skull base than in the PNS [7].

Detection on a CT is typical (saturating lesion, with skeletal destruction). MRI may be added (metastases are mostly hypointense on T1 and hyperintense on T2) [6].

The treatment is palliative in advanced disease stages. Surgery and radiother-

apy are suggested, combined with systemic chemotherapy or hormonal therapy, with respect to the patient's performance status. Radiotherapy provides pain relief in up to 90% of patients and reduces other local symptoms. Better results are achieved in patients with rapidly progressing symptoms (less than 1 month). Surgical treatment – a palliative metastasectomy is indicated in the case of serious local symptoms.

## Conclusion

Metastases of BC in the head and neck region occur only very rarely. The extremely variable symptomatology depends on the location of the metastasis and the affected structures. This might be a pitfall for diagnostics, especially in cases of an unidentified primary tumor, but these type of metastases are rather unexpected also in cases of identified primary tumors, which may result in a delay in correct diagnosis. In addition, correlation between histopathological and clinical findings might be of great relevance in these cases.

## References

1. Raap M, Antonopoulos W, Dammrich M et al. High frequency of lobular breast cancer in distant metastases to the orbit. *Cancer Med* 2015; 4 (1): 104–111. doi: 10.1002/cam4.331.
2. Schneider C, Fehr MK, Steiner RA et al. Frequency and distribution pattern of distant metastases in breast cancer patients at the time of primary presentation. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 269: 9–12. doi: 10.1007/s00404-002-0445-x.
3. Garcia TD, Molina QC, Sanz FR. Ethmoid metastasis of primary breast tumour. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1998; 49(2): 163–164.
4. Pignataro L, Peri A, Ottaviani F. Breast carcinoma metastatic to the ethmoid sinus: a case report. *Tumori* 2001; 87(6): 455–457.
5. Flis DW, Shah AT, Tracy JC et al. Metastatic breast carcinoma of the jugular foramen: a rare case of Billaret syndrome. *Head Neck* 2015; 37(11): 146–149. doi: 10.1002/hed.24008.
6. Löwenheim H, Koerbel A, Ebner FH et al. Differentiating imaging findings in primary and secondary tumors of the jugular foramen. *Neurosurg Rev* 2006; 29(1): 1–11. doi: 10.1007/s10143-005-0420-7.
7. Wanamaker JR, Kraus DH, Eliachar I et al. Manifestations of metastatic breast carcinoma to the head and neck. *Head Neck* 1993; 15(3): 257–262.

# Primary Branchiogenic Carcinoma

## Primární branchiogenní karcinom

Horakova Z.<sup>1</sup>, Velecky L.<sup>2</sup>, Pazourkova M.<sup>3</sup>, Urbankova P.<sup>1</sup>, Smilek P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Clinic of otorhinolaryngology head and neck surgery, Faculty of Medicine, Masaryk university, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of pathology, Faculty of Medicine, Masaryk university, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Clinic of Medical Imaging, Faculty of Medicine, Masaryk university, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

### Summary

**Background:** Primary branchiogenic carcinoma (BC) is an exceptional diagnostic entity. In most cases, suspicion of BC is confirmed to be a cystic lymph node metastasis of an occult primary tumor. Martin and Khafif therefore established diagnostic criteria, emphasizing above all the importance of a histologically assessed transformation of cystic lining epithelium into an invasive squamous cell carcinoma in one pathological lesion after the exclusion of a primary tumor. **Case report:** We present a case report of an 80-year-old patient who presented for a follow-up for an 8-year history of a benign lateral cervical cyst, which was not surgically treated due to the patient's high risk of complications from general anesthesia. In spite of the risk, the surgery was performed after a sudden clinical progression, and surprisingly, post-operative histology revealed BC. **Conclusion:** BC is a very rare entity, strictly defined by Martin's and Khafif's criteria. Recently, BCs have been presented in the literature only as unique case reports responding as in our patient to the above mentioned criteria, with particular emphasis on the histological aspect, imaging the cystic lining epithelium transforming into an invasive squamous cell carcinoma in one pathological lesion and a long history without evidence of primary tumor.

### Key words

branchiogenic carcinoma – lateral branchial neck cyst – occult carcinoma – metastasis of unknown primary origin

### Souhrn

**Východiska:** Primární branchiogenní karcinom (branchiogenic carcinoma – BC) v laterální krční cystě je výjimečná klinická jednotka. V naprosté většině případů se jedná o cystickou metastázu okultního primárního nádoru. Martin a Khafif stanovili diagnostická kritéria zdůrazňující především histologicky potvrzenou transformaci normální epiteliální výstelky cysty s přechodnou zónou transformace po jednoznačný invazivní karcinom a důsledné vyloučení primárního tumoru. **Pozorování:** Presentován je případ pacienta (80 let) s 8letou anamnézou zduření na krku – suspektní laterální krční cystou, pro kterou byl sledován. Chirurgické řešení nebylo indikováno pro významné interkurence. Přistoupeno bylo k exstirpaci až při náhlé progresi infiltrátu. Histologie překvapivě odhalila BC, jednoznačně splňující kritéria. **Závěr:** Představujeme ojedinělý případ onemocnění, jehož existence je jednoznačně definována kritérii dle Martina a Khafifa. Nedávno byl v literatuře prezentován ojedinělý případ splňující zmíněná kritéria, odpovídající i našemu pacientovi, s důrazem především na histologii dokumentující transformaci epitelu s přechodnou zónou až po invazivní spinocelulární karcinom v jedné patologické jednotce s dlouhodobým sledováním bez diagnostiky primárního nádoru.

### Klíčová slova

branchiogenní karcinom – laterální krční cista – okultní nádor – metastáza neznámého primárního nádoru

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 studie 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.



MUDr. Zuzana Horakova

Department of otorhinolaryngology  
head and neck surgery

Faculty of Medicine of Masaryk  
university

St. Anne's University Hospital

Pekařská 664/53

656 91 Brno

e-mail: zuhorakova@seznam.cz

Submitted/Obdrženo: 22. 2. 2018

Accepted/Přijato: 24. 4. 2018

doi: 10.14735/amko2018296



### Introduction

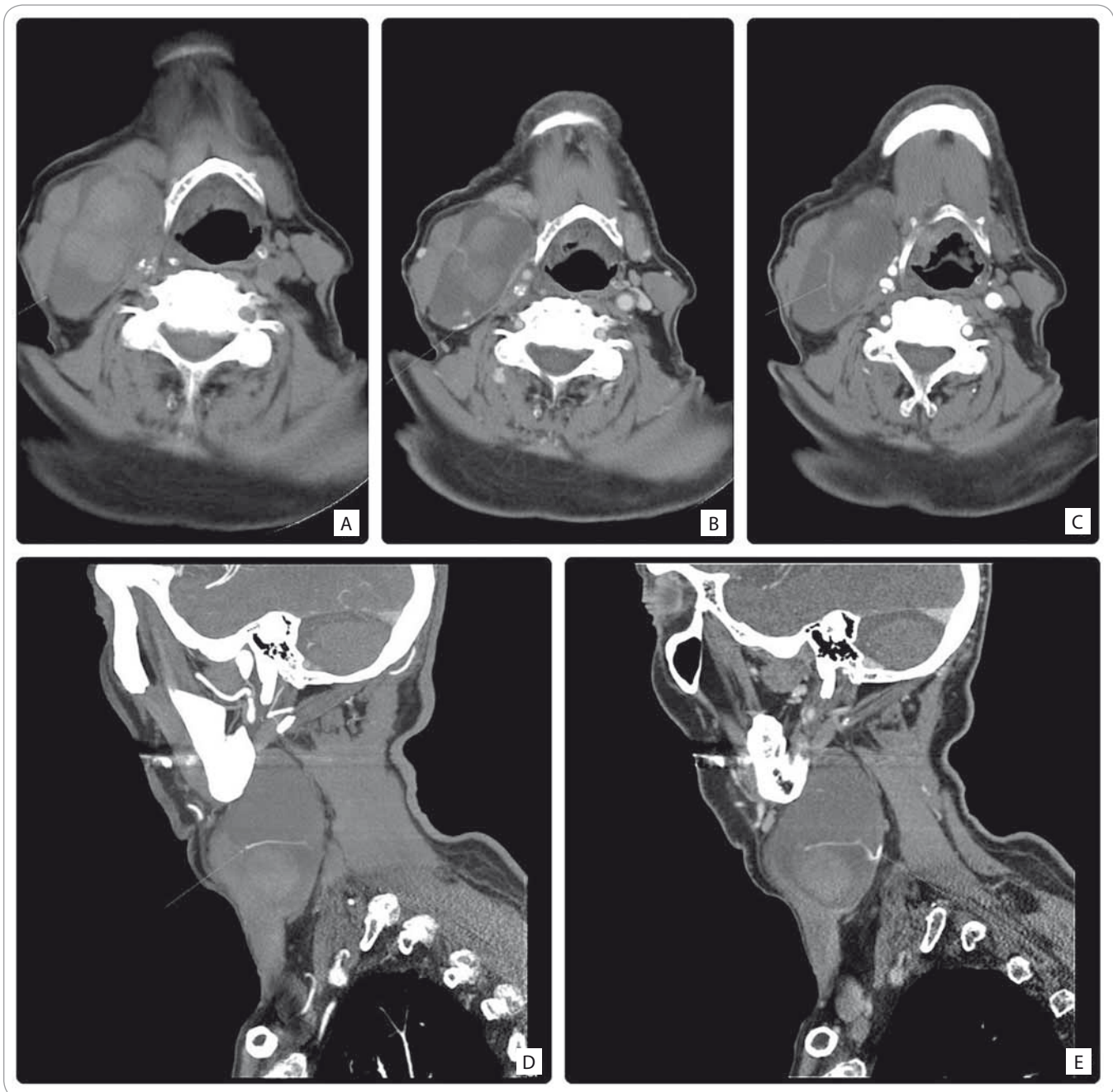
Primary branchiogenic carcinoma (BC) is a malignant tumor arising in branchial cervical cysts. It was first described by Volmann in 1882, and criteria were defined by Martin in 1950, which were then modified by Khafif in 1989 [1,2]. Branchial cyst presents as a smooth, soft ovoid cystic structure of the lateral neck originating in

the remnant of an incompletely closed branchial cleft at the anterior margin of the sternocleidomastoid muscle. The lining of the cyst consists of a layered squamous cell epithelium from which its malignancy (squamous cell carcinoma – SCC) develops. The BC diagnosis itself is accepted only when the strict criteria are met.

However, many authors still view the BC only as a cystic metastasis of an undiagnosed occult primary tumor.

### Case Report

An 80-year-old patient had been monitored in an ear, nose and throat (ENT) outpatient department for several years. Eight years ago, he was first ex-



**Fig. 1.** A) A native CT image in the transversal plane – a cyst located among musculus sternocleidomastoideus, submandibular gland and vascular bundle with a inhomogeneous dense content and with a wall slightly irregular in width,  $5.5 \times 3.3 \times 8.5$  cm in size. B) Enhancement of the dorsal cyst wall after contrast medium application. C) The vessel in the early arterial phase. D) Sagittal reconstruction in the early arterial phase. E) Sagittal reconstruction in the late arterial phase.

mined for a 6 × 6 cm, painless but slowly progressing lateral neck swelling of several months duration; otherwise he was symptom-free. A lateral cervical cyst was suspected (soft, elastic, fixed, painless, and located at the level of the middle third of the sternocleidomastoid muscle). The diagnosis was supported by ultrasound and CT scans – a thin-walled ovoid cystic formation with fluid content was displayed, without evidence of increased vascularization or pathological changes in the surrounding soft tissues, without neck lymphadenopathy; there was no other pathology under the regular (including endoscopic) ENT examination. As the patient was polymorbid, already suffering especially from cardiovascular diseases, the most conservative procedure was suggested. An aspiration biopsy was performed to reduce the volume and to exclude malignancy. The patient was regularly monitored. Regular aspiration of about 40–50 ml of a serous fluid was performed approximately 2–4 times a year. Cytology never indicated suspicious malignancy. After 8 years, however, there was a clinical reversal; the swelling progressed significantly faster, and a sudden bleeding complication emerged after the puncture. The CT showed an ovoid structure, 65 × 34 × 87 mm, but it was heterogenic, with a highly vascular wall of irregular width, pushing the neck vessel, deforming the hypopharynx (Fig. 1). Surgery was suggested despite the risk of general anesthesia.

A large cystic structure, located between the jugular vein and the sternocleidomastoid muscle, with inflammation in the surrounding tissues, was removed. The histology of the structure was surprisingly determined to be BC, fulfilling the criterion of the presence of a squamous cyst in the lining of the epithelium, the transition zone, and an invasive SCC comprised in the vestige.

Histology macroscopically identified a cystic structure 70 × 35 × 30 mm in size, the inner surface with cauliflower formations and blood coagulants and a smooth outer surface. Microscopically, the cyst consisted of a fibrohyaline wall, lined with a squamous epithelium with

areas of heavy metaplasia transforming to *in situ* carcinoma and finally to invasive G2/G3 differentiated SCC with focal keratinization (p53+, CK5+) (Fig. 2). Due to a complete removal, assuming non-aggressive biological behavior and taking into account the age of the patient, no other general anesthesia associated with tonsillectomy and panendoscopy with guided biopsies were performed. For the same reason, adjuvant irradiation was not recommended. The patient has now been tumor-free for more than one year after finishing the treatment; he is under the follow-up care of a general practitioner.

### Discussion

Martin first proposed criteria for the diagnosis of BC (Tab. 1) [1] and Khafif later modified these criteria (Tab. 2) [2]. As he disagreed with the third criterion (e.g. an independent duplex tumor can be detected over 5 years or, on the contrary, an administered adjuvant radiotherapy could eliminate an occult primary tumor), he replaced it with different two criteria – the absence of a primary tumor in a different location and a clear histological identification of a cystic structure where the normal squamous cell epithelium of the lining with transition zone of dysplasia, carcinoma *in situ* and an invasive SCC. These criteria are widely accepted. Both authors emphasize the histological aspect of BC.

BCs have been published in recent years as unique case reports that meet Martin's and Khafif's above-mentioned criteria. Zimmerman documented the *in situ* carcinoma stage without clear invasion, which confirms the above-mentioned etiopathogenetic theory [3]. The histological assessment was the strongest argument supporting the branchiogenic etiology in our case as well. Our patient met all of the criteria of localization, histological type of an invasive SCC, absence of primary malignancy and, above all, a characteristic, histologically well-documented process of transition.

Diagnosis of BC is based on clinical, cytological and radiodiagnostic imaging. Ultrasound, CT and MRI reveal a characteristic image – a thin-walled cystic

lesion with a back wall enhancement. However, an atypia may always arise (pseudosolid, anechogenous, heterogeneous, with debris and pseudocysts or an indistinguishable wall), which is associated with a change in cyst content in intra-capsule bleeding or solidification, thickening of the wall caused by inflammation, or an increase in vascularization which may indicate a malignant transformation. We consider ultrasound to be an ideal follow-up method, as it is non-burdensome and applicable in regular intervals and allows for guided aspiration biopsy for cytological assessment [4].

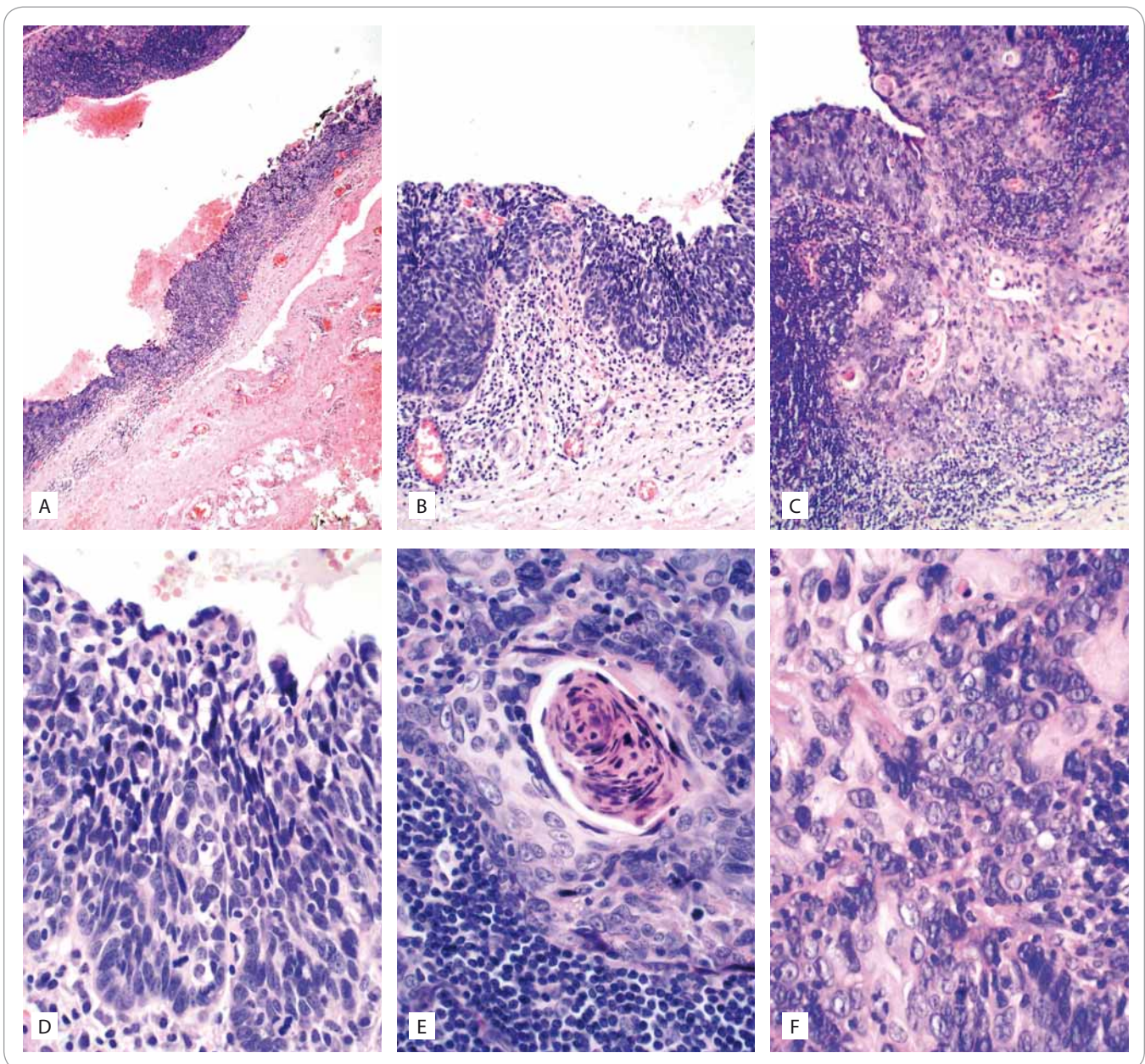
CT corresponded with the diagnosis of a benign cyst in our patient for a long period until a rapidly progressing symptomatology recently arose. This, however, was more suspected to be inflammation induced by a repeated Fine needle aspiration biopsy (FNAB) (cytology was always benign.)

For BC diagnostics, the issue is first and foremost to exclude an occult primary head and neck tumor metastasis; in the past, this diagnosis was probably overestimated, whereas nowadays some authors completely deny the existence of BC as a pathologic unit itself.

On the other hand, the histology illustrating a transition of the epithelium to the carcinoma is the strongest argument supporting the existence of this clinical unit, which has never been explained in another way [5–7].

Cancer of unknown primary origin (CUP) presenting with cervical metastasis accounts for approximately 5% of all head and neck malignancies, over 90% of which, as it was later assessed, originate from the lymphatic tissue (tonsil, nasopharynx, root of the tongue).

Though recent theories suggest that a small primary tumor may be eliminated by the patient's immune system, examination, including panendoscopy, biopsy from Waldeyer's ring and bilateral tonsillectomy are vastly recommended. Positron-emission tomography imaging is indicated for excluding a primary tumor during the diagnostic procedure and subsequent follow-up, when a metastasis of unknown primary should be confirmed [8–10].



**Fig. 2.** A) Branchial cleft cyst with epithelial dysplasia (40×). B) Branchial cleft cyst with high-grade epithelial dysplasia/squamous cell carcinoma *in situ* (100×). C) Invasive squamous cell carcinoma arising in the wall of branchial cleft cyst (100×). D) Epithelium with high-grade dysplasia/squamous cell carcinoma *in situ* (400×). E) Epithelium with high-grade dysplasia/squamous cell carcinoma *in situ* (400×). F) Nest of invasive squamous cell carcinoma, G3 (400×).

In recent years, oropharyngeal location is regarded as particularly susceptible considering the dramatic increase in incidence of human papillomavirus (HPV)-associated oropharyngeal carcinomas (OPC), known for its early cystic metastases of small primary tumors. OPC is finally diagnosed in up to 70% of cases. From the HPV point of view, an interesting case of HPV-associated BC was reported by Maeda [11–15].

In our patient, the immunohistochemistry was negative for p16, which also supports the non-HPV etiology.

In our patient, histology was a great surprise considering the long-lasting history with a benign FNAB cytology. We do not believe the malignancy could persist for such a long time.

Another theory might arise – the malign transformation could be brought on by repeating FNAB; however, this

was not supported by any report in the reviewed literature.

Therefore, endoscopy followed, but a tonsillectomy was not performed. The patient had a very high risk of general anesthesia and there was no clinical suspicion of tumor. The 8-year history of cystic lesion in the lateral neck, free of progression even without any treatment, is a very strong argument against the theory of occult tumor metastasis.

**Tab. 1. Criteria for the diagnosis of branchiogenic carcinoma by Martin [1].**

- 1 The cervical tumor must have occurred somewhere along the line extending from a point just anterior to the tragus, downward along the anterior border of the sternocleidomastoid muscle to the clavicle.
- 2 The histologic appearance of the growth must be consistent with an origin from tissue known to be present in the branchial vestiga.
- 3 The patient must have survived and have been followed up for at least 5 years without the primary tumor.
- 4 The histologic demonstration of cancer developing in the wall of an epithelial cyst situated in the lateral aspect of the neck (a normal branchiogenic cyst).

**Tab. 2. Criteria modified by Khaff [2].**

- 1 The location of the tumor in the anatomic region of the branchial cleft cyst or sinus as defined by Martin.
- 2 Histologic appearance of the tumor consistent with its origin from branchial vestiges, i.e. squamous cell carcinoma.
- 3 Presence of carcinoma within the lining of an identifiable epithelial cyst.
- 4 Identification of transition from the normal squamous epithelium of the cyst to carcinoma.
- 5 Absence of any identifiable primary malignant tumor after exhaustive evaluation of the patient.

Complete surgical excision and adjuvant radiotherapy is considered to be an adequate therapy; even though data are rare in a rare diagnosis, a good prognosis is assumed. In our patient, a complete excision of a large cyst was performed. On account of the patient's performance status, recommended panendoscopy and tonsillectomy were not performed. However, even though the suggested adjuvant radiotherapy could not be performed, he is, after a year of follow-up, recurrence-free under regular clinical examination.

### Conclusion

BC is a very rare entity, strictly defined by Martin's and Khaff's criteria. The existence of BC itself is denied by some authors and pathologists and is considered to be the cystic metastasis of an unknown primary tumor.

In recent years, BCs have been presented in the literature only as unique case reports responding to the above mentioned criteria, with particular emphasis on the histological aspect, imaging the cystic lining epithelium transforming into an invasive SCC in one pathological lesion.

### References

1. Martin H, Morfit HM, Ehrlich H. The case for branchiogenic cancer (malignant branchioma). *Ann Surg* 1950; 132(5): 867–887.
2. Khaff RA, Prichep R, Minkowitz S. Primary branchiogenic carcinoma. *Head Neck* 1989; 11(2): 153–163.
3. Zimmermann CE, von Domarus H, Moubayed P. Carcinoma in situ in a lateral cervical cyst. *Head Neck* 2002; 24(10): 965–969. doi: 10.1002/hed.10118.
4. Hu S, Hu Ch, Yang L et al. Atypical imaging observations of branchial cleft cysts. *Oncol Lett* 2014; 7(1): 219–222. doi: 10.3892/ol.2013.1656.
5. Lin YC, Fang SY, Huang RH et al. Branchiogenic squamous cell carcinoma: a case report. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(2): 209–212.
6. Girvigian MR, Rechdouni AK, Zeger D et al. Squamous cell carcinoma arising in a second branchial cleft cyst. *Am J Clin Oncol* 2004; 27(1): 96–100.
7. Nakano A, Misima K, Katase N. A case of squamous cell carcinoma arising from branchial cleft cyst. *Oral Maxillofac Surg* 2015; 73(4): 781–785. doi: 10.1016/j.joms.2014.10.036.
8. Zdražil B, Profant M, Povinec P. Prínos PET CT vyšetrenia do diagnostiky neznámého primárneho tumoru s metastázovaním do krčných lymfatických uzlín – naše skúsenosti. *Otorinolaryng Foniat* 2012; 61(1): 53–56.
9. National Comprehensive Cancer Network. [online]. Available from: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/head-and-neck.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf).
10. Mackenzie K, Watson M, Jankowska P et al. Investigation and management of the unknown primary with metastatic neck disease: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* 2016; 130 (Suppl 2): S170–S175. doi: 10.1017/S0022215116000591.
11. Maeda H, Deng Z, Ikegami T et al. Branchiogenic carcinoma with high-risk-type human papillomavirus infection: a case report. *Oncol Lett* 2016; 12 (3): 2087–2091. doi: 10.3892/ol.2016.4907.
12. Chauhan A, Tiwari S, Pathak N. Primary branchiogenic carcinoma: report of a case and a review of the literature. *J Can Res Ther* 2013; 9(1): 135–137. doi: 10.4103/0973-1482.110380.
13. Schmalbach CE, Miller FR. Occult primary head and neck carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2007; 9(2): 139–146.
14. Goldenberg D, Sciubba J, Koch WM. Cystic metastasis from head and neck squamous cell cancer: a distinct disease variant. *Head Neck* 2006; 28(7): 633–638. doi: 10.1002/hed.20381.
15. Yasui T, Morii E, Yamamoto Y et al. Human papillomavirus and cystic node metastasis in oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary origin. *PLoS One* 2014; 9(4): e95364. doi: 10.1371/journal.pone.0095364.

# Fludarabín v liečbe indolentného lymfómu s chylothoraxom

## Use of Fludarabine for the Treatment of Indolent Lymphoma with Chylothorax

Wild A.<sup>1,2</sup>, Holasová J.<sup>1,2</sup>, Králiková E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hematologické oddelenie, FNŠP F. D. Roosevelta Banská Bystrica

<sup>2</sup> LF SZU v Bratislave

### Súhrn

**Východiská:** Chylothorax je zriedkavou komplikáciou lymfómov. Vyskytuje sa pri zväčšení mediastinálnych lymfatických uzlín a pri veľkej retroperitoneálnej tumoróznej mase, príp. následkom upchatia ductus thoracicus lymfocytmi pri chronickej lymfocytovej leukémii (CLL). Má nešpecifický klinický obraz. Prispieva, najmä po opakovanej evakuácii, k imunokompromitácii a malnutriícii pacienta. Diagnostická je hladina triacylglycerolov v punktáte > 1,24 mmol/l a zároveň cholesterolu < 5,18 mmol/l. Pri malígnom chylothoraxe sa ako prvá používa liečba asociovannej malignity – chemoterapia alebo rádioterapia. Odpoveď sa dostavuje po 3–8 kúrach chemoterapie. Publikovaných je niekoľko prípadov liečby chylothoraxu pri indolentných lymfómoch fludarabínovým režimom s rôznymi výsledkami. Ústup chylothoraxu môže urýchliť podporná diéta – totálna parenterálna výživa alebo nízko-tuková strava kombinovaná s užívaním triacylglycerolov so stredne dlhým reťazcom. **Prípady:** Autori prezentujú prípady dvoch pacientov s chylothoraxom pri relabujúcej CLL, resp. novodiagnostikovanom folikulovom lymfóme, v oboch prípadoch s veľkou tumoróznou masou retroperitonea. Po 1 a 3 kúrach fludarabínu a cyklofosfamidu +/- rituximabu bez ďalšej potreby evakuácie chylothoraxu, po 5 kúrach vymiznutie chylothoraxu a dosiahnutie parciálnej, resp. kompletnej odpovede lymfómu. Odpoveď v prvom prípade pretrvala 30 mesiacov, v druhom prípade je pacient doteraz bez relapsu počas udržiavacej liečby rituximabom. **Záver:** Obmedzené skúsenosti naznačujú, že fludarabínové režimy u pacientov s indolentnými lymfómami môžu rýchlo viesť popri zmenšení tumoróznej masy aj k regresii chylothoraxu, čo zabraňuje prehlbovaniu malnutrie a imunokompromitácie pacienta.

### Kľúčové slová

lymfóm – fludarabín – chylothorax

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. Alexander Wild**  
Hematologické oddelenie  
FNŠP F. D. Roosevelta  
Nám. L. Svobodu 1  
975 17 Banská Bystrica  
e-mail: awild@nspbb.sk

Obdržané/Submitted: 2. 2. 2018

Prijaté/Accepted: 20. 5. 2018

doi: 10.14735/amko2018301

## Summary

**Background:** Although chylothorax is rare in patients with malignant lymphoma, it has been reported in cases with mediastinal lymphadenopathy, a bulky retroperitoneal mass, or thoracic ducts blocked by lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia (CLL). The clinical picture is not specific. Patients become more immunocompromised and malnourished after repeated evacuations. Chylothorax is usually diagnosed when the triglyceride level is  $> 1.24$  mmol/l and the cholesterol level is  $< 5.18$  mmol/l in the effusion. Chemotherapy or radiotherapy of the associated malignant tumors has been used as the first-line treatment of malignant chylothorax. The responses of chylothorax after 3–8 chemotherapy courses have been described. A few cases of indolent lymphoma associated with chylothorax that were treated with fludarabine-based chemotherapies with various outcomes have been published. Total parenteral nutrition or a low-fat diet combined with ingestion of medium-chain triglycerides can accelerate remission of chylothorax. **Observation:** This study presents two cases with chylothorax associated with a bulky abdominal mass in relapsed CLL and newly diagnosed follicular lymphoma, respectively. No further evacuations were required after one and three courses of fludarabine plus cyclophosphamide with/without rituximab in the patients with CLL and follicular lymphoma, respectively. Chylothorax disappeared after five courses, and a partial or complete response of malignant lymphoma was achieved. The response lasted for 30 months in the patient with CLL and has persisted throughout maintenance therapy with rituximab in the patient with follicular lymphoma. **Conclusion:** Limited experience indicates that fludarabine-based regimes can result in rapid regression of chylothorax, in addition to treating indolent lymphoma, which prevents patients becoming more malnourished and immunocompromised.

## Key words

lymphoma – fludarabine – chylothorax

## Úvod

Lymfa obsahuje vysoké koncentrácie cholesterolu, triacylglycerolov (TAG), chylomikróny, imunoglobulíny, enzýmy, rozpadové produkty a variabilné množstvo leukocytov. Priemerne sa jej vytvorí 2,4 l denne. Lymfa z dolných končatín a brucha prúdi cez ductus thoracicus (DT), ktorý prebieha vpravo od chrbtice do úrovne 3. až 6. hrudného stavca, potom prechádza na ľavú stranu chrbtice a ústi najčastejšie do vena subclavia [1,2].

Chylothorax vzniká únikom lymfy do pleurálneho priestoru, a to poškodením DT priamo, jeho útlakom zvonku alebo

jeho infiltráciou a následnou ruptúrou alebo môže dôjsť k retrográdnemu toku lymfy cez lymfatické cievy parietálnej pleury [1,3]. Etiológia môže byť traumatická (po úsilnom zvracaní alebo kašli, pri katetrizácii vena subclavia, po operácii hrudníka, krku a hlavy) alebo netraumatická – zhubné nádory (mediastinálna, zriedkavejšie retroperitoneálna lymfadenomegália, upchatie DT lymfocytmi), sarkoidóza, retrosternálna struma, amyloidóza, trombóza centrálnych vén [1,3].

Klinický obraz je nešpecifický – dominuje dýchavica, bolesť na hrudníku a kašeľ. Často sa pridáva malnutícia zo strát proteínov, tukov, vitamínov a minerálov, najmä po opakovaných evakuáciách. Strata imunoglobulínov a T lymfocytov vedie k imunokompromitácii s vyšším rizikom oportúnnych infekcií. Podľa lokalizácie lézie môže byť pravostranný alebo ľavostranný [1,2].

Vzhľad je v polovici prípadov mliečny (obr. 1), ale môže byť aj žltý, zelený, serosanguinolentný až sanguinolentný, pri hladovaní pacienta až serózný. Štandardom diagnostiky je stanovenie prítomnosti chylomikrónov. Ak nie je dostupné, za diagnostické sa považuje, keď v punktáte je hladina TAG  $> 1,24$  mmol/l a zároveň cholesterolu  $< 5,18$  mmol/l. Pri hladovaní a malnutícii to nemusí byť splnené. Iné odporúčané kritérium je pomer tukov vo fluidothoraxe a v sére – v prípade TAG nad 1,0 a zároveň cholesterolu pod 1,0. Môže sa jednať o exudát

aj transudát. Diferenciálno diagnosticky treba chylothorax odlišiť od empyému a pseudochylothoraxu. Po centrifugácii má empyém vrstvu supernatantu, chylothorax ostane homogénny. Pseudochylothorax znamená tekutinu podobného vzhľadu, ktorá vzniká pri chronickom fluidothoraxe s hladinou TAG pod 0,56 mmol/l a absenciou chylomikrónov, môžu byť prítomné pseudocholesterolové kryštály [1,2]. Denzita pri vyšetrení počítačovou tomografiou neumožňuje odlišiť chylothorax od fluidothoraxu inej etiológie [4].

## Kazuistika 1

Muž narodený v roku 1942 mal stanovenú diagnózu chronickej lymfocytovvej leukémie (CLL) v roku 2003. Liečba chlorambucil + prednizon bola bez efektu, 1. kúra fludarabín + cyklofosfamid (FC) komplikovaná febrilnou neutropéniou, obrazom cerebelitídy a herpes zoster, dosiahnutá bola parciálna odpoveď (partial response – PR). Pre progresiu podané 3 kúry chemoterapie CVP (cyklofosfamid + vinkristín + prednizon) od decembra 2005 s dosiahnutím PR, sprevádzané častými infekciami s potrebou substitúcie intravenózných imunoglobulínov.

Začiatkom roku 2007 sa zistila pravostranná pneumónia s bilaterálnym fluidothoraxom a známkami progresie v zmysle trombocytopenie, anémie, generalizovanej lymfadenopatie (v me-



Obr. 1. Vzhľad chylothoraxu.

diastíne do 18 mm) s veľkou tumoróznou masou abdomenu (18 × 11 cm). Po zvládnutí pneumónie od marca 2007 podané 2 kúry CVP s regresiou externej lymfadenopatie, ale pretrvávaním fluidothoraxu s opakovanou potrebou evakuácie. Pleurálny puntát mal oranžový opaleskujúci vzhľad. V apríli 2007 pri hladine TAG 6,28 mmol/l bol diagnostikovaný ako chylothorax. Od júna 2007 podávaná chemoterapia FC (fludarabín 25 mg/m<sup>2</sup> i.v., cyklofosfamid 250 mg/m<sup>2</sup> i.v., 1. až 3. deň) so súčasťou substitúciou imunoglobulínmi. V júli a začiatkom augusta boli potrebné ešte opakované evakuácie fluidothoraxu. V septembri dosiahnutá kompletná nodálna remisia. V novembri 2007 už podľa RTG hrudníka bez fluidothoraxu, obr. 2 a 3. Celkovo bolo pacientovi podaných 5 kúr FC. Vzhľadom k uspokojujúcej odpovedi sa po komplikujúcej kandidovej kolitíde už v liečbe nepokračovalo. Podľa CT hrudníka, brucha a panvy a cytologie kostnej drene dosiahnutá kompletná odpoveď.

V roku 2009 riešená sekundárna autoimúnna trombocytopenia, v 2010 progresia do štádia IV podľa Raia pri masívnej infiltrácii kostnej drene s nálezom genetickej aberácie del p53 v 26 %. Alemtuzumab 30 mg i. v. 3× týždenne po dobu 12 týždňov viedol k 6. PR trvajúcej 2 mesiace, následne 12 dávok ofatumomabu 2 000 mg/ dávku k 7. PR. Pri nasledujúcej progresii opätovne vznik chylothoraxu. Prvá kúra FC bola sprevádzaná závažnou infekciou, preto v 2. kúre dávkovanie znížené (fludarabín 25 mg/m<sup>2</sup> i.v. deň 1., cyklofosfamid 80 mg/m<sup>2</sup>, 1. až 2. deň) výsledkom bolo progredujúce ochorenie. R-bendamustín bol rovnako bez efektu a pacient exitoval v marci 2012.

### Kazuistika 2

Muž narodený v roku 1971 mal stanovenú diagnózu folikulového lymfómu, stupeň 1, klinické štádium IVA s generalizovanou lymfadenopatiou, veľkou tumoróznou masou retroperitonea a postihnutím kostnej drene. Dva razy bola potrebná punkcia fluidothoraxu zakaleného jantárového vzhľadu. Vyšetrenie fluidothoraxu svedčilo pre chylothorax – celkové bielkoviny 42 g/l, cholesterol 2,1 mmol/l, TAG 2,07 mmol/l. Po predfáze vinkristín a prednizon podaná 1 kúra ben-



Obr. 2. Kazuistika 1 – RTG hrudníka pred liečbou.



Obr. 3. Kazuistika 1 – RTG hrudníka po liečbe.

damustínu 100 mg/m<sup>2</sup> deň 1 a 2 v monoterapii, po ktorej bola potrebná znovu evakuácia 1 520 ml chylothoraxu. Vzhľadom k predchádzajúcej skú-

senosti bol ďalej pacient liečený kombináciou RFC – rituximab 375 mg/m<sup>2</sup> s FC (fludarabín 20 mg/m<sup>2</sup> p.o., cyklofosfamid 150 mg/m<sup>2</sup> p.o. 1. až 5. deň každých

28 dní). Po 1. kúre RFC bez potreby pleurálnej punkcie. Po 4 kúrach RFC v januári 2016 konštatovaná regresia lymfatických uzlín aj fluidothoraxu. Pre recidivujúcu neutropéniu až stupňa 3, v jednom prípade aj so subfebríliami, boli redukované dávky cytostatík a celkovo bolo podaných 5 kúr RFC a 1× rituximab v monoterapii do februára 2016. Od apríla 2016 do decembra 2017 bolo podaných 11 dávok udržiavacej liečby rituximabom každé 2 mesiace. V júli 2016 na CT obraz PR – hrudník bez lymfadenomegálie a fluidothoraxu, retroperitoneum s lymfatickými uzlinami do 22 mm v priemere, slezina s dlhším rozmerom 152 mm.

### Diskusia

Podľa literatúry [1,2] môže znížiť tvorbu chylothoraxu diéta s obmedzením vstrebávania tukov do lymfatického riečišťa. To vedie k zníženiu – odstráneniu potreby evakuačných punkcií, ktoré sú príčinou malnutície a imunokompromitácie pacienta. Možno to doceliť totálnou parenterálnou výživou alebo nízkotukovou stravou s pridaním triacylglycerolov so stredne dlhým reťazcom (medium-chain triglycerides – MCT), ktoré sa rezorbujú priamo do portálneho riečišťa, obchádzajú lymfatické cievy a tak znižujú tvorbu lymfy. Druhá možnosť často neodstráni potrebu evakuácie [2,3]. Túto pomocnú liečbu sme u prvého pacienta nepovažovali za prínosnú a v druhom prípade sme ju nepoužili

pre postoj pacienta ku kvantite a kvalite stravy.

V prípade malígneho chylothoraxu sa ako prvá používa liečba asociovanej malignity – chemoterapia, kde sa odporúča súčasne aplikovať aj antiinfekčnú profylaxiu a/alebo rádioterapiu [1].

V prípade chylothoraxu asociovaného s CLL sa v literatúre uvádzajú kazuistiky s použitím imunochemoterapie RFC, v jednom prípade [5] s odpoveďou a v dvoch prípadoch [2,6] bez nej. V jednom prípade [6] sa progresia s chylothoraxom vyvinula na liečbe fludarabínom, ale nie je uvedené, či pacient nemal mutácie spojené s nízkou efektívnosťou chemoterapie. V druhom prípade [2] chylothorax pretrval napriek normalizácii krvného obrazu a veľkosti lymfatických uzlín po RFC, rádioterapii a následne vymizol po chirurgickom riešení. Pri folikulovom lymfóme bola popísaná účinná nízkodávkovaná rádioterapia [3] ako aj chemoterapia rituximab + bendamustín [7]. Efekt chemoterapie na chylothorax pri lymfómoch sa popisuje po 3–8 kúrach [8]. V tejto práci prezentované kazuistiky poukazujú na včasný efekt fludarabínového režimu u pacientov s indolentným lymfómom – odstránenie potreby evakuácie chylothoraxu po 3., resp. 1. kúre.

V prípade neefektivity chemoterapie/rádioterapie možno použiť chemickú pleurodéz. Pri malígnom chylothoraxe sa zriedkavo aplikuje chirurgická liečba vrátane pleurektómie a resekcie kompri-

mujúceho tumoru. Popísaný bol aj prípad použitia octreotidu. [1]

### Záver

Obmedzené skúsenosti naznačujú, že fludarabínové režimy u pacientov s indolentnými lymfómami môžu rýchlo viesť popri odpovedi tumoróznej masy aj k regresii chylothoraxu, čo zabraňuje prehlbovaniu malnutície a imunokompromitácie pacienta.

### Literatúra

1. McGrath EE, Blade Z, Anderson PB. Chylothorax: aetiology, diagnosis and therapeutic options. *Resp Med* 2010; 104(1): 1–8. doi: 10.1016/j.rmed.2009.08.010.
2. Scholtz GA, Sirbu H, Semrau S et al. Persisting right-sided chylothorax in a patient with chronic lymphocytic leukemia: a case report. *J Med Case Reports* 2011; 5: 492. doi: 10.1186/1752-1947-5-492.
3. Van De Voorde L, Vanneste B, Borger J et al. Rapid decline of follicular lymphoma-associated chylothorax after low dose radiotherapy to retroperitoneal lymphoma localization. *Case Rep Hematol* 2014; 2014: 684689. doi: 10.1155/2014/684689.
4. Novotný J, Eliáš P. Prínos kontrastného CT v detekcii maligní etiologie pleurálneho výpotku. *Ces Radiol* 2007; 61(4): 392–399.
5. Thomas LC, Maida MJ, Martinez-Outschoorn U et al. Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma with pancytopenia and chylothorax. *Semin Oncol* 2001; 38(2): 165–170. doi: 10.1053/j.seminoncol.2010.11.013.
6. Tanrıverdi H, Uygur F, Tilkan OK et al. Chylothorax due to leukemic infiltration in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Respir Med Case Rep* 2015; 16: 131–133. doi: 10.1016/j.rmcr.2015.09.006.
7. Jagosky M, Taylor B, Taylor SP. A case of chyloperitoneum secondary to follicular lymphoma and a review of prognostic implications. *Case Rep Hematol* 2016; 2016: 4625819. doi: 10.1155/2016/4625819.
8. Janjetovic S, Janning M, Daukeva L et al. Chylothorax in a patient with Hodgkin's lymphoma: a case report and review of the literature. *Tumori* 2013; 99(3): e96–e99. doi: 10.1700/1334.14813.



# The Therapeutic Effects of Specific CDK4/6-inhibitors in Treating HR-positive, HER2-negative Advanced Breast Cancer

Terapeutické účinky specifických inhibitorů CDK4/6 při léčbě pokročilých HR-positivních a HER2-negativních pokročilých karcinomů prsu

Mendoza L.

IQVIA Solutions a. s.

## Introduction

The current oncology practice recommends that all newly diagnosed breast cancers (BC) be evaluated for PR (progesterone receptor) and OR (oestrogen receptor) protein expression by immunohistochemistry [1]. Approximately 70% of patients with metastatic BC have hormone receptor positive (HR+) disease and are commonly treated with hormone-based therapies that include a non-steroidal aromatase inhibitor (NSAI) such as letrozole, anastrozole, or exemestane [2,3]. However, some patients have intrinsic resistance or acquired tolerance to hormone or endocrine therapy, which hampers their survival prolongation [4]. Thus, novel and effective therapies are urgently required for the BC population treated with endocrine therapy.

Cancer derives from uncontrolled cell division, which results from dysregulation of the cell cycle progression, including four stages, G1 (Gap phase 1), S phase (DNA synthesis), G2 (Gap phase 2), and M phase (mitosis). Cyclin D1 is a major transcriptional target of the ER. The cyclin D1-CDK4-RB pathway regulates cell proliferation by controlling the G1 to S cell cycle checkpoint [5,6]. The OR factor (E2F) family of transcription factors are downstream targets of the RB protein, which function in the cell

cycle control and contribute to tumour development [7]. The combination of RB and E2F causes suppression of E2F transcription modules through inducing recruitment of the chromatin remodelling proteins, histone modifiers, and repressive chromatin marks, resulting in cell cycle block [8]. Therefore, the essential roles of CDK4/6 in the cell cycle regulation make them effective targets for cancer therapeutic intervention, especially in BC [9–11]. Fig. 1 shows details of the mechanism of action of the CDK4/6-inhibitors.

## Clinical Trials

Palbociclib (Ibrance®, Pfizer), the most advanced specific CD4/6-inhibitor, was approved by the US FDA (United States Food and Drug Administration) based on the randomised phase II PALOMA-1 study, where palbociclib in combination with letrozole in the 1<sup>st</sup> line setting substantially improved median progression-free survival (mPSF) and yielded an absolute 10-month benefit [12]. In order to further confirm and extend the efficacy and safety data of PALOMA-1, the double-blind phase III PALOMA-2 study enrolled 666 postmenopausal patients with ER+, HER2– advanced breast cancer (ABC) who had not received any treatment for this deadly disease [13].

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.

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



Luis Mendoza, MD, PhD.

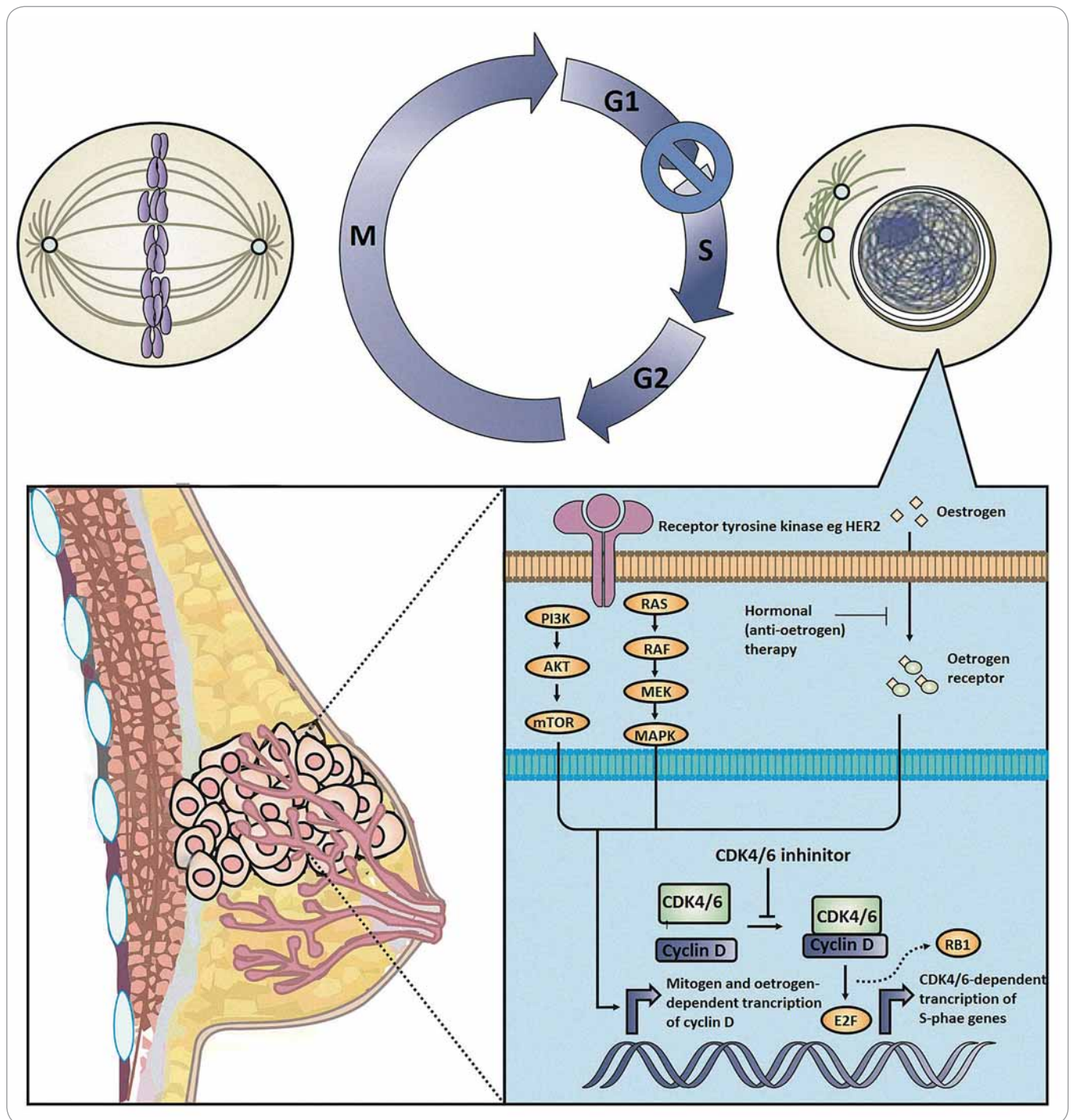
IQVIA Solutions a. s.  
Senior Medical Advisor  
Radlicka 714/113 Praha 5  
158 00 Czech Republic  
e-mail: luis.mendoza@iqvia.com

Submitted/Obdrženo: 3. 2. 2018

Accepted/Přijato: 28. 5. 2018

doi: 10.14735/amko2018305

A total of 444 patients were randomly assigned to receive letrozole (2.5 mg/d oral) + palbociclib (125 mg/d oral in 4-week cycles, 3 weeks of treatment followed by 1 week off), and the other patients received letrozole + placebo. The overall response rate (ORR) was 42.1% in the letrozole + palbociclib arm and 34.7% in the letrozole + placebo arm. In patients with measurable



**Fig. 1. Mechanism of action of CDK4/6 inhibitors.**

In brief, the CDK4/6-cyclin D axis is hyperactive in hormone receptor-positive breast cancer (BC) because estrogen receptor signaling induce the expression of cyclin D1. Selective CDK4/6 inhibitors prevent the assembly of the CDK4/6-cyclin D1 complex, which normally functions to phosphorylate the retinoblastoma (RB) protein in order to liberate transcription factor E2F from the inactive RB-E2F complex. Administration of anti-CDK4/6 agents therefore suppresses the bioavailability of the E2F transcription factor, resulting in decreased transcription and translation of S-phase-related gene sets, causing BC cells to undergo G1 arrest and/or death.

The picture was a courtesy of Dr. Nicholas Syn from the National University of Singapore with small modifications.

disease, the ORR was 55.3% and 44.4%, resp. Evaluation of the primary endpoint, mPFS, indicated that palbociclib in

combination with letrozole dramatically prolonged mPFS (24.8 months) in comparison with letrozole + placebo

(14.5 months) (HR 0.58; 95% CI 0.46–0.72;  $p < 0.001$ ) [13]. In addition to the combination of palbociclib and letrozole,

**Tab. 1. Outcomes of treatment with CD4/6 inhibitors in HR+, HER2- advanced or metastatic breast cancer patients.**

Clinical trial name (trial identifier)	Treatment arms	ORR (%)	ORR (%) in patients with measurable disease	mPFS (months)	Hazard ratio (95% CI)	Ref.
<b>1<sup>st</sup> line setting</b>						
PALOMA-2 (NCT01740427)	letrozole + palbociclib vs. letrozole + placebo	42.1 34.7	55.3 44.4	24.8 14.5	0.58 (0.46–0.72) p < 0.001	[13]
MONALEESA-2 (NCT01958021)	letrozole + ribociclib vs. letrozole + placebo	40.7 27.5	52.7 37.1	NR** 14.7	0.59 (0.41–0.85)	[15]
MONARCH-3 (NCT02246621)	NSAI* + abemaciclib vs. NSAI* + placebo	48.2 34.5	59.2 43.8	NR 14.7	0.54 (0.41–0.72)	[17]
<b>After prior hormonal treatment</b>						
PALOMA-3 (NCT01942135)	fulvestrant + palbociclib vs. fulvestrant + placebo	19 9	25 11	9.5 4.6	0.46 (0.36–0.59) p < 0.001	[14]
MONARCH-2 (NCT02107703)	fulvestrant + abemaciclib vs. fulvestrant + placebo	35.2 16.1	48.1 21.3	16.4 9.3	0.55 (0.45–0.68) p < 0.001	[16]

HR – hormonal receptor, HER2 – human epidermal growth factor receptor 2, NSAI – non-steroidal aromatase inhibitor, ORR – overall response rate, mPFS – median progression-free survival, NR – not reached

\*letrozole or anastrozole

\*\* after 24 months, the mPFS was 25.3 months for the ribociclib arm (updated data)

the efficacy of fulvestrant + palbociclib was also studied in HR+, HER2- ABC that progressed in the process of prior hormone therapy [14]. In the PALOMA-3 study, 347 patients received palbociclib (with the same dosage scheme as PALOMA-2) + fulvestrant (500 mg intramuscularly on day 1 and 15, and on day 1 of subsequent cycles every 28 days) and 174 patients received fulvestrant + placebo. The ORR was 19% in the fulvestrant + palbociclib arm and 9% in the fulvestrant + placebo arm. In patients with measurable disease, fulvestrant + palbociclib achieved an ORR of 25 % compared with 11% in the control arm (Tab. 1). There was a clinically meaningful and statistically significant improvement in mPFS in patients receiving palbociclib + fulvestrant (9.5 months) in comparison with the placebo group (4.6 months) (HR 0.46; 95% CI 0.36–0.59; p < 0.001). The most common grade 3 or 4 adverse events observed in palbociclib-treated arms of the PALOMA-2 and -3 studies were neutropenia, leukopenia, and fatigue. The myelotoxicity effect > grade 3 or

higher was observed in > 50% of the palbociclib-treated patients, but the rate of febrile neutropenia was low. The myelotoxicity effects were successfully managed with appropriate supportive care and dose reductions.

Next to become FDA-approved was ribociclib (Kisqali®, Novartis), which when combined with letrozole in the MONALEESA-2 trial met its primary endpoint – after 18 months, mPFS was not reached in the ribociclib (600 mg/d oral in 4-week cycles, 3 weeks of treatment followed by 1 week off) arm vs. 14.7 months in the letrozole (2.5 mg/d oral) + placebo arm [15]. In this randomised, placebo-controlled, phase III trial, 668 postmenopausal (334 assigned to receive ribociclib + letrozole and 334 assigned to receive placebo + letrozole) women with HR+, HER2- ABC who had not received previous systemic therapy for advanced disease were eligible. The data were updated, and after 24 months, the mPFS for the ribociclib arm showed 25.3 months. The mPFS of the placebo arm remained the same. The ORR was

40.7% in the letrozole + ribociclib arm and 27.5% in the letrozole + placebo arm. The ORR for patients with measurable disease was 52.7% vs. 37.1%, resp. [15] (Tab. 1). The most common grade 3 or 4 adverse events were neutropenia (59.3%), leukopenia (21%), hypertension (9.9%), lymphopenia (6.9%), and increase of liver enzymes in < 10% of the patients treated in the ribociclib arm. A few cases of febrile neutropenia were also reported.

A third selective CDK4/6 inhibitor is abemaciclib (Verzenio®, Eli Lilly and Company), which was granted a breakthrough designation after the positive results from the MONARCH-2 study in HR+, HER2- ABC who had progressed while receiving neoadjuvant or adjuvant endocrine therapy [16]. The MONARCH-2 study enrolled 669 patients of whom 446 were randomly assigned to receive abemaciclib (150 mg 2x daily) + fulvestrant (500 mg intramuscularly on day 1 and 15, and on day 1 of subsequent cycles every 28 days) and 223 placebo + fulvestrant. The ORR was 35.2% in the abemaciclib arm

and 16.1% in the control arm. Patients with measurable disease achieved an ORR of 48.1% in the abemaciclib arm and 21.3% in the control arm. Abemaciclib + fulvestrant significantly extended the mPFS vs. fulvestrant alone (16.4 vs. 9.3 months; HR 0.553; 95% CI 0.4449–0.681;  $p < 0.001$ ) (Tab. 1). In September 2017, the US FDA approved abemaciclib based on the results of the phase III MONARCH-3 trial, which was a double-blind, randomised study of abemaciclib or placebo plus a NSAI in 493 postmenopausal women with HR+, HER2– ABC who had no prior systemic therapy [17]. Patients were randomly assigned 2 : 1 to receive abemaciclib or placebo (150 mg 2x daily orally) or matching placebo plus a NSAI (either 1 mg anastrozole or 2.5 mg letrozole). The ORR was 59.2% in the abemaciclib + NSAI arm and 43.8% in the NSAI + placebo arm. Patients with measurable disease achieved an ORR of 59.2% in the abemaciclib arm and 43.8% in the control arm. The mPFS for the abemaciclib arm was not reached compared with 14.7 months in the placebo arm (0.54; 95% CI 0.41–0.72;  $p = 0.00021$ ) (Tab. 1). In both MONARCH studies, the percentages of grade 3 or 4 myelotoxicity events were lower than those observed in the palbociclib and ribociclib studies.

It is worth noting that individual trials have not been powered to detect a difference in the overall survival, and the follow-up data for survival of the trials are currently immature to conclude the real benefit for these patients in this aspect.

### Conclusions

From the results presented above, it can be concluded that the addition of the three selective approved CDK4/6-inhibitors in CDK4/6-containing regimens enhances ORR and mPFS in the 1<sup>st</sup> line or relapsed setting for HR+, HER2– ABC patients. For this reason, the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) added the following recommendations in the NCCN guidelines version 4 (2017) for BC – the use of CDK4/6-containing regimens

in the 1<sup>st</sup> line setting for the treatment of premenopausal and palbociclib or ribociclib for the treatment of postmenopausal HR+, HER2– ABC patients; and CDK4/6-containing regimens in the 2<sup>nd</sup> line setting for pre- and postmenopausal HR+, HER2– ABC patients [18]. It has to be noted that the concomitant use of CDK4/6 inhibitors to standard adjuvant treatments considerably aggravates the toxic effects of endocrine therapy. Serious haematologic toxicities are inevitably common, consistent with the on-target inhibition of CDKs 4 and 6, which are highly expressed in haematopoietic stem and progenitor cells.

### Discussion

Despite the acceptance of anti-CDK4/6-containing regimens as a new therapeutic benchmark, several questions remain unresolved, especially whether the CDK4/6 inhibitor-containing regimens are more efficient compared with cytotoxic chemotherapy or what is the impact on the overall quality of life due to the toxicity. In fact, there is still a lot to know about the safety and efficacy of CDK4/6-containing regimens across various categories defined by the menopausal status, age, HER2 positivity and biomarkers (RB expression, p16 status). Ongoing clinical trials explore the potential of these agents outside the HR+, HER2– ABC setting, including as adjuvant and neoadjuvant treatments and in combination with chemotherapy and targeted agents. The CDK4/6 inhibitors are being evaluated in women with triple-negative BCs, and since abemaciclib crosses the blood-brain barrier, it is also being evaluated as a treatment for brain metastases, including metastatic BC patients. Finally, CDK4/6 inhibition may result in favorable modulation of the immune microenvironment, and thus combination trials with immune checkpoint blockers have also been initiated.

### References

1. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for

immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(16): 2784–2795. doi: 10.1200/JCO.2009.25.6529.

2. Thorpe SM, Rose C, Rasmussen BB et al. Prognostic value of steroid hormone receptors: multivariate analysis of systemically untreated patients with node negative primary breast cancer. *Cancer Res* 1987; 47(22): 6126–6133.

3. Nomura Y, Miura S, Koyama H et al. Relative effect of steroid hormone receptors on the prognosis of patients with operable breast cancer. A univariate and multivariate analysis of 3089 Japanese patients with breast cancer from the study group for the Japanese breast cancer society on hormone receptors and prognosis in breast cancer. *Cancer* 1992; 69(1):153–164.

4. Milani A, Geuna E, Mittica G et al. Overcoming endocrine resistance in metastatic breast cancer. Current evidence and future directions. *World J Clin Oncol* 2014; 5(5): 990–1001. doi: 10.5306/wjco.v5.i5.990.

5. Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274(5293): 1672–1677.

6. Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathway as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* 2006; 24(11): 1770–1783. doi: 10.1200/JCO.2005.03.7689.

7. Chen HZ, Tsai SY, Leone G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(11): 785–797. doi: 10.1038/nrc2696.

8. Johnson J, Thijssen B, McDermott U et al. Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene* 2016; 35(37): 4829–4835. doi: 10.1038/onc.2016.32.

9. Asghar U, Witkiewicz AK, Turner NC et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2015; 14(2): 130–146. doi: 10.1038/nrd4504.

10. Shah AN, Cristofanilli M. The growing role of CDK4/6 inhibitors in treating hormone receptor-positive advanced breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2017; 18(1): 6. doi: 10.1007/s11864-017-0443-7.

11. Sablin MP, Ricci F, Lohr D et al. Cell cycle inhibitors in endocrine receptor positive breast cancer. *Bull Cancer* 2017; 104(2): 114–122. doi: 10.1016/j.bulcan.2016.12.005.

12. Finn RS, Crown JP, Lang I et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015; 16(1): 25–35. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71159-3.

13. Finn RS, Martin M, Rugo HS et al. Palbociclib and letrozole in advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2016; 375(20): 1925–1936. doi: 10.1056/NEJMoa1607303.

14. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I et al. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(4): 425–439. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00613-0.

15. Hortobagyi GN, Stemmer SM, Burris HA et al. Ribociclib as first-line therapy for HR-positive, advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2016; 375(18): 1738–1748. doi: 10.1056/NEJMoa1609709.

16. Sledge GW, Toi M, Neven P et al. MONARCH 2: abemaciclib in combination with fulvestrant in women with HR+/HER2-advanced breast cancer who had progressed while receiving endocrine therapy. *J Clin Oncol* 2017; 35(25): 2875–2884. doi: 10.1200/JCO.2017.73.7585.

17. Goetz MP, Toi M, Campone M et al. MONARCH 3: abemaciclib as initial therapy for advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 2017; 35: 3628–3646. doi: 10.1200/JCO.2017.75.6155.

18. NCCN. [online]. Available from: <https://www.nccn.org>.

# Onkologie v obrazech

## Nové techniky IGRT – sledování povrchu těla pacienta (SIGRT)

Šimoničová L.<sup>1</sup>, Procházka T.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Klinika radiační onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup>Oddělení radiologické fyziky, Masarykův onkologický ústav, Brno

Techniky léčby zářením se s postupující dobou a novými technickými možnostmi stále zdokonalují. Souborné zobrazovací modalita, plánovací systémy a moderní ozařovací přístroje umožňují přesnou lokalizaci cílových objemů, eskalaci léčebných dávek a současné šetření okolních zdravých tkání. Nové ozařovací techniky tak vyžadují funkční systém kontrol v celém procesu radiotherapie, jehož nedílnou součástí je kontrola polohy pacienta a cílového objemu po celou dobu ozařování.

Ke kontrole správnosti polohy pacienta se čím dál častěji využívá zobrazovacích modalit, potom hovoříme o radiotherapii řízené obrazem (image guided radiotherapy – IGRT), konkrétní zobrazovací modalita pak záleží na technické vybavenosti pracoviště. Většina moderních ozařovačů umožňuje provedení jednak 2D megavoltážních radiografic-

kých snímků, 2D kilovoltážních radiografických snímků, příp. provedení tzv. CBCT (cone beam computed tomography), tedy možnost 3D kontroly a úpravy polohy pacienta na základě srovnání provedení CBCT s plánovacím CT. Jmenované možnosti IGRT využívají ionizující záření a jejich použití znamená další dávku záření pro pacienta.

Klinika radiační onkologie Masarykova onkologického ústavu v Brně je nově vybavena systémem Catalyst firmy C-RAD, který umožňuje sledovat povrch těla pacienta (surface image guided radiation therapy – SIGRT) před zahájením ozařování i v jeho průběhu. Systém pracuje ve viditelné části elektromagnetického spektra, nevyužívá ionizujícího záření a jeho použití tak pro pacienta neznámá další radiační zátěž.

Jelikož systém sleduje povrch těla pacienta, je jeho použití vhodné zejména při ozařování prsu a končetin. Na

Podpořeno MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

Supported by MH CZ – RVO (MOÚ, 00209805).



**Ing. Tomáš Procházka**

Oddělení radiologické fyziky

Masarykův onkologický ústav

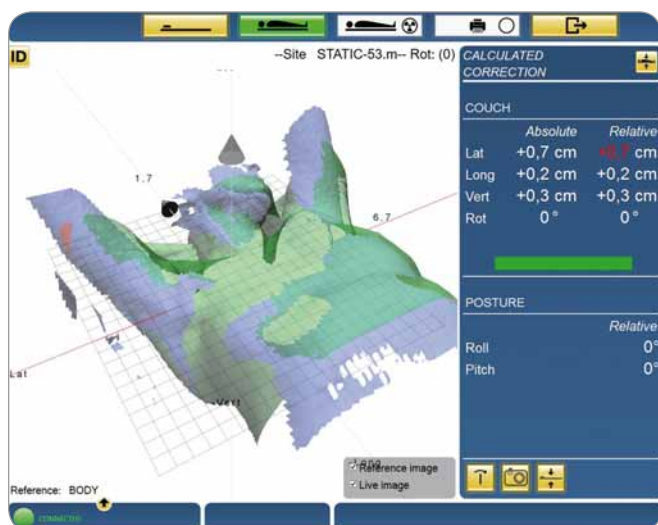
Žlutý kopec 7

565 53 Brno

e-mail: tprochazka@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 11. 6. 2018

obr. 1 a 2 je vidět použití systému během polohování pacientky před ozařením pravé hrudní stěny. Systém Catalyst snímá obraz a srovnává s obrazem referenčním (typicky kontura těla z plánovacího CT). Radiologický asistent tak vidí odchylky v poloze pacienta od žádané ozařovací polohy, současně je zpět



Obr. 1. Systém Catalyst polohování před ozařováním pravé hrudní stěny.



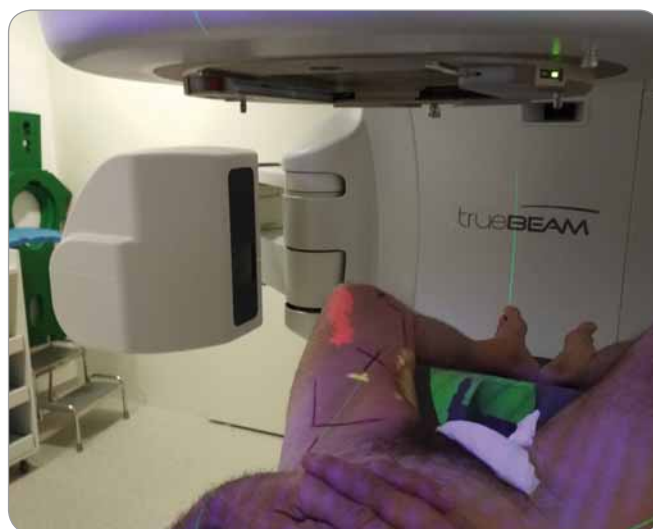
Obr. 2. Polohování před ozařováním pravé hrudní stěny s využitím projekce odchylek na pacienta.



Obr. 3. Systém Catalyst polohování před ozařováním levé dolní končetiny.

na pacienta promítán barevný obraz, ve kterém jsou nevyhovující oblasti zvýrazněny červenou (pozitivní odchylky) nebo žlutou (negativní odchylky) barvou, což polohování pacienta usnadňuje. Příklady použití systému při ozařování levé dolní končetiny jsou na obr. 3 a 4.

Kontrola polohy pacienta probíhá nejen před zahájením ozařování, ale i v jeho průběhu. Catalyst kontinuálně snímá povrch pacienta a kontroluje stálost polohy, v případě náhlé změny polohy (např. zakašláním) dojde k překročení zadaných tolerancí a pozastavení záření.



Obr. 4. Polohování před ozařováním levé dolní končetiny s využitím projekce odchylek na pacienta.

Zařazení SIGRT do radioterapeutických postupů umožní snadnější a přesnější polohování pacientů, zvýšení bezpečnosti pacientů během ozařování a může vést rovněž k redukci přídatných dávek ze zobrazovacích systémů.

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 chechoslovaca.

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!

# Od 1. dne chemoterapie v trojkombinaci PREVENCE CINV<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 jednu hodinu 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, malabsorpčí glukózy a galaktózy nebo deficitem sacharózy-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: skytavka (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 skytavka (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. 5 hliníkových blistrů, každý obsahující jednu 125mg tobolku. Hliníkový blistr obsahující jednu 125 mg tobolku a dvě 80 mg tobolky. 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.msdd.cz

04-2018-ONCO-1214899-0000



# EFEKTIVNÍ HOJENÍ RAN

## SPECIFIKA VZNIKU A CÍLE LÉČBY RAN

### U ONKOLOGICKÝCH PACIENTŮ

**19. 9.****BRNO**

Hotel Continental

**16. 10.****LIBEREC**

Hotel Imperial

**PROGRAM:****13.30–13.45** Registrace účastníků

13.45–13.50 Úvodní slovo

13.50–14.50 Specifika ran u onkologických pacientů a prevence jejich vzniku

**15.00–15.10** Přestávka

15.10–16.10 Život před a po stanovení onkologické diagnózy Ca prsu (Mamma HELP)

**16.10–16.30** Přestávka

16.30–17.40 Cíle a možnosti léčby ran u onkologických pacientů

17.40–18.00 Diskuze

**18.00–18.20** Předávání certifikátů**PŘEDNÁŠEJÍCÍ:****Mgr. Jana Dvořáková,**  
lektor certifikovaného kursu hojení ran,  
NCO NZO, Brno

Konference je určena pro všeobecné sestry, zdravotnické záchranáře a farmaceutické asistenty. **Registrujte se na [www.centram.cz](http://www.centram.cz).** Registrační poplatek 150 Kč. Změna programu vyhrazena.

PARTNER

POŘADATEL

# 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

prof. 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 Kozá, 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).

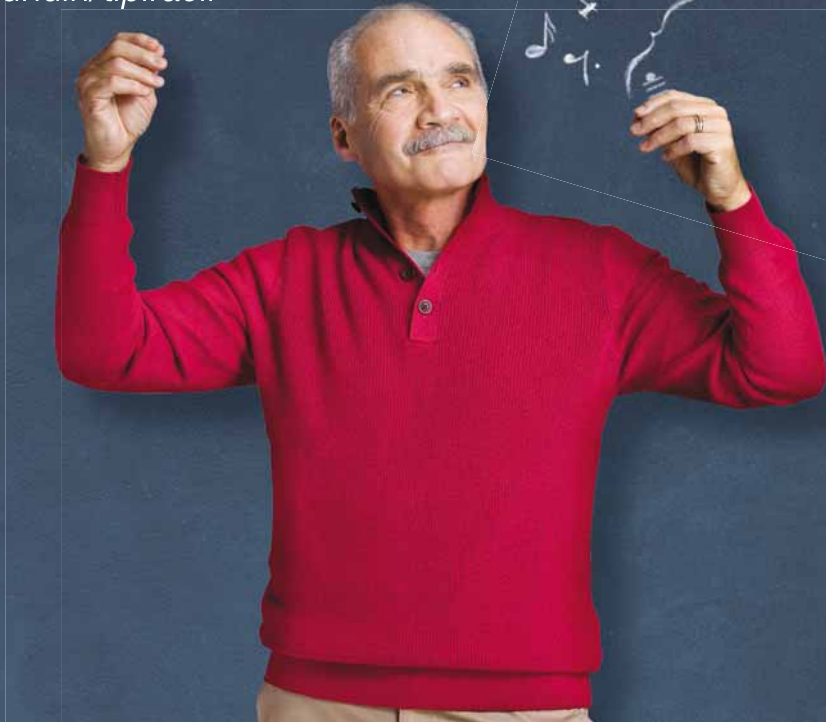
Pokyny pro autory naleznete na [www.linkos.cz](http://www.linkos.cz) v sekci časopisu nebo na [www.klinickaonkologie.cz](http://www.klinickaonkologie.cz).

Toto číslo vychází 15. 8. 2018.

# Léčba předléčených pacientů s mCRC

## Více času na zážitky

**Lonsurf®**  
trifluridin/tipiracil



### Změňte budoucnost vašich pacientů s mCRC

LONSURF® (trifluridin/tipiracil) je indikován pro léčbu dospělých pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem (mCRC), kteří byli v minulosti léčeni nebo nejsou vhodnými kandidáty pro terapie zahrnující chemoterapie založené na fluoropyrimidinu, oxaliplatině a irinotekanu, anti-VEGF látek a anti-EGFR látek.

LONSURF® je vyvíjen společností Servier a Taiho, a na základě licence obchodován v příslušných teritoriích.



TAIHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.



**Zkrácená informace o přípravku Lonsurf®:** ▼ Tento léčivý přípravek podléhá dalšímu sledování.

**SLOŽENÍ\*:** Lonsurf 15 mg/6,14 mg: jedna potahovaná tableta obsahuje trifluridinum 15 mg a tipiracilum 6,14 mg (jako tipiracili hydrochloridum). Lonsurf 20 mg/8,19 mg: jedna potahovaná tableta obsahuje trifluridinum 20 mg a tipiracilum 8,19 mg (jako tipiracili hydrochloridum). **INDIKACE\*:** Léčba dospělých pacientů s metastazujícím kolorektálním karcinomem, kteří byli v minulosti léčeni nebo nejsou vhodnými kandidáty pro dostupné terapie zahrnující chemoterapie založené na fluoropyrimidinu, oxaliplatině a irinotekanu, anti-VEGF látek a anti-EGFR látek. **DÁVKOVÁNÍ A ZPŮSOB PODÁNÍ\*:** *Dávkování:* Doporučená úvodní dávka je 35 mg/m<sup>2</sup>/dávku, podávaných perorálně dvakrát denně 1. až 5. den a 8. až 12. den každého 28denního cyklu do 1 hodiny po ranním a večerním jídle. Dávkování přípravku se počítá podle plochy povrchu těla a nesmí překročit 80 mg v 1 dávce. Úpravy dávkování jsou možné podle individuální bezpečnosti a snášenlivosti; jsou povoleny 3 snížené dávky na minimální hodnotu dávky 20 mg/m<sup>2</sup> dvakrát denně, zvýšení dávky není povoleno poté, co byla snížena. **KONTRAINDIKACE\*:** Hypersenzitivita na léčivé látky nebo na kteroukoli pomocnou látku. **ZVLÁŠTNÍ UPOZORNĚNÍ\*:** Útlum kostní dřeně. Před zahájením terapie, a dále v intervalech potřebných k monitorování toxicity je nutno provádět vyšetření kompletního krevního obrazu, minimálně však před každým léčebným cyklem. Léčba nesmí být zahájena, je-li absolutní počet neutrofilů < 1,5 × 10<sup>9</sup>/l, počet trombocytů < 75 × 10<sup>9</sup>/l, nebo pokud má pacient nevyřešenou klinicky významnou nehematologickou toxicitu stupně 3 nebo 4 z předchozí léčby. Stav pacienta je třeba pečlivě sledovat a, je-li to klinicky indikováno, mají být nasazena adekvátní opatření. *Gastrointestinální toxicita:* antiemetika, léky proti průjmům a další opatření mají být nasazena, je-li to klinicky indikováno, úpravy dávkování (odložení a/nebo snížení) se mají aplikovat tak, jak je třeba. *Porucha funkce ledvin:* přípravek Lonsurf se nedoporučuje u pacientů s těžkou poruchou funkce ledvin nebo terminálním stadiem onemocnění ledvin. Pacienti se středně těžkou poruchou funkce ledvin by měli být častěji monitorováni kvůli hematologické toxicitě. *Porucha funkce jater:* přípravek Lonsurf se nedoporučuje k použití u pacientů s výchozí středně těžkou nebo těžkou poruchou funkce jater. *Proteinurie:* doporučuje se sledovat proteinurii za pomoci diagnostického proužku pro analýzu moči před zahájením a během léčby. *Intolerance laktosy:* Přípravek Lonsurf obsahuje laktosu. **INTERAKCE\*:** Opatrnosti je zapotřebí při používání léčivých přípravků, které jsou substráty pro nukleosidové transportéry CNT1, ENT1 a ENT2, inhibitory OCT2 a MATE1, a substráty lidské thymidin-kinázy (zidovudin). **FERTILITA\* TĚHOTENSTVÍ A KOJENÍ\*:** Nedoporučuje se. **ANTIKONCEPCE\*:** Muži i ženy musí používat účinnou antikoncepci v průběhu léčby a ještě 6 měsíců po ukončení léčby. **ÚČINKY NA SCHOPNOST ŘÍDIT A OBSLUHOVAT STROJE\*:** Během léčby může být pozorována únava, závrať nebo malátnost. **NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY\*:** *Velmi časté:* Neutropenie, leukopenie, anémie, trombocytopenie, snížená chuť k jídlu, průjem, nauzea, zvracení, únava. *Časté:* Infekce dolních cest dýchacích, infekce horních cest dýchacích, febrilní neutropenie, lymfopenie, monocytóza, hypalbuminémie, insomnie, dysgeuzie, periferní neuropatie, závrať, bolest hlavy, zčervenání, dušnost, kašel, bolest břicha, zácpa, stomatitida, orální poruchy, hyperbilirubinémie, syndrom palmoplantární erytrodysestezie, vyrážka, alopecie, pruritus, suchá kůže, proteinurie, pyrexie, edém, zánět sliznic, malátnost, zvýšená hladina jaterních enzymů, zvýšená hladina alkalické fosfatázy v krvi, snížení tělesné hmotnosti. *Méně časté:* Septický šok, střevní infekce, plicní infekce, infekce žlučových cest, chřipka, infekce močových cest, infekce dásní, herpes zoster, tinea pedis, kandidóza, bakteriální infekce, infekce, nádorová bolest, pancytopenie, granulocytopenie, monocytopenie, erytropenie, leukocytóza, dehydratace, hyperglykemie, hyperkalemie, hypokalemie, hypofosfatémie, hypernatremie, hyponatremie, hypokalémie, dna, úzkost, neurotoxická, dysestezie, hyperestezie, hypostezie, synkopa, parestezie, pocit pálení, letargie, snížení zrakové ostrosti, rozostřené vidění, diplopie, katarakta, konjunktivitida, suché oči, vertigo, ušní dyskomfort, angina pectoris, arytmie, palpitace, embolie, hypertenze, hypotenze, plicní embolie, pleurální výpotek, rinorea, dysfonie, orofaryngeální bolest, epistaxe, hemoragická enterokolitida, gastrointestinální krvácení, akutní pankreatitida, ascites, ileus, subileus, kolitida, gastritida, refluxní gastritida, ezofagitida, porucha vyprazdňování žaludku, abdominální distenze, anální zánět, ulcerace v ústech, dyspepsie, gastroesofageální refluxní nemoc, proktalgie, bukalní polyp, krvácení dásní, glositida, periodontální nemoc, onemocnění zubu, říhání, flatulence, zápach z úst, hepatotoxicita, biliární dilatace, olupování kůže, kopřivka, fotosenzitivní reakce, erytém, akné, hyperhidróza, puchýře, porucha nehtů, otok kloubů, artralgie, bolest kostí, myalgie, svalová a kosterní bolest, svalová slabost, svalové křeče, bolest končetin, pocit tíhy, renální selhání, neinfekční cystitida, porucha mikce, hematurie, leukocyturie, menstruační porucha, zhoršení celkového tělesného zdravotního stavu, bolest, pocit změny tělesné teploty, xeróza, zvýšená hladina kreatininu v krvi, elektrokardiogram: prodloužený interval QT, zvýšení INR, prodloužení APTT, zvýšená hladina urey v krvi, zvýšená hladina laktátdehydrogenázy v krvi, pokles celkové hladiny proteinů, vzestup C-reaktivního proteinu, pokles hematokritu. *Post-marketingové zkušenosti:* hlášeny případy intersticiálního plicního onemocnění u pacientů v Japonsku. **PŘEDÁVKOVÁNÍ\* VLASTNOSTI\*:** Trifluridin je antineoplastický analog nukleosidů založený na thymidinu a tipiracil-hydrochlorid je inhibitor thymidin-fosforylázy (TPázy). Po zachycení nádorovými buňkami je trifluridin fosforylován thymidin-kinázou, dále metabolizován v buňkách na substrát kyseliny deoxyribonukleové (DNA) a přímo inkorporován do DNA, čímž narušuje funkci DNA a brání proliferaci buněk. Po perorálním podání je však trifluridin rychle rozkládán TPázou a ihned metabolizován efektem prvního průchodu, proto je do složení přidán inhibitor TPázy, tipiracil-hydrochlorid. **PODMÍNKY UCHOVÁVÁNÍ\*:** Nevyžaduje žádné zvláštní podmínky uchovávání. **BALENÍ\*:** Balení obsahuje 20, 40 nebo 60 potahovaných tablet. **Datum poslední revize textu:** 08/2017. **Registrační číslo:** EU/1/16/1096/001-006. **Držitel registračního rozhodnutí:** Les Laboratoires Servier, 50 rue Carnot, 92284 Suresnes cedex, Francie. Před předepsáním přípravku si přečtěte Souhrn údajů o přípravku. Výdej léčivého přípravku je vázán na lékařský předpis. Přípravek je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění, viz Seznam cen a úhrad léčivých přípravků: <http://www.sukl.cz/sukl/seznam-leviciv-a-pzlu-hrazenych-ze-zdrav-pojisteni> platný od 1.10.2017, Od 2.10.2017 je přípravek k dispozici v lékárnách. **Další informace** lze vyžádat na adrese Servier s.r.o., Na Florenci 2116/15, 110 00 Praha 1, tel.: (+420) 222 118 111, [www.servier.cz](http://www.servier.cz)

\* pro úplnou informaci si prosím přečtěte celý Souhrn údajů o přípravku

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 uchování:** 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