

KLINICKÁ ONKOLOGIE

TÉMA: IMUNOTERAPIE



Editorial

Úspěchy imunologické léčby inhibitory kontrolních bodů v onkologii jsou nepochybnitelné. V posledních 10 letech způsobily tyto léky revoluci v léčbě melanomu a podstatně zlepšily prognózu pacientů s metastatickým renálním karcinomem, plicním karcinomem, kolorektálním karcinomem s mikrosatelitovou instabilitou, nádory sliznic hlavy a krku, trojitě negativním karcinomem prsu, uroteliálními nádory a některými dalšími malignitami.

Fyziologickou rolí receptorů PD-1 a CTLA-4 je limitace imunitní reakce proti cizorodým antigenům tak, aby nedošlo k závažnému poškození orgánů, nebo dokonce celého organismu. Autoimunitní nežádoucí účinky jsou relativně časté, zejména u podávání kombinací imuno-onkologických léků, avšak jejich fatální průběh je při správné a včasné léčbě naštěstí vzácný. Žádný z imuno-onkologických léků není bez potenciálu tyto reakce vyvolávat. Podle rozsáhlé metaanalýzy studií u nemalobuněčného plicního karcinomu není většího rozdílu v toxicitě mezi anti-PD-1 a anti-PD-L1 protilátkami. Míra imunitně podmíněných nežádou-

cích účinků při léčbě inhibitory PD-1 byla 16 % ve srovnání s 11 % u inhibitorů PD-L1 ($p = 0,07$), při incidenci závažných toxicit (stupně 3–5) 3 % u anti-PD-1 a 5 % u anti-PD-L1 ($p = 0,4$) [1,2].

Prediktivní parametry pro účinek ani toxicitu imuno-onkologické léčby zatím nebyly validovány. Některé studie ukazují na spojení mezi toxicitou imunoterapie a složením střevního mikrobiomu. Francouzská studie u nemocných s melanomem léčených ipilimumabem ukázala, že pacienti, jejichž střevní mikrobiota byla obohacena rodem *Faecalibacterium* a jinými zástupci kmene *Firmicutes*, měli jednak delší přežití, jednak vyšší riziko kolitidy ve srovnání s pacienty s vyšším obsahem bakterií kmene *Bacteroidetes* [3].

Jak píše v tomto čísle ve svém článku Ondřej Fiala, souvislost mezi efektem imunoterapie a výskytem nežádoucích účinků lze považovat za prokázanou. Proto lze usuzovat i na společnou podstatu a neoddělitelnost léčebného a terapeutického účinku a zaměřit úsilí především na dostatečnou edukaci nemocných a připravenost onkologických

pracovišť rychle a účinně zasáhnout v případě nežádoucích účinků.

Velká část tohoto čísla Klinické onkologie je věnovaná právě nejčastějším typům imunitní toxicity inhibitorů kontrolních bodů, především jejich diagnostice a léčbě. Autory článků jsou odborníci z předních pracovišť, která mají s imuno-onkologickou léčbou již dlouholeté zkušenosti a stovky léčených pacientů.

doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

Onkologická klinika

1. LF UK a Thomayerovy nemocnice

Literatura

1. Pillai RN, Behera M, Owonikoko TK et al. Comparison of the toxicity profile of PD-1 versus PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer: a systematic analysis of the literature. *Cancer* 2018; 124(2): 271–277. doi: 10.1002/cncr.31043.
2. Spagnuolo A, Gridelli C. Comparison of the toxicity profile of PD-1 versus PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer: is there a substantial difference or not? *J Thorac Dis* 2018; 10 (Suppl 33): S4065–S4068. doi: 10.21037/jtd.2018.09.83.
3. Chaput N, Lepage P, Coutzac C et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol* 2017; 28(6): 1368–1379. doi: 10.1093/annonc/mdx108.

BOJUJEME S NÁDOROVÝMI ONEMOCNĚNÍMI

Pacienti jsou v centru
všeho, co děláme.
Inspirují nás.
Motivují nás.



Bristol-Myers Squibb je globální biofarmaceutická společnost zaměřující se na vývoj inovativních způsobů léčby a podporu biofarmaceutického výzkumu.

Naším posláním je objevovat, vyvíjet a dodávat moderní léky, které pomáhají pacientům zvítězit nad nádorovými onemocněními.

Náš závazek vyvíjet inovativní léky je tak silný jako vůle pacientů bojovat proti závažným onemocněním. Naši vědci se snaží objevit nový typ léků, které dají pacientům naději. Nakonec bude náš úspěch měřen jedinou věcí: jak dokážeme změnit životy pacientů.

Obsah | Contents

Editorial	3
IMUNOTERAPIE IMMUNOTHERAPY	
Nežádoucí účinky a efekt imunoterapie Side Effects and Efficacy of Immunotherapy Fiala O., Šorejs O., Šustr J., Fínek J.	8
Neurotoxická a imunoterapie Neurotoxicity and Immunotherapy Kopecký J.	11
Management imunitně podmíněné endokrinní patologie při protinádorové léčbě checkpoint inhibitory Management of Immune-Related Endocrinopathies in Anticancer Treatment with Checkpoint Inhibitors Lakomý R., Poprach A., Kazda T.	15
Toxicita imuno-onkologické léčby – myokarditida Immunotherapy-Associated Myocarditis Spisarová M.	20
Gastrointestinální toxicita imunoterapie Gastrointestinal Toxicity of Immunotherapy Špaček J.	23
Renální toxicita imuno-onkologické léčby Renal Toxicity of Cancer Immunotherapy Büchler T.	29
PŘEHLEDY REVIEWS	
The Important Role of STAT3 in Chronic Lymphocytic Leukaemia Biology Důležitá role STAT3 v biologii chronické lymfocytární leukemie Boudny M., Trbusek M.	32
Význam fibroblastů asociovaných s nádorem při patogenezi karcinomů v oblasti hlavy a krku The Importance of Cancer-Associated Fibroblasts in the Pathogenesis of Head and Neck Cancers Raudenská M., Svobodová M., Gumulec J., Falk M., Masařík M.	39

PŮVODNÍ PRÁCE | ORIGINAL ARTICLES

Dlouhodobé klinické výsledky IGRT karcinomu prostaty

Long-Term Clinical Results of IGRT in Prostate Cancer Treatment

Doležel M., Odrážka K., Vaňásek J., Štuk J., Hlávka A., Vítková M., Ulrych V., Kohlová T., Vlachová Z., Hafuda A., Hartmann I.

49

Expresia ligandu receptora programovanej bunkovej smrti 1 v biopsii nemalobunkového karcinómu pľúc a jej asociácia s tumor infiltrujúcimi lymfocytmi a stupňom dezmozplázie

Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non-Small Cell Lung Carcinoma Biopsies and Its Association with Tumor Infiltrating Lymphocytes and the Degree of Desmoplasia

Tancoš V., Grendár M., Farkašová A., Huťka Z., Kviatková Z., Plank L.

55

SDĚLENÍ | COMMUNICATION

Novinky z genetiky, molekulární biologie a klinické onkologie sarkomů

Novel Aspects of Genetics, Molecular Biology and Clinical Oncology of Sarcomas

Houfková K., Hatina J.

66

RŮZNÉ | VARIOUS

Vzpomínka na prof. MUDr. Vítězslava Kolka, DrSc.

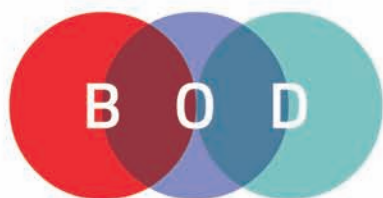
78

Prof. MUDr. Stanislav Špánik, CSc. – 60-ročný

79

AKTUALITY Z ODBORNÉHO TISKU | REPORTS FROM THE LITERATURE

80



44. Brněnské onkologické dny / 34. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky 2020

Výstaviště Brno, Pavilon E / 22.–24. dubna 2020

se v roce 2020 těší na Vaši účast!

Přihlaste Vaše sdělení do těchto tematických bloků:

Onkologická prevence a screening
Organizace a financování zdravotní péče
Pacientské organizace
Epidemiologie nádorů, klinické registry, zdravotnická
informatika
Vzdělávání, kvalita a bezpečnost v onkologické praxi
Diagnostické metody v onkologii
Onkochirurgie, rekonstrukční chirurgie
Radioterapeutické metody
Nežádoucí účinky protinádorové léčby
Paliativní péče a symptomatická léčba
Nutriční podpora v onkologii
Ošetrovatelská péče a rehabilitace
Psychosociální péče
Hereditární nádorové syndromy
Nádory prsu
Nádory kůže a maligní melanom
Nádory jícnu a žaludku

Nádory tlustého střeva a konečníku
Nádory slinivky, jater a žlučových cest
Nádory skeletu a sarkomy
Nádory hlavy a krku
Nádory hrudníku, plic, průdušek a pleury
Gynekologická onkologie
Uroonkologie
Neuroendokrinní a endokrinní nádory
Nádory nervového systému
Hematoonkologie
Nádory dětí, adolescentů a mladých dospělých
Vývoj nových léčiv, farmakoekonomika,
klinická farmacie v onkologii
Základní a aplikovaný výzkum v onkologii
Lokální aplikace protinádorových léčiv a vakcín,
radiointervenční metody
Integrativní přístupy v onkologii
Varia (ostatní, jinde nezařazené příspěvky)

Připravujeme pro Vás zajímavý odborný a doprovodný program, včetně několika soutěží!

Soutěž o nejlepší přednášku BOD – Soutěž o nejlepší přednášku KNZP – Soutěž o nejzajímavější kazuistiku
To nejlepší z onkologického výzkumu – Soutěž o nejlepší posterové sdělení

Edukační bloky

Karcinom plic, karcinom prsu, metastatický karcinom rekta, imuno-onkologie, paliativní péče v onkologii, geriatrická onkologie, onkochirurgie, onkogynekologie, nádory hlavy a krku, urogenitální nádory, endokrinní a neuroendokrinní nádory, cévní vstupy, precizní onkologie.

Poznamenejte si!

Zahájení on-line registrace: **1. ledna 2020.**

Poslední termín k registraci aktivní účasti a zaslání abstrakt příspěvků je **15. února 2020.**

Poslední termín k on-line registraci pasivní účasti je **22. března 2020.**

Dotazy: bod@mou.cz

www.onkologickedny.cz

Nežádoucí účinky a efekt imunoterapie

Side Effects and Efficacy of Immunotherapy

Fiala O.^{1,2}, Šorejs O.^{1,2}, Šustr J.¹, Fínek J.¹

¹ Onkologická a radioterapeutická klinika LF UK a FN Plzeň

² Biomedicínské centrum LF UK v Plzni

Souhrn

Východiska: Moderní imunoterapie založená na tzv. checkpoint inhibitech představuje inovativní léčbu, která se již běžně uplatňuje v léčbě řady malignit a u mnoha dalších je cílem různě pokročilého klinického výzkumu. Nejčastěji jsou zde využívány monoklonální protilátky proti CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) a PD-1 (programmed cell death-1) nebo PD-L1 (programmed cell death-1 ligand). Specifikem této léčby jsou nežádoucí účinky, které se svým charakterem blíží autoimunitním onemocněním. V poslední době narůstají důkazy o tom, že výskyt některých nežádoucích účinků imunoterapie je asociován s příznivým efektem této léčby. **Cíl:** Cílem této přehledové práce bylo sumarizovat dosavadní poznatky o asociaci výskytu nežádoucích účinků checkpoint inhibitorů s efektem této léčby. **Závěr:** Souvislost mezi efektem imunoterapie a výskytem nežádoucích účinků byla zjištěna v řadě studií. Nejlépe byla dokumentována u pacientů s maligním melanomem, nemalobuněčným karcinomem plic a renálním karcinomem. Většina publikovaných studií je limitovaná relativně nízkým množstvím pacientů a retrospektivním designem. Stále zde tedy zůstává velké množství nezodpovězených otázek.

Klíčová slova

imunoterapie – checkpoint inhibitory – nežádoucí účinky – efekt

Summary

Background: Modern immunotherapy based on immune checkpoint inhibitors is an innovative treatment, which is already used in the treatment of a number of malignancies, and many other checkpoint inhibitors have been investigated in clinical trials. Monoclonal antibodies against CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) and PD-1 (programmed cell death-1) or PD-L1 (programmed cell death-1 ligand) are the most commonly used agents. The side effects of these treatments are similar in nature to those of autoimmune diseases. Recently, increasing evidence has indicated that some adverse effects of immunotherapy are associated with the beneficial effect of this treatment. **Purpose:** The aim of this review was to summarize current knowledge of the association between the adverse effects of checkpoint inhibitors and the outcomes of patients treated with this therapy. **Conclusion:** The association between the effect of immunotherapy and the occurrence of adverse reactions has been identified in a number of studies. It has been best documented in patients with malignant melanoma, non-small cell lung cancer, and renal cell carcinoma. Many studies published so far are limited by the relatively low number of patients and their retrospective design, leaving many questions still unanswered.

Key words

immunotherapy – checkpoint inhibitors – side effects – efficacy

Práce byla podpořena Národním programem udržitelnosti I (NPU I) č. LO1503 poskytovaným MŠMT ČR; projektem „Centrum klinické a experimentální jaterní chirurgie, UNCE/MED/006“ poskytovaným MŠMT ČR; programem rozvoje vědních oborů Univerzity Karlovy (Progres Q39); projektem „Aplikace moderních technologií v medicíně a průmyslu“ reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280 financovaného z EFRR.

This work was supported by the National Sustainability Program I (NPU I) Nr. LO1503 provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic and by the Charles University Research Fund (Progres Q39) and by the European Regional Development Fund-Project „Application of Modern Technologies in Medicine and Industry“ (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/17_048/0007280).

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.



doc. MUDr. Ondřej Fiala, Ph.D.
Onkologická a radioterapeutická
klinika
LF UK a FN Plzeň
alej Svobody 80
304 60 Plzeň-Lochotín
e-mail: fialao@fnplzen.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 11. 2019

Přijato/Accepted: 8. 12. 2019

doi: 10.14735/amko20208

Úvod

Moderní imunoterapie založená na blokadě kontrolních bodů imunity, tzv. checkpoint inhibitory (immune checkpoint inhibitor – ICI), představuje inovativní léčbu, která v současné době doslova hýbe světem onkologie. Nejčastěji jsou zde zkoumány monoklonální protilátky proti CTLA-4 (cytotoxický T-lymphocytový antigen-4) a PD-1 (programmed cell death-1) nebo PD-L1 (programmed cell death-1 ligand). V současné době máme k dispozici již celou řadu těchto preparátů, které v klinických studiích prokázaly svou účinnost u různých malignit. Mnohé z nich již nalezly své pevné místo v běžné klinické praxi, jiné jsou zatím v různé pokročilé fázi klinického zkoušení. Mezi diagnózy, kde se léčba ICI již dobře etablovala a je běžně využívána i v našich podmínkách, patří zejména maligní melanom, nemalobuněčný karcinom plic a renální karcinom. Z dalších malignit, u kterých tato léčba prokázala účinnost nebo probíhají klinické studie s nadějnými výsledky, lze uvést např. uroteliální karcinom, malobuněčný karcinom plic, dlaždicobuněčný karcinom hlavy a krku, karcinom žaludku, karcinom prsu, také některé hematologické malignity mimo solidní nádory. Na rozdíl od chemoterapie nebo cílené léčby má imunoterapie některá specifika, co se týče charakteru léčebné odpovědi a nežádoucích účinků. Překonání imunotolerance vůči nádoru může být provázeno nežádoucím porušením imunotolerance vůči „normálním tkáním“. Důsledkem toho je pak vznik nežádoucích účinků, které se svým charakterem blíží autoimunitním onemocněním (immune related adverse effect – irAE). Tyto irAE jsou pro imunoterapii do značné míry typické. Obecně je možné je rozdělit na orgánově specifické a orgánově nespecifické nebo podle doby výskytu na časně a pozdní. Nežádoucí účinky mohou vést k poškození jakéhokoliv orgánu, vč. kůže, střev, jater, ledvin, očí, endokrinních žláz, srdce, svalů, centrálního nebo periferního nervového systému.

V poslední době narůstají důkazy o tom, že výskyt některých irAE je asociován s příznivým efektem terapie a ve výsledku s přežitím takto léčených pa-

cientů. Tento efekt je zatím nejlépe zdokumentován u pacientů s maligním melanomem, nemalobuněčným karcinomem plic (non-small cell lung cancer – NSCLC) a renálním karcinomem, tedy u diagnóz, kde jsou s imunoterapií největší zkušenosti.

Maligní melanom

Souvislost mezi irAE a účinností ICI byla poprvé popsána u pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým maligním melanomem, ačkoliv publikovaná data týkající se léčby ipilimumabem a PD-1 inhibitory nejsou zcela konzistentní.

První retrospektivní analýza pacientů léčených ipilimumabem (n = 56), kterou publikovali Attia et al, ukázala, že u 36 % pacientů s irAE stupně 3–4 byla zaznamenána léčebná odpověď, oproti tomu u pacientů bez nebo s nízkým stupněm irAE bylo dosaženo léčebné odpovědi jen u 5 % [1]. Tyto výsledky následně potvrdila kombinovaná analýza dvou klinických studií (n = 139), která ukázala, že irAE libovolného stupně u pacientů léčených ipilimumabem byly významně spojené s pravděpodobností léčebné odpovědi (p = 0,0004), a bylo pozorováno výrazně delší trvání dosažené odpovědi u pacientů s irAE stupně 3–4 oproti pacientům s irAE nízkého stupně (34 vs. 11 měsíců) [2]. Studie dále ukázala, že trvání léčebné odpovědi nebylo negativně ovlivněno nutností užívání vysokých dávek kortikosteroidů k řešení nežádoucích účinků [2]. Některé studie ukázaly význam zejména kožních irAE. Významnou asociaci přežití pacientů a vzniku vitiliga ukazují výsledky metaanalýzy studií u pacientů léčených ipilimumabem, kde bylo vitiligo spojeno s delším přežitím bez progresu (progression-free survival – PFS) i celkovým přežitím (overall survival – OS) (HR 0,51; p = 0,005 a HR 0,25; p = 0,003) [3]. V minulosti byly podobné výsledky zaznamenány u pacientů s melanomem léčených vysoce dávkovaným interferonem nebo vysoce dávkovaným interleukinem 2 [4,5]. Dalším typem irAE, jehož výskyt je popisován v souvislosti s příznivým efektem imunoterapie, je endokrinopatie, nejčastěji v podobě hypopituitarizmu nebo hypothyreózy. Fujisawa et al pozorovali sig-

nifkantní asociaci výskytu endokrinních irAE s OS u pacientů (n = 60) léčených ipilimumabem (HR 0,22; p = 0,015) [6].

Analýza dat bezpečnosti nivolumabu získaných ze čtyř prospektivních klinických studií (n = 576) ukázala vyšší dosažení léčebné odpovědi (overall response rate – ORR) u pacientů se zaznamenanými irAE jakéhokoliv stupně (48,6 vs. 17,8 %; p < 0,0001) [7]. Další analýza pacientů léčených nivolumabem ukázala, že pouze kožní irAE v podobě exantému a vitiliga byly signifikantně asociovány s OS (p = 0,0004 a p = 0,028) [8]. Maeda et al pozorovali významnou asociaci výskytu endokrinních irAE s dosažením kontroly nemoci (disease control rate – DCR) (84,6 vs. 37,5 %; p = 0,004) u pacientů (n = 69) léčených nivolumabem, byl zde pozorován i trend delšího PFS [9].

Analýza prospektivně sbíraných dat holandských pacientů léčených pembrolizumabem (n = 147) ukázala vyšší DCR u pacientů s irAE jakéhokoliv stupně (75,0 vs. 17,9 %; p = 0,02), nejlepších výsledků dosahovali pacienti s irAE vyššího stupně, u nich bylo zjištěno i delší PFS a OS oproti pacientům bez irAE [10].

Nemalobuněčný karcinom plic

U pacientů s pokročilým a metastatickým NSCLC byla souvislost irAE s efektem léčby ICI dokumentována zejména při léčbě anti-PD-1 a anti-PD-L1 inhibitory.

Souvislost efektu léčby nivolumabem s irAE u NSCLC (n = 40) poprvé dokumentovali Hasan Ali et al, kteří popsali asociaci léčebné odpovědi s kožní toxicitou [11]. Retrospektivní analýza pacientů léčených nivolumabem (n = 134) ukázala vyšší ORR (52,3 vs. 27,9 %; p = 0,02) a delší PFS (HR 0,542; p = 0,04) i OS (HR 0,285; p = 0,003) u pacientů s irAE. Jednalo se o landmark analýzu po 6 týdnech léčby (tj. byli zahrnuti pouze pacienti s minimální dobou expozice 6 týdnů) [12]. Co se týče typu irAE, kožní irAE byly spojeny s PFS (HR 0,476; p = 0,03) i OS (HR 0,209; p = 0,003), endokrinní irAE ukázaly souvislost jen s PFS (HR 0,237; p = 0,02) [12]. Následně byly publikovány dvě větší retrospektivní studie. Ricciuti et al ukázali v analýze pacientů léčených nivolumabem (n = 195) vyšší ORR (43,5 vs. 10,0 %; p < 0,0001)

a DCR (70,5 vs. 18,1%; $p < 0,0001$), i delší PFS a OS (HR 0,41; $p < 0,0001$ a HR 0,33; $p < 0,0001$) u pacientů s irAE oproti pacientům bez nich [13]. Coxův vícerozměrný model ukázal jako nezávislé faktory pro PFS: jakékoliv irAE (HR 0,48; $p < 0,0001$), plicní irAE (HR 0,56; $p = 0,038$), gastrointestinální irAE (HR 0,52; $p = 0,021$), endokrinní irAE (HR 0,59; $p = 0,011$) a kožní irAE (HR 0,57; $p = 0,031$); nezávislé faktory pro OS byly: jakékoliv irAE (HR 0,38; $p < 0,0001$), plicní irAE (HR 0,46; $p = 0,022$), gastrointestinální irAE (HR 0,50; $p = 0,045$), endokrinní irAE (HR 0,45; $p = 0,001$) a kožní irAE (HR 0,80; $p = 0,043$) [13]. Výsledky studie rovněž ukázaly delší PFS i OS pacientů s ≥ 2 typy irAE oproti pacientům s 1 irAE oproti pacientům bez irAE (PFS 8,5 vs. 4,6 vs. 2,0 měsíce; $p < 0,0001$; OS 26,8 vs. 11,9 vs. 4,0 měsíce; $p < 0,0001$) [13]. Souvislost výskytu irAE s efektem léčby anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab) a anti-PD-L1 (atezolizumab) inhibitory ($n = 270$) byla recentně potvrzena retrospektivní studií, kterou publikovali Grangeon et al [14]. Výsledky této studie ukázaly asociaci mezi výskytem irAE a ORR (22,9 vs. 5,7 %; $p < 0,0001$), DCR (72,4 vs. 36,7 % $p < 0,001$), PFS (HR 0,42; $p < 0,001$) i OS (HR 0,29; $p < 0,001$) [14]. Studie rovněž potvrdila asociaci vzniku hypotyreózy s PFS (HR 0,56; $p = 0,005$) i OS (HR 0,46; $p = 0,01$) [14].

Renální karcinom

U pacientů s metastickým renálním karcinomem je důkazů o souvislosti irAE s efektem léčby ICI dosud relativně málo. Byly publikovány dvě retrospektivní analýzy pacientů léčených nivolumabem. První studie provedená Ishiharou et al ($n = 47$) ukázala vyšší ORR (60,9 vs. 12,5 %; $p = 0,0006$) a delší PFS ($p < 0,0001$) i OS ($p = 0,0072$) u pacientů s irAE [15]. Coxův vícerozměrný model potvrdil výskyt irAE jako nezávislého faktoru pro PFS (HR 0,25; $p = 0,0009$), analýza OS nebyla provedena [15]. PFS bylo delší jak u pacientů s irAE stupně 1–2 ($p = 0,0024$), tak u pacientů s irAE stupně ≥ 3 ($p = 0,0023$) v porovnání s pacienty bez irAE; OS

signifikantně korelovalo pouze s irAE stupně 1–2 oproti pacientům s vyšším stupněm ($p = 0,0124$) [15]. Co se týče typu irAE, signifikantní asociace s PFS a OS byla prokázána pouze pro kožní toxicitu ($p = 0,011$) [15]. Výsledky následně publikované retrospektivní studie ($n = 389$) potvrdily signifikantní asociaci výskytu irAE s OS, verifikovanou vícerozměrným Coxovým modelem (HR 0,57; $p = 0,002$) [16]. V landmark analýze OS v 6 týdnech od zahájení léčby přetrvávala signifikantní asociace s irAE ($p = 0,006$). Při analýze ročního OS nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi irAE stupně 1–2 a stupně 3–4 (60,9 vs. 79,6 %; $p = 0,19$) ani mezi časným (do 6 týdnů od zahájení) a pozdním (nad 6 týdnů od zahájení) výskytem irAE (78,7 vs. 85,2 %; $p = 0,34$) [16].

Závěr

Zprávy poukazující na souvislost irAE s efektem léčby ICI postupně přibývá. Většina publikovaných prací pochází z posledních několika let. Jedná se tedy o téma v současné době velmi aktuální. Řada doposud publikovaných studií je limitovaná relativně nízkým počtem pacientů. Retrospektivní studie jsou většinou zatíženy nepřesným zpětným hodnocením toxicity, která nemusí být přesně zanesena v dokumentaci, a často tak dochází k podhodnocení, zejména nežádoucích účinků nižšího stupně. Stále zde tedy zůstává velké množství nezodpovězených otázek. Detailní porozumění asociaci mezi irAE a efektem léčby ICI může mít, mimo jiné, význam v klinicky problematických situacích, kdy je obtížné rozlišit pseudoprogresi a reálnou progresi nálezu.

Literatura

1. Attia P, Phan GQ, Maker AV et al. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 2005; 23(25): 6043–6053. doi: 10.1200/JCO.2005.06.205.
2. Downey SG, Klapper JA, Smith FO et al. Prognostic factors related to clinical response in patients with metastatic melanoma treated by CTL-associated antigen-4 blockade. *Clin Cancer Res* 2007; 13(22): 6681–6688. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0187.

3. Teulings HE, Limpens J, Jansen SN et al. Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III–IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2015; 33(7): 773–781. doi: 10.1200/JCO.2014.57.4756.
4. Gogas H, Ioannovich J, Dafni U et al. Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon. *N Engl J Med* 2006; 354(7): 709–718. doi: 10.1056/NEJMoa053007.
5. Boasberg PD, Hoon DS, Piro LD et al. Enhanced survival associated with vitiligo expression during maintenance biotherapy for metastatic melanoma. *J Invest Dermatol* 2006; 126(12): 2658–2663. doi: 10.1038/sj.jid.5700545.
6. Fujisawa Y, Yoshino K, Otsuka A et al. Retrospective study of advanced melanoma patients treated with ipilimumab after nivolumab: analysis of 60 Japanese patients. *J Dermatol Sci* 2018; 89(1): 60–66. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.10.009.
7. Weber JS, Hodi FS, Wolchok JD et al. Safety profile of nivolumab monotherapy: a pooled analysis of patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2017; 35(7): 785–792. doi: 10.1200/JCO.2015.66.1389.
8. Freeman-Keller M, Kim Y, Cronin H et al. Nivolumab in resected and unresectable metastatic melanoma: characteristics of immune-related adverse events and association with outcomes. *Clin Cancer Res* 2016; 22(4): 886–894. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1136.
9. Maeda T, Yoshino K, Nagai K et al. Development of endocrine immune-related adverse events and improved survival in advanced melanoma patients treated with nivolumab monotherapy. *Eur J Cancer* 2019; 115: 13–16. doi: 10.1016/j.ejca.2019.04.005.
10. Bisschop C, Wind TT, Blank CU et al. Association between pembrolizumab-related adverse events and treatment outcome in advanced melanoma: results from the Dutch expanded access program. *J Immunother* 2019; 42(6): 208–214. doi: 10.1097/CJI.0000000000000271.
11. Hasan Ali O, Diem S, Markert E et al. Characterization of nivolumab-associated skin reactions in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *Oncimmunology* 2016; 5(11): e1231292. doi: 10.1080/2162402X.2016.1231292.
12. Haratani K, Hayashi H, Chiba Y et al. Association of immune-related adverse events with nivolumab efficacy in non-small-cell lung cancer. *JAMA Oncol* 2018; 4(3): 374–378. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.2925.
13. Ricciuti B, Genova C, De Giglio A et al. Impact of immune-related adverse events on survival in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with nivolumab: long-term outcomes from a multi-institutional analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019; 145(2): 479–485. doi: 10.1007/s00432-018-2805-3.
14. Grangeon M, Tomasini P, Chaleat S et al. Association between immune-related adverse events and efficacy of immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2019; 20(3): 201–207. doi: 10.1016/j.clcc.2018.10.002.
15. Ishihara H, Takagi T, Kondo T et al. Association between immune-related adverse events and prognosis in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with nivolumab. *Urol Oncol* 2019; 37(6): 355.e21–355.e29. doi: 10.1016/j.urolonc.2019.03.003.
16. Verzoni E, Carteni G, Cortesi E et al. Real-world efficacy and safety of nivolumab in previously-treated metastatic renal cell carcinoma, and association between immune-related adverse events and survival: the Italian expanded access program. *J Immunother Cancer* 2019; 7(1): 99. doi: 10.1186/s40425-019-0579-z.

Neurotoxicita a imunoterapie

Neurotoxicity and Immunotherapy

Kopecký J.

Klinika onkologie a radioterapie FN Hradec Králové

Souhrn

Východiska: V poslední době bylo dosaženo velkého pokroku na poli imunoterapie napříč solidními nádory. Avšak s příchodem imunoterapie jsme vystaveni nejen odlišnému mechanismu účinku, ale i odlišným projevům nežádoucích účinků. Jedná se o účinky podobné autoimunitním onemocněním označované jako imunitně podmíněné nežádoucí účinky. Ve většině případů se jedná o účinky nižšího stupně závažnosti. Mezi méně časté nežádoucí účinky patří i neurotoxicita. S rozšířením používání imunoterapie je nutné předpokládat, že i nežádoucí účinky s nižší incidencí se při širším použití mohou vyskytnout v relativně vyšším počtu a mohou se s nimi setkat i lékaři mimo onkologická pracoviště. Hlavní léčebnou intervencí je immunosupresivní terapie kortikoidy. V některých případech či při opožděné intervenci však nežádoucí účinky mohou mít i fatální dopad. **Cíl:** Je nutné, aby s nežádoucími účinky souvisejícími s imunoterapií byli seznámeni nejen pacienti, ale i lékaři, kteří přicházejí s těmito pacienty do styku. Podstatné je, že při správném managementu a pozitivní motivaci pacientů je možné těmto situacím předcházet.

Klíčová slova

imunoterapie – ipilimumab – nivolumab – neurotoxicita

Summary

Background: Great progress has recently been made in immunotherapy of solid carcinomas. The advent of immunotherapy with checkpoint inhibitors has brought not only a completely different mechanism of action but also different types of adverse reactions. These adverse reactions are similar to those of autoimmune diseases and are referred to as immune-related adverse events. Most adverse reactions are due to lower grade toxic effects. Neurotoxicity is a less frequent. On the other hand, with the spread of immunotherapy, it can be assumed that adverse events with a lower incidence may occur in a relatively higher frequency due to broader usage of immunotherapeutics and thus, physicians outside of cancer centres may be presented with these events. The main therapeutic intervention is immunosuppressive therapy with corticoids. However, in some cases, or in case of delayed intervention, they may be fatal. **Purpose:** Therefore, it is of great importance to increase the physician's and patient's knowledge of the possible complications of this promising treatment modality. It is essential to apply proper management and help patients engage positively to prevent these situations occurring.

Key words

immunotherapy – ipilimumab – nivolumab – neurotoxicity

Práce byla realizována za podpory Ministerstva zdravotnictví ČR v rámci programu koncepčního rozvoje výzkumné organizace – RVO (FNHK, 00179906).

This study was supported by the following research programme of Ministry of Health of the Czech Republic – RVO (FNHK, 00179906).

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has 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. Jindřich Kopecký, Ph.D.
Klinika onkologie a radioterapie
FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové
e-mail: kopeccjin@fnhk.cz

Obdrženo/Submitted: 15. 10. 2019
Přijato/Accepted: 25. 10. 2019

doi: 10.14735/amko202011

Úvod

Imunoterapie se v posledním desetiletí stala neodmyslitelnou součástí standardní onkologické léčby. Rozšiřuje se nejen spektrum diagnóz léčených touto modalitou, ale současně narůstá i absolutní počet pacientů. Jedna z méně častých, avšak potenciálně život ohrožujících imunitně podmíněných reakcí je neurotoxicita.

Vlastní zkušenost

Případ 64letého pacienta s generalizovaným tumorem ledviny léčeného nivolumabem v 2. linii jsme již prezentovali formou kazuistiky [1]. U tohoto pacienta se 14 dní po 6. dávce (240 mg každých 14 dní) objevily nespecifické změny chování. Z fyzikálního vyšetření u pacienta dominovaly mírné choreatické pohyby horních končetin a hlavy. Dle dostupných laboratorních vyšetření nebyla nalezena žádná patologie, která by vysvětlovala změnu chování. Na kontrolním vyšetření výpočetní tomografií (computed tomography – CT) byl nalezen jako regrese (skelet, plíce). Vyšetření magnetickou rezonancí (magnetic resonance imaging – MRI) mozku vyloučilo přítomnost mozkové metastázy, avšak byla popsána suspektní inflamatorní infiltrace v okolí bazálních ganglií (obr. 1). V rámci diferenciální diagnostiky byly dále provedeny odběry krevního séra k virologickému a základnímu autoimunitnímu vyšetření (negativní). V rámci širší diferenciální diagnostiky byl proveden odběr mozkomíšního moku k mikrobiologickému, virologickému, cytologickému a biochemickému vyšetření, ve všech případech bez patologie, která by vysvětlovala pacientovy příznaky. Dále bylo provedeno vyšetření likvoru průtokovým cytometrem, kde dominujícím nálezem byla přítomnost lymfocytů reprezentovaných v drtivé většině CD4⁺ pomocnými T lymfocyty. Mozkomíšní mok byl dále vyšetřen ve speciální laboratoři se zaměřením na neuroimunologické parametry, přičemž nález vyloučil poškození mozkové tkáně či příznaky primární infekce. Jediným nálezem byla vyšší hladina anti-paraneoplastického antigenu Ma2 imunoglobulin G třídy. Tyto nálezy spolu s výsledky MRI vyšetření a klinickým obrazem, který

se u pacienta každým dnem zhoršoval, svědčily o toxicitě vyvolané nivolumabem. U pacienta byla zahájena již od začátku hospitalizace vysokodávkovaná léčba kortikoidy. I přes nasazení adekvátní léčby kortikosteroidy a následně i infliximabu došlo u pacienta k progresi stavu s rozvojem halucinatorního syndromu se suicidálními tendencemi. Ve vývoji celé situace sehrála důležitou roli rodina a pacient, kteří odmítli další setrvání v nemocnici, a po podepsání negativního reverzu byl pacient propuštěn do domácího léčení. Pacient zemřel v důsledku močové infekční komplikace. Patologicko-anatomická pitva prokázala kompletní regresí v plicích, zbytkové nekrotické tkáně ve skeletu a dále zánět mozku s predominancí v oblasti ganglií a perivaskulárně (obr. 2).

Epidemiologie

Imunitně podmíněné nežádoucí účinky (immune-related adverse events – irAE) ovlivňující centrální nervový systém (CNS) nebo periferní nervový systém (PNS) jsou vzácné. Míra výskytu závisí i na tom, co vše je pojmem neurotoxicity myšleno. Pokud se do neurologických komplikací léčby přiřadí symptomy jako bolest hlavy, dysgúzie či motání, pak se výskyt jakéhokoliv stupně toxicity pohybuje kolem 3,8 % pro anti-CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), 6,1 % pro anti-PD-1 (programed cell death 1) a 12 % při použití kombinace anti-CTLA-4 a anti-PD-1 léčby [2]. Avšak výskyt toxicity stupně 3 a 4 je vzácný – 0,7 %, 0,4 %, resp. 0,7 % [2]. Na druhou stranu víme, že neurotoxicita se podílí na celkové mortalitě spojené s imunoterapií z 6 % pro anti-CTLA-4, z 15 % pro anti-PD-1 a z 8 % pro kombinaci anti-CTLA-4 s anti-PD-1 [3], což ji řadí na přední místa příčiny úmrtí při léčbě checkpoint inhibitory.

Nebyla prokázána souvislost mezi dávkou a výskytem neurotoxicity pro anti-CTLA-4, v případě anti-PD-1 protiletak se ukázaly protichůdné výsledky pro nivolumab (míra vyšší incidence neurotoxicity s vyšší dávkou) s pembrolizumabem (opačný jev) [2].

Mezi častěji vyskytující se neurotoxicity patří rozličné fokální projevy neuropatií, meningoradikulitid [4], ale mohou

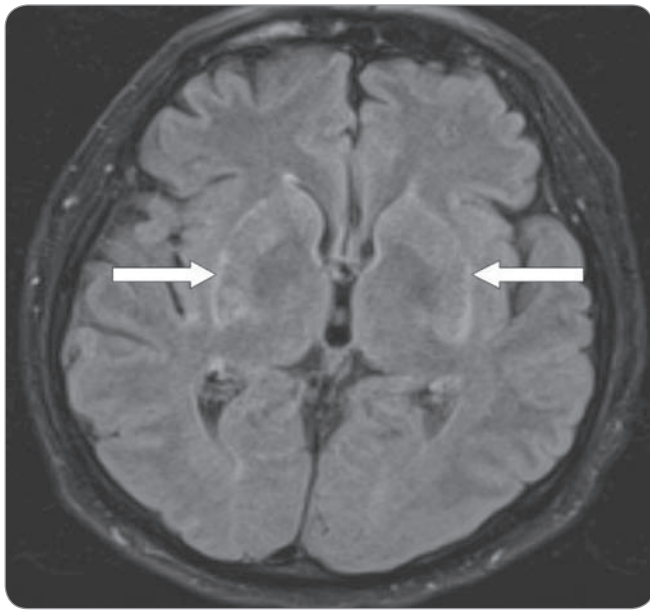
se vyskytnout i případy vzácnějšího postižení podobné Guillainovu-Barrého syndromu [5]. Dále sem patří imunoterapií indukovaná či *de novo* vzniklá myasthenia gravis [6]. V případě CNS se nejčastěji jedná o různé projevy encefalitid [7] a aseptických meningitid [8].

Klinický obraz a diagnostika

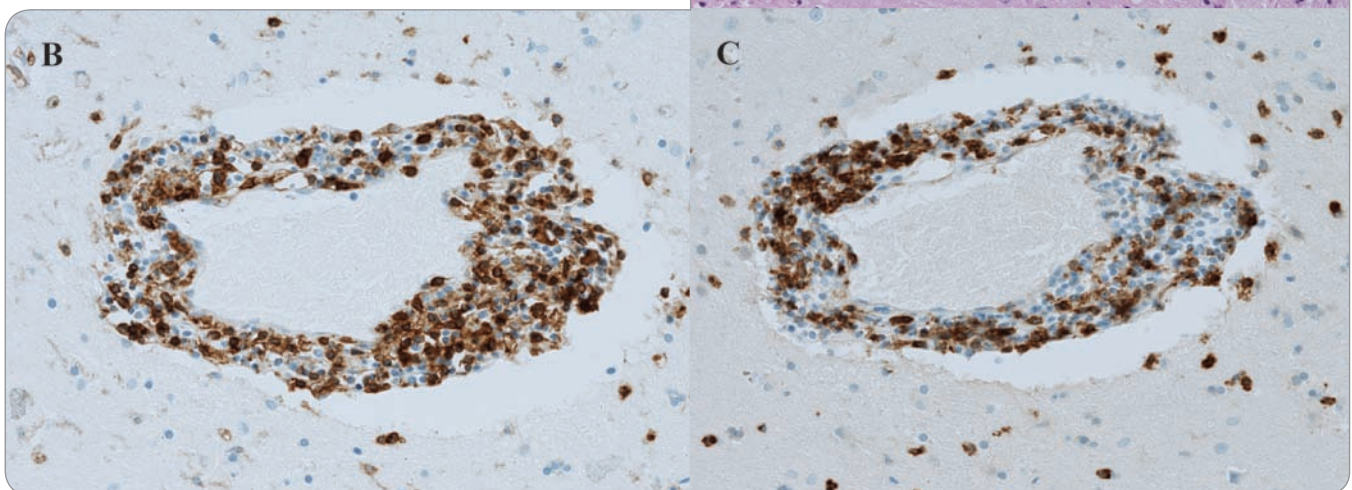
V závislosti na místě postižení se klinicky může neurotoxicita projevit jako encefalitida, meningitida, demyelinizační polyneuropatie, myastenický syndrom, senzomotorické neuropatie a další. Imunitně podmíněná neurotoxicita je těžko odlišitelná od neurotoxicity z jiné příčiny. Může se projevovat širokou škálou příznaků, vč. bolesti hlavy, horečky, slabosti, únavy, poruchy paměti, halucinací a křečí, svalové ochablosti apod. Diagnóza se často provádí metodou *per exclusionem*. Vzhledem k tomu, že s těžšími intervencí pro léčbu neurologických irAE jsou kortikosteroidy, je klíčové, aby tyto diagnostické postupy nebyly příčinou opoždění iniciace léčby, a to hlavně v případech, kdy je infekční etiologie málo pravděpodobná. Nástup irAE neurotoxicity můžeme nejčastěji očekávat v počátcích imunoterapie mezi 6. a 12. týdnem, avšak výjimkou není ani pozdější výskyt a není vyloučen i výskyt po skončení samotné terapie.

Diagnostické přístupy se liší dle postižené oblasti a je vhodné do tohoto procesu přizvat neurologa, minimálně proto, aby bylo provedeno detailní fyzikální neurologické vyšetření. Definitivní stanovení diagnózy vyžaduje ve většině případů širší diagnostický algoritmus, ve kterém se provádí vyšetření séra, mozkomíšního moku a dále pak různá zobrazovací, event. funkční vyšetření. Jedním z hlavních cílů diagnostického procesu je vyloučení infekční etiologie (bakteriální či virové) a dále vyloučení metastatického postižení zasahujícího nervovou soustavu.

Základní vyšetřovací metodou pro toxicitu postihující CNS je MRI a CT vyšetření. Tato vyšetření nám pomohou při vyloučení metastatického postižení a dále k vyloučení možných kontraindikací pro lumbální punkci. Pokud je proveden odběr mozkomíšního moku, pak součástí vyšetření musí být kromě stan-



Obr. 1. Magentická rezonance mozku zobrazující oblast bazálních ganglií, šipky znázorňují oblast zánětlivě zvýšeného signálu.



Obr. 2. Histologické vyšetření bazálních ganglií (zvětšení 100x).

A. Hematoxylin-eozinové barvení perivaskulární infiltrace.

B. Imunohistochemické barvení perivaskulární oblasti pomocí CD4.

C. CD8 znaku.

dardního mikrobiálního, virologického a biochemického vyšetření i cytologické vyšetření. Použití průtokové cytometrie může být dalším vodítkem ke stanovení konečné diagnózy. V nejednoznačných případech je vhodné provést i specifické neuroimunologické vyšetření likvoru ve specializovaných laboratořích, které je zaměřeno na imunoglobuliny vč. jejich izoelektrické fokuzace, na reaktanty akutní fáze a cytokiny.

V případě toxicity PNS je hlavním vyšetřovacím nástrojem elektromyografie, dále pak opět vyšetření mozkomíšního moku a celkové vyšetření s cílem vylou-

čit infekční etiologii. Pokud diagnostické úsilí nevede ke stanovení konečné diagnózy, je v jednotlivých případech indikováno i histopatologické vyšetření, především pokud v rámci diferenciální diagnostiky pomýšlíme na myozitidu. V případě podezření na určité neurologické syndromy (např. myasthenia gravis, Guillainův-Barrého syndrom) je pak vhodné provést specifické testy k potvrzení či vyloučení těchto syndromů. Například specifické protilátky vůči acetylcholinovým receptorům či svalové specifické kináze při podezření na myasthenia gravis či taková vyšetření jako

plicní funkční vyšetření při podezření na Guillainův-Barrého syndrom.

Názorný grafický a přehledný diagnostický algoritmus pro neurotoxicitu prezentovali autoři Touat et al [8] či Cuzuzubo et al [2].

Management toxicity

Pro vlastní léčbu nežádoucích účinků byla vypracována podrobná doporučení, která vycházejí ze zkušeností získaných v rámci klinických studií. V současné době existují algoritmy pro jednotlivé nežádoucí účinky, které byly již mnohokrát publikovány [9,10].

Koncept managementu nežádoucích účinků stojí na pěti základních pilířích: prevence, vstupní vyšetření, detekce, léčba a monitorace [11]. Každý z těchto pilířů má v managementu irAE své nezastupitelné místo. Dalším rozhodujícím faktorem pro stanovení postupu léčby irAE je zhodnocení závažnosti příznaku toxicity pomocí tzv. kritérií obecné terminologie pro nežádoucí účinky (common terminology criteria for adverse events – CTCAE).

Použití této klasifikace je velmi užitečným nástrojem ke stanovení a hodnocení průběhu nežádoucího účinku v čase. Na druhou stranu musíme mít na paměti, že jsou CTCAE primárně koncipována pro klinická hodnocení a nemusejí vždy odrážet reálný dopad. Toto je příznačné právě pro neurotoxicitu, kdy se často může jednat o symptomy nejednoznačné, často mírné, hodnocené jako symptomy nízkého stupně toxicity, ale nevyovídající nic o potenciálu jejich závažnosti, kdy i nízký stupeň může mít fatální dopad na celkový průběh nemoci pacienta. Například počáteční parestzie nízkého stupně toxicity se mohou změnit v závažný až život ohrožující stav, jako např. Guillainův-Barrého syndrom. Z tohoto důvodu je důležité, aby v případě podezření na neurologickou toxicitu byla provedena včasná diagnostika a včasné zahájení imunosupresivní léčby bez ohledu na stupeň toxicity, a současně v případě předpokládaného závažného či nejistého vývoje by měla být zvažována i hospitalizace k pečlivé monitoraci vývoje stavu.

Hlavním pilířem léčby ke zvládnutí neurologické toxicity, snížení morbidity a případně i mortality je terapie kortikosteroidy. Dávka kortikosteroidů závisí na stupni projevu toxicity a pohybuje se v rozmezí od 0,5 do 2 mg/kg/den. Vzhledem k tomu, že odpověď na léčbu kortikosteroidy u neurologických irAE se ukazuje být obecněji pomalejší a méně účinná než u jiných irAE, je vhodné zvažovat od počátku intravenózní aplikaci

a dále zvážit iniciační léčbu vyššími dávkami kortikosteroidů.

K vyhodnocení efektu léčby kortikosteroidy je nutné, aby proběhlo v průběhu 3, max. 5 dnů, a nedostaví-li se očekávané zlepšení, pak je nutné zvažovat další postup. V případě nižšího vstupního dávkování kortikosteroidů zvolit eskalaci dávky či zvážit další časné intervence. Jako efektivní metoda pro neurologické irAE se jeví použití plazmaferézy. Jde o metodu, při které dochází k odstranění patologických látek v plazmě (auto-protilátek, monoklonálních proteinů, toxinů vázaných na plazmatické bílkoviny) nebo odstranění nadměrně zmnožených fyziologických součástí plazmy (cytokinů, kininů, složek komplementu aj.). Interval, kdy je ještě možné očekávat účinek plazmaferézy, je závislý na farmakokinetických vlastnostech použitého checkpoint inhibitoru. Pro nivolumab je terminální biologický poločas kolem 25 dnů, pro ipilimumab 14 dnů, pro atezulizumab 27 dnů a pro avelumab 6 dnů, pro pembrolizumab se interval pohybuje mezi 14 až 27 dny [12].

V případě selhání plazmaferézy nebo současně s ní je možno uvažovat o použití dalších imunosupresiv jako infliximab či podání intravenózních imunoglobulinů. V rámci jednotlivých kazuistik byly podávány i preparáty jako např. tacrolimus, cyklofosfamid, rituximab a další [8], a není tedy chybou tyto látky použít, ač se jedná často o indikaci off-label.

Závěrem je však nutno poznamenat, že základní premisa bezpečné léčby checkpoint inhibitory spočívá nejen ve znalosti toxického profilu, znalosti kinetiky nežádoucích účinků daného preparátu či v časné intervenci, ale jak ukazuje i naše zkušenost, také v dobré spolupráci pacienta, resp. jeho rodiny.

Závěr

Imunoterapie představuje velký přínos pro onkologické pacienty napříč širokým spektrem nádorových onemocnění. S účinností této léčby jdou však v ruce i nežádoucí účinky vč. neurologických.

Tento typ toxicity je zcela odlišný od doposud zavedené terapie a souvisí s vlastním mechanismem účinku. Může mít projevy v různé intenzitě, od lehkých až po život ohrožující stavy. Vzhledem k rychlému rozšíření imunoterapie do klinické praxe dochází ke zvyšování počtu takto léčených pacientů. Je proto nezbytně nutné, aby s nežádoucími účinky imunoterapie byli seznámeni nejen lékaři indikující tuto léčbu, ale i lékaři, kteří s takto léčenými pacienty přicházejí do kontaktu.

Literatura

1. Kopecky J, Kubeček O, Geryk T et al. Nivolumab induced encephalopathy in a man with metastatic renal cell cancer: a case report. *J Med Case Rep* 2018; 12(1): 262. doi: 10.1186/s13256-018-1786-9.
2. Cuzzubbo S, Javeri F, Tissier M et al. Neurological adverse events associated with immune checkpoint inhibitors: review of the literature. *Eur J Cancer* 2017; 73: 1–8. doi: 10.1016/j.ejca.2016.12.001.
3. Wang DY, Salem JE, Cohen JV et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol* 2018; 4(12): 1721–1728. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.3923.
4. Gu Y, Menzies AM, Long GV et al. Immune mediated neuropathy following checkpoint immunotherapy. *J Clin Neurosci* 2017; 45: 14–17. doi: 10.1016/j.jocn.2017.07.014.
5. Supakornnumporn S, Katirji B. Guillain-Barre syndrome triggered by immune checkpoint inhibitors: a case report and literature review. *J Clin Neuromuscul Dis* 2017; 19(2): 80–83. doi: 10.1097/CND.000000000000193.
6. Makariou D, Horwood K, Coward JI. Myasthenia gravis: an emerging toxicity of immune checkpoint inhibitors. *Eur J Cancer* 2017; 82: 128–136. doi: 10.1016/j.ejca.2017.05.041.
7. Larkin J, Chmielowski B, Lao CD et al. Neurologic serious adverse events associated with nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone in advanced melanoma, including a case series of encephalitis. *Oncologist* 2017; 22(6): 709–718. doi: 10.1634/theoncologist.2016-0487.
8. Touat M, Talmassov D, Ricard D et al. Neurological toxicities associated with immune-checkpoint inhibitors. *Curr Opin Neurol* 2017; 30(6): 659–668. doi: 10.1097/WCO.0000000000000503.
9. Haanen JB, Carbonnel F, Robert C et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018; 29 (Suppl 4): 264–266. doi: 10.1093/annonc/mdy162.
10. Lakomy R, Poprach A. Side effects of modern immunotherapy and how to solve them in the clinics. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 4): 4S103–4S114. doi: 10.14735/amko20154S103.
11. Kyllarová A, Kubeček O, Trojanová P et al. Toxicita imunoterapie. *Onkologie* 2017; 11(2): 83–87.
12. Centanni M, Moes DJ, Trocóniz IF et al. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of immune checkpoint inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 2019; 58(7): 835–857. doi: 10.1007/s40262-019-00748-2.

Management imunitně podmíněné endokrinopatie při protinádorové léčbě checkpoint inhibitory

Management of Immune-Related Endocrinopathies in Anticancer Treatment with Checkpoint Inhibitors

Lakomý R.¹, Poprach A.¹, Kazda T.²

¹ Klinika komplexní onkologické péče LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno

² Klinika radiační onkologie LF MU a Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Moderní imunoterapie s checkpoint inhibitory se stala základním pilířem v léčbě řady nádorů. Klinický efekt je často doprovázen imunitně podmíněnými vedlejšími účinky. Jedná se principiálně o zcela jiný typ nežádoucích účinků vycházející z vlastní podstaty léčby. S rostoucím počtem léčených pacientů přibývá i četnost vedlejších účinků. Situace se stává ještě složitější s příchodem kombinované imunoterapie. I když byla dobře popsána kinetika nástupu a trvání této specifické toxicity, je třeba dbát zvýšené opatrnosti. V klinické praxi se často objevují případy s atypickými průběhy. Neznalost problematiky pak může vést k podcenění příznaků a poškození pacienta. Imunitně podmíněné vedlejší účinky se vyznačují svojí variabilitou, postižen může být kterýkoliv orgán. Vedle kožní, střevní a jaterní toxicity je imunitně podmíněná endokrinopatie další poměrně frekventní toxicitou. Nejčastěji bývá postižena štítná žláza, hypofýza a nadledviny. Symptomy nastupující endokrinopatie bývají často nespecifické, což může dělat potíže při diferenciální diagnostice. Většina toxicit je naštěstí stupně 1 a 2, ale v běžné klinické praxi musíme být připraveni na život ohrožující stavy, jako je nadledvinová krize nebo diabetes mellitus I. typu s ketoacidózou. Podání vysokých dávek kortikoidů s cílem zachránit funkci endokrinní žlázy je sporné. Základem léčby je dlouhodobá hormonální substituce, protože imunitně podmíněné endokrinopatie jsou na rozdíl od jiných toxicit často nevratné. Důležitá je úzká spolupráce s endokrinologem.

Klíčová slova

imunoterapie – léková toxicita – hypofyzitida – tyroiditida

Summary

Modern immunotherapy with checkpoint inhibitors has become the backbone treatment for many cancers. However, it is often accompanied by immune-related side effects, which may differ depending on the nature of the treatment. The frequency of adverse reactions increases with the number of patients receiving immunotherapy. The situation has become even more difficult with the advent of combination immunotherapy. Although the kinetics of the onset and duration of toxicity have been well described, caution should be exercised. In clinical practice, cases with atypical courses often occur. Ignorance of the problem can lead to underestimation of symptoms and damage to the patient. Immune-related side effects are variable and any organ can be affected. In addition to skin, intestinal and liver toxicity, immune-related endocrinopathy is another relatively frequent toxicity. Thyroid, pituitary and adrenal glands are most commonly affected. Symptoms of endocrinopathy are often nonspecific, which may complicate a differential diagnosis. Fortunately, most toxicities are grade 1 and 2; however, in routine clinical practice, care must be exercised to detect the onset of life-threatening toxicity such as an adrenal crisis or type 1 diabetes mellitus with ketoacidosis. It is unclear whether high doses of corticosteroids are effective in preserving endocrine gland function. Long-term hormone replacement therapy is essential because immune-related endocrinopathy is often irreversible, unlike other immune-related toxicities. Close cooperation with an endocrinologist is therefore very important.

Key words

immunotherapy – drug toxicity – hypophysitis – thyroiditis

Práce byla podpořena MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805).

This work was supported by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805).

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

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

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

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



MUDr. Radek Lakomý, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: lakomy@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 3. 10. 2019

Přijato/Accepted: 11. 11. 2019

doi: 10.14735/amko202015

Úvod

Endokrinní toxicita v souvislosti s moderní imunoterapií onkologických onemocnění často probíhá pod obrazem nespecifických potíží. Ve většině případů není závažná, nevyžaduje delší přerušování nebo ukončení léčby a je zvládnutelná hormonální substitucí. Jsou však situace, kdy pacient může být v ohrožení života. Mortalita je ve srovnání s jinými imunitně podmíněnými nežádoucími účinky naštěstí nízká (< 5 % všech endokrinopatií) [1]. Cílem příspěvku je poukázat na nejčastější typy endokrinní toxicity u moderní imunoterapie a shrnout základní doporučení z pohledu diagnostiky a léčby.

Kazuistika pacienta s imunitně podmíněnou hypofyzitidou se sekundárním útlumem tyreotropní, adrenokortikotropní a gonadotropní osy

Pacient ve věku 64 let, původně s nízkým rizikovým maligním melanomem zad, po primární excizi (pT1aN0M0), byl referován na našem pracovišti v říjnu 2017 ke zvážení další léčby po radikálním odstranění intrazitní podkožní metastázy nad pravým žeberním obloukem. Pacient byl v klinicky výborném výkonnostním stavu, bez laboratorních anomálií a s vyloučením možného duplicitního melanomu. Z interních komorbidit byl pacient zatížen pouze arteriální hypertenzí. V polovině listopadu 2017 byla zahájena adjuvantní léčba s nivolumabem + ipilimumabem/placebem v rámci klinické studie CA209-915. Přibližně po 4 měsících od započetí léčby se pacient dostavil ke kontrole pro několik dnů rozvíjející se těžkou únavu, celkovou slabost, nechutenství a návaly horka s bolestí hlavy. Ze základního objektivního vyšetření dominovalo zpomalené psychomotorické tempo a arteriální hypotenze. Laboratorně i klinicky nebyly přítomny známky infektu. Vzhledem k podezření na projev nežádoucího účinku imunoterapie byl pacient přijat k hospitalizaci. Vstupně byl doplněn endokrinologický screening s nálezem útlumu tyreotropní, adrenokortikotropní a gonadotropní osy – tyreotropní hormon (thyroid stimulating hormone – TSH) 0,04 mIU/l (norma 0,35–4,94), volný tyroxin (free T4 – fT4)

11,69 pmol/l (norma 9,01–19,05), adrenokortikotropní hormon (adrenocorticotrophic hormone – ACTH) < 9,0 ng/l (norma 0–46), kortizol 3 nmol/l (norma 166–507), testosteron 2,27 nmol/l (norma 7,66–24,82). Vstupně proběhlo i neurologické vyšetření – bez známek neurodeficitu svědčícího pro centrální či periferní topiku. V úvodu hospitalizace byla vysazena antihypertenziva, byly podávány infuze s krystaloidy a zahájena kortikoterapie solu-medrolem intravenózně (i.v.) v úvodní dávce 1 mg/kg i.v., po 3 dnech byl převeden na perorální aplikaci prednisonu 1 mg/kg/den. Po nasazení kortikoidů došlo k promptní úpravě klinického stavu pacienta. Cílené vyšetření magnetickou rezonancí (magnetic resonance imaging – MRI) zaměřené na hypofýzu, provedené druhý den po přijetí, neprokázalo patologii. Ve spolupráci s endokrinologem byl postupně vysazován prednison a po 1 měsíci byl pacient převeden na substituční léčbu hydrokortizonem v perorální dávce 30 mg/den (20 mg ráno, 10 mg odpoledne). Současně s touto substitucí probíhala i terapie euthyroxem (75 µg/den). Pokračování adjuvantní imunoterapie bylo pro závažnou formu toxicity (stupeň 3) ukončeno. V současné době je pacient (listopad 2019) bez potíží, na chronické substituční terapii hydrokortizonem a euthyroxem. A je nadále bez známek relapsu základního onemocnění.

Epidemiologie

Incidence endokrinopatií u moderní imunoterapie se napříč studiemi a různými publikacemi liší. Důvodem mohou být často nespecifické klinické projevy, které se dávají do souvislosti s vlastním onemocněním nebo jiným vedlejším účinkem. Kvůli tomu nemusí být řada endokrinopatií diagnostikována a je zde vysoká pravděpodobnost, že reálná incidence této toxicity je podstatně vyšší.

K nejčastěji primárně postiženým orgánům patří štítná žláza a hypofýza. Postižení hypofýzy je pak důvodem sekundární dysfunkce dalších endokrinních žláz. Převážná většina endokrinopatií je nízkého stupně závažnosti, asymptomatické nebo mírně symptomatické (stupeň 1 a 2), ale mohou se objevit i závažné toxicity vyžadující hospitalizaci

(stupeň 3) a život ohrožující stavy (stupeň 4), jako je nadledvinková krize.

Incidence tyreopatie, stejně jako dalších toxicit, je u ipilimumabu dávkově závislá. Při dávce 3 mg/kg je uváděna v rozmezí 1–5 %, při dávkách 10 mg/kg až 10 % [2–4]. U anti-PD-1 protilátek podávaných v monoterapii (nivolumab, pembrolizumab) je její výskyt vyšší a pohybuje se v rozmezí 5–10 % [5,6]. A ještě vyšší je při kombinaci ipilimumabu a nivolumabu – do 20 % [3]. Vyšší pravděpodobnost rozvoje tyreopatie mají pacienti se vstupně pozitivními autoprotilátkami (např. proti tyreoidální peroxidáze), s anamnézou onemocnění štítné žlázy nebo po prodělané radioterapii na oblast krku [7]. Vyšetření autoprotilátek před zahájením imunoterapie se dnes standardně neprovádí.

Postižení hypofýzy (při hypofyzitidě) je u podávání samotných anti-PD-1 protilátek vzácné. U ipilimumabu v dávce 3 mg/kg jsme se s ní na našem pracovišti již setkali (pravděpodobnost cca 1 %, obr. 1, 2) a určitě s ní musíme počítat při použití kombinace ipilimumabu a nivolumabu (incidence cca 10 %) [2–4].

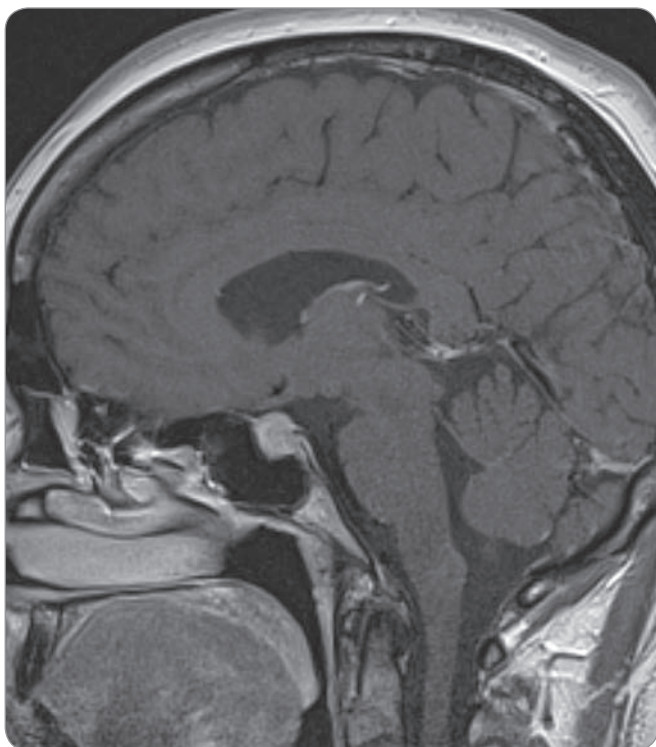
Výskyt dalších endokrinopatií, jako je primární adrenální insuficience, hypoparathyreóza nebo diabetes mellitus I. typu, je vzácný (do 1 %) [8]. Medián doby nástupu endokrinopatií je kolem 3. měsíce od započetí léčby, ale interval je velmi variabilní a k rozvoji může dojít kdykoliv, i za několik měsíců po ukončení imunoterapie. Jedná se o dlouhodobě trvající toxicitu (zvláště hypothyreóza, sekundární insuficience nadledvin), která je často ireverzibilní a může vyžadovat trvalou hormonální substituční léčbu [5,9].

Klinický obraz a diagnostika

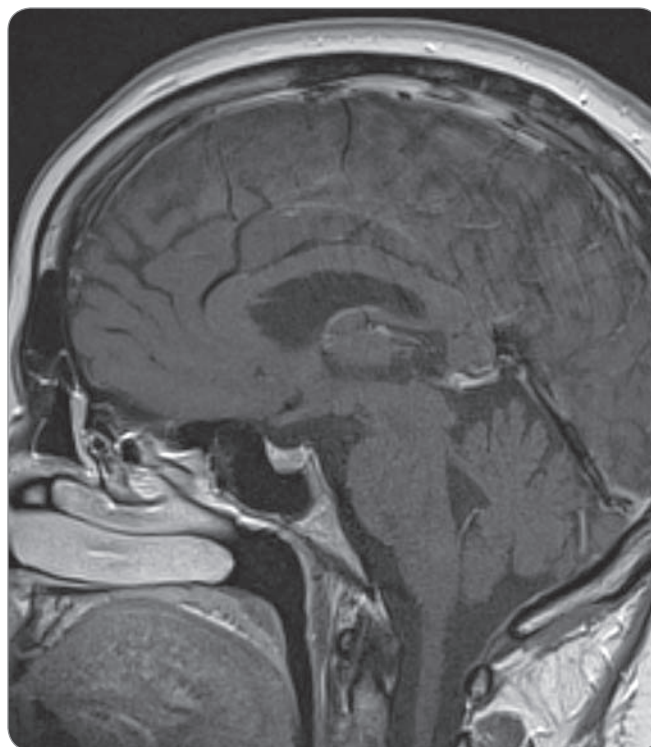
Klinický obraz endokrinopatií je často nespecifický. V rámci diferenciální diagnostiky je nutno vyloučit jinou etiologii potíží (progrese nádorového onemocnění, metastatické postižení endokrinního orgánu, jiná poléková etiologie – např. glukokortikoidy a další).

Hypertyreóza a hypothyreóza

Postižení funkce štítné žlázy může být primární (častěji po anti-PD-1/L1 protilátkách) nebo sekundární při hy-



Obr. 1. Akutní hypofyzitida po ipilimumabu.



Obr. 2. Regrese otoku hypofýzy po 1 měsíci.

pofyzitidě (častěji po ipilimumabu +/- anti-PD-1 protilátka). Můžeme se setkat s hypertyreózou nebo častěji hypotyreózou.

Při hypertyreóze může být v popředí potíží nervozita, neklid, nespavost, tachykardie, srdeční arytmie, teplá vlhká kůže a úbytek na váze. Hypertyreóza často přechází do hypotyreózy (do několika týdnů). Pokud přetrvává hypertyreóza, tak je nutno ve spolupráci s endokrinologem vyloučit Gravesovu-Basedowovu nemoc (protilátky proti TSH receptoru, mladší ženy, orbitopatie, ultrazvuk štítné žlázy s Dopplerem – typická hypervaskularizace). Pro hypotyreózu je naopak typická únava, spavost, zimomřivost, nabírání na váze, deprese, neuropatie, myalgie, suchá kůže, hypomimie, otoky a zácpa.

K základním vyšetřením patří odběr hladiny hormonů – TSH a fT4. Pro vysokou pravděpodobnost vzniku tyreopatie se odběry provádějí pravidelně – vstupně před léčbou, poté 1× měsíčně prvních 6 měsíců léčby, dále je možno interval mezi odběry při absenci klinických potíží prodloužit na 3 měsíce, s nutnou kontrolou i po ukončení imunoterapie (alespoň 6 měsíců). Pro plně vyvinutou

hypertyreózu při tyreoiditidě je typické vysoké fT4 a nízké TSH (negativní zpětná vazba), naopak u primární hypotyreózy je fT4 nízké a TSH vysoké. U sekundární hypotyreózy při hypopituitarismu důsledkem hypofyzitidy je nízké TSH i nízké fT4. Je nutné si uvědomit, že systém stimulací a zpětných vazeb (hypotalamus – hypofýza – štítná žláza) je dynamický a změny v hormonálních hladinách jsou pozvolné (např. ještě normální hladina fT4 a stoupající TSH svědčí pro počínající rozvoj hypotyreózy). V těchto případech je třeba odběr v kratším intervalu opakovat.

Při tyreopatii dále provádíme odběry na autoprotilátky – proti tyreoidální peroxidáze, proti tyreoglobulinu, doplňujeme ultrazvuk štítné žlázy. Další vyšetření provádíme dle doporučení endokrinologa (diferenciální diagnostika jiné příčiny, např. horký uzel štítné žlázy).

Hypofyzitida a hypopituitarismus

Hypofyzitida se sekundární insuficiencí nadledvin může být závažný stav. Až třetina případů může probíhat pod obrazem toxicity stupně 3 a 4 (vážná toxicita vyžadující hospitalizaci a život ohrožující toxicita).

Symptomy mohou být lokální ze zvětšené hypofýzy při zánětu (bolesti hlavy, zrakové poruchy – rozmazané vidění, výpadky zorného pole) a systémové ze sekundární dysfunkce hypofýzou řízených endokrinních orgánů (adrenální insuficience, hypotyreóza, hypogonadismus). Systémové příznaky bývají často nespecifické, např. únava, slabost, nevolnost, zvracení, nechutenství, bolesti břicha, průjem, bolesti svalů, kloubů, psychické změny, teploty, hypotenze, hyponatremie, dehydratace.

K základním diagnostickým vyšetřením patří krevní odběr zaměřený na hormonální profil – fT4, TSH, ranní kortizol, ACTH, folikuly stimulující hormon, luteinizační hormon, testosteron, estradiol (premenopauzální ženy), +/- prolaktin. ACTH stimulační test bývá v úvodu nepřínosný (nadleviny fungují, jen nemají stimul z hypofýzy). V rámci diferenciální diagnostiky je nutné odlišit iatrogenní hypokortikalismus při podávání exogenních kortikoidů, např. z důvodu řešení jiné toxicity – kvůli negativní zpětné vazbě je často přítomný útlum celé osy (hypotalamus – hypofýza – nadledviny). Mezi další vyšetřované parametry patří krevní obraz s diferenciálním rozpo-

tem bílých krvinek, biochemie séra vč. C-reaktivního proteinu. Je nutné vyloučit závažný infekční a při přetrvávajícím podezření na hypofyzitidu provést co nejdříve MRI vyšetření (odložené vyšetření je často již negativní), případně oční vyšetření s perimetrem.

Vzhledem k potenciálnímu riziku spojenému s hypofyzitidou je stav nutno řešit ve spolupráci s endokrinologem. Pro vyšší riziko hypofyzitidy při kombinaci ipilimumabu a anti-PD-1 protilátek je dnes doporučováno kromě fT4 a TSH také pravidelně kontrolovat ACTH a ranní kortizol (u anti-PD-1/L1 protilátek v monoterapii stačí dále jen fT4 a TSH) [7,10].

Diabetes mellitus I. typu

Inzulin dependentní diabetes mellitus s poškozením β buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu se vyskytuje vzácně (< 1 %), častější je po anti-PD-1/L1 protilátkách než po ipilimumabu. Klinicky je přítomna hyperglykemie, polyurie, polydipsie, dehydratace, ketoacidóza. Je nutno odlišit diabetes inzulin dependentní od non-dependentního. V rámci diferenciální diagnostiky se kromě C-peptidu provádí odběry na autoprotilátky proti glutamátdekarboxyláze (anti-GAD65) a proti buňkám ostrůvků pankreatu [11].

Léčba toxicity

Hypertyreóza a hypotyreóza

Při diagnostikované hypertyreóze se v její léčbě řídíme podle přítomnosti symptomů. Pokud je přítomna tachykardie, nasadíme beta-blokátory (atenolol, metoprolol), u kardiaků nebo při bolestivém otoku štítné žlázy můžeme krátkodobě podávat prednison tablety perorálně (p.o.) 0,5–1 mg/kg/den, většinou ale nejsou potřeba. Tyreostatika se používají výjimečně (Gravesova-Baseidova hypertyreóza) a vždy ve spolupráci s endokrinologem. Velká většina hypertyreózy během několika týdnů přechází do hypotyreózy, při níž je naopak nutná dlouhodobá substituční léčba. K úpravě funkce štítné žlázy dochází jen cca u třetiny pacientů. Základem léčby hypotyreózy je substituce levothyroxinem s iniciační dávkou 25–50 μ g/den, na lačno, s postupným navyšováním do norma-

lizace TSH (kontrola TSH 1× měsíčně). U starších pacientů a kardiaků začínáme vždy menší dávkou a zvyšujeme pomaleji. Pokud řešíme sekundární hypotyreózu a současnou insuficienci nadledvin, tak nejdříve provádíme substituci kortikoidy a až za několik dnů nasadíme levothyroxin, abychom se vyvarovali rizika adrenální krize. U asymptomatického pacienta (vč. absence únavy) s elevací TSH < 10 U/l při normální hodnotě fT4 můžeme se substitucí počkat (subklinická hypotyreóza) [7,10,11]. Imunoterapie se v obou případech tyreopatií dočasně přerušuje jen v případě významných symptomů. Po adekvátní substituci hormonů a ústupu potíží se k léčbě můžeme vrátit. Tyreopatie bývá výjimečně důvodem k trvalému ukončení imunoterapie.

Hypofyzitida a hypopituitarismus

Základem je hormonální substituce, dle útlumu konkrétní hormonální osy (sekundární adrenální insuficience, sekundární hypotyreóza, sekundární hypogonadismus). Nejčastěji je nutno podávat glukokortikoidy s mineralokortikoidní aktivitou (např. hydrokortizon 15–20 mg ráno a 10 mg odpoledne nebo večer) a levothyroxin tablety 50–100 μ g/den. U mladých pacientů lze zvážit také substituci pohlavních hormonů. Sekundární hypotyreóza a hypogonadismus se mohou upravit, útlum adrenokortikotropní osy bývá trvalý s nutností celoživotní substituce. Vysoké dávky kortikoidů jsou rezervovány jen pro vážné stavy v úvodu hypofyzitidy – bolesti hlavy, zrakové či jiné neurologické potíže, MRI nález zvětšené hypofýzy. K zaléčení akutních symptomů je možno podat metylprednisolon v infuzi i.v. 1–2 mg/kg/den nebo prednison tablety p.o. 1–2 mg/kg/den po dobu 1–2 týdnů a po ústupu potíží pacienta převést na dlouhodobou hormonální substituci [12]. V případě adrenální krize s hypotenzí je doporučována hospitalizace na jednotce intenzivní péče (život ohrožující stav!). Okamžitě se podávají i.v. kortikoidy s mineralokortikoidní aktivitou (hydrokortizon 100 mg i.v. každých 6–8 hod), infuze s NaCl a glukózou, nutná je monitorace vitálních funkcí a vyloučení sepse. Následně po stabilizaci stavu

je opět nutná dlouhodobá substituce p.o. hydrokortizonem (20–30 mg/den p.o. s navýšením při stresových situacích, infekcích či teplotách 2–4 \times). Pacient musí být veden u endokrinologa, musí být řádně edukován o případné úpravě dávek glukokortikoidů v zátěžových situacích. Závažná porucha funkce nadledvin (stupeň toxicity 3 a 4) je důvodem pro ukončení imunoterapie.

Diabetes mellitus I. typu

Základem je substituční léčba inzulinem (celoživotní), kortikoidy v úvodu nejsou indikovány, vysoce pravděpodobně nepomohou, naopak mohou zhoršit kompenzaci diabetu. Léčba imunoterapií po nastavení dávek inzulinu může pokračovat [11].

Obecná doporučení pro přerušování nebo trvalé ukončení imuno-onkologické léčby

Při asymptomatické endokrinopatii (pouze patologický laboratorní nález) je možno v léčbě pokračovat. Při symptomatické endokrinopatii se léčba s imunoterapií přerušuje. Po nastavení hormonální substituční léčby a ústupu symptomů lze u převážné většiny pacientů v imunoterapii pokračovat. Pouze u nadledvinkové nedostatečnosti stupně 3 a 4 a ostatních endokrinopatií stupně 4 je doporučováno zvážit trvalé ukončení léčby.

Závěr

Endokrinní toxicita se v mnohém liší od jiných imunitně podmíněných toxicit. Její nástup může být opožděný a trvá dlouhodobě až celoživotní. S příchodem kombinované imunoterapie se výskyt endokrinopatií zvýší a budeme se častěji potýkat s vážnými stavy jako je hypofyzitida a sekundární nadledvinková nedostatečnost. Kortikoidy jako imunosupresivum jsou indikovány výjimečně. Hlavní roli hraje dobře vedená hormonální substituce ve spolupráci s endokrinologem. Špatně řešená endokrinopatie zbytečně zhoršuje kvalitu života pacienta a jeho toleranci k léčbě.

Literatura

1. Wang DY, Salem JE, Cohen JV et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: a system-

- atic review and meta-analysis. *JAMA Oncol* 2018; 4(12): 1721–1728. doi: 10.1001/jamaoncol.2018.3923.
2. Lakomý R, Poprach A. Sideeffects of modern immunotherapy and how to solve them in the clinics. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 4): 4S103–4S114. doi: 10.14735/amko20154S103.
 3. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373(1): 23–34. doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
 4. Eggermont AM, Chiarion Sileni V, Grob JJ et al. Prolonged survival in stage III melanoma with ipilimumab adjuvant therapy. *N Engl J Med* 2016; 375(19): 1845–1855. doi: 10.1056/NEJMoa1611299.
 5. Weber JS, Hodi FS, Wolchok JD et al. Safety profile of nivolumab monotherapy: a pooled analysis of patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2017; 35(7): 785–792. doi: 10.1200/JCO.2015.66.1389.
 6. Robert C, Schachter J, Long GV et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372(26): 2521–2532. doi: 10.1056/NEJMoa1503093.
 7. Cukier P, Santini FC, Scaranti M et al. Endocrine side effects of cancer immunotherapy. *Endocr Relat Cancer* 2017; 24(12): 331–347. doi: 10.1530/ERC-17-0358.
 8. Mellati M, Eaton KD, Brooks-Worrell BM et al. Anti-PD-1 and antiPDL-1 monoclonal antibodies causing type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2015; 38(9): 137–138. doi: 10.2337/dc15-0889.
 9. Weber JS, Kähler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol* 2012; 30(21): 2691–2697. doi: 10.1200/JCO.2012.41.6750.
 10. Girotra M, Hansen A, Farooki A et al. The current understanding of the endocrine effects from immune checkpoint inhibitors and recommendations for management. *JNCI Cancer Spectr* 2018; 2(3): pky021. doi: 10.1093/jncics/pky021.
 11. Haanen JB, Carbone F, Robert C et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017; 28 (Suppl 4): 119–142. doi: 10.1093/annonc/mdx225.
 12. Sznol M, Postow MA, Davies MJ et al. Endocrine-related adverse events associated with immune checkpoint blockade and expert insights on their management. *Cancer Treat Rev*; 58: 70–76. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.06.002.

Toxicita imunoonkologické léčby – myokarditida

Immunotherapy-Associated Myocarditis

Spisarová M.

Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

Souhrn

Checkpoint inhibitory významně ovlivňují křehkou rovnováhu mezi aktivací a inhibicí T lymfocytů v celém organismu. Právě tímto mechanismem se mohou nejen uplatnit v léčbě celé řady nádorových onemocnění, ale také mohou usnadňovat autoimunitní reakce. Léky této skupiny mohou způsobit exacerbaci již přítomného autoimunitního onemocnění nebo jej spustit u pacienta, který dosud autoimunitním onemocněním vůbec netrpěl. Protilátky cílené na kontrolní body cyklu imunitní odpovědi, ať už anti-CTLA4, či anti-PD-1/PD-L1, jsou obecně dobře tolerovanými léky, avšak je nutno mít na paměti jejich širokou škálu nežádoucích účinků spojených s mechanismem jejich působení, mezi které se mimo jiné řadí i kardiotoxické nežádoucí účinky. Lymfocytární myokarditida je považována za hlavní mechanismus, který je následně zodpovědný za různé spektrum kardiovaskulárních nežádoucích účinků – od asymptomatické elevace kardiomarkerů přes projevy srdečního selhání, arytmie až po kardiogenní šok. Mezi další nežádoucí účinky se řadí poškození perikardu či Tako-tsubo kardiomyopatie.

Klíčová slova

imunoterapie – checkpoint inhibitory – nežádoucí účinky – kardiotoxicita – myokarditida

Summary

The influence of checkpoint inhibitors on the balance between activation and inhibition of T-lymphocytes is strong. The development of checkpoint inhibitors has led to treatments for many malignancies but has also facilitated auto-immune disease. These immunotherapeutic agents could exacerbate already present autoimmune disease or could cause new complications in patients with no prior history of autoimmunity. Monoclonal antibodies targeting immune check points, namely anti-CTLA4 or anti-PD-1/PD-L1, are generally well tolerated; however, treatment with these drugs is associated with a variety of adverse events, such as cardiotoxicity, among others. The main mechanism of cardiac damage is lymphocytic myocarditis, which can consequently cause many symptoms of cardiovascular disease – from asymptomatic elevation of cardiac markers, heart failure, and arrhythmias to cardiogenic shock. Other adverse events include pericardium damage or Tako-tsubo cardiomyopathy.

Key words

immunotherapy – checkpoint inhibitors – adverse events – cardiotoxicity – myocarditis

Autorka deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares she has 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. Martina Spisarová
Onkologická klinika
LF UP a FN Olomouc
I. P. Pavlova 185/6
779 00 Olomouc
e-mail: martina.spisarova@fnol.cz

Obdrženo/Submitted: 31. 10. 2019

Přijato/Accepted: 31. 12. 2019

doi: 10.14735/amko202020

Úvod

Checkpoint inhibitory významně ovlivňují křehkou rovnováhu mezi aktivací a inhibicí T lymfocytů v celém organismu. Právě tímto mechanismem se mohou nejen uplatnit v léčbě celé řady nádorových onemocnění, ale také mohou usnadňovat autoimunitní reakce. Léky této skupiny mohou způsobit exacerbaci již přítomného autoimunitního onemocnění nebo jej spustit u pacienta, který dosud autoimunitním onemocněním vůbec netrpěl [1]. Protilátky cílené na kontrolní body cyklu imunitní odpovědi, ať už anti-CTLA4 (T-lymphocyte-associated protein 4), či anti-PD-1/PD-L1 (programmed cell death protein 1 / programmed cell death protein 1 ligand), jsou obecně dobře tolerovanými léky, avšak je nutno mít na paměti jejich širokou škálu nežádoucích účinků spojených s mechanismem jejich působení (immune-related adverse events – irAEs), mezi které se mimo jiné řadí i kardiotoxické nežádoucí účinky. Lymfocytární myokarditida je považována za hlavní mechanismus, který je následně zodpovědný za různé spektrum kardiovaskulárních nežádoucích účinků – od asymptomatické elevace kardiomarkerů přes projevy srdečního selhání, arytmie až po kardiogenní šok. Mezi další nežádoucí účinky se řadí postižení perikardu či Tako-tsubo kardiomyopatie [2].

Epidemiologie

Incidence klinicky manifestní myokarditidy spojené s léčbou checkpoint inhibitory se v různých zdrojích pohybuje od 0,09 %, dle analýzy z roku 2016, která hodnotila více než 20 000 pacientů léčených ipilimumabem a/nebo nivolumabem, vyšší incidence je pak pozorována u pacientů léčených kombinací anti-CTLA4 a anti-PD-1 protilátkami, kde dosahuje až 0,27 % [3]. V roce 2018 pak Mahmood et al publikovali výsledky multicentrického registru, kde byla incidence imunoterapií indukované myokarditidy dokonce 1,14 % [4]. Myokarditida se vyvíjí většinou na začátku léčby, s mediánem 17–34 dnů od zahájení terapie [3,5]. Postižení myokardu je bohužel považováno za irAE s nejvyšší mortalitou, která se pohybuje od 27–46 % v zá-

vislosti na typu poškození kardiovaskulárního systému [4,6].

Klinický obraz a diagnostika

Imunoterapií indukovaná myokarditida může probíhat zcela asymptomaticky pouze s laboratorní elevací kardiomarkerů, nebo se klinicky manifestuje celou řadou symptomů od hrudního diskomfortu, palpitací, únavy, projevů srdečního selhání (dušnost, otoky dolních končetin), abnormality srdečního převodu, arytmie až po rychle progresující kardiogenní šok [6]. Zpozorování změny klinického stavu a nových potíží, příp. zhoršení preexistujících potíží je zcela základním krokem k diagnostice irAE. U postižení myokardu je ale tento fakt ještě více umocněn. Kardiotoxicita je totiž relativně vzácnou komplikací léčby a eventuální laboratorní markery, které by mohly na přítomnost postižení kardiovaskulárního systému poukázat, nejsou součástí rutinního laboratorního vyšetření.

Celý vyšetřovací algoritmus začíná elektrokardiogramem a echokardiografií, dvěma bazálními neinvazivními vyšetřovacími metodami. Pro myokarditidu mohou svědčit nespecifické změny vlny T, objevit se mohou i nové poruchy převodu, arytmie či elevace ST úseku, u kterých je pak nutné vyloučit akutní koronární syndrom [7]. Změny elektrokardiografie lze pozorovat u 40 % pacientů a až 70 % pacientů má sníženou ejekční frakci levé komory [6,8]. Dalším krokem ve vyšetřovacím algoritmu jsou laboratorní vyšetření kardiomarkerů, troponinu T, NT-proBNP (N-terminální natriuretický mozkový peptid typu B) a CK-MB (kreatinkináza). Tyto bývají zvýšené ve většině případů postižení myokardu.

Myokarditida je často diagnostikována spolu s imunotoxicitou jiných orgánových soustav, a je proto více než nutné mít na paměti, že potvrzení postižení některé z orgánových soustav nevyklučuje další jiné postižení [6]. Indikace k magnetické rezonanci srdce zůstává otázkou. Ačkoli její přínos nebyl jednoznačně prokázán, stále je součástí některých doporučení k vyloučení jiné etiologie kardiální dysfunkce [9]. Vysokou

výpovědní hodnotu má zcela jistě endomyokardiální biopsie. Histologické vyšetření s lymfocytárním infiltrátem srdeční svaloviny může sloužit k potvrzení diagnózy. Toto invazivní vyšetření má však velmi malý klinický význam vzhledem k riziku, které pro pacienta představuje [8].

Management toxicity

Stejně jako u jiných irAE je i u kardiotoxicity základem léčby kortikoterapie. U projevů srdečního selhání je nutné přerušit terapii a zahájit podávání prednisonu v dávce 1–2 mg/kg/den intravenózně či perorálně v závislosti na závažnosti symptomů. U pacientů bez okamžité odpovědi na vysokodávkovanou kortikoterapii je nutné zvážit dávky kortikoidů užívané u potransplantačních rejekcí (methylprednisolon 1 g/den) a přidání dalších imunosupresiv (mykofenolát mofetil, infliximab nebo antitymocytní globulin). Samozřejmě součástí léčby je spolupráce kardiologa, který doplní i léčbu symptomů srdečního selhání [10].

Závěr

Kardiotoxicita nepatří mezi irAE, se kterými by se onkolog ve své klinické praxi setkával často. Přesto by ji, vzhledem k její závažnosti, měl mít na paměti, kdykoli se u pacienta objeví symptomatologie, jako je dušnost, bolesti na hrudi, nově vzniklá arytmie, změny elektrokardiografie aj. Spolupráce s kardiologem je neodmyslitelná a pro zvládnutí této často letální komplikace zcela zásadní.

Literatura

1. Johnson DB, Chandra S, Sosman JA. Immune checkpoint inhibitor toxicity in 2018. *JAMA* 2018; 320(16): 1702–1703. doi: 10.1001/jama.2018.13995.
2. Zarifa A, Salih M, Juan Lopez-Mattei J et al. Cardiotoxicity of FDA-approved immune checkpoint inhibitors: a rare but serious adverse event. *J Immunother* 2018; 1(2): 68–77.
3. Johnson DB, Balko JM, Compton ML et al. Fulminant myocarditis with combination immune checkpoint blockade. *N Engl J Med* 2016; 375: 1749–1755. doi: 10.1056/NEJMoa1609214.
4. Mahmood SS, Fradley MG, Cohen JV et al. Myocarditis in patients treated with immune checkpoint inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71(16): 1755–1764. doi: 10.1016/j.jacc.2018.02.037.
5. Upadhrasta S, Elias H, Patel K et al. Managing cardiotoxicity associated with immune checkpoint inhibitors.

Chronic Dis Transl Med 2019; 5(1): 6–14. doi: 10.1016/j.cdtm.2019.02.004.

6. Moslehi JJ, Salem JE, Sosman JA et al. Increased reporting of fatal immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis. Lancet 2018; 391(10124): 933. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30533-6.

7. Escudier M, Cautela J, Malissen N et al. Clinical features, management, and outcomes of immune checkpoint in-

hibitor-related cardiotoxicity. Circulation 2017; 136(21): 2085–2087. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030571.

8. Yang S, Asnani A. Cardiotoxicities associated with immune checkpoint inhibitors. Curr Probl Cancer 2018; 42(4): 422–432. doi: 10.1016/j.ccurrprobcancer.2018.07.002.

9. Semper H, Muehlberg F, Schulz-Menger J et al. Drug-induced myocarditis after nivolumab treatment in a patient with PDL1-negative squamous cell carcinoma of the

lung. Lung Cancer 2016; 99: 117–119. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.06.025.

10. Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ et al. Management of immune-related adverse events in patients treated with immune checkpoint inhibitor therapy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. J Clin Oncol 2018; 36(17): 1714–1768. doi: 10.1200/JCO.2017.77.6385.

Vyhlášení výsledků soutěže

O NEJLEPŠÍ PRÁCI V ROCE 2019

publikovanou v časopise **Klinická onkologie**

Soutěž uspořádala redakční rada časopisu Klinická onkologie, oficiálního časopisu České onkologické společnosti ČLS JEP a Slovenskej onkologickej spoločnosti SLS, spolu s nakladatelem, společností Ambit Media, a. s.

Vítězi soutěže se stali

v kategorii Původní práce

Macháčková E., Claes K., Miková M., Házová J., Šťahlová Hrabincová E., Vašíčková P., Trbušek M., Navrátilová M., Svoboda M., Foretová L.

za práci

Dvacet let molekulární analýzy genů BRCA1 a BRCA2 v MOÚ – aktuální vývoj v klasifikaci nálezů
Klin Onkol 2019; 32 (Suppl 2): 2S51–2S71

v kategorii Přehled

Burkoň P., Slávik M., Kazda T., Pospíšil P., Procházka T., Vrzal M., Šlampa P.

za práci

Extrakraniální stereotaktická radioterapie – přehled současných indikací
Klin Onkol 2019; 32(1): 10–24

a v kategorii Kazuistika

Pavelka Z., Zitterbart K., Nosková H., Bajčiová V., Slabý O., Štěrba J.

za práci

Účinná imunoterapie glioblastomu u adolescenta se syndromem konstitučního deficitu v mismatch repair opravném systému
Klin Onkol 2019; 32(1): 70–74

Redakce bude kontaktovat první autory.

Ceny budou předány na slavnostním večeru, který se bude konat při příležitosti pořádání XLIV. Brněnských onkologických dnů a XXXIV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky dne 23. 4. 2020.

Vítězům blahopřejeme!

Gastrointestinální toxicita imunoterapie

Gastrointestinal Toxicity of Immunotherapy

Špaček J.

Onkologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Souhrn

Imunoterapie je standardní moderní léčebnou modalitou klinické onkologie. Vzhledem k specifickému charakteru ovlivnění imunitního systému onkologického pacienta přináší moderní imunoterapie nové a někdy velmi obtížně rozpoznatelné autoimunitní nežádoucí účinky. Jednou z orgánových soustav nejčastěji postiženou autoimunitním zánětem je gastrointestinální systém. Incidence autoimunitní enterokolitidy u pacientů podstupujících moderní imunoterapii se pohybuje v rozmezí 1–25 % podle druhu aplikovaného léčiva (checkpoint inhibitoru) a podle toho, zda je pacient léčen monoterapií, či kombinovanou imunoterapií. Klinické příznaky (průjem) a závažnost gastrointestinální toxicity imunoterapie se stratifikují do čtyřstupňové škály. Intenzita farmakoterapie těchto nežádoucích účinků je určena stupněm jejich závažnosti. Většina nežádoucích účinků je reverzibilní a dobře zvládnutelná terapií kortikosteroidy. Pokud nedojde ke zmírnění symptomů během 3–5 dnů při aplikaci vysokých dávek kortikosteroidů, zahájí se imunosupresivní léčba anti-TNF α inhibítorem infliximabem v dávce 5 mg/kg každé 2 týdny, dokud příznaky toxicity imunoterapie nezmizí. Brzké zahájení adekvátní kortikoterapie těchto autoimunitních stavů indukovaných imunoterapií je zásadní pro úspěšnost této podpůrné terapie. Proto by obecné povědomí o možných úskalích terapie checkpoint inhibitory mělo být co nejšířší. Stejně jako hledáme biomarkery predikce efektu imunoterapie, měli bychom se také zaměřit na výzkum v oblasti predikce toxicity imunoterapie.

Klíčová slova

imunoterapie – checkpoint inhibitory – autoimunitní zánět – enterokolitida – kortikosteroidy

Summary

Immunotherapy is a standard modern therapeutic modality of clinical oncology. Due to the specific nature of affecting the immune system of the oncology patient, modern immunotherapy brings new and sometimes difficult to recognise autoimmune adverse reactions. One of the organ systems most commonly affected by autoimmune inflammation is the gastrointestinal system. The incidence of autoimmune enterocolitis in patients undergoing immunotherapy ranges from 1 to 25% depending on the type of drug administered (checkpoint inhibitor) and whether the patient is being treated with monotherapy or combination immunotherapy. The clinical signs (diarrhoea) and severity of gastrointestinal toxicity of immunotherapy are stratified on a four-step scale. The intensity of pharmacotherapy for these adverse events is determined by the degree of severity. Most side effects are reversible and well-managed with corticosteroid therapy. If symptoms are not relieved within 3–5 days with high doses of corticosteroids, immunosuppressive therapy with the anti-TNF α inhibitor infliximab at 5 mg/kg should be given every 2 weeks until the signs of toxicity have disappeared. Early initiation of adequate corticotherapy for these auto-immune conditions induced by immunotherapy is essential to the success of this supportive therapy. Therefore, general awareness of the potential pitfalls of checkpoint inhibitor therapy should be well understood and anticipated. Just as we are looking for biomarkers to predict the effect of immunotherapy, we should also focus on research into predicting the toxicity of immunotherapy.

Key words

immunotherapy – checkpoint inhibitors – autoimmune inflammation – enterocolitis – corticosteroids

Autor deklaruje, že v souvislosti s předmětem studie nemá žádné komerční zájmy.

The author declares he has 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. Jan Špaček
Onkologická klinika
1. LF UK a VFN v Praze
U Nemocnice 2
128 08 Praha
e-mail: jan.spacek@vfn.cz

Obdrženo/Submitted: 29. 10. 2019

Přijato/Accepted: 11. 1. 2020

doi: 10.14735/amko202023

Úvod

Imunoterapie je standardní moderní léčebnou modalitou klinické onkologie. Vzhledem k specifickému charakteru modifikace imunitního systému onkologického pacienta přináší moderní imunoterapie nové a někdy velmi obtížně rozpoznatelné autoimunitní nežádoucí účinky. Jednou z orgánových soustav nejčastěji postiženou autoimunitním zánětem je gastrointestinální systém.

Epidemiologie

Imunitně podmíněné nežádoucí účinky (immune related adverse effect – irAE) ovlivňující gastrointestinální systém (GIT) jsou během léčby moderní imunoterapií poměrně frekventované. Do gastrointestinálních obtíží při imunoterapii se řadí zejména průjem doprovázející autoimunitní zánět střevní sliznice. Incidence autoimunitní enterokolitidy u pacientů podstupujících moderní imunoterapii se pohybuje v rozmezí 1–25 % podle druhu aplikovaného léčiva (checkpoint inhibitoru) a podle toho, zda je pacient léčen monoterapií, či kombinovanou imunoterapií. Endoskopický a histologický obraz autoimunitních střevních zánětů a idiopatických střevních zánětů je do jisté míry totožný. Rozdíl je zejména v bohatších infiltracích polymorfonukleárních granulocytů ve sliznici střeva postiženého autoimunitním zánětem oproti většímu zastoupení lymfocytů ve střevě postiženém chronickým idiopatickým střevním zánětem. U více než dvou třetin pacientů, kteří absolvovali terapii anti-CTLA-4 protilátkou, se vyskytne nějaký druh irAE. Jedna třetina pacientů, kteří jsou takto léčeni, manifestuje irAE právě v oblasti gastrointestinálního traktu, jako jsou aftózní vředy, ezofagitida, gastritida a enterokolitida, která se obvykle projevuje jako průjem [1,2]. Incidence průjmu stupně 3–4 je vyšší u pacientů, kteří podstupují terapii anti-CTLA-4 protilátkou (jako je ipilimumab), ve srovnání s pacienty, kteří mají léčbu anti-PD-1/anti-PD-L1 (programmed cell death-1 / programmed cell death-1 ligand) protilátkou (jako je nivolumab nebo pembrolizumab) [3,4]. Vyskytovala se u 21 % pacientů s maligním melanomem léčených ipilimumabem. Bylo také prokázáno, že incidence

kolitidy stupně 3–4 se zvýšila z 13 na 16 % u pacientů s karcinomem prostaty navýšením dávky ipilimumabu z 5 na 10 mg/kg [5]. Bez zajímavosti není ani fakt, že profil toxicity se nezvýšil, pokud se dávka nivolumabu nebo pembrolizumabu zvýšila z FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) doporučené dávky 2 mg/kg každé 3 týdny na vyšší dávky 10 mg/kg každé 2 nebo 3 týdny. Lze proto tvrdit, že gastrointestinální toxicita způsobená terapií checkpoint inhibitory závisí v případě anti-CTLA-4 protilátek na dávce, zatímco v případě anti-PD-1/anti-PD-L1 protilátek tomu tak není [6].

Rizikové faktory

Střevní mikrobiom

Základní složení mikrobioty může predikovat riziko vzniku enterokolitidy indukované ipilimumabem. V prospektivní studii s 34 pacienty, u nichž bylo analyzováno složení střevního mikrobiomu před zahájením imunoterapie, byla zjištěna zvýšená přítomnost bakterií kmene *Bacteroides* u pacientů, u kterých se při léčbě ipilimumabem neobjevila autoimunitní enterokolitida [7]. Další studie s 26 pacienty léčenými ipilimumabem pro metastatický maligní melanom ukázala, že u pacientů s větším zastoupením bakterií druhu *Bacteroides* ve stolici se nerozvinula autoimunitní enterokolitida a většina druhů bakterií souvisejících s autoimunitní enterokolitidou byla z kmene *Firmicutes* [8]. Ve srovnání s pacienty, jejichž mikrobiom byl před léčbou složen zejména z bakterií kmene *Bacteroides*, vykazovali pacienti s mikrobiotou obohacenou o *Faecalibacterium* a *Firmicutes* delší přežití bez progresu a delší celkové přežití.

Autoimunitní choroby

Pacienti s anamnézou autoimunitních onemocnění jsou po dobu terapie checkpoint inhibitory ohroženi zhoršením svého autoimunitního onemocnění. Toxicita terapie je však často mírná a zvládnutelná bez přerušení imunoterapie [9]. U pacientů, kteří již zažili irAE při předchozí terapii checkpoint inhibitorem, existuje větší riziko rozvoje irAE po léčbě jiným typem checkpoint inhibitoru. Riziko irAE se také zvyšuje při kombinované terapii [9,10].

Další rizikové faktory

Nedávná data prokázala, že užívání nesteroidních antirevmatik je spojeno se zvýšeným rizikem enterokolitidy vyvolané ipilimumabem [11]. U pacientů s Crohnovou chorobou a ulcerativní kolitidou je k dispozici jen málo údajů o riziku vzniku autoimunitní enterokolitidy indukované protinádorovou imunoterapií.

Klinický obraz

Nejčastějším klinickým korelátem GIT toxicity imunoterapie je průjem, který je definován jako zvýšená frekvence řídké stolice. Jeho patologickoanatomickým podkladem je autoimunitní enterokolitida projevující se bolestmi břicha, krvácením z konečníku nebo přítomností hlenu ve stolici [12]. Přítomnost enterokolitidy zvyšuje riziko dalších komplikací, vč. vzniku ileu, střevní distenze, toxického megakolonu, perforace střeva až klinické smrti pacienta. Klinická závažnost průjmu i kolitidy je odstupňována podle společných terminologických kritérií pro nežádoucí účinky [13]. Mírný průjem (stupeň 1) je definován jako < 4 stolice denně nad standardní počet stolic daného pacienta. Průjem stupně 2 je definován jako 4–6 stolic denně nad standardní počet stolic pacienta, zatímco enterokolitida stupně 2 je charakterizována bolestmi břicha nebo krví nebo hlenem ve stolici. Těžký průjem (stupeň 3) je definován jako ≥ 7 stolic denně nad standardní počet stolic pacienta a enterokolitida stupně 3 je navíc definována přítomností peritoneálních příznaků – horečkou, ileem a hrozící perforací střeva. Označení stupně 4 se liší od enterokolitidy stupně 3 zvýšenou závažností klinických příznaků a život ohrožující povahou těchto symptomů.

Diagnostika

Při prvním průjmu nebo bolestech břicha by měly být u pacientů léčených terapií checkpoint inhibitory nejprve vyloučeny infekční příčiny průjmu. Stolica by měla být zaslána na standardní mikrobiologická vyšetření, vč. vyšetření parazitologického a testování na *Clostridium difficile* [14]. Infekční kolitida a enterokolitida indukovaná imunoterapií

pií mohou koexistovat, jak ukazují dvě kazuistiky koinfekce cytomegaloviru (CMV) a *Salmonelly* u pacientů podstupujících imunoterapii [15,16]. Přestože infekční etiologie průjmů je v rámci diferenciální diagnostiky pravděpodobnější příčinou obtíží, je třeba vyloučit i GIT metastázy jako potenciální důvod trávicích obtíží. Pacienti s klinickými příznaky peritonitidy, jako je peritoneální dráždění, horečka, distenze střeva či rigidita břišní stěny, by měli podstoupit vyšetření břicha výpočetní tomografií (computed tomography – CT). Toto vyšetření by mělo vyloučit perforace tlustého střeva, což je vzácná, ale dobře zdokumentovaná nežádoucí příhoda, která může být fatální [17–19]. Kolonoskopie s vyšetřením terminálního ilea a biopsií tlustého střeva je u pacientů s přetrvávajícím průjmem stupně ≥ 2 zlatým standardním diagnostickým testem. Pacienti s příznaky horního GIT, jako je nevolnost nebo zvracení, by měli podstoupit gastrofibroskopii s biopsií. Normální vzhled sliznice při endoskopickém vyšetření nevylučuje přítomnost autoimunitního zánětu, a proto musí být vždy provedena slizniční biopsie. Někteří pacienti s imunitně zprostředkovaným průjmem nebo enterokolitidou mohou vykazovat slizniční ulcerace, eroze, erytém nebo ztrátu cévních kresby. Možný je však také fyziologický nálezh na mukóze [20]. Enterokolitida vyvolaná ipilimumabem velmi často způsobuje léze v oblasti konečníku a sigmoidea, proto pro diagnostiku obvykle postačuje flexibilní sigmoidoskopie či rektoskopie. Mezi závažnostmi autoimunitního zánětu, resp. jeho stupněm a endoskopickým nálezem nebyla prokázána žádná korelace.

Léčba gastrointestinálních toxických účinků imunoterapie

Optimální léčba imunitně indukované enterokolitidy vyžaduje zejména včasné rozpoznání a následně rychlé podání immunosupresivních medikamentů, jejichž dávkování je přizpůsobeno vážnosti klinických projevů. U mírného průjmu stupně 1 mohou pacienti pokračovat v terapii checkpoint inhibitory při symptomatické terapii (podávání loperamidu a substituce elektrolytů) [21]. Pro průjem nebo en-

terokolitidu stupně 2, definované jako 4–6 stolic denně nad standardní denní počet stolic pacienta + klinické symptomy (bolesti břicha, krev nebo hlen ve stolici), musí být před zahájením kortikoterapie vyloučeny infekční příčiny. Imunoterapie by v těchto případech měla být zastavena a podávání perorálních kortikosteroidů by mělo být zahájeno dávkou 0,5–1 mg/kg za den prednisonu, pokud příznaky přetrvávají > 1 týden.

Pro závažnou GIT toxicitu stupně 3–4, definovanou jako ≥ 7 stolic nad běžný počet stolic pacienta za 1 den nebo přítomnost peritoneálních příznaků, ileu, horečky či perforací střeva by měla být terapie checkpoint inhibitory přerušena trvale. Pacienti s toxicitou stupně 3–4 jsou obvykle hospitalizováni vzhledem k nutnosti rehydratační infuzní terapie a kortikoterapie. Terapie systémovými kortikosteroidy se zahajuje v dávce 1–2 mg/kg za den (prednison nebo ekvivalent), jakmile je vyloučena perforace střeva a infekce *Clostridium difficile*.

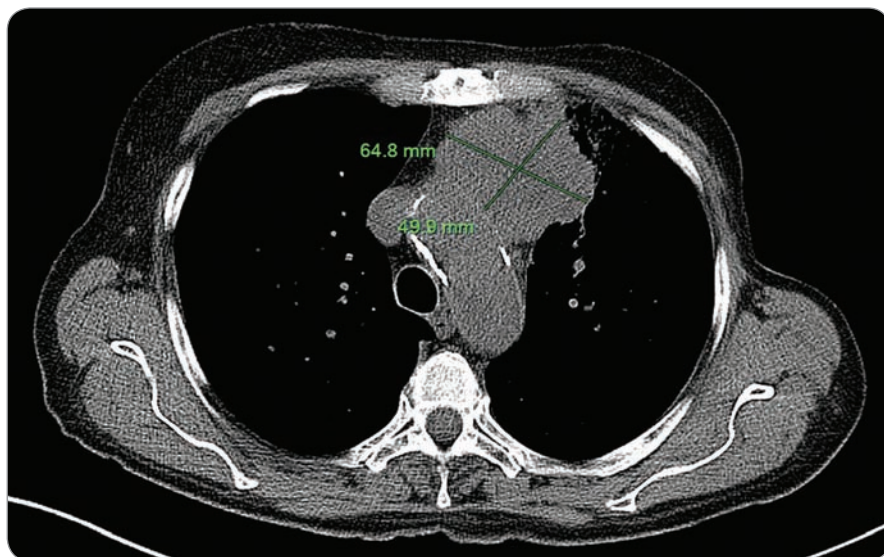
Jedna až dvě třetiny pacientů nereagují na vysoké dávky intravenózních kortikosteroidů nebo mají relaps enterokolitidy vyžadující zvýšení dávky kortikoterapie [21]. Ve studii s 92 pacienty, u nichž se při imunoterapii maligního melanomu nebo bronchogenního karcinomu vyvinul imunitně indukovaný průjem či enterokolitida, byla u 54 (56 %) z nich tato příhoda rezistentní na kortikoterapii [22]. Recentní studie rovněž naznačují, že přítomnost ulcerací tlustého střeva při endoskopickém vyšetření u pacientů s autoimunitní enterokolitidou tuto rezistenci na kortikoterapii predikuje [22–24]. Další studie s 92 pacienty s autoimunitní enterokolitidou vyžadující terapii kortikosteroidy potvrdila, že přítomnost ulcerace, pankolitidy a vysokého Mayo skóre nebo vysoké skóre van der Heijde, které posuzují závažnost kolitidy na základě endoskopického nálezu, predikují rezistenci na kortikoterapii a určují pacienty s potenciálním benefitem z terapie infliximabem [22,25,26]. Pokud nedojde ke zmírnění symptomů během 3–5 dnů při aplikaci vysokých dávek kortikosteroidů, zahájí se immunosupresivní léčba

anti-TNF α inhibitorem infliximabem v dávce 5 mg/kg každé 2 týdny, dokud nezmizí příznaky [26]. Pacienti, kteří vyžadují terapii infliximabem, mají obvykle vynikající odpověď.

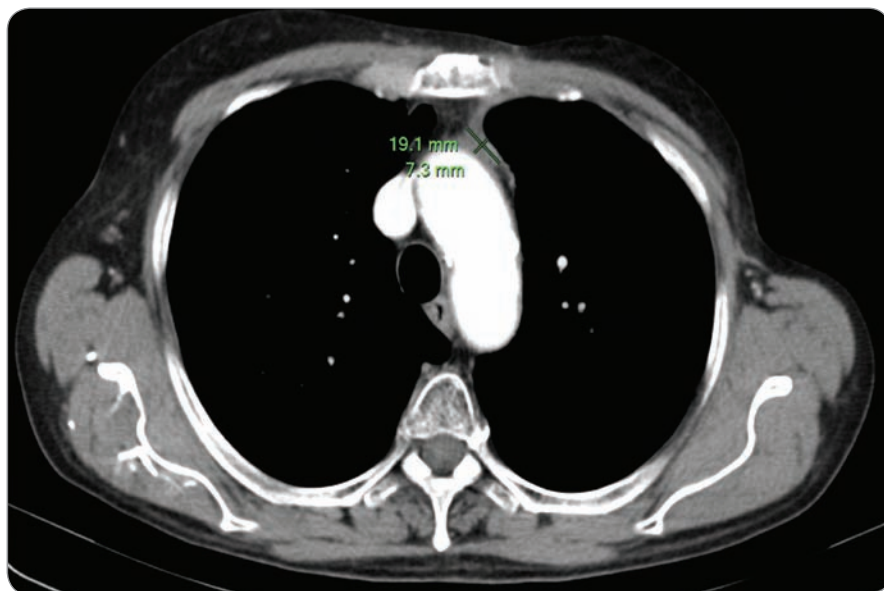
Podle všech klinických doporučení se trvale ukončuje imunoterapie při enterokolitidě stupně 4. Při kolitidě stupně 3 se doporučení liší. Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) doporučuje pokračovat v imunoterapii, jakmile je kortikosteroid snížen na dávku ≤ 10 mg/den a pacient zůstává bez příznaků. American Society of Clinical Oncology (ASCO) doporučuje zvážit trvalé přerušování léčby anti-CTLA-4 protilátkami, zatímco PD-1 nebo PD-L1 inhibitory mohou být znovu podávány, pokud se autoimunitní příznaky drží na stupni 1. European Society for Medical Oncology (ESMO) neposkytuje žádná jasná doporučení ohledně pokračování v imunoterapii u průjmu či enterokolitidy stupně 3. Všechny odborné společnosti souhlasí, že pokračování v imunoterapii je možné při autoimunitní enterokolitidě či průjmu stupně 2, jakmile je zaznamenáno zlepšení klinického stavu pacienta. U pacientů, u nichž se objeví perforace tlustého střeva, je indikována urgentní subtotalní kolektomie. Někdy může být doporučena i totální kolektomie, protože léze tlustého střeva jsou obecně často rozsáhlé a po segmentální resekci tlustého střeva záněť recidivuje do zbývajících tlustého střeva [20].

Závěr

Imunoterapie představuje naději pro určitou skupinu pacientů napříč širokým spektrem nádorových onemocnění. Efektivita terapie je vyzorována u zhruba třetiny pacientů. Stejně jako hledáme biomarkery predikce efektu imunoterapie, měli bychom se také zaměřit na výzkum v oblasti predikce toxicity imunoterapie. Tento typ toxicity je zcela specifický a souvisí s vlastním mechanismem účinku moderní imunoterapie. Může mít projevy v různé intenzitě od lehkých až po život ohrožující stavy. Brzké zahájení adekvátní kortikoterapie těchto autoimunitních stavů indukovaných imunoterapií je zásadní pro její úspěšnost. Proto by obecné povědomí



Obr. 1. Primární tumor před zahájením onkologické terapie (16. 5. 2013).



Obr. 2. Téměř kompletní zobrazovací remise po konkomitantní chemoradioterapii (12. 2. 2014).

o možných úskalích terapie checkpoint inhibitory mělo být co nejširší.

Kazuistika

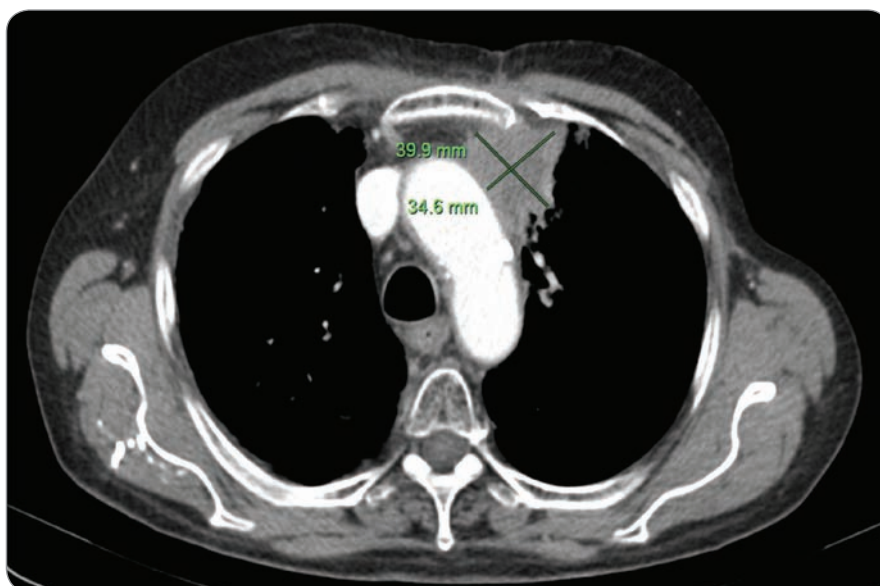
Projevy a terapii GIT toxicity imunoterapie budeme demonstrovat na případu pacientky s generalizovaným spinocelulárním karcinomem mediastina, léčené v 6. linii paliativní terapie nivolumabem. Pacientka se narodila v roce 1945. Byla silnou kuřačkou, kouřila od 18 do 56 let přibližně 20 cigaret denně a po 8leté pauze kouřila už jen příležitostně. V roce 2001 byla léčena pro invazivní duktální

karcinom levého prsu, který byl resekován a pacientka následně podstoupila adjuvantní radioterapii a hormonální léčbu. Jiné závažné interní komorbidity nebyly u pacientky přítomny. V době diagnózy karcinomu mediastina byla pacientka léčena na plicním oddělení pro chronickou obstrukční chorobu plic. Od ledna 2013 trpěla zhoršující se dušností, a proto byla odeslána praktickým lékařem na CT vyšetření. Na CT byl v květnu roku 2013 pacientce diagnostikován tumor horního mediastina s infiltrací do levé pleury a perikardu. Tumor byl

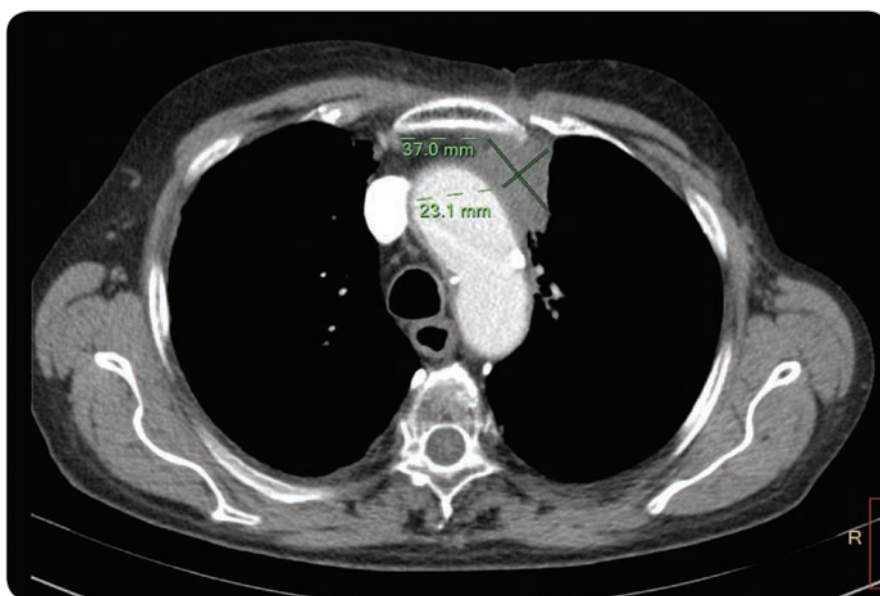
verifikován cestou mediastinoskopie, jednalo se o spinocelulární karcinom. Bronchoskopické vyšetření, otorinolaryngologické vyšetření a PET/CT neobjasnily primární původ nádorového bujení a vyloučily jiná vzdálená ložiska. Bylo tedy jasné pouze to, že se jedná o spinocelulární karcinom, v diferenciální diagnóze velmi pravděpodobně bronchogenní, avšak byla zvažována i možnost skvamózního karcinomu thymu. Rozsah primárního tumoru byl poměrně velký (obr. 1) a zcela jistě se jednalo o inoperabilní nález. Vzhledem k lokalizaci nádoru v předním mediastinu bez postižení plicního parenchymu a zjevným klinickým obtížím pacientky se přistoupilo k zahájení chemoterapie PAC (cisplatin, doxorubicin, cyklofosamid) s primární profylaxí G-CSF a následně 35 frakcím radioterapie. Efekt této léčby byl značný a došlo k významné parciální regresi (obr. 2). Dle kontrolní CT hrudníku, provedené v květnu 2014, však byla popsána mírná progresse ložiska v mediastinu a nové ložisko na pleuře. Kvůli progresi a elevaci nádorových markerů specifických pro karcinom prsu zahájila pacientka vzhledem k onkologické anamnéze perorální chemoterapii kapecitabinem v monoterapii, a to až do října roku 2014. Vzhledem k další progresi nádorového onemocnění byla změněna terapie na další linii léčby paklitaxelem, jehož užívání ale musela pacientka ukončit po druhém cyklu pro alergickou reakci. Pro alergii byl dále až do května 2015 podáván nab-paklitaxel. Kvůli dalšímu zvětšení nádoru o 1 cm byla terapie změněna na perorální, metronomické podávání navelbinu. Tuto léčbu však pacientka extrémně špatně tolerovala. Dostavilo se nechutenství, zvracení, začala hubnout a progredovala i dušnost. Pro masivní pneumonii byla v červenci roku 2015 ukončena specifická onkologická terapie a pacientka byla převedena do režimu nejlepší možné symptomatické terapie.

Po ukončení onkologické léčby nevolnosti zcela odezněly, klidově a při malé námaze byla pacientka na nižší dávce transdermálního opiátu (fentanyl 25 mcg/h) prakticky bez dušnosti. Výkonnostní stav se výrazně zlepšil a začala přibírat na váze. Vzhledem

k možnému plicnímu původu tumoru a značné předléčenosti pacientky byla od listopadu 2015 indikována terapie nivolumabem v rámci specifického léčebného programu. Před zahájením imunoterapie podstoupila pacientka kontrolní CT trupu, která ukázala progresi do zhruba dvou třetin původní velikosti (obr. 3). První aplikaci v standardním dávkování 3 mg/kg absolvovala pacientka dne 12. 11. 2015. Po čtvrtém cyklu se objevila první epizoda průjmovitého onemocnění. Pacientka měla až 7 stolic denně a situace si vyžádala podpurnou a rehydratační infuzní terapii za hospitalizace. Vzhledem k podezření na rozvoj autoimunitní enterokolitidy byla indikována perorální kortikoterapie v dávce 60 mg prednisonu denně. Klinický stav se poměrně rychle upravil a pacientka absolvovala další cyklus imunoterapie při snížené dávce prednisonu 40 mg denně. Šestý cyklus nebyl dne 25. 2. 2016 podán pro zánět průdušek. Během těchto komplikací byla provedena restagingová CT, která prokázala i u takto předléčené pacientky pozoruhodnou efektivitu nivolumabu (obr. 4). Následně byla ovšem opět nutná hospitalizace z důvodu febrilních stavů a trombocytopenie při rozsáhlé pravostranné pneumonii. Pneumokoková pravostranná pneumonie byla léčena antibiotiky a pacientka mohla být dimotována ve stabilizovaném stavu do domácího prostředí. Přes chronickou kortikoterapii se dostavila druhá epizoda průjmů autoimunitní etiologie G3 vyžadující intenzifikaci kortikoterapie. Pacientka byla převedena na 2 mg/kg/den metylprednisolonu podávaného intravenózně. Při selhání této terapie (průjem pokračoval více než 5 dní) byl indikován infliximab, který vyžadoval schválení revizního lékaře. Teprve po třech aplikacích infliximabu průjmy ustaly a klinický stav se stabilizoval. Dle kontrolní CT v září 2016 bylo onemocnění stabilizováno. Vzhledem k rizikovosti recidivy autoimunitních GIT komplikací byla imunoterapie ukončena a pacientka byla nadále léčena pouze symptomaticky. V prosinci 2016 byla na centrálním interním příjmu vyšetřena s příznaky rozvíjejícího se septického stavu. V průběhu následné hospitalizace v lednu 2017 došlo k po-



Obr. 3. Poslední CT před zahájením terapie nivolumabem (14. 10. 2015).



Obr. 4. CT hrudníku a břicha z 10. 2. 2016 po čtyřech aplikacích nivolumabu – regrese patologického ložiska v hrudníku.

stupnému zhoršení stavu vedoucímu k úmrtí.

Shrnutí kauzistiky

I u takto komplikované pacientky s rozsáhlým primárním nádorovým postižením, kde selhala řada onkologických léčebných postupů, byla imunoterapie efektivní a výrazně prodloužila život. GIT toxicita byla úspěšně залечена i přes primární rezistenci na kortikoterapii. Autoimunitní enterokolitida může být život ohrožující komplikací imunoterapie, ale

včasná aplikace kortikosteroidů a při jejich selhání infliximabu může předejít jejím fatálním důsledkům.

Literatura

1. Graziani G, Tentori L, Navarra P. Ipilimumab: a novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmacol Res* 2012; 65(1): 9–22. doi: 10.1016/j.phrs.2011.09.002.
2. Gupta A, De Felice KM, Loftus EV jr et al. Systematic review: colitis associated with anti-CTLA-4 therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2015; 42(4): 406–417. doi: 10.1111/apt.13281.
3. Hofmann L, Forschner A, Loquai C et al. Cutaneous, gastrointestinal, hepatic, endocrine, and renal side-effects of

- anti-PD-1 therapy. *Eur J Cancer* 2016; 60: 190–209. doi: 10.1016/j.ejca.2016.02.025.
4. Beck KE, Blansfield JA, Tran KQ et al. Enterocolitis in patients with cancer after antibody blockade of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4. *J Clin Oncol* 2006; 24(15): 2283–2289. doi: 10.1200/JCO.2005.04.5716.
5. Slovin SF, Higano CS, Hamid O et al. Ipilimumab alone or in combination with radiotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer: results from an open-label, multicenter phase I/II study. *Ann Oncol* 2013; 24(7): 1813–1821. doi: 10.1093/annonc/mdt107.
6. Kumar V, Chaudhary N, Garg M et al. Corrigendum: current diagnosis and management of immune related adverse events (irAEs) induced by immune checkpoint inhibitor therapy. *Front Pharmacol* 2017; 8: 49. doi: 10.3389/fphar.2017.00049.
7. Dubin K, Callahan MK, Ren B et al. Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat Commun* 2016; 7: 10391. doi: 10.1038/ncomms10391.
8. Chaput N, Lepage P, Coutzac C et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol* 2017; 28(6): 1368–1379. doi: 10.1093/annonc/mdx108.
9. Menzies AM, Johnson DB, Ramanujam S et al. Anti-PD-1 therapy in patients with advanced melanoma and preexisting autoimmune disorders or major toxicity with ipilimumab. *Ann Oncol* 2017; 28(2): 368–376. doi: 10.1093/annonc/mdw443.
10. Bowyer S, Prithviraj P, Lorigan P et al. Efficacy and toxicity of treatment with the anti-CTLA-4 antibody ipilimumab in patients with metastatic melanoma after prior anti-PD-1 therapy. *Br J Cancer* 2016; 114(10): 1084–1089. doi: 10.1038/bjc.2016.107.
11. Marthey L, Mateus C, Mussini C et al. Cancer immunotherapy with anti-CTLA-4 monoclonal antibodies induces an inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2016; 10(4): 395–401. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjv227.
12. Postow MA. Managing immune checkpoint-blocking antibody side effects. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015; 35: 76–83. doi: 10.14694/EdBook_AM.2015.35.76.
13. Marin-Acevedo JA, Harris DM, Burton MC. Immunotherapy-induced colitis: an emerging problem for the hospitalist. *J Hosp Med* 2018; 13(6): 413–418. doi: 10.12788/jhm.2925.
14. Rawa T, Regula J. Management of gastrointestinal toxicity from nivolumab therapy. *Oncol Clin Pract* 2017; 13(5): 225–229. doi: 10.5603/OCP.2017.0026.
15. McCutcheon JL, McClain CM, Puzanov I et al. Infectious colitis associated with ipilimumab therapy. *Gastroenterology Res* 2014; 7(1): 28–31. doi: 10.14740/gr594e.
16. Lankes K, Hundorfean G, Harrer T et al. Anti-TNF-refractory colitis after checkpoint inhibitor therapy: possible role of CMV-mediated immunopathogenesis. *Oncoimmunology* 2016; 5(6): e1128611. doi: 10.1080/2162402X.2015.1128611.
17. Dilling P, Walczak J, Pikiel P et al. Multiple colon perforation as a fatal complication during treatment of metastatic melanoma with ipilimumab – case report. *Pol Przegl Chir* 2014; 86(2): 94–96. doi: 10.2478/pjs-2014-0017.
18. Burdine L, Lai K, Laryea JA. Ipilimumab-induced colonic perforation. *J Surg Case Rep* 2014; 86(2): 94–96. doi: 10.1093/jscr/rju010.
19. Shah R, Witt D, Asif T et al. Ipilimumab as a cause of severe pan-colitis and colonic perforation. *Cureus* 2017; 9(4): e1182. doi: 10.7759/cureus.1182.
20. Verschuren EC, van den Eertwegh AJ, Wonders J et al. Clinical, endoscopic, and histologic characteristics of ipilimumab-associated colitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14(6): 836–842. doi: 10.1016/j.cgh.2015.12.028.
21. Weber JS, Köhler KC, Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J Clin Oncol* 2012; 30(21): 2691–2697. doi: 10.1200/JCO.2012.41.6750.
22. Geukes Foppen MH, Rozeman EA, van Wilpe S et al. Immune checkpoint inhibition-related colitis: symptoms, endoscopic features, histology and response to management. *ESMO Open* 2018; 3(1): e000278. doi: 10.1136/esmoopen-2017-000278.
23. Jain A, Lipson EJ, Sharfman WH et al. Colonic ulcerations may predict steroid-refractory course in patients with ipilimumab-mediated enterocolitis. *World J Gastroenterol* 2017; 23(11): 2023–2028. doi: 10.3748/wjg.v23.i11.2023.
24. Wang Y, Abu-Sbeih H, Mao E et al. Endoscopic and histologic features of immune checkpoint inhibitor-related colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2018; 24(8): 1695–1705. doi: 10.1093/ibd/izy104.
25. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987; 317(26): 1625–1629. doi: 10.1056/NEJM198712243172603.
26. van der Heide H, van den Brandt-Gradel V, Tytgat GN et al. Comparison of beclomethasone dipropionate and prednisolone 21phosphate enemas in the treatment of ulcerative proctitis. *J Clin Gastroenterol* 1988; 10(2): 169–172. doi: 10.1097/00004836-198804000-00013.

Renální toxicita imuno-onkologické léčby

Renal Toxicity of Cancer Immunotherapy

Büchler T.

Onkologická klinika 1. LF UK a Thomayerovy nemocnice

Souhrn

Východiska: Akutní poškození renálních funkcí je relativně vzácnou komplikací protinádorové imunoterapie. Incidence renální toxicity následkem imuno-onkologické léčby je relativně nízká – přibližně 2 % u nemocných léčených inhibitory PD-1/PD-L1 a 4,5 % u kombinace anti-PD-1/PD-L1 léků s inhibitory CTLA-4. Nejčastější základní patologií je akutní tubulointerstiální nefritida. Dalším typem renálního postižení je autoimunitní nefropatie projevující se iontovou dysbalancí. U pacientů se středně závažným a závažným poškozením ledvin je indikováno přerušení imunoterapie a léčba kortikosteroidy. **Případ:** Pacient ve věku 61 let s metastatickým renálním karcinomem byl po 7 měsících léčby nivolumabem hospitalizován pro celkové zhoršení stavu, výraznou slabost, nevolnost a nechutenství. Laboratorní vyšetření prokázalo zhoršení glomerulární filtrace, těžkou hyperkalemii a metabolickou acidózu. Hladiny hormonů štítné žlázy a kortizolu byly v normálním rozmezí. Stanovili jsme diagnózu renální tubulární acidózy následkem imuno-onkologické léčby a zahájili léčbu metylprednisolonem. Při této léčbě došlo k rychlé úpravě iontogramu i potíží. Ambulantně jsme dávku prednisonu postupně snižovali, ale po snížení na 5 mg denně došlo k rekurenci hyperkalemie a u pacienta byla ponechána trvale dávka 10 mg prednisonu denně orálně. Imunoterapie nebyla znovu nasazena. **Závěr:** Renální toxicita imuno-onkologické léčby se zpočátku obvykle projevuje zvýšeným sérovým kreatininem bez jakýchkoli klinických příznaků. Postupně se mohou rozvinout poruchy elektrolytů, oligurie, anurie a otoky. V rámci diferenciální diagnostiky iontového rozvratu je nutné vyloučit endokrinní a metabolické poruchy, jako nově vzniklý diabetes mellitus 1. typu, hypofyzitida, adrenální insuficience a hypotyreóza. Léčbou volby jsou kortikoidy v běžné imunosupresivní dávce. Prognóza je příznivá, protože renální toxicita bez ohledu na patofyziologický podklad dobře reaguje na léčbu kortikoidy.

Klíčová slova

nefritida – hyperkalemie – kortikosteroidy – imunoterapie

Autor obdržel honoráře, cestovní granty a podporu výzkumu od následujících firem s produkty v oblasti nádorové imunoterapie: Bristol Myers Squibb, MSD, Roche, Astra Zeneca, Merck.

The author received honoraria, travel grants, and research support from the following companies with cancer immunotherapy products: Bristol Myers Squibb, MSD, Roche, Astra Zeneca, Merck.

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.



doc. MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

Onkologická klinika

1. LF UK a Thomayerovy nemocnice

Vídeňská 800

140 59 Praha

e-mail: tomas.buchler@ftn.cz

Obdrženo/Submitted: 16. 10. 2019

Přijato/Accepted: 25. 10. 2019

doi: 10.14735/amko202029

Summary

Background: Acute renal impairment is a relatively rare complication of anti-tumour immunotherapy. The incidence of renal toxicity due to immuno-oncological therapy is relatively low, approximately 2% in patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors and 4.5% with combination treatments with PD-1/PD-L1 therapy and a CTLA-4 inhibitor. The most common underlying pathology is acute tubulointerstitial nephritis. Auto-immune nephropathy presenting as an electrolyte imbalance may also occur during immuno-oncological therapy. Discontinuation of immunotherapy and corticosteroid therapy are indicated in patients with moderate to severe renal toxicity. **Case:** A 61-year-old patient with metastatic renal cell carcinoma was admitted to hospital after 7 months of treatment with nivolumab for general deterioration, severe weakness, nausea, and anorexia. Laboratory examinations showed worsening of the glomerular filtration rate, severe hyperkalaemia, and metabolic acidosis. Thyroid hormone and cortisol levels were within normal ranges. Renal tubular acidosis resulting from immuno-oncological therapy was diagnosed, and treatment with methylprednisolone was initiated. Electrolyte abnormalities and symptoms improved rapidly, after which the dose of prednisone was gradually reduced; however, after a reduction to 5 mg daily, hyperkalaemia recurred and the patient was kept on a maintenance dose of 10 mg prednisone administered orally on a daily basis thereafter. Immunotherapy was not reintroduced. **Conclusion:** Renal toxicity following immuno-oncological therapy usually presents initially as an increase in the serum creatinine level without any clinical signs or symptoms. Electrolyte disturbances, oliguria, anuria, and swelling may develop gradually. Endocrine and metabolic disorders such as new-onset type 1 diabetes mellitus, hypophysitis, adrenal insufficiency, and hypothyroidism should be excluded as possible causes of electrolyte abnormalities. Corticosteroids at the usual immunosuppressive dose are the treatment of choice. The prognosis is generally favourable because renal toxicity responds well to corticosteroid treatment regardless of the underlying pathology.

Key words

nephritis – hyperkalaemia – corticosteroids – immunotherapy

Kazuistika

Pacient ve věku 61 let bez významných komorbidit prodělal v roce 2009 pravostannou nefrektomii pro světlebuněčný renální karcinom grade 2 (pT1 N0 M0). Po 7 letech se v rámci restagingu zjistila oboustranná plicní ložiska. Dále se u pacienta objevila bulka v dutině ústní sublinguálně. Biopsie z dutiny ústní i bronchoskopicky odebraný cytologický vzorek potvrdily metastázy renálního karcinomu. U pacienta jsme zahájili terapii pazopanibem, která však musela být po 6 měsících ukončena pro progresi. V další linii byl nemocný léčen sunitinibem celkem 8 měsíců, kdy opět dochází k progresi onemocnění. Byl nasazen nivolumab v dávkování 3 mg/kg à 2 týdny, později byl režim v souladu s vývojem standardu změněn na 480 mg à 4 týdny. Po 7 měsících léčby byl nemocný hospitalizován pro celkové zhoršení stavu, výraznou slabost, nevolnosti a nechutenství.

Laboratorní vyšetření prokázalo zhoršení glomerulární filtrace z hodnot kolem 0,9 ml/s na 0,44 ml/s, těžkou hyperkalemii (6,9 mmol/l) a metabolickou acidózu (žilní astrap: pH 7,222; base deficit –10,1; standardní bikarbonát 15,70). Močový sediment byl v normě. Hladiny hormonů štítné žlázy a kortizolu byly v normálním rozmezí. Stanovili jsme diagnózu renální tubulární acidózy následkem imuno-onkologické léčby a zahá-

jili léčbu metylprednisolonem v dávce 1 mg/kg denně intravenózně. Při této léčbě došlo k úpravě iontogramu i potíží v průběhu 7 dnů. Pacient byl propuštěn na udržovací dávce 30 mg prednisonu denně. Ambulantně jsme dávku prednisonu postupně snižovali, ale po snížení na 5 mg denně došlo k rekurenci hyperkalemie a u pacienta byla ponechána trvale dávka 10 mg prednisonu denně orálně. Imunoterapie nebyla znovu nasazena, k další progresi nemoci došlo po 5 měsících od vysazení léčby.

Epidemiologie

Incidence renální toxicity následkem imuno-onkologické léčby je relativně nízká – přibližně 2 % u nemocných léčených inhibitory PD-1/PD-L1 a 4,5 % u kombinace anti-PD léčby s inhibitory CTLA-4. Do tohoto procenta se však obvykle počítá jen nefritida. Naše kazuistika ilustruje případ iontového rozvratu na základě porušení regulační funkce ledvin a tyto iontové poruchy jsou pravděpodobně častější. Střední doba do rozvoje renální toxicity je 14 týdnů (rozmezí: 6–56 týdnů), u kombinované imunoterapie k ní však dochází rychleji [1–3].

Klinický obraz

Renální toxicita imuno-onkologické léčby se může zpočátku projevit zvýšeným sérovým kreatininem bez jakýchkoli klinických příznaků. Postupně se mohou

rozvinout poruchy elektrolytů, oligurie, anurie, otoky. Nejběžnějším nálezem v moči je proteinurie [1,2].

Patofyziologie

Spektrum patologických nálezů při renální toxicitě imuno-onkologické léčby je široké – akutní tubulointerstiální nefritida, imunokomplexová glomerulonefritida, trombotické mikroangiopatie, fokální nefroskleróza a syndrom minimálních změn [1,2]. Získaná distální tubulární acidóza je výsledkem alterace H⁺ ATPázy nebo Cl⁻/HCO₃⁻ pumpy v interkalovaných buňkách typu A ve sběrných kanálcích. Tento typ autoimunitního poškození se mimo kontext imuno-onkologické léčby vyskytuje např. u Sjögrenova syndromu [4,5].

V rámci diferenciální diagnostiky iontového rozvratu je nutné vyloučit endokrinní a metabolické poruchy, jako nově vzniklý diabetes mellitus 1. typu, hypofyritida, adrenální insuficience a hypotyreóza [6]. V případě nefritidy přichází diferenciálně-diagnosticky v úvahu vzácná paraneoplastická glomerulonefritida, která se vyskytuje zejména u hematologických malignit a tymomů.

Léčba a prognóza

V rámci monitorování nemocných léčených imuno-onkologickými léky se doporučuje sledovat hladinu kreatininu před každou dávkou. Pokud dochází k vze-

Tab. 1. Doporučený postup léčby nefritidy vyvolané imuno-onkologickou léčbou [3].

Stupeň	Postup
G1 – zvýšení hladiny kreatininu o > 26 µmol/l; kreatinin 1,5–2,0× oproti základní hodnotě	<ul style="list-style-type: none"> • zvažte pozastavení IO léčby, dokud nebudou vyhodnoceny jiné možné příčiny zhoršení renálních funkcí (nedávné podání i.v. kontrastu, nefrotoxické léky, dehydratace);
G2 – kreatinin 2–3× nad vstupní hodnotou	<ul style="list-style-type: none"> • dočasně zastavte IO léčbu; • nefrologické konzilium; • vyhodnoťte další možné příčiny zhoršení renálních funkcí (i.v. kontrast, nefrotoxické léky, dehydratace); • pokud je jiná etiologie nepravděpodobná, podejte 0,5–1 mg/kg/d prednisonu nebo jiného kortikosteroidu v ekvivalentní dávce; • pokud se renální funkce zhorší nebo nezlepší, podejte 1–2 mg/kg/d prednisonu (nebo ekvivalent) a IO léčbu ukončete; • pokud dojde ke zlepšení na G1 nebo méně, postupně redukuje dávku kortikosteroidů po dobu 4–6 týdnů; • pokud nedochází k recidivě renální toxicity, zvažte opětovné nasazení IO léčby po zohlednění jejích rizik a přínosu;
G3 – kreatinin > 3× nad vstupní hodnotou nebo > 350 µmol/l; indikována hospitalizace	<ul style="list-style-type: none"> • ukončete IO léčbu; • nefrologické konzilium; • vyhodnoťte další možné příčiny zhoršení renálních funkcí (i.v. kontrast, nefrotoxické léky, dehydratace);
G4 – život ohrožující následky; indikována dialýza	<ul style="list-style-type: none"> • podávejte kortikosteroidy v počáteční dávce 1–2 mg/kg/d prednisonu (nebo ekvivalent).

Další doporučení:

- monitorovat kreatinin v týdenních intervalech;
- biopsie ledviny se před nasazením kortikosteroidů rutinně neprovádí.

IO léčba – imuno-onkologická léčba, i.v. – intravenózně

stupu kreatininu a není zjevná jiná příčina zhoršení renálních funkcí, doporučuje se zahájit imunosupresivní léčbu bez biopsie ledviny. Vyšetření moči slouží k vyloučení uroinfekce. Léčbu volby jsou kortikoidy v běžné imunosupresivní dávce [3,7]. Jen ojediněle je v literatuře zmíněno podání infliximabu. Prognóza je příznivá, protože renální toxicita bez ohledu na patofyziologický podklad dobře reaguje na léčbu kortikoidy. Potřeba dlouhodobé dialýzy je uváděna jen u nemocných, kteří nedostali imunosupresivní léčbu.

Algoritmus léčby nefritidy podle stupně postižení je uveden v tab. 1. Spe-

cifický postup pro léčbu renálních toxicit projevujících se primárně iontovým rozvratem nebyl definován. Kromě imuno-onkologické léčby se doporučuje úprava vnitřního prostředí podle dané abnormality (např. infuzní léčba bikarbonátem).

Literatura

1. Mamlouk O, Selamet U, Machado S et al. Nephrotoxicity of immune checkpoint inhibitors beyond tubulointerstitial nephritis: single-center experience. *J Immunother Cancer* 2019; 7(1): 2. doi: 10.1186/s40425-018-0478-8.
2. Perazella MA, Sprangers B. AKI in patients receiving immune checkpoint inhibitors. *Clin J Am Soc Nephrol* 2019; 14(7): 1077–1079. doi: 10.2215/CJN.02340219.
3. Brahmer JR, Lacchetti C, Schneider BJ et al. Management of immune-related adverse events in patients

treated with immune checkpoint inhibitor therapy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2018; 36(17): 1714–1768. doi: 10.1200/JCO.2017.77.6385.

4. Charmetant X, Teuma C, Lake J et al. A new expression of immune checkpoint inhibitors' renal toxicity: when distal tubular acidosis precedes creatinine elevation. *Clin Kidney J* 2019; sfz051. doi: 10.1093/ckj/sfz051.

5. El Bitar S, Weerasinghe C, El-Charabaty E et al. Renal tubular acidosis an adverse effect of PD-1 inhibitor immunotherapy. *Case Rep Oncol Med* 2018; 2018: 8408015. doi: 10.1155/2018/8408015.

6. Barroso-Sousa R, Ott PA, Hodi FS et al. Endocrine dysfunction induced by immune checkpoint inhibitors: practical recommendations for diagnosis and clinical management. *Cancer* 2018; 124(6): 1111–1121. doi: 10.1002/cncr.31200.

7. Lakomý R, Poprach A. Nežádoucí účinky moderní imunoterapie a jejich řešení v klinické praxi. *Klin Onkol* 2015; 28 (Suppl 4): 4S103–4S114. doi: 10.14735/amko20154S103.

The Important Role of STAT3 in Chronic Lymphocytic Leukaemia Biology

Důležitá role STAT3 v biologii chronické lymfocytární leukemie

Boudny M., Trbusek M.

Department of Internal Medicine, Hematology and Oncology, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno

Summary

Background: Signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins are cytoplasmic transcription factors that transmit the signal of cytokines, hormones and growth factors. STAT proteins control fundamental cellular processes including survival, proliferation and differentiation. Inappropriate activation of STATs might contribute to cellular transformation and leukaemogenesis. About 70% of all solid and haematological tumours exhibit aberrant STAT3 expression and/or activation, highlighting its essential role in tumorigenesis. Aberrant STAT3 activation has been found in several solid tumours and haematologic malignancies. Importantly, constitutive activation of STAT proteins has been found in several leukaemias including acute myeloid leukaemia, acute promyelocytic leukaemia, acute lymphoblastic leukaemia, chronic myeloid leukaemia and chronic lymphocytic leukaemia (CLL). Constitutively activated STAT3 plays an important role in CLL biology. CLL cells harbour constitutive phosphorylation on S727 and acetylation on K685 and transient phosphorylation on Y705 residues. Moreover, STAT3 messenger RNA expression is significantly higher in CLL cells compared to healthy B-lymphocytes. Interestingly, STAT3 inhibition was disclosed as an important by-product of ibrutinib treatment in CLL patients. **Purpose:** The purpose of this review is to describe the consequences of STAT3 dysregulation in CLL cells. Here, we discuss aberrantly modified processes by STAT3 activation in CLL cells such as proliferation, apoptosis, B cell receptor signalling, cytokine secretion, immune checkpoint regulation, microRNA regulation, free fatty acid metabolism and electron transport chain in the mitochondria.

Key words

STAT3 – STAT – chronic lymphocytic leukaemia – therapy – microenvironment – ibrutinib – constitutive activation – leukaemia

Souhrn

Východiska: Proteiny STAT (signal transducer and activator of transcription) jsou cytoplazmatické transkripční faktory, které přenášejí signál cytokinů, hormonů a růstových faktorů. Proteiny STAT kontrolují základní buněčné procesy vč. přežití, proliferace a diferenciaci. Nadměrná aktivace proteinů STAT může přispět k transformaci buněk a vzniku leukemie. Okolo 70 % všech solidních a hematologických nádorů vykazuje aberantní expresi a/nebo aktivaci STAT3, což dokumentuje zásadní roli STAT3 v tumorigenezi. Aberantní aktivace STAT3 byla popsána u několika solidních nádorů a hematologických malignit. Důležité je, že konstitutivní aktivace proteinů STAT byla detekována u několika typů leukemie vč. akutní myeloidní leukemie, akutní promyelocytární leukemie, akutní lymfoblastické leukemie, chronické myeloidní leukemie a chronické lymfocytární leukemie (CLL). Konstitutivně aktivovaný STAT3 hraje důležitou roli v biologii CLL. Buňky CLL jsou konstitutivně fosforylované na S727 a acetylované na K685, navíc může dojít i k fosforylaci na Y705. Expresí mediátorové RNA STAT3 je výrazně vyšší v buňkách CLL ve srovnání se zdravými B lymfocyty. Zajímavé je, že inhibice STAT3 byla popsána jako důležitý vedlejší produkt léčby ibrutinibem u pacientů s CLL. **Cíl:** Účelem tohoto přehledu je popsat důsledky deregulace STAT3 u buněk CLL. V práci jsou popsány procesy ovlivněné nadměrnou aktivací STAT3 jako proliferace, apoptóza, signalizace BCR (B cell receptor), sekrece cytokinů, regulace kontrolních bodů imunitního systému, regulace mikroRNA, metabolismus mastných kyselin a elektronový transportní řetězec v mitochondriích.

Klíčová slova

STAT3 – STAT – chronická lymfocytární leukemie – terapie – mikroprostředí – ibrutinib – konstitutivní aktivace – leukemie

The work was supported by Project FNBr 65269705 – Conceptual Development of Research Organisation and Project MUNI/A/1105/2018.

Práce byla podpořena projektem FNBr 65269705 – koncepční rozvoj výzkumné organizace a projektem MUNI/A/1105/2018.

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.



Miroslav Boudny, PhD

Department of Internal Medicine,

Hematology and Oncology

Faculty of Medicine

Masaryk University

University Hospital Brno

Jihlavská 340/20

625 00 Brno

e-mail: boudny.miroslav@fnbrno.cz

Submitted/Obdrženo: 11. 9. 2019

Accepted/Přijato: 6. 11. 2019

doi: 10.14735/amko202032

Introduction

Signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins are intracellular transcription factors involved in cellular immunity, proliferation, apoptosis and differentiation. Aberrantly expressed STAT proteins were found to play an important role in cancer promotion [1]. Importantly, constitutive activation of STAT proteins have been found in several leukaemias including acute myeloid leukaemia [2–4], acute promyelocytic leukaemia [5], acute lymphoblastic leukaemia [6], chronic myeloid leukaemia [7] and chronic lymphocytic leukaemia (CLL) [8,9]. Importantly, in CLL STAT3 was constitutively activated in all analysed samples regardless of genetic aberrations, disease stage or other factors [8,10]. Therefore, it plays a crucial role in CLL. In this review we focus on the role of STAT3 in CLL biology.

STAT3

STAT3 belongs to the STAT family of signal responsive transcription factors which are kept in an inactive form in the cytoplasm of non-stimulated cells [11]. STAT

proteins are cytoplasmic transcription factors that convey signals from cytokine and growth-factor receptors to the nucleus (Fig. 1) [12]. STAT proteins regulate processes that are acquired by tumour cells such as uncontrolled proliferation, resistance to apoptosis, sustained angiogenesis and escape from the immune system [12,13]. STAT3 is activated by phosphorylation of tyrosine residues (Y705) or serine residues (S727) [8,11]. STAT3 activation is most commonly mediated by members of the Janus kinase (JAK) family tyrosine kinases. Then it dimerises and translocates to the nucleus, where it binds specific DNA sequences in the promoters of target genes. STAT proteins (especially STAT3 and STAT5) are constitutively activated in a surprisingly large number of cancers [12]. Remarkably, STAT3 activation is required for the survival and proliferation of a number of cancer cells [11]. STAT3 activation in cancer cells is often the result of chronic stimulation by extracellular signals in the tumour microenvironment.

STAT3 is crucial for cell development, which has been evidenced in experi-

ments using null (knock out) mice suffering from early embryonic lethality [14]. Constitutive activation of STAT3 has been found to be associated with the initiation and progression of various cancers has been found in several solid tumours and haematologic malignancies; altogether STAT3 is one of the most commonly activated transcription factors in cancer [12].

STAT3 in CLL

Although CLL is a heterogeneous disease with various genetic aberrations, there are abnormalities in CLL that occur in all patients. One of them is constitutively activated STAT3 protein [8–10]. STAT3 plays a role in promoting tumorigenesis of CLL where it represents a key pathway involved in the growth and survival of CLL cells [8,9,15,16]. In CLL, STAT3 messenger RNA (mRNA) expression is significantly higher compared to healthy B-lymphocytes [17–19]. Therefore, the regulation of STAT3 activity is highly dysregulated in CLL cells. STAT3 is involved directly or indirectly in many processes in CLL cells including proliferation, apoptosis, B-cell receptor (BCR) signalling, cytokine secretion, immune checkpoint regulation, microRNA regulation, free fatty acid metabolism and electron transport chain in the mitochondria (Fig. 2).

Constitutive activation of STAT3 in CLL cells

Constitutive Y705 phosphorylation of STAT3 occurs in several solid tumours and haematologic malignancies [12]. However, it is interesting that in CLL STAT3 is constitutively phosphorylated exclusively on S727 but not on Y705 [8,9]. Conversely, inducible Y705 phosphorylation was transient. In contrast to normal peripheral blood B-lymphocytes, constitutive S727 phosphorylation was detected in all tested samples of CLL, regardless of disease stage or treatment status. Moreover, this phosphorylation is constitutive in CLL cells. Importantly, the S727 phosphorylation also activates STAT3, which translocates to the nucleus, binds to the STAT3-specific DNA binding sites in unstimulated CLL cells and regulates the expression

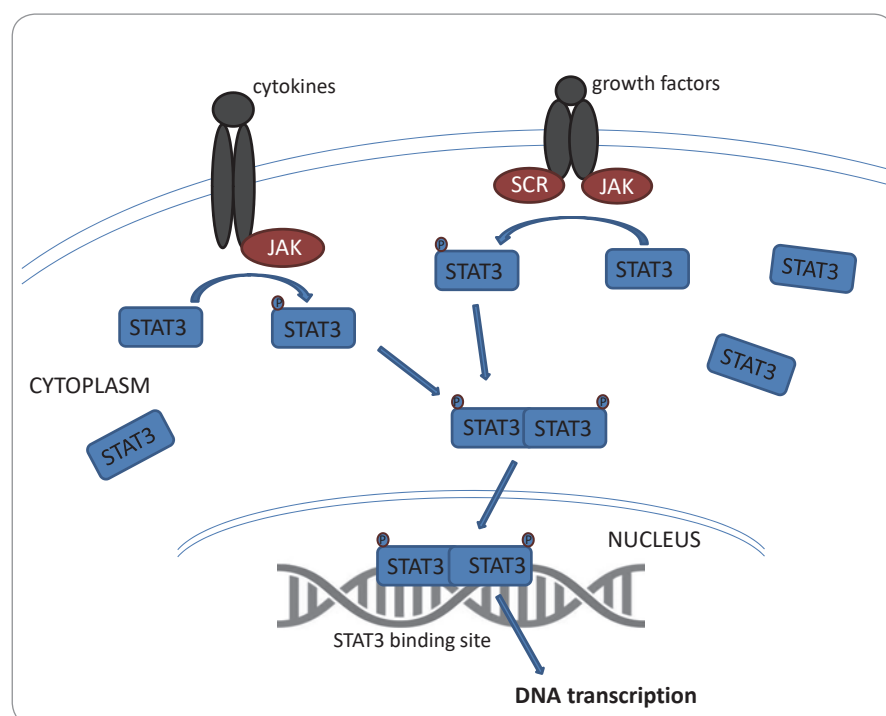


Fig. 1. General STAT3 activation. Inactive non-phosphorylated STAT3 in the cytoplasm is phosphorylated and thus activated by the JAK kinases. It enables dimerization of STAT3. The phosphorylated STAT3 dimers enter the nucleus and bind STAT3 target genes.

STAT – signal transducer and activator of transcription

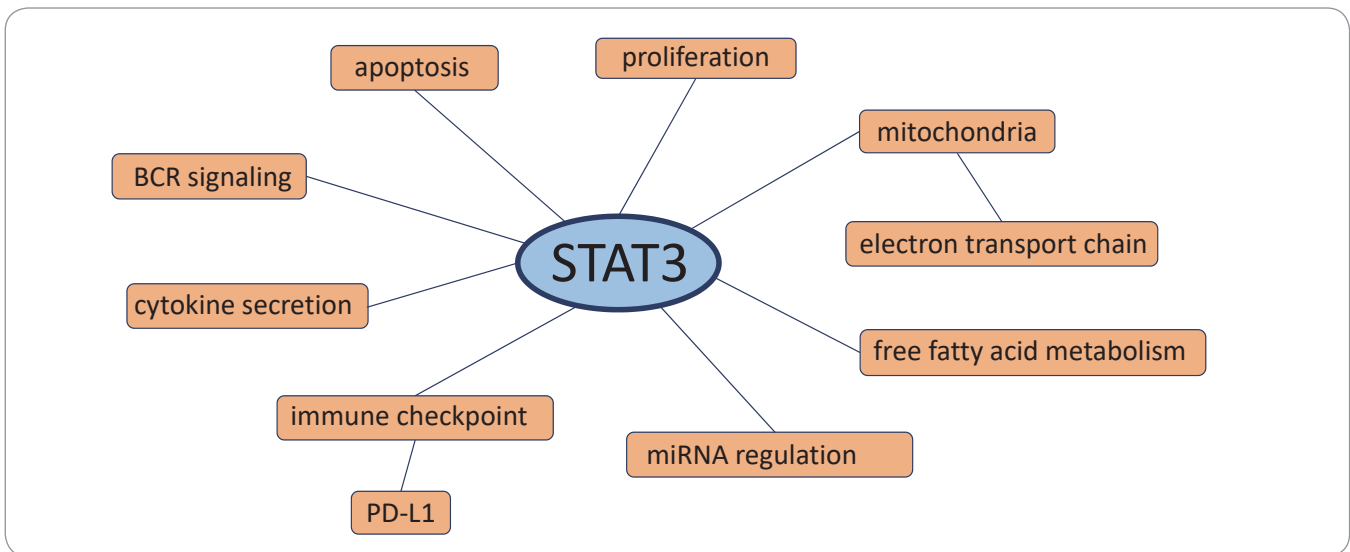


Fig. 2. Processes in which STAT3 is involved in chronic lymphocytic leukemia cells.

STAT – signal transducer and activator of transcription, BCR – B cell receptor, PD-L1 – programmed death-ligand 1, miRNA – microRNA

of STAT3-dependent genes. The elimination of STAT3 using short hairpin RNA (shRNA) reduced the mRNA levels of STAT3 and the STAT3-regulated genes such as *BCL2*, *Pim1*, *BCL-XL*, *Cyclin D1*, *p21* and *c-MYC* in a dose-dependent manner. Besides STAT3, STAT1 was also found to be constitutively activated on S727 residues in CLL cells [9]. In addition, in CLL cells, STAT3 can be activated easily through Y705 phosphorylation because CLL cells reside in the bone marrow, blood and lymph nodes and are thus exposed to various cytokines, chemokines and growth factors and therefore capable of potentiate through this phosphorylation a magnitude of STAT3 activation. Although it is not constitutive in CLL cells, increased pY705 STAT3 levels were described by Myhrvold et al. [20]. In CLL cells, the basal phosphorylation level of proteins involved in B-cell signalling was similar or lower compared to normal B cells, with the exception of pY705 STAT3, which was increased. Constitutive S727 phosphorylation of STAT3 is biologically significant and probably plays a role in the pathogenesis of CLL because it activates the transcription of pro-survival and pro-proliferative genes. The STAT3 constitutive phosphorylation on S727 residues is induced by casein kinase 2, which is required for the phosphorylation together with SD5 and BLNK; together

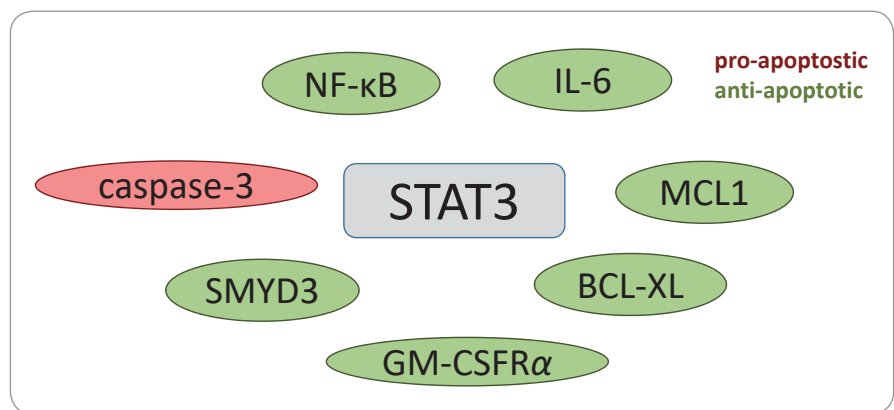


Fig. 3. Directly and indirectly regulated apoptosis by STAT3. Pro-apoptotic proteins are circled in red, anti-apoptotic proteins in green.

STAT – signal transducer and activator of transcription

they create a complex that phosphorylates STAT3 [21]. Moreover, in addition to phosphorylation, STAT3 is constitutively acetylated on K685 in CLL cells [10]. It was detected in all the analysed samples regardless of clinical characteristics, cytogenetic abnormalities or *IGHV* mutation status. Acetyltransferase p300 was detected at high levels in CLL cells and subsequently it was found that p300 induces constitutive acetylation and activation of STAT3. Acetylated STAT3 increased the transcriptional activity of STAT3 and provided CLL cells with a survival advantage. The acetylation and phosphorylation of STAT3 were found as independent events in CLL cells.

STAT3 in regulating CLL cell survival

Interestingly, it was found that the sensitivity of fresh CLL cells to spontaneous apoptosis is highly variable among different patients and inversely correlates with constitutive activation of STAT3 and NF-κB [22]. Both transcription factors maintain the levels of anti-apoptotic proteins MCL1 and BCL-XL and autocrine IL-6 secretion. The sensitivity of CLL cells to spontaneous apoptosis is thus regulated by STAT3 and NF-κB (Fig. 3).

One reason for increased proliferation in CLL cells is NF-κB activation. Yang et al. described the mechanism of NF-κB activation through interaction with

STAT3 [23]. They found that unphosphorylated STAT3 (U-STAT3) binds to NF- κ B dimers in competition with I κ B [23]. The U-STAT3/NF- κ B complex translocates to the nucleus, binds to the DNA and activates NF- κ B-regulated genes. In CLL cells, constitutively activated STAT3 induces STAT3 protein production, and thus CLL cells harbour high levels of U-STAT3. Moreover, Liu et al. confirmed that also in CLL cells U-STAT3 binds to the NF- κ B dimers, forming a complex that activates NF- κ B-regulated genes (e.g. *VEGF-C*, *CCL5* and *CXCR5*) [24]. Further, increased transcription of *SMYD3* promotes CLL survival – Lin et al. found that activated STAT3 binds directly to the *SMYD3* promoter and enhances *SMYD3* transcription [19]. Decreased phosphorylation of STAT3 or *SMYD3* knock down inhibited CLL cell growth. Another mechanism which protects CLL cells from apoptosis is STAT3-mediated GM-CSFR α (α subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor) production [25].

On the other hand, STAT3 also regulates the apoptosis of CLL cells [26]. Besides that STAT3 protects CLL cells from apoptosis, at high levels STAT3 can activate pro-apoptotic mechanisms and induce apoptosis in CLL cells. Overexpression of STAT3 upregulated caspase-3 levels and induced apoptosis. STAT3 binds with low affinity to the *caspase-3* promoter and at very high levels can activate *caspase-3* expression. This could represent a physiological negative feedback mechanism used in normal cells to counteract uncontrolled proliferation.

Microenvironment activation of STAT3 in CLL cells

Interestingly, CD5^{high}CXCR4^{dim} CLL cells, which probably recently exited the lymph node, express higher levels of pY705 STAT3 than the CD5^{dim}CXCR4^{high} CLL cells likely circulating in the peripheral blood [27]. Moreover, the expression of STAT3-target genes was significantly higher in CLL cells isolated from the lymph node than in CLL cells isolated from the blood of the same patient [27,28]. Chen et al. found that nurse-like cells could induce Wnt5a/ROR1-dependent activation of NF- κ B in CLL cells that in turn elicits au-

tochrine IL-6-induced activation of STAT3. Further, it was found that cirtuzumab, the anti-ROR1 antibody, can inhibit the activation of both STAT3 and NF- κ B in CLL cells.

STAT3 is involved in BCR signalling in CLL cells [15,16,29]. BCR stimulation triggers survival signals in CLL cells. BCR stimulation via anti-immunoglobulin M (anti-IgM) antibodies induces transient Y705 phosphorylation and nuclear localisation of pSTAT3 [15]. In contrast, S727 phosphorylation was increased only mildly. BCR activation induces the activation of JAK2, which phosphorylates STAT3 on Y705 residues. Anti-IgM upregulates STAT3-regulated genes *CyclinD1*, *STAT3*, *p21*, *c-MYC* and *BCL2*. In addition, Rozovski et al. found that stimulation of the BCR increases the constitutive activation of NF- κ B, NF- κ B then induces the production of IL-6, which subsequently leads to phosphorylation of STAT3 on Y705 residues [29]. Furthermore, BCR signalling can also activate the second STAT3 phosphorylation; Kondo et al. found that Bruton's tyrosine kinase (BTK) is an upstream activator of pS727 STAT3 in CLL cells [16]. Ibrutinib abrogated IgM/IgG- or CD40L-induced pS727 STAT3 activation. Moreover, BTK knockout significantly reduced the constitutive level of pS727 STAT3. The effect was probably exerted indirectly through the activation of serine kinases.

Further, STAT3 regulates cytokine production in CLL cells. STAT3 was found to regulate the secretion of IL-9 and IL-10 in CLL cells [18,30]. STAT3-mediated translational upregulation of miR-155 and miR-21 promoted IL-9 secretion [18]. Concerning IL-10, the CXCL12–CXCR4–STAT3 axis regulates IL-10 production in CLL cells and their ability to suppress T-cell effector function [30].

Moreover, STAT3 directly or indirectly upregulates or downregulates microRNA gene levels in CLL cells including, for example miR-155 involved in tumourigenesis [31]. The levels of 63 microRNAs were downregulated and 9 upregulated after STAT3 shRNA transfection. Li et al. confirmed that STAT3 binds to the miR-155 gene promoter and activates miR-155 expression in CLL cells [32].

STAT3 mediates the response to ibrutinib in CLL cells

Recently, one of the important effects of ibrutinib, in addition to the inhibition of BTK, is the inhibition of STAT3 signalling, demonstrating the important role of this signalling pathway and the potential for its use in CLL therapy, either through inhibition by ibrutinib or another specific inhibitor [16]. The study showed an interesting link between the STAT3 pathway and regulation of the immune response through programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression, which was significantly reduced following treatment with ibrutinib, enhancing the T-cell response in the CLL cells. In the peripheral blood CLL samples treated with ibrutinib, durable downregulation of PD-L1 by 3 months post-treatment was observed. This effect was mediated through the inhibition of constitutively active STAT3 on S727 in the CLL cells. In contrast, chlorambucil therapy had no effect on PD-L1 expression, suggesting a specific effect of ibrutinib treatment. PD-1/PD-L1 receptors play an important role in the anti-tumour immune response, which has recently been used for targeted anti-tumour therapy [33,34]. Moreover, the effect of inhibition of STAT3 and subsequent downregulation of PD-L1 has already been described in lymphoma-derived cell lines [35].

Effect of STAT3 on CLL cell metabolism

In addition to its classic function as the transcription factor in the nucleus, a pool of pS727 STAT3 molecules has been identified in the mitochondria, where it modulates the activity of the electron transport chain [36]. Importantly, this was also confirmed in CLL cells where the pS727 STAT3 level correlated with prolonged *in vivo* survival [37]. pS727 STAT3 was detected in the mitochondria and associated with complex I of the respiratory chain. Furthermore, STAT3 activity contributes to the CLL cell but not to healthy B cell resistance to apoptosis *in vitro*. Mitochondrial pS727 STAT3 overactivity is therefore a part of the antioxidant defence pathway of CLL cells. Thus, mitochondrial pS727 STAT3 appears to be a newly

Tab. 1. Preclinical and clinical testing of STAT3 inhibition.

Drug	STAT3 targeting	Combination	Model	Reference
JSI-124	directly	single-agent, TRAIL	cell lines, primary cells	Ishdorj et al., 2010 [40]
WP1066 and niclosamide	directly	single-agent	primary cells	Myhrvold et al., 2018 [20]
WP1066	directly	single-agent	cell lines, <i>in vivo</i>	Lin et al., 2019 [19]
C6-ceramide	indirectly	single-agent, ibrutinib	cell lines, primary cells, <i>ex vivo</i>	Doshi et al., 2017 [48]
Pyrimethamine	indirectly	single-agent	clinical trial (NCT01066663)	Brown et al., 2018 [42]
Cirmtuzumab	indirectly	single-agent	clinical trial (NCT01066663)	Chen et al., 2019 [27]
Ibrutinib	indirectly	single-agent	clinical practice	Kondo et al., 2018 [16]

STAT – signal transducer and activator of transcription, TRAIL – tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

identified cell-protective signal involved in CLL cell survival.

Rozovski et al. found that CLL cells, similar to Burkitt's lymphoma cells but unlike normal B-lymphocytes, store lipids in the form of cytoplasmic lipid vacuoles [38]. STAT3 was found to modulate free fatty acid metabolism through aberrant lipoprotein lipase expression in CLL cells. It seems that CLL cells transformed their metabolism to oxidise free fatty acids. Activated STAT3 induces lipoprotein lipase, which catalyses the hydrolysis of triglycerides into free fatty acids. Recently, it was found that STAT3-activated CD36 facilitates fatty acid uptake in CLL cells [39].

Preclinical testing of STAT3 inhibition in CLL

The inhibition of STAT3 using JSI-124 potently induced apoptosis in B leukaemia cell lines and primary CLL cells [40]. JSI-124 reduced STAT3 S727 phosphorylation. JSI-124 also induced cell cycle arrest prior to apoptosis activation. Moreover, the knockdown of STAT3 induced apoptosis and cell cycle arrest in leukaemia cells. The blocking of STAT3 led to downregulation of an anti-apoptotic protein XIAP. STAT3 inhibitors WP1066 and niclosamide significantly reduced both pY705 STAT3 levels and cell viability [20]. STAT3 inhibition reduced cellular metabolism before cell death was induced. Moreover, WP1066 significantly inhibited tumour growth *in vivo* [19]. This suggests that STAT3 activation can be a potential target for therapy of CLL (Tab. 1).

In addition, SOCS3, a negative regulator of the JAK/STAT signalling pathway, was found to be a potentially new therapeutic target in CLL using the inhibition of Hsp90 [41]. In this study Hsp90 induced the cell death of CLL cells through upregulation of SOCS3 via the p38 pathway.

Clinical testing of STAT3 inhibition in CLL

The fact that STAT3 is a promising target for CLL therapy led to the initiation of a clinical trial investigating the efficiency of STAT3 inhibitors. STAT3 inhibitor pyrimethamine was tested in relapsed CLL/SLL (NCT01066663) [42,43]. Pyrimethamine, an anti-microbial drug that is effective in the prevention and treatment of malaria and toxoplasmosis, was found to be a potent STAT3 inhibitor in a screen of a chemical library of drugs already known to be safe in humans [44,45]. Pyrimethamine was found to inhibit STAT3 transcriptional function at concentrations known to be safe in patients. The anti-tumour effect of pyrimethamine through STAT3 inhibition was confirmed in murine models of breast cancer [46]. Pyrimethamine inhibited the expression of STAT3-regulated genes in CLL cells *ex vivo* and decreased the survival of CLL cells [42]. Importantly, peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were not affected. A clinical trial was done in CLL patients whose disease progressed despite therapy. There were no dose-limiting toxicities and no significant drug-related

toxicities. No objective responses were observed. Half of the patients achieved stable disease for 12 months and two people for 4 and 6 months, respectively. The remaining patients had progressive disease, and all but one patient discontinued therapy for disease progression. The median overall survival was 22 months. Nevertheless, only the highest dose which was applied approached the threshold of 10 µM of plasma concentrations, which effectively inhibited STAT3 *in vitro*. Therefore, it is necessary to increase the dose of pyrimethamine in future studies to determine its efficiency in CLL patients.

Another drug tested in clinical trial (NCT02860676) which indirectly targets STAT3 is cirmtuzumab. Cirmtuzumab, the anti-ROR1 antibody tested in a phase I clinical trial showed the mechanism of its action through downregulating the expression of STAT3 [27]. It downregulated the expression of STAT3 and NF-κB target genes and reduced the levels of phosphorylated STAT3 and p65 detected in the CLL cells of treated patients.

Therefore, targeting STAT3 may have a high therapeutic potential because normal cells can tolerate a loss of STAT3 function [47].

Summary

CLL cells harbour constitutively activated STAT3. STAT3 is permanently phosphorylated on S727 and acetylated on K685 residues in all CLL samples [8,10]. The full activation of STAT3 occurs in the lymph nodes, where CLL cells are stimu-

lated from various stimuli which also activates Y705 of STAT3. For example, BCR signalling is able to increase both types of STAT3 phosphorylation [15,16]. Fully activated STAT3 contributes to the increased proliferation and survival of CLL cells in this compartment. It is interesting that, unlike constitutive S727 phosphorylation detected in all samples, Y705 phosphorylation status varies between samples. Although it is rare, some samples from the peripheral blood also harbour a high level of Y705 phosphorylation indicating a different stimulation of the CLL cells by the microenvironment [15; our unpublished data]. This is in line with the fact that CD5^{high} CXCR4^{dim} CLL cells (which recently exited the lymph node) express higher levels of pY705 STAT3 than the CD5^{dim} CXCR4^{high} CLL cells (circulating in the peripheral blood) [27]. It seems that after exiting the lymph node, CLL cells keep increased anti-apoptotic signalling at least for some time.

This notwithstanding, no STAT3 inhibitor has been approved at the moment for CLL therapy; the effect of STAT3 inhibition can be seen after other drugs such as ibrutinib or cirtuzumab, which indirectly block STAT3 signalling [16,27]. Therefore, the blocking of STAT3 contributes to the observed therapeutic effect of ibrutinib in the clinics.

STAT3 plays an important role in CLL biology and pathology because constitutive STAT3 activation on S727 and K685 is present in all patient samples regardless of genetic aberration presence [8,10]. Therefore, one molecular hallmark of CLL biology is the constitutive phosphorylation and acetylation, and consequently the transcriptional activation of STAT3.

References

1. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(11): 798–809. doi: 10.1038/nrc2734.
2. Hayakawa F, Towatari M, Iida H et al. Differential constitutive activation between STAT-related proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1998; 101(3): 521–528. doi: 10.1046/j.1365-2141.1998.00720.x.
3. Xia Z, Baer MR, Block AW et al. Expression of signal transducers and activators of transcription proteins in acute myeloid leukemia blasts. *Cancer Res* 1998; 58: 3173–3180.
4. Redell MS, Ruiz MJ, Alonzo TA et al. Stat3 signaling in acute myeloid leukemia: ligand-dependent and -independent activation and induction of apoptosis by a novel small-molecule Stat3 inhibitor. *Blood* 2011; 117(21): 5701–5709. doi: 10.1182/blood-2010-04-280123.
5. Dong S, Chen SJ, Twardy DJ. Cross-talk between retinoic acid and STAT3 signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44(12): 2023–2029. doi: 10.1080/1042819031000116670.
6. Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C et al. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* 1996; 87(5): 1692–1697.
7. Frank DA, Varticovski L. BCR/abl leads to the constitutive activation of Stat proteins, and shares an epitope with tyrosine phosphorylated Stats. *Leukemia* 1996; 10(11): 1724–1730.
8. Hazan-Halevy I, Harris D, Liu Z et al. STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood* 2010; 115(14): 2852–2863. doi: 10.1182/blood-2009-10-230060.
9. Frank DA, Mahajan S, Ritz J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J Clin Invest* 1997; 100(12): 3140–3148. doi: 10.1172/JCI119869.
10. Rozovski U, Harris DM, Li P et al. STAT3 is constitutively acetylated on lysine 685 residues in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* 2018; 9(72): 33710–33718. doi: 10.18632/oncotarget.26110.
11. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21(1): 11–19. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.11.005.
12. Yu H, Jove R. The STATs of cancer – new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(2): 97–105. doi: 10.1038/nrc1275.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
14. Takeda K, Noguchi K, Shi W et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94(8): 3801–3804. doi: 10.1073/pnas.94.8.3801.
15. Rozovski U, Wu JY, Harris DM et al. Stimulation of the B-cell receptor activates the JAK2/STAT3 signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2014; 123(24): 3797–3802. doi: 10.1182/blood-2013-10-534073.
16. Kondo K, Shaim H, Thompson PA et al. Ibrutinib modulates the immunosuppressive CLL microenvironment through STAT3-mediated suppression of regulatory B-cell function and inhibition of the PD-1/PD-L1 pathway. *Leukemia* 2018; 32(4): 960–970. doi: 10.1038/leu.2017.304.
17. Antosz H, Wojciechowska K, Sajewicz J et al. IL-6, IL-10, c-Jun and STAT3 expression in B-CLL. *Blood Cells Mol Dis* 2015; 54(3): 258–265. doi: 10.1016/j.bcmd.2014.11.006.
18. Chen N, Feng L, Qu H et al. Overexpression of IL-9 induced by STAT3 phosphorylation is mediated by miR-155 and miR-21 in chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep* 2018; 39(6): 3064–3072. doi: 10.3892/or.2018.6367.
19. Lin F, Wu D, Fang D et al. STAT3-induced SMYD3 transcription enhances chronic lymphocytic leukemia cell growth in vitro and in vivo. *Inflamm Res* 2019; 68(9): 739–749. doi: 10.1007/s00011-019-01257-5.
20. Myhrvold IK, Cremaschi A, Hermansen JU et al. Single cell profiling of phospho-protein levels in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* 2018; 9(10): 9273–9284. doi: 10.18632/oncotarget.23949.
21. Rozovski U, Harris DM, Li P et al. Constitutive phosphorylation of STAT3 by the CK2–BLNK–CD5 complex. *Mol Cancer Res* 2017; 15(5): 610–618. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-16-0291.
22. Liu FT, Jia L, Wang P et al. STAT3 and NF- κ B cooperatively control in vitro spontaneous apoptosis and poor chemo-responsiveness in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* 2016; 7(22): 32031–32045. doi: 10.18632/oncotarget.8672.
23. Yang J, Liao X, Agarwal MK et al. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NF- κ B. *Genes Dev* 2007; 21(11): 1396–1408. doi: 10.1101/gad.1553707.
24. Liu Z, Hazan-Halevy I, Harris DM et al. STAT-3 activates NF- κ B in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Cancer Res* 2011; 9(4): 507–515. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0559.
25. Li P, Harris D, Liu Z et al. STAT3-activated GM-CSFR α translocates to the nucleus and protects CLL cells from apoptosis. *Mol Cancer Res* 2014; 12(9): 1267–1282. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0652-T.
26. Rozovski U, Harris DM, Li P et al. At high levels, constitutively activated STAT3 induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *J Immunol* 2016; 196(10): 4400–4409. doi: 10.4049/jimmunol.1402108.
27. Chen Y, Chen L, Yu J et al. Cirtuzumab blocks Wnt5a/ROR1-stimulation of NF- κ B to repress autocrine STAT3-activation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2019; 134(13): 1084–1094. doi: 10.1182/blood.2019001366.
28. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011; 117(2): 563–574. doi: 10.1182/blood-2010-05-284984.
29. Rozovski U, Harris DM, Li P et al. Activation of the B-cell receptor successively activates NF- κ B and STAT3 in chronic lymphocytic leukemia cells. *Int J Cancer* 2017; 141(10): 2076–2081. doi: 10.1002/ijc.30892.
30. Shaim H, Estrov Z, Harris D et al. The CXCR4–STAT3–IL-10 pathway controls the immunoregulatory function of chronic lymphocytic leukemia and is modulated by lenalidomide. *Front Immunol* 2018; 8: 1773. doi: 10.3389/fimmu.2017.01773.
31. Rozovski U, Calin GA, Setoyama T et al. Signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 regulates microRNA gene expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Mol Cancer* 2013; 12: 50. doi: 10.1186/1476-4598-12-50.
32. Li P, Grgurevic S, Liu Z et al. Signal transducer and activator of transcription-3 induces microRNA-155 expression in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE* 2013; 8(6): e64678. doi: 10.1371/journal.pone.0064678.
33. Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood* 2018; 131(1): 68–83. doi: 10.1182/blood-2017-07-740993.
34. Darwin P, Toor SM, Sasidharan Nair V et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med* 2018; 50(12): 165. doi: 10.1038/s12276-018-0191-1.
35. Ma C, Horlad H, Pan C et al. Stat3 inhibitor abrogates the expression of PD-1 ligands on lymphoma cell lines. *J Clin Exp Hematop* 2017; 57(1): 21–25. doi: 10.3960/jslrt.17006.
36. Wegryn J, Potla R, Chwae YJ et al. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science* 2009; 323(5915): 793–797. doi: 10.1126/science.1164551.
37. Capron C, Jondeau K, Casetti L et al. Viability and stress protection of chronic lymphoid leukemia cells involves overactivation of mitochondrial phosphoSTAT3Ser727. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1451. doi: 10.1038/cddis.2014.393.
38. Rozovski U, Grgurevic S, Bueso-Ramos C et al. Aberrant LPL expression, driven by STAT3, mediates free fatty acid metabolism in CLL cells. *Mol Cancer Res* 2015; 13(5): 944–953. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0412.
39. Rozovski U, Harris DM, Li P et al. STAT3-activated CD36 facilitates fatty acid uptake in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncotarget* 2018; 9(30): 21268–21280. doi: 10.18632/oncotarget.25066.

40. Ishdorj G, Johnston JB, Gibson SB. Inhibition of constitutive activation of STAT3 by curcubitacin-I (JSI-124) sensitized human B-leukemia cells to apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(12): 3302–3314. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0550.
41. Chen TL, Gupta N, Lehman A et al. Hsp90 inhibition increases SOCS3 transcript and regulates migration and cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* 2016; 7(19): 28684–28696. doi: 10.18632/oncotarget.8760.
42. Brown JR, Walker SR, Heppler LN et al. A clinical trial of the STAT3 inhibitor pyrimethamine in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2018; 132: 1855–1855.
43. clinicaltrials.gov. Pyrimethamine for the treatment of relapsed chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. [online]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01066663>.
44. Takakura A, Nelson EA, Haque N et al. Pyrimethamine inhibits adult polycystic kidney disease by modulating STAT signaling pathways. *Hum Mol Genet* 2011; 20(21): 4143–4154. doi: 10.1093/hmg/ddr338.
45. Legorreta-Herrera M, Retana-Ugalde R, Ventura-Gallegos JL et al. Pyrimethamine induces oxidative stress in *Plasmodium yoelii* 17XL-infected mice: a novel immunomodulatory mechanism of action for an old antimalarial drug? *Exp Parasitol* 2010; 126(3): 381–388. doi: 10.1016/j.exppara.2010.02.013.
46. Khan MW, Saadalla A, Ewida AH et al. The STAT3 inhibitor pyrimethamine displays anti-cancer and immune stimulatory effects in murine models of breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2018; 67(1): 13–23. doi: 10.1007/s00262-017-2057-0.
47. Inghirami G, Chiarle R, Simmons WJ et al. New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle* 2005; 4(9): 1131–1133. doi: 10.4161/cc.4.9.1985.
48. Doshi UA, Shaw J, Fox TE et al. STAT3 mediates C6-ceramide-induced cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Signal Transduct Target Ther* 2017; 2: 17051. doi: 10.1038/sigtrans.2017.51.

Společnost Merck Sharp & Dohme s.r.o. podpořila publikaci
tohoto čísla časopisu *Klinická onkologie*.

Význam fibroblastů asociovaných s nádorem při patogenezi karcinomů v oblasti hlavy a krku

The Importance of Cancer-Associated Fibroblasts in the Pathogenesis of Head and Neck Cancers

Raudenská M.¹, Svobodová M.², Gumulec J.², Falk M.³, Masařík M.^{1,2,4}

¹ Fyziologický ústav, LF MU, Brno

² Ústav patologické fyziologie, LF MU, Brno

³ Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Brno

⁴ 1. LF UK a BIOCEV – Biotechnologické a biomedicínské centrum AV ČR, v.v.i., Vestec

Souhrn

Východiska: Navzdory pokroku v protinádorové terapii jsou spinocelulární karcinomy v oblasti hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) stále spojeny s nízkou mírou dlouhodobého přežívání pacientů. Nedávné studie poukazují na to, že nádorové stroma může hrát důležitou roli v patogenezi tohoto maligního onemocnění. Fibroblasty jsou hlavní složkou nádorového mikroprostředí a mohou významně ovlivňovat progresi HNSCC, protože přispívají k významným znakům onkogeneze, jako je zánět, neomezený růst, angiogeneze, invaze, vznik metastáz a rezistence k terapii. Je dobře známo, že nádorové buňky mohou modulovat fenotyp fibroblastů do podoby fibroblastů asociovaných s nádorem (cancer-associated fibroblast – CAF), které následně mohou podporovat růst a šíření nádorových buněk. CAF stimulují progresi nádoru prostřednictvím kontaktů mezi buňkami, remodelace extracelulární matrix a produkce velkého množství signálních molekul a matrixových metaloproteináz. Genetické a epigenetické změny v epiteliálních buňkách tedy pravděpodobně nejsou výlučným faktorem řídicím kancerogenezi HNSCC, jelikož se na tomto procesu mohou významně podílet i negenetické změny v buňkách stromatu. Signály vyvolané buněčným stresem narušují funkční program mnoha buněk, čímž se ve tkáni vytváří oblasti predisponované k maligní transformaci. Koncept „nádorového pole“ (field cancerization) představuje proces aktivního vývoje mezibuněčných interakcí a zpětnovazebných smyček mezi nádorovými a stromálními buňkami. Tento model se jeví jako velice slibný, otvírá nové způsoby studia nádorového onemocnění a může poskytnout nové terapeutické cíle. **Cíl:** V tomto přehledovém článku diskutujeme současné poznatky o CAF, jako je jejich buněčný původ, fenotypová plasticita a funkční heterogenita, a podtrhujeme jejich vliv na progresi HNSCC.

Klíčová slova

dlaždicobuněčné karcinomy hlavy a krku – fibroblasty asociované s nádorem – mikroprostředí nádoru – extracelulární matrix – metastázy nádorů – angiogeneze

Práce na tomto článku byla podpořena projektem AZV 16-29835A.

This article was supported by the project AZV 16-29835A.

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.



doc. RNDr. Michal Masařík, Ph.D.
Ústav patologické fyziologie
LF MU
Kamenice 5
625 00 Brno
e-mail: masarik@med.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 18. 6. 2019

Přijato/Accepted: 9. 9. 2019

doi: 10.14735/amko202039

Summary

Background: Despite progress in anticancer therapies, head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) has still a low survival rate. Recent studies have shown that tumour stroma may play an important role in the pathogenesis of this malignant disease. Fibroblasts are a major component of the tumour microenvironment and may significantly influence HNSCC progression as indicated by the contribution they make to important hallmarks of cancer, such as inflammation, non-restricted growth, angiogenesis, invasion, metastasis, and therapy resistance. It is well known that tumour cells can confer a cancer-associated fibroblast (CAF) phenotype that supports the growth and dissemination of cancer cells. CAFs can stimulate cancer progression through cell-cell contacts and communication, remodelling of extracellular matrix, and production of many signal molecules and matrix metalloproteinases. Consequently, genetic changes in epithelial cells are probably not the only factor that drives HNSCC carcinogenesis. Non-genetic changes in the tumour stroma can also be significantly involved. Stress-induced signals can induce a multicellular program, creating a field of tissue that is predisposed to malignant transformation. The “field cancerization” concept represents a process of active evolution of intercellular interactions and feedback loops between tumour and stromal cells. This model paves the way to study cancer from a new perspective and identify new therapeutic targets. **Purpose:** In this review, we discuss current knowledge about CAFs, such as their cellular origin, phenotypical plasticity and functional heterogeneity, and stress their contribution to HNSCC progression.

Key words

head and neck squamous cell carcinoma – cancer-associated fibroblasts – cancer microenvironment – extracellular matrix – neoplasm metastasis – angiogenesis

Úvod

Nádory hlavy a krku jsou globálně pátými nejčastěji se vyskytujícími solidními tumory. Převládající formou tohoto onemocnění jsou nádory dlaždicobuněčné (neboli spinocelulární), které představují více než 90 % všech nádorů této oblasti. Spinocelulární karcinomy hlavy a krku (head and neck squamous cell carcinoma – HNSCC) jsou přesněji klasifikovány podle své polohy (nádory dutiny ústní či nosní, orofaryngu, nosohltanu, hrtanu nebo hypofaryngu), TNM (tumor-node-metastasis) stadia a histologického gradingu. Při léčbě nádorů raného stadia (stadium I a II) jsou účinnými přístupy chirurgie a radioterapie, nicméně u 70 % pacientů je diagnostikováno stadium pokročilé, III nebo IV, kde je efektivita uvedených způsobů terapie radikálně nižší [1]. Zatímco u pacientů s I. a II. stadiem je 5leté přežití v rozmezí 70–90 % (nezávisle na lokalizaci tumoru), 50 % pacientů s pokročilejším stadiem karcinomu zemře do 2 let od stanovení diagnózy. U 5 % pacientů dochází po léčbě k rozvoji dalšího primárního nádoru [2]. Špatná terapeutická odpověď pacientů s pokročilými nádory zdůrazňuje urgentní potřebu hlubšího porozumění mechanismům patogenese HNSCC. V rámci řešení tohoto závažného klinického problému bylo provedeno mnoho studií zaměřených na poznání vlastností nádorových buněk. S postupem času se však ukazuje, že terapeutická rezistence není pouze inherentní charakteristikou samot-

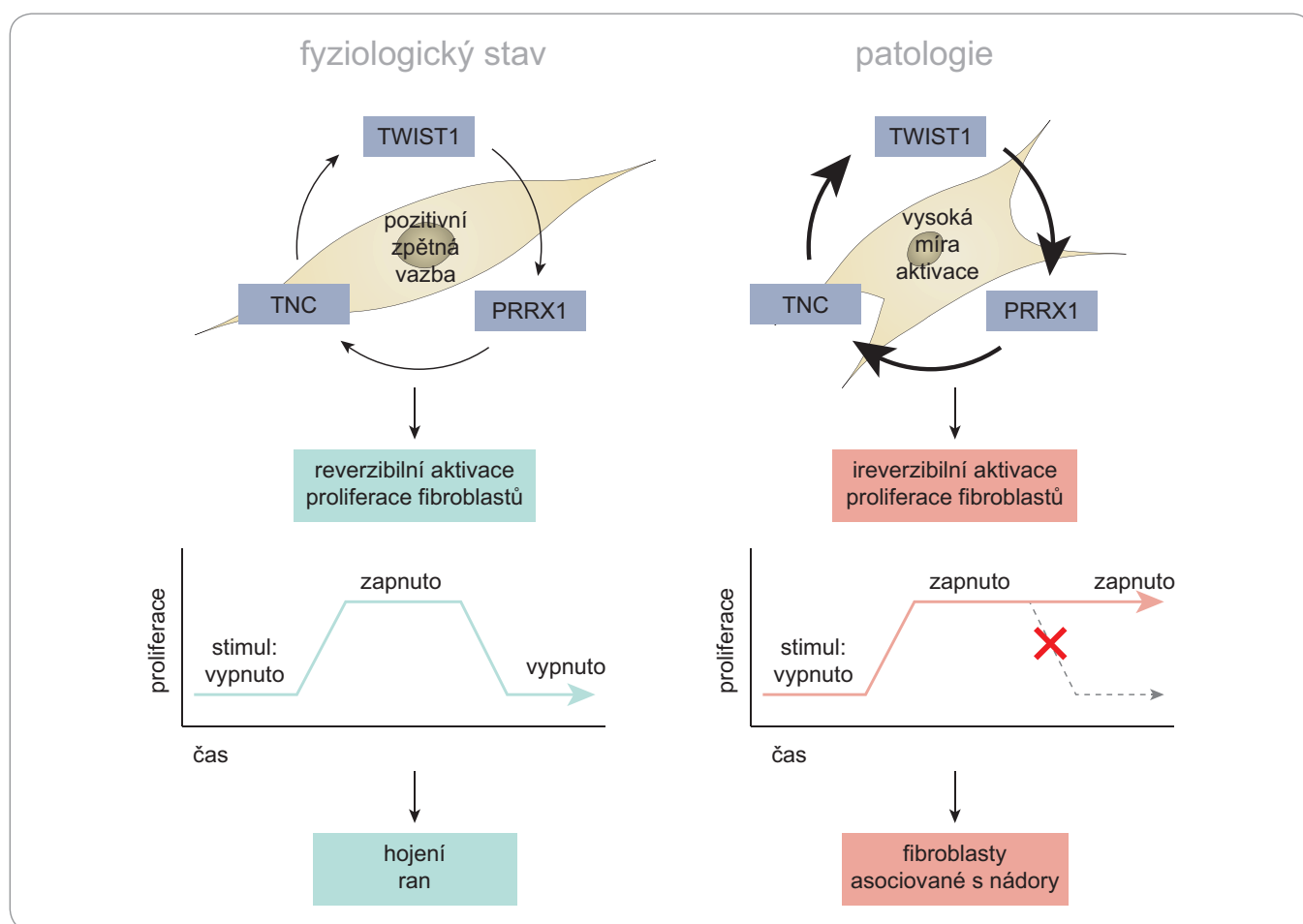
ných nádorových buněk a klíčovou roli mohou hrát rovněž buňky nádorového stromatu a jejich komunikace s buňkami nádorovými [3]. Tento vliv je natolik zásadní, že v některých případech dochází k reverzi rezistence nádorových buněk, pokud je narušena podpůrná (pronádorová) funkce buněk stromatu [4]. V nádorovém mikroprostředí (tumour microenvironment – TME) se nachází mnoho typů buněk, molekul extracelulární matrix (extracellular matrix – ECM) a signálů, které mohou inhibovat, či naopak podporovat růst nádorů. Zásadní podíl na rozvoji HNSCC má např. infekce virem HPV. Karcinomy pozitivní na HPV jsou lokalizovány zejména v oblasti orofaryngu a vykazují příznivější terapeutickou odpověď na radioterapii. Problematika HPV a jeho vlivu na kancerogenezi HNSCC byla podrobně zpracována např. v článku Rautava et al (2012) [5]. V tomto přehledovém článku jsme se zaměřili na roli fibroblastů asociovaných s nádorem (cancer-associated fibroblast – CAF) v TME HNSCC.

Fibroblasty klidové a aktivované

Fibroblasty jsou buňky mezenchymového původu, které jsou nejhojnějšími buňkami pojivové tkáně a výrazně se podílejí na syntéze i degradaci složek ECM. V důsledku toho jsou fibroblasty zodpovědné za zajištění strukturní integrity většiny tkání. Produkty fibroblastů rovněž spoluvytvářejí bazální membránu, která poskytuje ochrannou bariéru kolem spe-

cializovaného epitelu a přispívá k jeho polaritě, funkčnosti a specifčnosti [6]. Prostřednictvím tvorby a remodelace ECM ovlivňují fibroblasty organogenezi a diferenciaci epitelu. V dobře diferencované a intaktní tkáni zůstávají fibroblasty v klidovém, neproliferujícím stavu a obvykle se nacházejí v intersticiálních oblastech mezi vrstvami funkčního parenchymu. Jsou to tenké, protáhlé buňky vřetenovitého tvaru, které nejsou napojeny na bazální membránu, zato však navazují intenzivní kontakt s vlákny ECM. Klidové fibroblasty jsou obecně považovány za quiescentní, mající mírnou metabolickou a transkripční aktivitu [7]. Spolehlivý marker klidových fibroblastů stále chybí, nicméně fibroblastový specifický protein 1 (fibroblast-specific protein 1 – FSP1 alias S100A4) se této definici zřejmě blíží nejvíce [8]. Je ovšem třeba si uvědomit, že FSP1 není zcela specifický pro fibroblasty. Jeho exprese byla nalezena rovněž u prozánětlivé subpopulace makrofágů v játrech [9] a u nádorových buněčných linií epitelálního původu [10].

Schopnost aktivace klidových fibroblastů byla poprvé pozorována při procesu hojení ran [11] a později v podmínkách, jako je akutní a chronický zánět a tkáňová fibróza [12]. Pokud dojde k poškození tkáně, rezidentní populace fibroblastů je aktivována, proliferuje a migruje do poraněné oblasti v reakci na signalizaci krevních destiček, které uvolňují svůj bioaktivní obsah, např. transfor-



Obr. 1. Aktivace fibroblastů pomocí Twist1-Prr1-TNC pozitivní zpětné vazby.

Za normálních podmínek působí zpětná vazba mezi Twist1-Prr1 a TNC jako reverzibilní přepínač. Fibroblasty se vyskytují v aktivovaném stavu pouze po dobu jejich dostatečně vysoké stimulace (stav „zapnuto“). Po odeznění stimulačních impulzů přepínač přejde do stavu „vypnuto“. Za patologických podmínek však může dojít k trvalému zapnutí tohoto přepínače, což vede k trvalé aktivaci fibroblastů. Volně přepracováno dle [19].

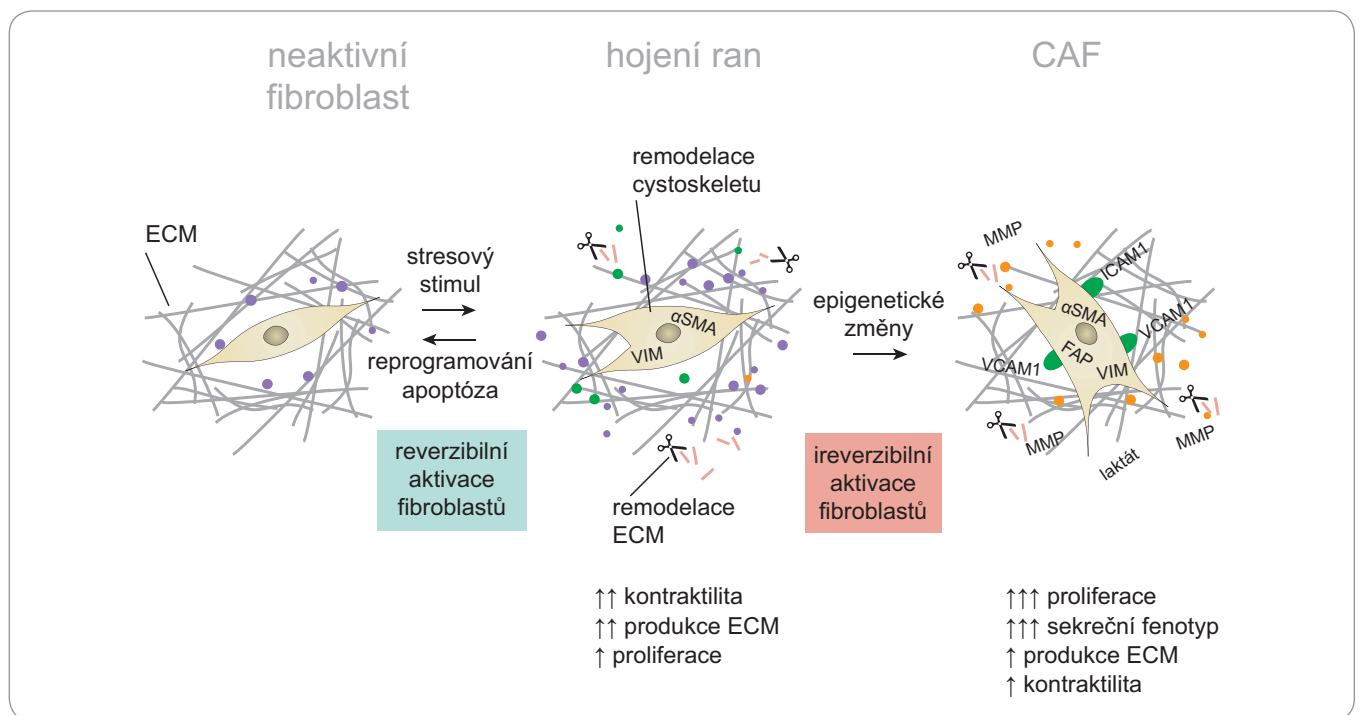
TNC – tenascin C, PRRX1 – paired-related homeobox 1

mující růstový faktor $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$ – TGF $\beta 1$), růstový faktor odvozený z destiček (platelet derived growth factor – PDGF) a interleukin 1 β (IL1 β). Bazální membrána je degradována a dochází k rekrutování dalších fibroblastů a zánětlivých buněk [13]. Takto se chovající fibroblasty se obecně považují za „aktivované“. U aktivovaných fibroblastů vzrůstá produkce vimentinu, aktinu a α -aktinu hladké svaloviny (α -smooth muscle actin – α -SMA kódovaný genem ACTA2), což jim umožňuje vyvíjet kontraktilní síly potřebné k uzavření rány [14]. Kontraktilita je zprostředkována fokální adhezí mezi aktivovanými fibroblasty a molekulami ECM. V důsledku aktivované exprese aktinu hladké svaloviny jsou aktivované fibroblasty často pojmenovávány jako myo-

fibroblasty, tedy buňky na pomezí fibroblastů a myoblastů. Fibroblasty odebrané z místa hojící se rány nebo z fibrotické tkáně kultivované v podmínkách *in vitro* aktivně syntetizují složky ECM a dělí se více než jejich protějšky izolované z nepoškozených tkání. Mezi produkovánými složkami ECM nechybí kolageny typu I, III, IV a V, různé typy lamininů a fibronectin [15].

Poté, co se rána uzavře, dochází k deaktivaci a masivní apoptóze myofibroblastů. Dlouhodobé přetrvávání myofibroblastů může vést k rozvoji závažných patologických stavů vč. idiopatické plicní fibrózy [16] a nádorů [17]. Mechanismy podílející se na přetrvávající aktivaci fibroblastů nejsou doposud zcela prozkoumány, nicméně je velmi pravděpodobné, že se tohoto procesu účastní po-

zitivní zpětná vazba poskytovaná např. biofyzikálními vlastnostmi opravované tkáně. V důsledku zvýšené produkce, ukládání a vzájemné provázanosti ECM proteinů se zvyšuje tuhost ECM v okolí aktivovaných myofibroblastů. Zvýšená tuhost ECM se může podílet na další aktivaci a perzistenci myofibroblastů, což vede k navýšené tvorbě proteinů ECM a opětovnému zvýšení tuhosti ECM za vzniku pozitivní zpětnovazebné smyčky. Během fyziologického hojení ran je tato amplifikační zpětnovazebná smyčka po nějaké době ukončena. Některé studie naznačují, že přežití aktivovaných myofibroblastů závisí na signálech vycházejících z mechanoreceptorů a přenášených signálními drahami reagujícími na mechanickou stimulaci (proces mechanotransdukce). Přerušení mechano-



Obr. 2. Model aktivace CAF fenotypu.

Klidové fibroblasty jsou vřetenovité buňky obklopené fyziologickou ECM. V důsledku poranění tkáně a s ním asociovaných aktivizačních stimulů se u fibroblastů zvyšuje exprese α -SMA, VCAM-1, ICAM-1 a vimentinu; aktivované fibroblasty ztrácí vřetenovitý tvar a díky přestavbám cytoskeletu získávají vysokou schopnost kontraktility a migrace. Dochází k remodelaci ECM a aktivaci sekrečního fenotypu, který dále zesiluje aktivaci a proliferaci fibroblastů. Tento stupeň aktivace je reverzibilní. Reverzibilita takové aktivace může být vysvětlena přeprogramováním nebo apoptózou aktivovaných fibroblastů. U CAF dochází k jejich nevratné aktivaci, umocnění sekrečního fenotypu, další remodelaci ECM a produkci imunomodulačních faktorů. Tento proces je spojen s rozvojem nádorových lézí. Změny v epigenetické regulaci mohou omezit reverzibilitu takovýchto aktivovaných stavů. CAF získávají zvýšené proliferační vlastnosti a vytvářejí funkčně různorodou populaci, což zvyšuje dynamickou komplexnost vyvíjejícího se nádorového mikroprostředí. Volně přepracováno dle [7].

CAF – fibroblasty asociované s nádorem, ECM – extracelulární matrix, α -SMA – α -aktin hladké svaloviny, VCAM1 – vaskulární intercelulární adhezivní molekula 1, ICAM1 – intracelulární adhezivní molekula 1, VIM – vimentin, MMP – matrixová metaloproteináza, FAP – protein aktivovaných fibroblastů

transdukční signalizace u aktivovaných fibroblastů, nikoliv však u neaktivovaných fibroblastů ve zdravé tkáni, vede k indukci apoptózy [18]. Další smyčka pozitivní zpětné vazby může vzniknout v signální dráze Twist1-Prrx1-TNC (paired-related homeobox 1; tenascin C). Twist1 a Prrx1 jsou transkripční faktory nezbytné pro vývoj tkání odvozených z mezodermy, které jsou schopny stimulovat přeměnu normálních klidových fibroblastů na fibroblasty aktivované. TNC pak představuje glykoprotein, který se účastní tvorby ECM. Injekce exogenního TNC do místa poranění je schopna indukovat pozitivní zpětnou vazbu mezi Twist1-Prrx1 a TNC a přispívá ke vzniku fibrotické tkáně podobné idiopatické plicní fibróze [19]. Zpětnovazebná smyčka Twist1-Prrx1-TNC může

být trvale zapnuta, což vede k patologické aktivaci fibroblastů (obr. 1). Myši postrádající expresi buď TLR4 (toll-like receptor 4), nebo jeho ligandů (např. tenascin C) trpí méně závažnou fibrózou kůže, plic a srdce v důsledku působení bleomycinu [20].

CAF fenotyp

Nádory jsou přirovnávány k ranám, které se nehojí [17], neboť dokážou využít proces hojení ran ke svému prospěchu a ve svém okolí udržovat vysokou míru aktivace fibroblastů. Na rozdíl od procesu hojení rány, ve kterém jsou fibroblasty postupně deaktivovány, zůstávají fibroblasty v TME trvale vystaveny podnětům, které podporují vznik sekrečního fenotypu a fenotypů remodelujících ECM (obr. 2). CAF mohou také

získat zvýšenou schopnost autokrinní signalizace a následně vysoce proliferační či migrační fenotyp. Kromě rezidentních tkáňových fibroblastů mohou jako prekurzory CAF sloužit také adipocyty [21], hematopoetické kmenové buňky [22], mezenchymální kmenové buňky odvozené z kostní dřeně [23], buňky epitelů (prostřednictvím epitel-mezenchymové tranzice – EMT [24,25]) a buňky endotelové (prostřednictvím endotel-mezenchymové tranzice – EndMT [26]) [27,28]. Aktivované fibroblasty se snadno transdiferencují do chondrocytů, myocytů, adipocytů a endotelových buněk [7].

Definice CAF

Přesná a specifická molekulární definice CAF prozatím neexistuje, což patrně

odráží skutečnost, že CAF jsou spíše buněčným stavem než buněčným typem. Většina studií uvádí, že CAF exprimují podobné sady markerů jako myofibroblasty. Nejčastěji využívaným markerem CAF je zřejmě α -SMA, nicméně využívány jsou také další markery jako např. FAP (fibroblast-activation protein), PDGFR- α (platelet-derived growth factor receptor- α) a PDGFR- β . Žádný z těchto markerů ale specificky neoznačuje všechny typy CAF nebo jasně neodlišuje CAF od normálních fibroblastů nebo jiných blízkých příbuzných typů buněk [13]. α -SMA je například exprimován rovněž u pericytů a buněk hladké svaloviny, PDGFR- α u astrocytů a PDGFR- β u pericytů a neuronů [13,29]. Vzhledem ke zjevné heterogenitě fibroblastů a jejich různému původu je obtížné rozlišit „pravé“ fibroblasty od buněk podobných fibroblastům. Aby tak bylo možné CAF klasifikovat, musí být použita kombinace několika různých markerů. Například α -SMA-pozitivní CAF mohou být odlišeny od pericytů na základě negativy na NG-2 antigen (neuron glial antigen 2) a RGS5 (regulator of G-protein signaling 5), jelikož pericyty jsou na tyto markery pozitivní [13]. V několika studiích byly identifikovány proteiny, jejichž exprese by měla být specifická pro CAF. Mezi tyto nadějně markery patří aspirin [30], kolagen 11 α 1 (COL11A1) [31] a MFAP5 (microfibrillar-associated protein 5) [32].

Aktivace CAF fenotypu

Zásadní otázkou zůstává, kdy se fibroblast stává CAF. Nomenklatura naznačuje, že se CAF nacházejí pouze v nádorové tkáni, nicméně termín CAF by mohl stejně dobře označovat jakýkoli fibroblast s pronádorovou aktivitou. Důkazy pro existenci CAF, jejichž výskyt předchází vznik malignity, byly získány z prsní tkáně zdravých žen. Zatímco fibroblasty získané z prsní tkáně s vysokou mamografickou denzitou podporovaly rozvoj nádorového onemocnění, fibroblasty odvozené z prsní tkáně s nízkou mamografickou denzitou nikoliv. Následné porovnání genové exprese těchto dvou odlišných typů fibroblastů vedlo k identifikaci CD36 jakožto klíčového markeru ve změně fenotypu fibroblastů [33].

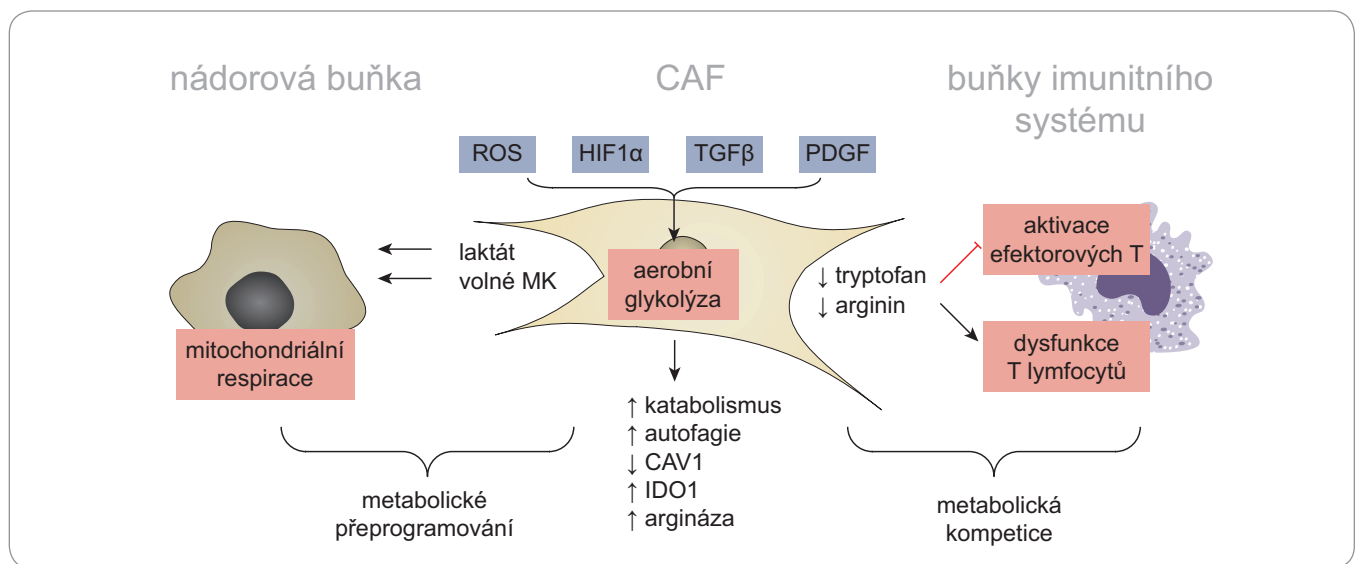
CD36 je glykoprotein, který zastává nezastupitelnou roli v transportu mastných kyselin, a to zejména v srdci, kosterním svalstvu a tukové tkáni. Současně ovlivňuje i obsah adipocytů a akumulaci ECM. Zmíněná pozorování naznačují, že aktivace stromálního programu, jež podporuje nádor, může být v onkogenezi časnou událostí [33]. Zajímavou skutečností je, že populace rezidentních tkáňových fibroblastů z různých částí těla a v rámci jednotlivých orgánů mohou mít výrazně odlišnou náchylnost k získání fenotypu CAF [7]. Například fibroblasty vyskytující se v prostatické tkáni potlačovaly maligní přeměnu imortalizovaného epitelu prostaty [34]. Naopak fibroblasty získané z místa perzistentního zánětu, třeba od pacientů s revmatoidní artritidou, vykazovaly často nádor podporující fenotyp [35]. Rovněž v rámci pronádorových CAF se mohou vyskytovat různé subpopulace s odlišnými vlastnostmi. Subpopulace orálních CAF s nižším skóre po barvení α -SMA (CAF typu C1) podporovala proliferaci nádorových buněk, ale potlačovala jejich přeměnu v nádorové kmenové buňky. Na druhou stranu, CAF s vyšším skóre α -SMA barvení (CAF typu C2) exprimovaly nižší hladiny BMP4 (bone morphogenetic protein 4), přičemž jejich přítomnost byla spojena s nižší proliferací buněk karcinomu ústní dutiny, zároveň však i s vyšší frekvencí výskytu nádorových kmenových buněk [36].

Doposud není zřejmé, které procesy jsou zásadní pro aktivaci fenotypu CAF. Četné studie ukázaly, že na rozdíl od nádorových epiteliálních buněk jsou změny počtu kopií genů a onkogenní a nádorově supresorové mutace (např. mutace TP53) u CAF poměrně vzácné [29]. Hybatelem fenotypu CAF jsou zřejmě epigenetické změny (tj. metylace DNA, modifikace histonů, změny v expresi nekódujících RNA aj.) a abnormální aktivace či inaktivace některých signálních drah (obr. 1, 3). Například umlčení CBF-1 (C-repeat-binding factor alias RBP-Jk) kombinované se sníženou expresí funkčního p53 v kožních fibroblastech postačovalo pro aktivaci fenotypu CAF podporujícího indukci nádorů odvozených od keratinocytů. Na snížení exprese p53 se podílel fibroblas-

tový růstový faktor 2 (fibroblast growth factor 2 – FGF2) vylučovaný sousedními epiteliálními nádorovými buňkami [37]. Jak již bylo zmíněno, jako významný aktivátor fenotypu CAF může sloužit také zpětnovazebná smyčka Twist1-Prrxl-TNC (obr. 1) [19], CCN2 alias růstový faktor pojivové tkáně (connective tissue growth factor – CTGF) [38], umlčení exprese TGF β 2 (transforming growth factor- β type 2 receptor) [39], a naopak aktivace faktorů TLR4 [40,41], CCR5 (C-C chemokine receptor type 5) [42,43] a IRF3 (interferon regulatory factor 3) [44]. Prozářlivý cytokin LIF (leukemia inhibitory factor) se podílí na aktivaci Janusovy kinázy 1 (JAK1) a transkripčního faktoru STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), čímž aktivuje DNA-metyltransferázy 1 (DNMT1) a DNA-metyltransferázy 3b (DNMT3b) a také hypermetylací a umlčení některých klíčových regulačních genů. V důsledku těchto procesů LIF zvyšuje kontraktilitu aktomyozinu a umožňuje tak CAF vytvářet cesty skrze ECM, které jsou následně využívány nádorovými buňkami při kolektivní invazi [45,46]. Kromě výše popsaných mechanismů mohou být normální fibroblasty konvertovány na CAF působením microRNA obsažených v exozomech a mikrovezikulech produkovaných nádorovými buňkami. Tuto konverzi může vyvolat např. miR-214 u nádorů vaječníku a miR-155 u karcinomu pankreatu [47].

CAF v nádorovém mikroprostředí

Víceřákový proces progresu nádorového onemocnění vyžaduje podporu buněk obsažených ve stromatu. Klidové fibroblasty však na rozdíl od CAF vykazují spíše inhibiční účinky na buněčnou proliferaci a motilitu nádorových buněk [48]. Pokud má tedy vzniknout nádor, TME musí být přeprogramováno na nádorově permissivní fenotyp. Současné studie naznačují, že vytvoření nádorově permissivního prostředí může dokonce předcházet vzniku samotného ložiska nádorových buněk. Signály indukované buněčným a tkáňovým stresem mohou spustit koordinovaný program koevoluce, který umožní zrod a proliferaci nádorových buněk a upevnění interakce mezi nádorovými buňkami



Obr. 3. Model metabolické symbiózy a konkurence v nádorovém mikroprostředí. Aktivace CAF a udržení jejich sekrečního fenotypu je energeticky náročné a vyžaduje metabolické změny. U některých typů CAF proto dochází k aktivaci aerobní glykolýzy. Zvýšená závislost CAF na aerobní glykolýze může být vyvolána mnoha faktory – sníženou dostupností kyslíku v rostoucích nádorech, stabilizací faktoru HIF1 α , aktivitou signálních drah TGF β a PDGF nebo ztrátou exprese CAV1, zprostředkovanou reaktivními kyslíkovými radikály. Zvýšená produkce laktátu, mastných kyselin a ketolátů podporuje mitochondriální respiraci nádorových buněk. Zatímco metabolická symbióza mezi CAF a nádorovými buňkami stimuluje růst a maligní fenotyp nádorových buněk, jejím vedlejším efektem je snížení dostupnosti klíčových metabolitů pro jiné složky TME. Tato metabolická konkurence následně narušuje funkčnost protinádorové imunity. Například zvýšená exprese indolamin 2,3-dioxygenázy 1 a argináz (ARG1 a ARG2) v CAF radikálně snižuje dostupnost tryptofanu a argininu v TME, čímž inhibuje proliferaci a aktivaci efektorových T lymfocytů. Volně přepracováno dle [7].

CAF – fibroblasty asociované s nádorem, HIF1 α – hypoxia inducible factor 1 α , TGF β – transformující růstový faktor β , PDGF – růstový faktor odvozený z destiček, CAV1 – caveolin 1, TME – nádorové mikroprostředí, ROS – reaktivní kyslíkové radikály, IDO1 – indolamin 2,3-dioxygenáza 1, MK – mastné kyseliny

a mikroprostředím [29]. Komunikace v rámci TME může být významně ovlivňována pomocí exozomů. Exozomy uvolňované nádorovými buňkami nebo jinými buňkami stromatu mohou do stromálních fibroblastů dodávat aktivní růstové faktory a cytokiny, stejně jako funkční fragmenty DNA a kódující a nekódující RNA, a indukovat jejich aktivaci [49–54]. Po přeprogramování klidových fibroblastů na CAF dochází k dynamickým změnám jejich metabolismu a sekretomu, což potencuje trvalou autokrinní aktivaci CAF. Bylo prokázáno, že fenotyp CAF (zejména jeho sekreční vzorce) do značné míry přetrvává při *in vitro* kultivaci i bez pokračující stimulace CAF nádorovými buňkami [55].

CAF a podpora primárního nádoru

CAF vylučují mnoho růstových faktorů a cytokinů, které mohou podporovat růst nádorových buněk a ovlivňovat ostatní buňky nádorového mikroprostředí. Jako příklad může být uveden růstový faktor hepatocytů (hepatocyte growth factor –

HGF), dále pak fibroblastové růstové faktory FGF2 a 7, TGF β , PDGF, osteopontin, SFRP2 (secreted frizzled-related protein 2), faktor 1 odvozený od stromatu (stromal derived factor1 – SDF-1), vaskulární endotelový růstový faktor A (vascular endothelial growth factor A – VEGFA), interleukin 6 (IL6), interleukin 8 (IL8) a mnoho dalších [7,56]. Bez aktivní tvorby nových krevních cév pro zásobování kyslíkem a živinami nejsou nádory schopny růst. Důležité je proto i pozorování, že faktory produkované CAF podporují angiogenezi a přispívají tak k zajištění růstových požadavků maligních nádorů. Výše uvedený SDF-1 (také známý jako CXCL12) produkovaný fibroblasty stimuluje neovaskularizaci nádoru prostřednictvím nábory progenitorových buněk endotelu [55]. SDF-1 je rovněž ligandem CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4), který je vysoce exprimován na nádorových buňkách a po aktivaci přímo stimuluje proliferaci nádorových buněk [55]. Alternativně mohou CAF modulovat angiogenezi a průtok krve

nádorem také nepřímo, a to pomocí remodelace ECM [57]. Kromě schopnosti vylučovat růstové faktory a podporovat proliferaci nádorových buněk působí CAF také jako promutagení agens prostřednictvím produkce reaktivních forem kyslíku [58].

CAF podporují růst nádorových buněk rovněž ovlivněním jejich metabolických drah. Nádorové buňky většinou preferují glukózu jakožto zdroj energie. Samotná glukóza však nedokáže pokrýt jejich potřebu uhlíku, a je proto zřejmé, že nádorové buňky musí využívat i jiné zdroje. Některé nádorové buňky jsou závislé na glutaminu a byla prokázána i konzumace laktátu. V průběhu kancerogeneze se CAF přizpůsobují metabolismu nádorových buněk a stávají se k nim komplementárními za vzniku metabolické symbiózy. Metabolická symbióza nabízí účinný systém, ve kterém mohou nádorové buňky využívat metabolity produkované fibroblasty. Jedním z typů metabolické symbiózy je situace, kdy dobře

okysličené anabolické nádorové buňky konzumují laktát poskytovaný katabolickými fibroblasty, které jsou působením nádorových buněk tlačeny do glykolytického metabolismu a autofagie (obr. 3). Katabolický a glykolytický fenotyp fibroblastů může být vyvolán např. ztrátou exprese caveolinu-1 (CAV1) [59]. Metabolický posun od oxidativní fosforylace ke glykolýze doprovázený zvýšenou expresí laktátového exportéru MCT4 (monocarboxylate transporter 4) vykazoval rovněž fibroblasty exprimující snížené množství CD36 [60,61]. Metabolická symbióza CAF s nádorovými buňkami se dynamicky vyvíjí v závislosti na množství kyslíku, extracelulární dostupnosti metabolitů a přítomnosti signálních molekul. Metabolická symbióza se tak může vyskytnout i v opačném uspořádání, kde oxidační metabolismus CAF podporuje růst glykolytických nádorových buněk [62]. Toto je zřejmě případ HNSCC – CAF zde vylučují HGF a stimulují tak glykolytický fenotyp v buňkách HNSCC; buňky HNSCC pak produkují FGF2, jež potencuje využívání laktátu fibroblasty [63].

CAF podporují kancerogenezi také změnou dostupnosti metabolitů v nádorovém mikroprostředí. Například významně ovlivňují biologickou dostupnost tryptofanu a argininu, přičemž hladiny těchto metabolitů jsou klíčové pro aktivitu a funkci T lymfocytů. Metabolická konkurence mezi CAF a buňkami imunitního systému tak může vést ke snížené protinádorové reaktivitě T lymfocytů akumulovaných v nádorech [7]. Přítomnost CAF zároveň zapřičiňuje zvýšenou expresi adhezivních molekul, např. vaskulární intercelulární adhezivní molekuly 1 (vascular cell adhesion molecule 1 – VCAM-1) a intracelulární adhezivní molekuly 1 (intercellular adhesion molecule 1 – ICAM-1), v nádorovém mikroprostředí a dopomáhá tak k rekrutování makrofágů asociovaných s nádorem, které dále přispívají k vytváření nádorově permissivní niky [64]. Vazba makrofágů asociovaných s nádorem na molekuly VCAM-1 nádorových buněk umožňuje přenos signálů, které zajišťují přežití metastazujících buněk karcinomu prsu v plicní tkáni bohaté na leukocyty [65].

CAF a vznik metastáz

CAF v TME nejenže podporují růst nádorových buněk, ale zvyšují také jejich invazivitu. CAF podporují metastazování nádorových buněk prostřednictvím přechodných heterotypických mezibuněčných kontaktů a produkcí parakrinně působících faktorů [66]. CAF zároveň ovlivňují tuhost ECM. U mnoha nádorů je původní tkáň nahrazena hustou ECM bohatou na kolagen, která se podobá jizvě. K tvorbě remodelovaných a nefyziologicky orientovaných kolagenních sítí významně přispívají právě CAF skrze produkci lysyl-6-oxidázy. Mechanická stimulace nádorových buněk pomocí těchto kolagenních sítí hraje významnou roli v aktivaci invazivního programu nádorových buněk [67]. Molekulární signalizace mezi nádorovými buňkami a CAF dále stimuluje migraci obou typů buněk a modifikuje sousední ECM a bazální membránu [68]. Přestavba ECM pomocí matrixových metaloproteináz (matrix metalloproteinases – MMPs) produkovaných CAF je jedním z nejdůležitějších kroků v progresi nádorového onemocnění. Za fyziologických podmínek je udržována rovnováha mezi aktivitou MMP a jejich inhibitorů. Tato rovnováha je v průběhu kancerogeneze posunována směrem k aktivaci MMP. Výsledkem je významná remodelace ECM, která přispívá k angiogenezi a invazivnímu chování nádorových buněk [58]. Při invazi do sekundárních ložisek mohou nádorové buňky migrovat samostatně, je-li u nich aktivován pseudomezenchymální fenotyp, nebo mohou k migraci využívat tažné síly CAF [69]. CAF jsou manipulovány nádorovými buňkami tak, aby se staly invazivními a schopnými remodelace ECM, a právě CAF zřejmě určují směrovost celé migrující metastatické skupiny. Ve srovnání s normálními fibroblasty produkují CAF ECM bohatou na fibronectin s anizotropní orientací vláken, která nádorové buňky navádí k migraci určitým směrem [70]. CAF pro nádorové buňky budují také cestu skrze ECM a zároveň slouží jako generátor tažné síly [69]. U spinocelulárních karcinomů je přenos tažné síly zprostředkovan heterofilní adhezí, na níž se podílí N-kadherin na membráně CAF a E-kadherin na membráně nádorových buněk.

Tato adheze funguje jako mechanický receptor, který podporuje invazi nádorových buněk spuštěním signální dráhy β -katenin–vinculin a remodelací aktinu v obou typech společně migrujících buněk [71]. CAF exprimující N-kadherin slouží jako pozitivní stimulátor proliferace a migrace nádorových buněk rovněž u melanomu. Buňky melanomu nejsou schopny produkovat IGF-1 (insulin-like growth factor 1) samy, a spoléhají proto na IGF-1 vylučovaný okolními fibroblasty [72]. Bylo též pozorováno, že metastazování nádorových buněk podporuje zvýšená exprese fibroblastového CAV1 [73], zatímco nízká exprese fibroblastového CAV1 napomáhala vzniku metabolické symbiózy u primárních nádorů (obr. 3). Vzhledem k tomu, že zvýšená kontraktilita (potřebná k pohybu buněk) je spíše než pro sekreční CAF charakteristická pro jejich myofibroblastové subtypy [8], mohla by exprese CAV1 potenciálně sloužit jako nová metoda charakterizace fibroblastů. Další subpopulací CAF jsou ty, které exprimují tenascin C a VEGFA. Tyto CAF byly identifikovány jako klíčové mediátory metastazování karcinomu prsu do plic [74]. CAF v metastázách mohou vylučovat interleukin-11, který v nádorových buňkách aktivuje signalizaci GP130-STAT3. Aktivace této dráhy umožňuje přežití nádorových buněk v cílové tkáni, a tím podporuje nádorovou kolonizaci orgánů [75].

Význam CAF u HNSCC

Navzdory intenzivnímu výzkumu jsou přesné mechanismy kancerogeneze a rozvoje HNSCC doposud poměrně nejasné. Shromážděné důkazy však naznačují, že nestačí sledovat kumulaci onkogenních mutací v samotných nádorových buňkách. Interakce mezi nádorovými buňkami a buňkami stromatu HNSCC mohou totiž dramaticky ovlivnit progresi tumoru. Cílení terapeutického efektu do nádorového stromatu tak může představovat nový způsob, jak efektivně omezit metastazování [76]. Slibným zástupcem terapeuticky cílitelných buněk stromatu jsou CAF, jelikož nádory pozdního stadia HNSCC často obsahují až 80 % těchto buněk [63]. Buňky HNSCC mohou přispívat k vývoji fenotypu CAF prostřednictvím sekrece

TGFβ1 či IL1β. Tato aktivita vede k zvýšení produkce HGF a SDF-1 u CAF, což hraje zásadní roli v interakci mezi CAF a buňkami karcinomu dutiny ústní [77]. Některé studie uvádějí, že transdiferenciace fibroblastů na CAF závisí na enzymu NAD(P)H oxidáze 4 (NOX4). Zvýšená exprese NOX4 byla nalezena u mnoha typů nádorů, vč. HNSCC [78]. Rozvoj interakcí mezi buňkami HNSCC a CAF následně indukuje zvýšenou expresi TGFβ, VEGF, TNFα, HGF, IL1α, IL1β, IL6, IL33, CXCL12 a MMPs u obou typů buněk. Zvýšené koncentrace těchto rozpustných faktorů přispívají k růstu, migraci a invazivnímu chování buněk HNSCC. U fibroblastů kultivovaných společně s buňkami HNSCC byly také prokázány zvýšené hladiny fibronektinu, tenascin C, trombospondinu 1 a latentního TGFβ vázajícího proteinu 2 (latent TGF-beta binding protein 2 – LTBP2) [79]. Faktory vylučované CAF, jako např. karboxypeptidáza E, růstový faktor destiček D (platelet-derived growth factor D – PDGFD), EFEMP1 (EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1), IBP5 a IBP7 (insulin-like growth factor binding proteins), výrazně zvyšovaly signalizaci skrze receptory epidermálního růstového faktoru, receptory inzulínu podobného růstového faktoru a PDGFR nádorových buněk, a tím podporovaly růst nezávislý na ukotvení a expresi markerů nádorových kmenových buněk [80]. Dalším faktorem, který je produktem CAF a může významně ovlivňovat vznik HNSCC metastáz, je BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Některé studie naznačují, že signální dráha BDNF-TrkB (neurotrophin receptor B) může být kritickou složkou progresu HNSCC [81]. TrkB indukuje v nádorových buňkách EMT a má klíčovou úlohu v invazivním chování HNSCC [82].

Srovnání sekrečních profilů CAF u karcinomu dutiny ústní a neaktivovaných fibroblastů prokázalo v případě prvně jmenovaných buněk také zvýšenou expresi proteinů podílejících se na organizaci ECM a metabolismu kolagenu. Exprese N-terminálního propeptidu kolagenu typu I signifikantně korelovala s přítomností vysoce migrujících CAF ve frontální části tumoru a byla spojena s významně zkráceným přežíváním

pacientů s karcinomem dutiny ústní [83]. Ve srovnání s nenádorovými fibroblasty exprimují CAF asociované s HNSCC také vyšší hladiny proteinu NAB2 (NGFI-A-binding protein 2) [84] a kolagenu typu COL11A1, který byl v některých studiích označen jako slibný marker CAF [31]. Rovněž se podařilo prokázat, že COL11A1 přispívá ke kancerogenezi HNSCC a může sloužit jako potenciální terapeutický cíl [85]. S progresí HNSCC vzrůstala v CAF rovněž i exprese periostinu [86]. Periostin je sekretovaný protein ECM kódovaný genem *POSTN*, který mj. umocňuje metastatické schopnosti nádorů HNSCC a podporuje vznik nádorových kmenových buněk. Děje se tak díky vazbě periostinu na PTK7 (protein tyrosine kinase 7) a aktivaci signální dráhy Wnt/β-Catenin. Kombinovaná detekce *POSTN* a PTK7 může být proto potenciálním prognostickým a diagnostickým ukazatelem a slibným terapeutickým cílem [87]. Další funkční molekulou, která přispívá k udržování populace nádorových kmenových buněk v TME, tentokrát exprimovanou na povrchu CAF, je CD44 [88].

Zásadní význam pro kancerogenezi HNSCC mají rovněž imunomodulační účinky CAF. Některé studie potvrzují, že CAF jsou významnými producenty prostaglandinu E2 (PGE2) [89], který stimuluje buněčnou proliferaci a invazivní chování buněk HNSCC, inhibuje apoptózu a narušuje imunitní dohled [90]. Jelikož buňky HNSCC konstitutivně exprimují PGE2 receptory EP1, EP2 a EP3, může PGE2 také modulovat invazivní vlastnosti samotných nádorových buněk [91]. Změny v expresi genů různých proteinů ECM asociované se signalizací TGFβ a aktivací CAF fenotypu spojují CAF rovněž s únikem nádorových buněk HNSCC imunitnímu systému a selháním imunoterapie [92]. CAF se zřejmě významnou měrou podílí také na vzniku rezistence nádorových buněk vůči cisplatině [93]. Farmakologická inhibice Vps34, klíčového mediátoru autofagie, u CAF dokázala tuto rezistenci opět zvrátit, což naznačuje, že autofagický fenotyp je důležitým rysem CAF. Pomocí sekreční autofagie mohou být ovlivňovány hladiny významných cytokinů v TME. Tímto způsobem je regulována

např. hladina interleukinů IL6 a IL8 [94]. Dalším faktorem, kterým se CAF zřejmě podílí na imunomodulaci v TME, může být galactin 1 (Gal-1). Gal-1 je jedním z 15 evolučně konzervovaných proteinů vázajících β-galactosid, který vykazuje biologicky rozmanité aktivity v patogenezi zánětu a nádorového onemocnění. U Hodgkinova lymfomu zprostředkovává Gal-1 imunosupresi CD8⁺ T lymfocytů [95]. Předpokládá se také, že Gal-1 hraje roli při vytváření imunitní tolerance v těhotenství [96]. Inhibice exprese Gal-1 v CAF také potlačuje tvorbu metastáz karcinomu dutiny ústní [97].

Závěrem lze říct, že se CAF v rámci patogeneze HNSCC podílejí na mnoha kritických bodech nádorové transformace, jako jsou vytváření nádorově permisivní struktury ECM a metabolické a imunitní přeprogramování TME, s dopadem na metastazování a adaptivní rezistenci vůči chemoterapii a radioterapii. Pleiotropní působení CAF na nádorové buňky je pravděpodobně odrazem heterogeneity a plasticity jejich populace, s kontextově závislým vlivem na kancerogenezi. Specifické vlastnosti CAF poskytují mnoho cílitelných molekul, které by mohly v budoucnu hrát významnou roli v terapii HNSCC.

Literatura

1. Lemaire F, Millon R, Young J et al. Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Br J Cancer* 2003; 89(10): 1940–1949. doi: 10.1038/sj.bjc.6601373.
2. Duray A, Demoulin S, Hubert P et al. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010: 701657. doi: 10.1155/2010/701657.
3. Castells M, Thibault B, Delord JP et al. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci* 2012; 13(8): 9545–9571. doi: 10.3390/ijms13089545.
4. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(9): 665–674. doi: 10.1038/nrc2714.
5. Rautava J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol* 2012; 6 (Suppl 1): S3–S15. doi: 10.1007/s12105-012-0367-2.
6. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6): 422–433. doi: 10.1038/nrc1094.
7. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(9): 582–598. doi: 10.1038/nrc.2016.73.
8. Nurmik M, Ullmann P, Rodriguez F et al. In search of definitions: cancer-associated fibroblasts and their markers. *Int J Cancer* 2019. doi: 10.1002/ijc.32193.
9. Österreicher CH, Penz-Österreicher M, Grivnenikov SI et al. Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflam-

- matory subpopulation of macrophages in the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(1): 308–313. doi: 10.1073/pnas.1017547108.
10. Kahounova Z, Kurfurstova D, Bouchal J et al. The fibroblast surface markers FAP, anti-fibroblast, and FSP are expressed by cells of epithelial origin and may be altered during epithelial-to-mesenchymal transition. *Cytometry A* 2018; 93(9): 941–951. doi: 10.1002/cyto.a.23101.
11. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 1971; 27(5): 549–550. doi: 10.1007/bf02147594.
12. Desmouliere A, Darby IA, Gabbiani G. Normal and pathologic soft tissue remodeling: role of the myofibroblast, with special emphasis on liver and kidney fibrosis. *Lab Invest* 2003; 83(12): 1689–1707. doi: 10.1097/01.lab.0000101911.53973.90.
13. Marsh T, Pietras K, McAllister SS. Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(7): 1070–1078. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.10.013.
14. Sousa AM, Liu T, Guevara O et al. Smooth muscle alpha-actin expression and myofibroblast differentiation by TGFbeta are dependent upon MK2. *J Cell Biochem* 2007; 100(6): 1581–1592. doi: 10.1002/jcb.21154.
15. Muller GA, Rodemann HP. Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 1991; 17(6): 680–683. doi: 10.1016/s0272-6386(12)80351-9.
16. Huang SK, Horowitz JC. Outstaying their welcome: the persistent myofibroblast in IPF. *Austin J Pulm Respir Med* 2014; 1(1): 3–13.
17. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315(26): 1650–1659. doi: 10.1056/NEJM198612253152606.
18. Lagares D, Santos A, Grasberger PE et al. Targeted apoptosis of myofibroblasts with the BH3 mimetic ABT-263 reverses established fibrosis. *Sci Transl Med* 2017; 9(420): 3765. doi: 10.1126/scitranslmed.aal3765.
19. Yeo SY, Lee KW, Shin D et al. A positive feedback loop bi-stably activates fibroblasts. *Nat Commun* 2018; 9(1): 3016. doi: 10.1038/s41467-018-05274-6.
20. Varga J, Trojanowska M, Kuwana M. Pathogenesis of systemic sclerosis: recent insights of molecular and cellular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Scleroderma Relat Disord* 2017; 2(3): 137–152. doi: 10.5301/jrsd.5000249.
21. Bochet L, Lehuède C, Dauvillier S et al. Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res* 2013; 73(18): 5657–5668. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0530.
22. Mori L, Bellini A, Stacey MA et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res* 2005; 304(1): 81–90. doi: 10.1016/j.jcyexr.2004.11.011.
23. Jung Y, Kim JK, Shiozawa Y et al. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat Commun* 2013; 4: 1795. doi: 10.1038/ncomms2766.
24. Iwano M, Plieth D, Danoff TM et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002; 110(3): 341–350. doi: 10.1172/JCI15518.
25. Mink SR, Vashistha S, Zhang W et al. Cancer-associated fibroblasts derived from EGFR-TKI-resistant tumors reverse EGFR pathway inhibition by EGFR-TKIs. *Mol Cancer Res* 2010; 8(6): 809–820. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0460.
26. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 2007; 67(21): 10123–10128. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3127.
27. Bu L, Baba H, Yoshida N et al. Biological heterogeneity and versatility of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment. *Oncogene* 2019; 38(25): 4887–4901. doi: 10.1038/s41388-019-0765-y.
28. Liao Z, Tan ZW, Zhu P et al. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – accomplices in tumor malignancy. *Cell Immunol* 2019; 343: 103729. doi: 10.1016/j.cellimm.2017.12.003.
29. Gascard P, Tlsty TD. Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev* 2016; 30(9): 1002–1019. doi: 10.1101/gad.279737.116.
30. Maris P, Blomme A, Palacios AP et al. Asporin is a fibroblast-derived TGF-beta1 inhibitor and a tumor suppressor associated with good prognosis in breast cancer. *PLoS Med* 2015; 12(9): e1001871. doi: 10.1371/journal.pmed.1001871.
31. Vazquez-Villa F, Garcia-Ocana M, Galvan JA et al. COL11A1(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. *Tumour Biol* 2015; 36(4): 2213–2222. doi: 10.1007/s13277-015-3295-4.
32. Leung CS, Yeung TL, Yip KP et al. Calcium-dependent FAK/CREB/TNNC1 signalling mediates the effect of stromal MFAP5 on ovarian cancer metastatic potential. *Nat Commun* 2014; 5: 5092. doi: 10.1038/ncomms6092.
33. DeFilippis RA, Chang H, Dumont N et al. CD36 repression activates a multicellular stromal program shared by high mammographic density and tumor tissues. *Cancer Discov* 2012; 2(9): 826–839. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0107.
34. Ulumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Research* 1999; 59(19): 5002–5011. doi: 10.1186/bcr138.
35. Hu M, Yao J, Carroll D K et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell* 2008; 13(5): 394–406. doi: 10.1016/j.ccr.2008.03.007.
36. Patel AK, Vipparthi K, Thatikonda V et al. A subtype of cancer-associated fibroblasts with lower expression of alpha-smooth muscle actin suppresses stemness through BMP4 in oral carcinoma. *Oncogenesis* 2018; 7(10): 78. doi: 10.1038/s41389-018-0087-x.
37. Procopio MG, Laszlo C, Al Labban D et al. Combined CSL and p53 downregulation promotes cancer-associated fibroblast activation. *Nat Cell Biol* 2015; 17(9): 1193–1204. doi: 10.1038/ncb3228.
38. Hutchenreuther J, Vincent K, Norley C et al. Activation of cancer-associated fibroblasts is required for tumor neovascularization in a murine model of melanoma. *Matrix Biol* 2018; 74: 52–61. doi: 10.1016/j.matbio.2018.06.003.
39. Banerjee J, Mishra R, Li X et al. A reciprocal role of prostate cancer on stromal DNA damage. *Oncogene* 2014; 33(41): 4924–4931. doi: 10.1038/onc.2013.431.
40. Bhattacharyya S, Wang W, Qin W et al. TLR4-dependent fibroblast activation drives persistent organ fibrosis in skin and lung. *JCI insight* 2018; 3(13): 98850. doi: 10.1172/jci.insight.98850.
41. Xu Y, Ma J, Zheng Q et al. MPSSS impairs the immunosuppressive function of cancer-associated fibroblasts via the TLR4-NF-kB pathway. *Biosci Rep* 2019; 39(5): BSR20182171. doi: 10.1042/BSR20182171.
42. Sasaki S, Baba T, Shinagawa K et al. Crucial involvement of the CCL3-CCR5 axis-mediated fibroblast accumulation in colitis-associated carcinogenesis in mice. *Int J Cancer* 2014; 135(6): 1297–1306. doi: 10.1002/ijc.28779.
43. Tanabe Y, Sasaki S, Mukaida N et al. Blockade of the chemokine receptor, CCR5, reduces the growth of orthotopically injected colon cancer cells via limiting cancer-associated fibroblast accumulation. *Oncotarget* 2016; 7(30): 48335–48345. doi: 10.18632/oncotarget.10227.
44. Zhang Y, Zhang L, Lin XH et al. Knockdown of IRF3 inhibits extracellular matrix expression in keloid fibroblasts. *Biomed Pharmacother* 2017; 88: 1064–1068. doi: 10.1016/j.biopha.2017.01.142.
45. Zeisberg EM, Zeisberg M. The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J Pathol* 2013; 229(2): 264–273. doi: 10.1002/path.4120.
46. Albregues J, Bertero T, Grasset E et al. Epigenetic switch drives the conversion of fibroblasts into proinvasive cancer-associated fibroblasts. *Nat Commun* 2015; 6: 10204. doi: 10.1038/ncomms10204.
47. Alkasalios T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M et al. Fibroblasts in the tumor microenvironment: shield or spear? *Int J Mol Sci* 2018; 19(5): 1532. doi: 10.3390/ijms19051532.
48. Alkasalios T, Flaberg E, Kashuba V et al. Inhibition of tumor cell proliferation and motility by fibroblasts is both contact and soluble factor dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(48): 17188–17193. doi: 10.1073/pnas.1419554111.
49. Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E et al. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 451(2): 295–301. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.109.
50. Webber J, Steadman R, Mason MD et al. Cancer exosomes trigger fibroblast to myofibroblast differentiation. *Cancer Res* 2010; 70(23): 9621–9630. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1722.
51. Balaj L, Lessard R, Dai L et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* 2011; 2: 180. doi: 10.1038/ncomms1180.
52. Guescini M, Genedani S, Stocchi V et al. Astrocytes and glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)* 2010; 117(1): 1–4. doi: 10.1007/s00702-009-0288-8.
53. Cai J, Han Y, Ren H et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol Cell Biol* 2013; 5(4): 227–238. doi: 10.1093/jmcb/mjt011.
54. Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U et al. Cardiomycyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One* 2012; 7(4): e34653. doi: 10.1371/journal.pone.0034653.
55. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121(3): 335–348. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.034.
56. Chen X, Song E. Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18(2): 99–115. doi: 10.1038/s41573-018-0004-1.
57. Seandel M, Noack-Kunmann K, Zhu D et al. Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood* 2001; 97(8): 2323–2332. doi: 10.1182/blood.v97.8.2323.
58. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2010; 15: 166–179. doi: 10.2741/3613.
59. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 2009; 8(23): 3984–4001. doi: 10.4161/cc.8.23.10238.
60. Martinez-Outschoorn U, Sotgia F, Lisanti MP. Tumor microenvironment and metabolic synergy in breast cancers: critical importance of mitochondrial fuels and function. *Semin Oncol* 2014; 41(2): 195–216. doi: 10.1053/j.semincol.2014.03.002.
61. Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Caveolae and signalling in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; 15(4): 225–237. doi: 10.1038/nrc3915.

62. Nakajima EC, van Houten B. Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Mol Carcinog* 2013; 52(5): 329–337. doi: 10.1002/mc.21863.
63. Kumar D, New J, Vishwakarma V et al. Cancer-associated fibroblasts drive glycolysis in a targetable signaling loop implicated in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Cancer Res* 2018; 78(14): 3769–3782. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1076.
64. Zhang R, Qi F, Zhao F et al. Cancer-associated fibroblasts enhance tumor-associated macrophages enrichment and suppress NK cells function in colorectal cancer. *Cell Death Dis* 2019; 10(4): 273. doi: 10.1038/s41419-019-1435-2.
65. Chen Q, Zhang XH, Massague J. Macrophage binding to receptor VCAM-1 transmits survival signals in breast cancer cells that invade the lungs. *Cancer Cell* 2011; 20(4): 538–549. doi: 10.1016/j.ccr.2011.08.025.
66. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD et al. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277(1): C1–C9. doi: 10.1152/ajpcell.1999.277.1.C1.
67. Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA et al. Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(3): 911–916. doi: 10.1073/pnas.1118910109.
68. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE et al. Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res* 2012; 10(11): 1403–1418. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0307.
69. Theveneau E, Linker C. Leaders in collective migration: are front cells really endowed with a particular set of skills? *F1000Research* 2017; 6: 1899. doi: 10.12688/f1000research.11889.1.
70. Erdogan B, Ao M, White L M et al. Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J Cell Biol* 2017; 216(11): 3799–3816. doi: 10.1083/jcb.201704053.
71. Labernadie A, Kato T, Brugues A et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat Cell Biol* 2017; 19(3): 224–237. doi: 10.1038/ncb3478.
72. Li G, Satyamoorthy K, Meier F et al. Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil. *Oncogene* 2003; 22(20): 3162–3171. doi: 10.1038/sj.onc.1206455.
73. Goetz JG, Minguet S, Navarro-Lerida I et al. Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 2011; 146(1): 148–163. doi: 10.1016/j.cell.2011.05.040.
74. O'Connell JT, Sugimoto H, Cooke VG et al. VEGF-A and Tenascin-C produced by S100A4+ stromal cells are important for metastatic colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(38): 16002–16007. doi: 10.1073/pnas.1109493108.
75. Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S et al. Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell* 2012; 22(5): 571–584. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.013.
76. Wheeler SE, Shi H, Lin F et al. Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models. *Head Neck* 2014; 36(3): 385–392. doi: 10.1002/hed.23312.
77. Routray S, Sunkavali A, Bari KA. Carcinoma-associated fibroblasts, its implication in head and neck squamous cell carcinoma: a mini review. *Oral Dis* 2014; 20(3): 246–253. doi: 10.1111/odi.12107.
78. Barnett RM, Vilar E. Targeted therapy for cancer-associated fibroblasts: are we there yet? *J Natl Cancer Inst* 2017; 110(1): 11–13. doi: 10.1093/jnci/djx131.
79. Dudas J, Fullar A, Bitsche M et al. 9 Matrix remodeling in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2015; 51(5): e30. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.02.012.
80. Alvarez-Teijeiro S, Garcia-Inclan C, Villaronga MA et al. Factors secreted by cancer-associated fibroblasts that sustain cancer stem properties in head and neck squamous carcinoma cells as potential therapeutic targets. *Cancers* 2018; 10(9): 334. doi: 10.3390/cancers10090334.
81. Jiffar T, Yilmaz T, Lee J et al. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) coordinates lympho-vascular metastasis through a fibroblast-governed paracrine axis in the tumor microenvironment. *Cancer Cell Microenviron* 2017; 4(2): 1566. doi: 10.14800/ccm.1566.
82. Kupferman ME, Jiffar T, El-Naggar A et al. TrkB induces EMT and has a key role in invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2010; 29(14): 2047–2059. doi: 10.1038/onc.2009.486.
83. Bagordakis E, Sawazaki-Calone I, Macedo CC et al. Secretome profiling of oral squamous cell carcinoma-associated fibroblasts reveals organization and disassembly of extracellular matrix and collagen metabolic process signatures. *Tumour Biol* 2016; 37(7): 9045–9057. doi: 10.1007/s13277-015-4629-y.
84. Choi SY, Oh SY, Kang SH et al. NAB 2-Expressing cancer-associated fibroblast promotes HNSCC progression. *Cancers* 2019; 11(3): 388. doi: 10.3390/cancers11030388.
85. Sok JC, Lee JA, Dasari S et al. Collagen type XI $\alpha 1$ facilitates head and neck squamous cell cancer growth and invasion. *Br J Cancer* 2013; 109(12): 3049–3056. doi: 10.1038/bjc.2013.624.
86. Utispan K, Koontongkaew S. Fibroblasts and macrophages: key players in the head and neck cancer microenvironment. *J Oral Biosci* 2017; 59(1): 23–30. doi: 10.1016/j.job.2016.11.002.
87. Yu B, Wu K, Wang X et al. Periostin secreted by cancer-associated fibroblasts promotes cancer stemness in head and neck cancer by activating protein tyrosine kinase 7. *Cell Death Dis* 2018; 9(11): 1082. doi: 10.1038/s41419-018-1116-6.
88. Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 expressed on cancer-associated fibroblasts is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. *Stem Cells* 2014; 32(1): 145–156. doi: 10.1002/stem.1556.
89. Alcolea S, Antón R, Camacho M et al. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE2. *J Lipid Res* 2012; 53(4): 630–642. doi: 10.1194/jlr.M019695.
90. Cohen EG, Almahmeed T, Du B et al. Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(9): 3425–3430.
91. Abrahao AC, Castilho RM, Squarize CH et al. A role for COX2-derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. *Oral Oncology* 2010; 46(12): 880–887. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.09.005.
92. Chakravarthy A, Khan L, Bensler NP et al. TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. *Nat Commun* 2018; 9(1): 4692. doi: 10.1038/s41467-018-06654-8.
93. Steinbichler TB, Metzler V, Pritz C et al. Tumor-associated fibroblast-conditioned medium induces CDDP resistance in HNSCC cells. *Oncotarget* 2016; 7(3): 2508–2518. doi: 10.18632/oncotarget.6210.
94. New J, Arnold L, Ananth M et al. Secretory autophagy in cancer-associated fibroblasts promotes head and neck cancer progression and offers a novel therapeutic target. *Cancer Res* 2017; 77(23): 6679–6691. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1077.
95. Gandhi MK, Moll G, Smith C et al. Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2007; 110(4): 1326–1329. doi: 10.1182/blood-2007-01-066100.
96. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 2011; 241(1): 20–38. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x.
97. Wu MH, Hong HC, Hong TM et al. Targeting galectin-1 in carcinoma-associated fibroblasts inhibits oral squamous cell carcinoma metastasis by downregulating MCP-1/CCL2 expression. *Clin Cancer Res* 2011; 17(6): 1306–1316. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1824.

Dlouhodobé klinické výsledky IGRT karcinomu prostaty

Long-Term Clinical Results of IGRT in Prostate Cancer Treatment

Doležel M.¹⁻³, Odrážka K.³⁻⁵, Vaňásek J.⁴, Štuk J.⁴, Hlávka A.⁴, Vítková M.⁴, Ulrych V.⁴, Kohlová T.^{3,6}, Vlachová Z.^{1,2}, Hafuda A.⁷, Hartmann I.^{2,8}

¹ Onkologická klinika FN Olomouc

² LF UP Olomouc

³ 1. LF UK v Praze

⁴ Komplexní onkologické centrum, Multiscan s.r.o, Pardubická nemocnice, Nemocnice Pardubického kraje, a.s.

⁵ 3. LF UK v Praze

⁶ Onkologická klinika VFN Praha

⁷ Urologické oddělení, Pardubická nemocnice, Nemocnice Pardubického kraje, a.s.

⁸ Urologická klinika FN Olomouc

Souhrn

Východiska: Kombinace radioterapie s modulovanou intenzitou svazku (intensity modulated radiation therapy – IMRT) a obrazem řízené radioterapie (image guided radiotherapy – IGRT) hraje díky šetření zdravých tkání v léčbě karcinomu prostaty významnou roli. Presentujeme zde klinické výsledky a nežádoucí účinky u 260 mužů léčených eskalovanou dávkou záření pomocí techniky IGRT. **Materiál a metody:** Od září 2008 do února 2012 podstoupilo 260 pacientů s lokalizovaným karcinomem prostaty radikální radioterapii. Dvě stě nemocných bylo léčeno technikou IGRT na oblast prostaty a báze semenných váčků dávkou 78 Gy ve 39 frakcích adaptivním protokolem kombinujícím trojrozměrné zobrazení konickým svazkem (cone-beam computed tomography – CBCT) s kilovoltážními snímky a individuálním bezpečnostním lemem. Šedesát mužů podstoupilo léčbu identickou dávkou technikou RapidArc s izocentrickým lemem 6 mm při denní online verifikaci nastavení pacienta pomocí CBCT. Pozdní toxicita byla hodnocena prospektivně dle RTOG/FC-LENT škály. **Výsledky:** U 18 pacientů (6,9 %) se projevila akutní gastrointestinální toxicita 2. stupně. Toxicita 3. ani 4. stupně nebyla zaznamenána. Akutní genitourinární toxicita 2., resp. 3. stupně se projevila u 39 (15 %), resp. 6 nemocných (2,3 %). Genitourinární toxicita 4. stupně byla přítomna u 5 mužů (1,9 %), u všech pro nezbytnost přechodného zavedení permanentního močového katetru. Při mediánu sledování 84,2 měsíce byla kumulativní incidence chronické gastrointestinální a genitourinární toxicity 2. a vyššího stupně v 7 letech 4,4, resp. 7,1 %. Přežití bez relapsu prostatického specifického antigenu v 7 letech u pacientů s nízkým rizikem bylo 97,1 %, se středním rizikem 83,6 % a u nemocných s vysokým rizikem 75 %. **Závěr:** Kombinace IMRT a IGRT umožňuje dosahovat velice nízké toxicity léčby.

Klíčová slova

obrazem řízená radioterapie – karcinom prostaty – toxicita

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.



doc. MUDr. Martin Doležel, Ph.D.

Onkologická klinika

FN Olomouc

I. P. Pavlova 6

775 20 Olomouc

e-mail: dolezelm@email.cz

Obdrženo/Submitted: 8. 9. 2019

Přijato/Accepted: 25. 10. 2019

doi: 10.14735/amko202049

Summary

Background: The combination of intensity modulated radiation therapy (IMRT) and image guided radiotherapy (IGRT) plays a significant role in sparing normal tissue during prostate cancer treatment. We report the clinical outcomes of 260 patients treated with high-dose IGRT as well as the toxicity of high-dose IGRT in these patients. **Materials and methods:** From September 2008 to February 2012, 260 men with clinically localized prostate cancer underwent radical radiotherapy. Two hundred patients were treated with IMRT (78 Gy in 39 fractions) to the prostate and base of seminal vesicles using an adaptive protocol combining cone-beam computed tomography (CBCT) and kilovoltage image matching with individualized safety margin calculation. Sixty patients underwent treatment with the same prescribed dose using RapidArc with a reduced safety margin of 6 mm and daily online matching using CBCT. Late toxicity was scored prospectively according to the RTOG/FC-LENT scale. **Results:** Eighteen patients (6.9%) experienced acute grade 2 gastrointestinal toxicity. There was no acute grade 3 or 4 gastrointestinal toxicity. Thirty-nine patients (15%) experienced acute grade 2 genitourinary toxicity and 6 patients (2.3%) had grade 3 genitourinary toxicity. Genitourinary toxicity grade 4 was observed in 5 (1.9%) patients, due to installation of a urinary catheter. At a median follow up of 84.2 months, the estimated 7-year cumulative incidences of grade ≥ 2 gastrointestinal and genitourinary toxicity were 4.4 and 7.1% respectively. The estimated 7-year prostate specific antigen relapse free survival was 97.1% for low-risk disease, 83.6% for intermediate-risk disease and 75% for high-risk patients. **Conclusion:** The use of IMRT in combination with IGRT results in a low rate of late toxicity.

Key words

image guided radiotherapy – prostate cancer – toxicity

Úvod

Karcinom prostaty je ve vyspělých zemích nejčastěji se vyskytujícím nádorovým onemocněním u mužů. Retrospektivní klinická data i prospektivní randomizované studie prokázaly závislost karcinomu prostaty na dávce radiotherapie [1–7]. Ve všech randomizovaných studiích byl jednoznačně prokázán vliv dávky na biochemickou kontrolu. V aktuálně publikované studii M. D. Anderson s dobou sledování 14,3 roku se benefit v biochemické i klinické kontrole transformoval rovněž do sníženého úmrtí na karcinom prostaty [8].

Eskalace dávky s sebou mimo lepší výsledky bohužel přináší i vyšší morbiditu, zejména pozdní gastrointestinální postradiační toxicitu. Použití radioterapie s modulovanou intenzitou (intensity modulated radiation therapy – IMRT) je jednou z možností, jak nežádoucí účinky redukovat [9–14]. IMRT umožňuje lepší rozložení dávky v prostoru s minimalizováním ozářeného objemu okolních zdravých tkání díky lepšímu tvarování svazku záření, významnějším poklesu dávky na okrajích cílového objemu a modulaci průtoku záření napříč svazkem. Další možností v rámci zevní radioterapie je implementace obrazem řízené radioterapie (image guided radiotherapy – IGRT). Tato technologie umožňuje redukovat bezpečnostní lemy nezbytné pro správnou aplikaci předepsané dávky do cílového objemu, a tím dále snižovat dávku na rizikové orgány v okolí.

Pacienti a metody

Od září 2008 do února 2012 bylo v Komplexním onkologickém centru Pardubického kraje léčeno pomocí obrazem řízené IMRT svazku 260 pacientů s verifikovaným karcinomem prostaty. Všichni pacienti podepsali před léčbou informovaný souhlas. Vyšetření před zahájením léčby obligátně zahrnovalo fyzikální vyšetření vč. palpáce prostaty, odběr prostatického specifického antigenu, histologické vyšetření vč. Gleason skóre, výpočetní tomografii (computed tomography – CT) malé pánve, techneciový scan skeletu (99-mTc) a transrektální ultrazvukové vyšetření. Na základě těchto vyšetření byli dle National Comprehensive Cancer Network guidelines pacienti rozděleni podle míry rizika relapsu do tří skupin – nízké, střední a vysoké riziko. Hormonální léčba byla prováděna u všech pacientů s vysokým rizikem a zvažována u pacientů se středním rizikem. Pacienti ve vysokém riziku byli léčeni formou neoadjuvantní hormonální blokady (LHRH analog + antiandrogen 4–6 měsíců před a v průběhu ozáření), pacienti s vysokým Gleason skóre (8–10) byli léčeni následně i dlouhodobou ablací androgenů. Muži s karcinomem prostaty se středním rizikem relapsu byli v případě indikace hormonální léčby léčeni pouze neoadjuvantní a konkomitantní formou.

Pacienti byli léčeni v supinační poloze, horní končetiny zkřížené na prsou. Dolní končetiny byly imobilizovány pomocí vakuové podložky (Vac-Lock, MED-TEC).

Před zahájením léčby byli pacienti poučeni o potřebě komfortně naplněného močového měchýře před provedením plánovacího CT i před jednotlivými frakcemi ozáření. Pro kalkulaci léčebného plánu byl použit inverzní plánovací systém (Eclipse 7.3, Varian). Plánovací CT řezy byly prováděny u všech pacientů po 3 mm.

Použity byly dvě techniky. U prvních 200 pacientů IMRT dávkou 78 Gy v 39 frakcích (IMRT 78), u 60 nemocných technika RapidArc pomocí 2–3 kyvů (Arc 78) identickou dávkou. U techniky IMRT 78 byl použit adaptivní protokol, který byl prezentován dříve [15]. Ve stručnosti při konturaci zahrnoval klinický cílový objem (clinical target volume – CTV) – prostatu a bázi semenných včků / celé semenné včky při jejich postižení. Lem mezi CTV a plánovacím cílovým objemem (planning target volume – PTV) byl v první fázi terapie 8 mm, 6 mm a 6 mm v anteroposteriorní, kraniokaudální a laterolaterální ose. Rektum bylo konturováno v úrovni PTV + 10 mm kranialně i kaudálně, močový měchýř byl konturován celý. Používali jsme techniku pěti koplanárních polí (45°, 105°, 180°, 255°, 315°). Při kalkulaci a optimalizaci ozařovacího plánu jsme respektovali řadu dávkově-objemových parametrů pro PTV a rizikové orgány. Mezi parametry s nejvyšší prioritou patřily následující limity: PTV – min. 95–98 % objemu obdrží min. 95 % předepsané dávky; rektum – max. 3–5 % objemu obdrží dávku 75 Gy, 15–20 % objemu dávku 70 Gy, 50 % objemu dávku

Tab. 1A. RTOG/FC-LENT skórovací systém pro pozdní genitourinární toxicitu.

Stupeň	Symptomy
1	nykturie (2× častější než před zahájením radioterapie), dysurie nevyžadující medikaci, dribbling, hematurie méně než 1× týdně
2	nykturie více než 2× častější (než před zahájením radioterapie), hematurie alespoň 2× týdně či vyžadující 1–2 koagulace, užití inkontinentních vložek, analgetika pro bolest
3	nykturie více než 1× za hod, hematurie vyžadující transfuzi či více než 2 koagulace, striktura uretry vyžadující dilataci, trvalé používání inkontinentních vložek, užití opiátů pro bolest
4	závažná hemoragická cystitida, nekróza či ulcerace močového měchýře, striktura měchýře vyžadující diverzi či cystektomii

Tab. 1B. RTOG/FC-LENT skórovací systém pro pozdní gastrointestinální toxicitu.

Stupeň	Symptomy
1	průjem, zvýšená četnost stolice, tenesmy nevyžadující medikaci, rektální krvácení méně než 1× týdně
2	průjem vyžadující medikaci, rektální krvácení min. 2× týdně, rektální krvácení vyžadující 1–2 koagulace, intermitentní užití inkontinentních vložek, bolesti vyžadující analgetika
3	průjem vyžadující medikaci více než 2× denně, rektální krvácení vyžadující transfuzi či více než 2 koagulace, trvalé používání inkontinentních vložek, pravidelné užívání opiátů pro bolesti
4	dysfunkce vyžadující chirurgickou intervenci (nekróza, perforace, obstrukce)

Tab. 2. Charakteristika pacientů.

Počet pacientů	260
Věk	69,6 roku (53–83)
Riziková skupina	
nízké riziko	37 (14,2 %)
střední riziko	75 (28,8 %)
vysoké riziko	148 (57 %)
PSA	9,8 ng/ml (0,6–102)
Hormonální léčba	
neoadjuvantní	114 (43,8 %)
adjuvantní	65 (25 %)
žádná	81 (31,2 %)
Dávka	78 Gy
IGRT	
adaptivní protokol	200
online korekce	60
Předchozí operace	
TURP	34 (12,6 %)
TVPE	7 (2,6 %)
Sledování	84,2 měsíce (6–121,2)

PSA – prostatický specifický antigen, IGRT – radioterapie s modulovanou intenzitou svazku, TURP – transuretrální resekce prostaty, TVPE – transvesikální prostatektomie

50 Gy; močový měchýř – dávku 75 Gy obdrží max. 5–10 cm³, 70 Gy méně než 20 cm³, a 50 Gy max. 25–35 cm³. Po 2 týdnech léčby s on-line nastavením pomocí trojrozměrného zobrazení konickým svazkem (cone-beam computed tomography – CBCT) a monitorováním polohy prostaty vůči skeletu jsme vyhodnotili prvních 10 frakcí, stanovili průměrnou pozici izocentra vůči skeletu pánve (systematická chyba Σ) a distribuci měření kolem průměrné pozice (náhodná chyba σ). Úpravu ozařovacího plánu pro druhou fázi radioterapie jsme provedli jednak posunem izocentra do jeho průměrné pozice, jednak volbou lemu CTV-PTV podle velikosti náhodné chyby [16–18]. Verifikace nastavení byla ve druhé fázi léčby prováděna denně kV-kV metodou registrace skeletu pánve, 1× týdně bylo zhotoveno kontrolní CBCT.

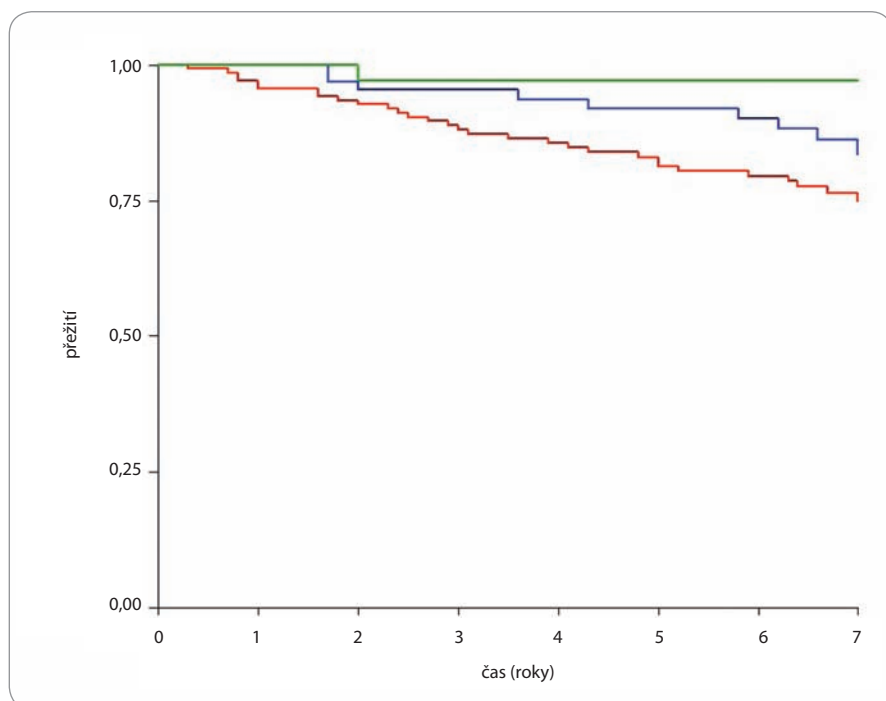
U zbývajících 60 pacientů léčených technikou RapidArc byl lem mezi CTV a PTV konstantně izocentrický 6 mm. Konturace rizikových orgánů a cílových objemů, předepsaná dávka i parametry dávkově objemového histogramu byly použity identické jako u techniky IMRT 78. Korekce polohy pacienta, resp. pozice prostaty, byla u pacientů léčených touto technikou prováděna pomocí CBCT online po celou dobu radioterapie.

Pacienti byli sledováni v průběhu radioterapie i následně po jejím ukončení. V průběhu ozařování byli vyšetřeni min. 1× týdně a vždy rovněž současně s poslední ozařovací frakcí. První kontrola po ozaření byla za měsíc po ukončení léčby, druhá za 3 měsíce po dokončení radioterapie a další vždy v odstupu 3 měsíců po dobu prvních 2 let. Následující 3 roky se interval prodloužil na 6 měsíců a po 5 le-

tech od ukončení radioterapie byli pacienti dispenzarizováni vždy 1× ročně. Vyšetření sestávalo z anamnézy, fyzikálního vyšetření a odběru prostatického specifického antigenu. Při každé kontrole byla důsledně vyšetřována tolerance léčby se zaměřením na symptomy pozdní gastrointestinální a genitourinární toxicity. Pro její hodnocení byla použita Fox Chase (FC) modification of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and Late Effects Normal Tissue Task Force (LENT) toxicity criteria (tab. 1A, B). Pro odhad toxicity a onkologických výsledků v čase byla použita Kaplanova-Meierova metoda.

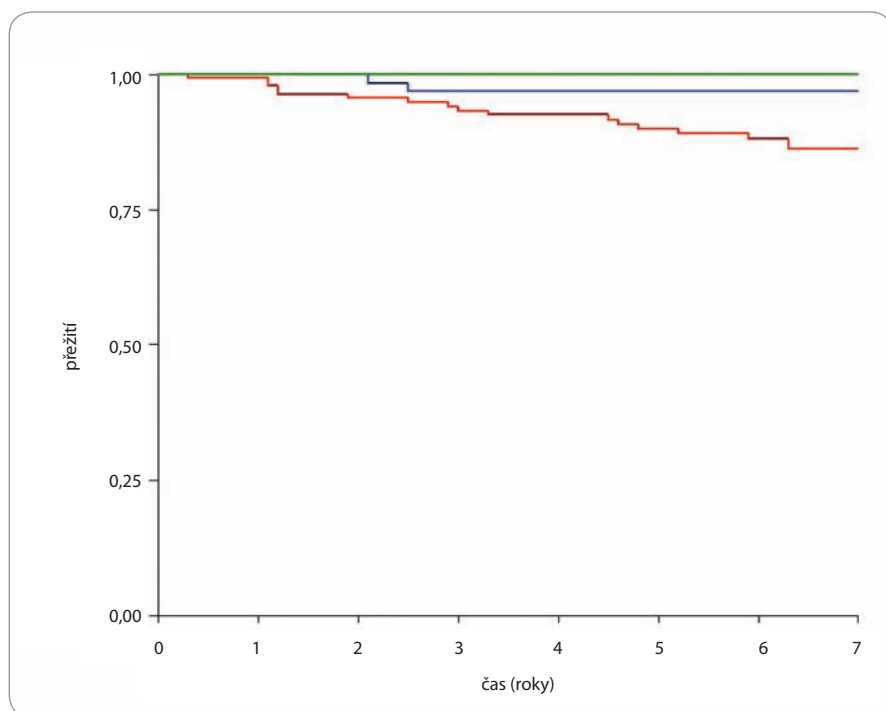
Výsledek

Detailní analýza struktury pacientů týkající se věku, rizikové skupiny, urologické intervence v anamnéze, použité



Graf 1. Přežití bez relapsu prostatického specifického antigenu.

nízké riziko – zelená, střední riziko – modrá, vysoké riziko – červená



Graf 2. Přežití bez vzdálených metastáz.

nízké riziko – zelená, střední riziko – modrá, vysoké riziko – červená

techniky a délky sledování je popsána v tab. 2.

Akutní gastrointestinální toxicita 1. a 2. stupně byla zaznamenána u 9,6 a 6,9 %

mužů, přičemž zcela bez symptomů bylo 83,5 % pacientů. Symptomy akutní toxicity obvykle v průběhu času spontánně odezněly. Jejich přítomnost po

dobu více než 4 týdnů byla přítomna pouze u méně než poloviny nemocných (41,9 %).

Akutní genitourinární toxicita 1., 2., 3. a 4. stupně byla přítomna u 22,3, 15, 2,3 a 1,9 % mužů. Zcela bez příznaků léčby bylo 58,5 % nemocných. Všechny případy toxicity 4. stupně byly způsobeny nutností zavedení permanentního močového katetru. Ve všech případech se jednalo o toxicitu přechodnou – po ukončení radioterapie byl katetr odstraněn bez nutnosti opětovného zacévkování. Symptomy akutní genitourinární toxicity odezněly po 4 týdnech u poloviny mužů a po 12 týdnech u 82,4 % pacientů.

Riziko pozdní gastrointestinální toxicity 2. a vyššího stupně v 7 letech bylo zaznamenáno u 4,4 % nemocných, riziko pozdní gastrointestinální toxicity 3. stupně v 7 letech bylo 0,4 %. Pozdní gastrointestinální toxicita 3. stupně byla zjištěna u jediného nemocného a byla způsobena krvácením sliznice rektu vyžadujícím vícečetné koagulace. Medián doby výskytu gastrointestinální toxicity 2.–3. stupně byl 19 měsíců. Symptomy nebyly trvalé, pouze u jediného pacienta po prodělané argonové plazma-koagulaci bylo přítomno krvácení alespoň 1× týdně i při poslední vizitě.

Riziko pozdní genitourinární toxicity 2. a vyššího stupně v 7 letech bylo zaznamenáno u 7,1 % mužů, riziko pozdní genitourinární toxicity 3. stupně v 7 letech bylo 2,4 %. Medián doby výskytu chronické genitourinární toxicity 2.–3. stupně byl 48,8 měsíce. Genitourinární toxicita 3. stupně byla v 75 % případů způsobena strikturou uretry vyžadující dilataci a v 25 % inkontinencí s nutností trvalého používání vložek. Medián doby výskytu striktury uretry byl 27 měsíců, medián doby výskytu inkontinence byl 60 měsíců. Výskyt symptomů toxicity 3. stupně nebyl trvalý, pouze u 50 % pacientů byly přítomny symptomy genitourinární toxicity i u poslední vizity (graf 1, 2).

Při mediánu sledování 84,2 měsíce bylo přežití v 7 letech bez biochemického relapsu pro muže s nízkým, středním a vysokým rizikem 97,1, 83,6 a 75 %. Pravděpodobnost přežití bez metastáz pro jednotlivé skupiny v 7 letech byla 100, 96,8 a 86,2 % (graf 3, 4).

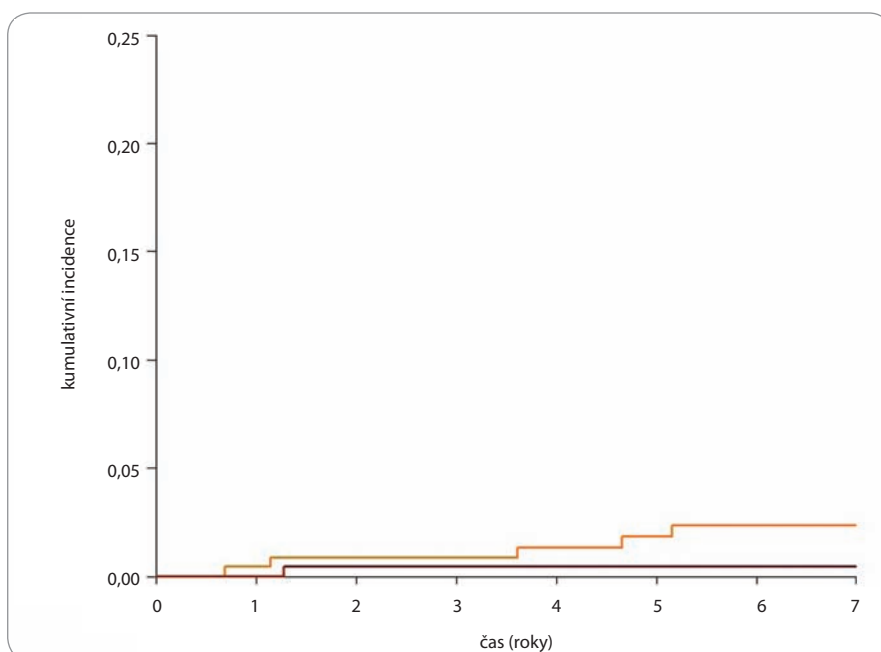
Diskuze

Prospektivní randomizované studie zabývající se eskalací dávky potvrdily nejen lepší onkologické výsledky, ale bohužel rovněž i vyšší toxicitu léčby. Jednou z možností redukce nežádoucích účinků radioterapie je i implementace obrazem řízené radioterapie, která svou účinnost prokázala v retrospektivních i prospektivních randomizovaných studiích [19–21].

Objektivní hodnocení chronické toxicity obzvláště vzhledem k ovlivnění kvality života z pohledu pacienta je ovšem obtížné. Mezi běžně používanými škálami pro hodnocení toxicity existují výrazné rozdíly [22,23]. Dle názoru pacientů i dle literatury dochází k dominantnímu ovlivnění kvality života zejména při postradiačním krvácení vyžadujícím opakované koagulace. Někteří pacienti dokonce upřednostňují méně agresivní a toxické formy léčby přes poučení o možném inferiorním onkologickém výsledku [23–25]. Pro hodnocení našich pacientů proto dlouhodobě používáme kritéria toxicity RTOG/FC-LENT. Tato škála umožňuje velice detailně hodnotit a kvantifikovat stupeň postradiační proktitidy (obzvláště enteroragie), hematurie a inkontinence. Pokud bychom použili místo kritérií RTOG/FC-LENT aktuální CTCAE 5.0, byla by pro zajímavost míra chronické genitourinární toxicity 2. a vyššího stupně nikoli 7,1 %, nýbrž 6,6 %. A v případě aplikace kritérií RTOG dokonce pouze 3,2 %.

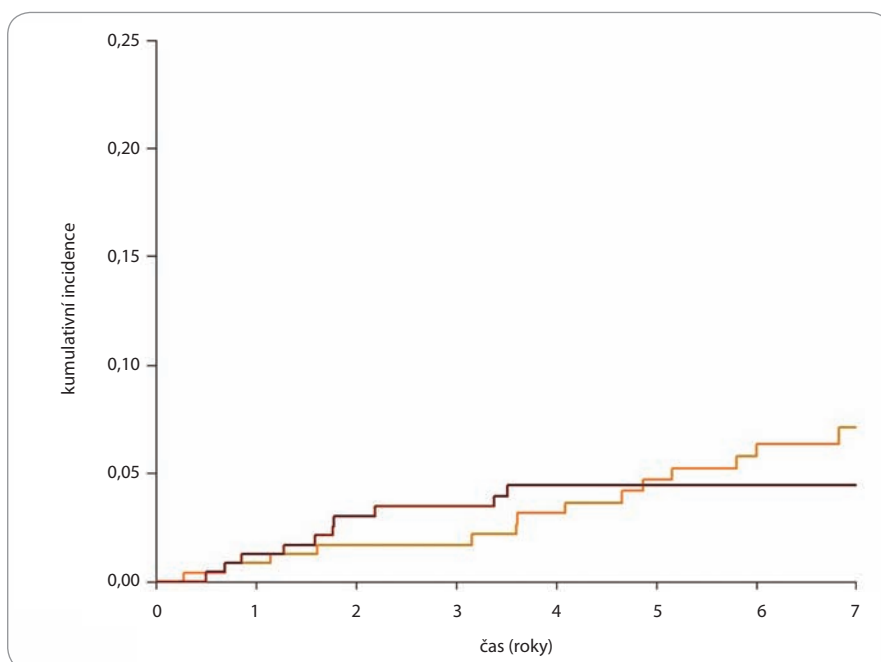
Přes zvolenou hodnotící škálu, pečlivé sledování a prospektivní charakter studie bylo u pacientů dosaženo pomocí IGRT velice nízké gastrointestinální i genitourinární toxicity. Při srovnání s pacienty léčenými v minulosti na našem pracovišti pomocí IMRT s lemem 10 mm byl v případě chronické gastrointestinální toxicity 2. a vyššího stupně zaznamenán dokonce pokles až na pětinovou hodnotu (22,4 vs. 4,4 %) [26,27]. Pozorovaná míra nežádoucích účinků léčby je rovněž srovnatelná s publikovanými výsledky normofrakcionované fotonové i protonové radioterapie v zahraničí [28,29].

Významným faktorem ovlivňujícím míru chronické toxicity je také čas. Naprostá většina symptomů pozdní post-



Graf 3. Kumulativní incidence chronické genitourinární (GU) a chronické gastrointestinální (GI) toxicity 3. a vyššího stupně.

GU – oranžová, GI – hnědá



Graf 4. Kumulativní incidence chronické genitourinární (GU) a chronické gastrointestinální (GI) toxicity 2. a vyššího stupně.

GU – oranžová, GI – hnědá

radiační gastrointestinální toxicity je pozorována v prvních 3 letech po ukončení radioterapie. Data z Fox Chase Cancer Center potvrzují naše pozorování, že medián doby do výskytu rektální toxicity je 18 měsíců [30,31]. Jistě je tedy možno

tvrdit, že doba sledování při mediánu sledování přes 7 let je dostatečná k vytvoření závěru, že sledovaná chronická gastrointestinální toxicita je validní a objektivní. S postupem času již nelze předpokládat signifikantní změny hodnot

gastrointestinální toxicity. V případě hodnot pozdní genitourinární toxicity je možno očekávat postupný pozvolný růst hodnot. Tento postupný nárůst je potvrzen mnoha studii s dlouhou dobou sledování [32,33].

Závěr

Použití obrazem řízené radioterapie umožňuje díky redukci bezpečnostního lemu dosáhnout nižší toxicity bez nežádoucího vlivu na onkologické výsledky.

Literatura

- Hanks GE, Hanlon AL, Epstein B et al. Dose response in prostate cancer with 8–12 years follow-up. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54(2): 427–435.
- Levegrün S, Jackson A, Zelefsky MJ et al. Risk group dependence of dose-response for biopsy outcome after three-dimensional conformal radiation therapy of prostate cancer. *Radiother Oncol* 2002; 63(1): 11–26. doi: 10.1016/s0167-8140(02)00062-2.
- Zelefsky MJ, Leibel SA, Gaudin PB et al. Dose escalation with three-dimensional conformal radiation therapy affects the outcome in prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41(3): 491–500. doi: 10.1016/s0360-3016(98)00091-1.
- Al-Mamgani A, van Putten WL, Heemsbergen WD et al. Update of the Dutch multicenter dose escalation trial of radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72(4): 980–988. doi: 10.1016/j.ijrobp.2008.02.073.
- Dearnaley DP, Jovic G, Syndikus I et al. Escalated-dose versus control-dose conformal radiotherapy for prostate cancer: long-term results from the MRC RT01 randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(4): 464–473. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70040-3.
- Kuban DA, Tucker SL, Dong L et al. Long-term results of the M. D. Anderson randomized dose-escalation trial for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 70(1): 67–74. doi: 10.1016/j.ijrobp.2007.06.054.
- Zietman AL, Bae K, Slater JD et al. Randomized trial comparing conventional-dose with high-dose conformal radiation therapy in early-stage adenocarcinoma of the prostate: long-term results from proton radiation oncology group/american college of radiology 95-09. *J Clin Oncol* 2010; 28(7): 1106–1111. doi: 10.1200/JCO.2009.25.8475.
- Pasalic D, Kuban DA, Allen PK et al. Dose escalation for prostate adenocarcinoma: a long-term update on the outcomes of a phase 3, single institution randomized clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2019; 104(4): 790–797. doi: 10.1016/j.ijrobp.2019.02.045.
- Zelefsky MJ, Fuks Z, Happersett L et al. Clinical experience with intensity modulated radiation therapy (IMRT) in prostate cancer. *Radiother Oncol* 2000; 55(3): 241–249. doi: 10.1016/s0167-8140(99)00100-0.
- Zelefsky MJ, Fuks Z, Hunt M et al. High-dose intensity modulated radiation therapy for prostate cancer: early toxicity and biochemical outcome in 772 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 53(5): 1111–1116. doi: 10.1016/s0360-3016(02)02857-2.
- Odrážka K, Zouhar M, Petera J et al. Comparison of rectal dose-volume constraints for IMRT prostate treatment planning. *Phys Med* 2005; 21(4): 129–135. doi: 10.1016/S1120-1797(05)80001-8.
- Cahlon O, Hunt M, Zelefsky MJ. Intensity-modulated radiation therapy: supportive data for prostate cancer. *Semin Radiat Oncol* 2008; 18(1): 48–57. doi: 10.1016/j.semradonc.2007.09.007.
- Dolezel M, Odrážka K, Vaculikova M et al. Dose escalation in prostate radiotherapy up to 82 Gy using simultaneous integrated boost: direct comparison of acute and late toxicity with 3D-CRT 74 Gy and IMRT 78 Gy. *Strahlenther Onkol* 2010; 186(4): 197–202. doi: 10.1007/s00066-010-2065-x.
- Dolezel M, Odrážka K, Zouhar M et al. Comparing morbidity and cancer control after 3D-conformal (70/74 Gy) and intensity modulated radiotherapy (78/82 Gy) for prostate cancer. *Strahlenther Onkol* 2015; 191(4): 338–346. doi: 10.1007/s00066-014-0806-y.
- Vañásek J, Odrážka K, Doležel M et al. Adaptivní IG-IMRT karcinomu prostaty. *Klin Onkol* 2011; 24(5): 361–366. doi: 10.14735/amko2011361.
- van Herk M, Remeijer P, Rasch C et al. The probability of correct target dosage: dose-population histograms for deriving treatment margins in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 47(4): 1121–1135. doi: 10.1016/s0360-3016(00)00518-6.
- Vanasek J, Odrážka K, Dolezel M et al. Searching for an appropriate image-guided radiotherapy method in prostate cancer-implications for safety margin. *Tumori* 2014; 100(5): 518–523. doi: 10.1700/1660.18168.
- Dolezel M, Slezak P, Odrážka K et al. Interfraction variation in prostate cancer – analysis of 11726 cone-beam CT. *J BUON* 2015; 20(4): 1081–1087.
- Kupelian PA, Langen KM, Willoughby TR et al. Image-guided radiotherapy for localized prostate cancer: treating a moving target. *Semin Radiat Oncol* 2008; 18(1): 58–66. doi: 10.1016/j.semradonc.2007.09.008.
- Zelefsky MJ, Kollmeier M, Cox B et al. Improved clinical outcomes with high-dose image guided radiotherapy compared with non-IGRT for the treatment of clinically localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012; 84(1): 125–129. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.11.047.
- de Crevoisier R, Bayar MA, Pommier P et al. Daily versus weekly prostate cancer image guided radiation therapy: phase 3 multicenter. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2018; 102(5): 1420–1429. doi: 10.1016/j.ijrobp.2018.07.2006.
- Šefrová J, Paluska P, Odrážka K et al. Chronic gastrointestinal toxicity after external-beam radiation therapy for prostate cancer. *Klin Onkol* 2009; 22(5): 233–241.
- Hanlon AL, Schultheiss TE, Hunt MA et al. Chronic rectal bleeding after high-dose conformal treatment of prostate cancer warrants modification of existing morbidity scales. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 38(1): 59–63. doi: 10.1016/s0360-3016(97)00234-4.
- Stalmeier PF, van Tol-Geerdink JJ, van Lin EN et al. Doctors' and patients' preferences for participation and treatment in curative prostate cancer radiotherapy. *J Clin Oncol* 2007; 25(21): 3096–3100. doi: 10.1200/JCO.2006.07.4955.
- van Tol-Geerdink JJ, Stalmeier PF, van Lin EN et al. Do patients with localized prostate cancer treatment really want more aggressive treatment? *J Clin Oncol* 2006; 24(28): 4581–4586. doi: 10.1200/JCO.2006.05.9592.
- Dolezel M, Odrážka K, Vanasek J et al. Five-year results of IMRT for prostate cancer – toxicity. *Klin Onkol* 2013; 26(6): 409–414. doi: 10.14735/amko2013409.
- Odrážka K, Dolezel M, Vanasek J et al. Five-year results of IMRT for prostate cancer – tumor control. *Klin Onkol* 2013; 26(6): 415–420. doi: 10.14735/amko2013415.
- Crehange G, Mirjoleit C, Gauthier M et al. Clinical impact of margin reduction on late toxicity and short-term biochemical control for patients treated with daily on-line image guided IMRT for prostate cancer. *Radiother Oncol* 2012; 103(2): 244–246. doi: 10.1016/j.radonc.2011.10.025.
- Bryant C, Smith TL, Henderson RH et al. Five-year biochemical results, toxicity, and patient-reported quality of life after delivery of dose-escalated image guided proton therapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2016; 95(1): 422–434. doi: 10.1016/j.ijrobp.2016.02.038.
- Odrážka K, Dolezel M, Vanasek J et al. Time course of late rectal toxicity after radiation therapy for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010; 13(2): 138–143. doi: 10.1038/pcan.2009.56.
- Teshima T, Hanks GE, Hanlon AL et al. Rectal bleeding after conformal 3D treatment of prostate cancer: time to occurrence, response to treatment and duration of morbidity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39(1): 77–83. doi: 10.1016/s0360-3016(97)00301-5.
- Odrážka K, Dolezel M, Vanasek J et al. Late toxicity after conformal and intensity-modulated radiation therapy for prostate cancer: impact of previous surgery for benign prostatic hyperplasia. *Int J Urol* 2010; 17(9): 784–790. doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02592.x.
- Marks LB, Carroll PR, Dugan TC et al. The response of the urinary bladder, urethra, and ureter to radiation and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31(5): 1257–1280. doi: 10.1016/0360-3016(94)00431-J.

Expresia ligandu receptora programovanej bunkovej smrti 1 v biopsii nemalobunkového karcinómu pľúc a jej asociácia s tumor infiltrujúcimi lymfocytmi a stupňom dezmozplázie

Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non-Small Cell Lung Carcinoma Biopsies and Its Association with Tumor Infiltrating Lymphocytes and the Degree of Desmoplasia

Tancoš V.¹, Grendár M.², Farkašová A.³, Huťka Z.¹, Kviatková Z.¹, Plank L.^{1,3}

¹ Ústav patologickej anatómie JLF UK a UN Martin, Slovenská republika

² Ústav bioinformatiky, Martinské centrum pre biomedicínu, JLF v Martine, UK v Bratislave, Slovenská republika

³ Martinské biooptické centrum, s.r.o., Martin, Slovenská republika

Súhrn

Východiská: Imunoterapia blokujúca signálnu dráhu PD-1/PD-L1 sa za posledné roky stala dominantnou liečebnou modalitou pacientov s nemalobunkovým karcinómom pľúc (non-small cell lung carcinoma – NSCLC). Imunohistochemicky dôkaz expresie ligandu receptora programovanej bunkovej smrti-1 (programmed death-ligand 1 – PD-L1) na membráne nádorových buniek a/alebo tumor infiltrujúcich lymfocytov (TIL) je stále jediným klinicky validovaným prediktívnym biomarkerom pre indikáciu imunoterapie, ale má svoje limity. Prítomnosť TIL v nádorovom mikroprostredí bola recentne identifikovaná ako komplementárny prediktívny faktor tejto terapie. V tejto retrospektívnej štúdii sme v súbore 134 chirurgických resektátov NSCLC analyzovali asociáciu medzi expresiou PD-L1, prítomnosťou TIL a stupňom dezmozplázie nádoru. **Materiál a metódy:** Expresia PD-L1 na membráne nádorových buniek a v TIL bola dokazovaná imunohistochemicky anti-PD-L1 protilátkou (klon 22C3) a prítomnosť TIL použitím protilátky anti-CD3 (polyklon). Expresia PD-L1 bola hodnotená systémom „nádorového proporčného skóre“ (tumour proportion score – TPS), pričom boli vymedzené kategórie TPS < 1 %, TPS 1–49 % a TPS ≥ 50 %. Semikvantitatívne hodnotenie prítomnosti TIL bolo vykonané metódou „percenta stromálnych TIL“ (PST) a rozlišované boli kategórie PST < 10 %, PST 10–49 % a PST ≥ 50 %. Analyzovaná bola asociácia medzi hodnotou expresie PD-L1 v nádorových bunkách a TIL ku hodnote PST. Štatistická analýza bola vykonaná Cochranovým-Armitageovým testom, pričom hodnota p < 0,05 bola pokladaná za signifikantnú. **Výsledky:** Expresia PD-L1 v nádorových bunkách bola signifikantne vyššia v kategóriách PST 10–49 % a PST ≥ 50 % v porovnaní s kategóriou PST < 10 % v grade 1 a grade 2 adenokarcinómoch (p = 0,008), v grade 3 adenokarcinómoch (p = 0,009) aj v skvamocelulárnych karcinómoch (p = 0,028). Expresia PD-L1 v TIL bola asociovaná s hodnotou PST v skvamocelulárnych karcinómoch (p = 0,025), ale nie v prípade adenokarcinómov. Nádory s vysokým stupňom dezmozplázie vykazovali obzvlášť nízku hodnotu TPS aj PST. **Záver:** Expresia PD-L1 v NSCLC je asociovaná s prítomnosťou TIL. Dezmozplastické oblasti nádoru predstavujú imunologicky neaktívne nádorové mikroprostredie. Podávanie anti PD-1/P-L1 imunoterapie s látkami blokujúcimi signálnu dráhu TGF-β predstavuje perspektívnu kombinovanú terapiu pre pacientov s NSCLC s dezmozpláziou.

Kľúčové slová

ligand receptora programovanej bunkovej smrti-1 – nemalobunkový karcinóm pľúc – tumor infiltrujúce lymfocyty – prediktívny faktor

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. MUDr. Lukáš Plank, CSc.

Ústav patologickej anatómie

JLF UK a UN Martin

Kollárova 2

036 01 Martin, Slovenská republika

e-mail: lukas.plank@uniba.sk

Obdržané/Submitted: 25. 11. 2019

Prijaté/Accepted: 8. 12. 2019

doi: 10.14735/amko202055

Summary

Background: Immunotherapy blocking the PD-1/PD-L1 signalling pathway has become a dominant treatment modality for patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC). Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression on the membrane of tumour cells and/or tumour infiltrating lymphocytes (TIL) evaluated immunohistochemically is still the only clinically validated predictive biomarker for immunotherapy, but it has its limitations. TIL in the tumour microenvironment was identified as having predictive value. We retrospectively evaluated 134 NSCLC resection specimens, and analysed the association between PD-L1 expression, the presence of TIL, and the degree of desmoplasia in tumours. **Material and methods:** PD-L1 expression on tumour cells and TIL were evaluated immunohistochemically using the anti-PD-L1 antibody (clone 22C3) and the anti-CD3 antibody (polyclone), respectively. PD-L1 was scored using the "tumour proportion score" (TPS) system with three categories: TPS < 1%, 1–49%, and ≥ 50%. TIL were evaluated semiquantitatively using the "percentage of stromal TIL" (PST) system, and categories of PST < 10%, 10–49% and ≥ 50% were recorded. The association between PD-L1 expression in tumour cells and TIL was compared with the PST value. Statistical analysis was conducted using the Cochran-Armitage test, and a p-value < 5% was considered significant. **Results:** PD-L1 expression was significantly higher in PST 10–49% and ≥ 50% categories than in the PST < 10% category in grade 1 and grade 2 adenocarcinomas (p = 0.008), grade 3 adenocarcinomas (p = 0.009), and squamous cell carcinomas (p = 0.028). PD-L1 expression in TIL was associated with the PST value in squamous cell carcinomas (p = 0.025) but not in adenocarcinomas. Desmoplastic tumours had particularly low TPS and PST values. **Conclusion:** PD-L1 expression in NSCLC is associated with the presence of TIL. Desmoplastic areas in tumours represent immunologically inactive tumour microenvironments. Administration of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy, together with agents blocking the TGF-β signalling pathway, represent a promising combinational therapy for patients with desmoplastic NSCLC.

Key words

programmed death-ligand 1 – non-small cell lung carcinoma – tumour infiltrating lymphocytes – predictive biomarker

Východiská

Plúcny karcinóm patrí celosvetovo medzi najčastejšie príčiny úmrtia na nádorové ochorenie, pričom viac ako 85 % prípadov tvoria nemalobunkové karcinómy pľúc (non-small cell lung carcinoma – NSCLC). Ide o heterogénnu skupinu nádorov s početnými histologickými typmi s odlišnými molekulárnymi charakteristikami a biologickým správaním [1].

Imunoterapia sa za posledné roky stala dominantnou liečebnou modalitou pacientov s rôznymi typmi malignít, vrátane NSCLC [2]. Inhibítory imunitných kontrolných bodov, ktoré blokovaním inhibičnej signálnej dráhy PD-1/PD-L1 (programmed death-1 / programmed death-ligand 1) vedú k reaktivácii potlačeného imunitného systému, výrazne zlepšili prognózu pacientov s lokálne pokročilým a metastazujúcim NSCLC [3,4]. V súčasnosti sú pre klinické použitie v európskych krajinách schválené anti-PD-1 protilátky nivolumab a pembrolizumab a anti-PD-L1 protilátky atezolizumab, avelumab a durvalumab [5,6].

Imunohistochemický dôkaz expresie proteínu PD-L1 na membráne nádorových buniek a/alebo imunitných buniek je stále jediným klinicky validovaným prediktívnym biomarkerom pre indikáciu tejto terapie [7]. Nejde pritom o dokonalý prediktívny faktor, pretože jeho negatívny výsledok nevy-

lučuje možnosť účinnosti inhibítorov imunitných kontrolných bodov. A naopak, bolo zistené, že viac ako polovica pacientov nereaguje priaznivo na túto liečbu napriek vysokej hodnote expresie PD-L1 [8]. Preto je potrebné nájsť nové, komplementárne prediktívne faktory, ktoré by pomohli identifikovať populáciu pacientov, ktorí s najvyššou pravdepodobnosťou budú priaznivo klinicky odpovedať na podávanie tejto terapie.

V posledných rokoch sa ukazuje, že expresia PD-L1 je pravdepodobne len jedným z mnohých determinantov, ktoré predpovedajú účinnosť inhibítorov imunitných kontrolných bodov. Pozornosť sa okrem iného upriamila na charakteristiky nádorového mikroprostredia, predovšetkým na prítomnosť imunitných buniek v nádorovej stróme, ktorá svedčí pre prítomnú protinádorovú imunitnú odozvu a na úlohu „s nádorom asociovaných fibroblastov“, ktoré prispievajú ku imunitnej dysregulácii. Viaceré štúdie poukazujú na to, že tzv. tumor infiltrujúce lymfocyty (TIL) prítomné v nádorovej stróme sú asociované s klinickou účinnosťou inhibítorov imunitných kontrolných bodov [9–11].

Mnoho aspektov nádorového mikroprostredia nie je dodnes plne objasnených. Cieľom našej štúdie bolo analyzovať možnú asociáciu medzi expresiou PD-L1 v tkanive rôznych typov NSCLC s charakteristikami nádorového mikro-

prostredia, ako je prítomnosť lymfocytov v nádorovej stróme a stupeň desmoplázie. Tieto výsledky by mohli mať potenciálne uplatnenie v klinickej terapeutickej praxi.

Materiál a metódy

Charakteristika vyšetřovaného súboru

Súbor zahŕňoval 134 chirurgických resekátov pľúcnych karcinómov, ktoré boli retrospektívne analyzované za účelom stanovenia expresie PD-L1 a prítomnosti TIL. Štúdia bola schválená etickou komisiou Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Martine (EK 136/2018).

Jednotlivé typy a podtypy NSCLC boli kategorizované v súlade s WHO (World Health Organization) klasifikáciou pľúcnych nádorov z roku 2015 [1]. Dva základné typy NSCLC predstavovali adenokarcinómy a skvamocelulárne karcinómy. V prípade adenokarcinómov sa na základe predominantného rastového vzoru rozlišovalo päť podtypov: predominantne lepidické adenokarcinómy, ktoré predstavujú dobre diferencované (grade 1) nádory, predominantne acinárne a predominantne papilárne adenokarcinómy, ktoré predstavujú menej diferencované (grade 2) formy, a predominantne solídne a predominantne mikropapilárne adenokarcinómy, ktoré predstavujú nízko diferencované (grade 3) podtypy.

V súbore boli vyčlenené tri základné skupiny NSCLC, ktoré boli analyzované separátne: skupina grade 1 a grade 2 adenokarcinómov, skupina grade 3 adenokarcinómov a skupina skvamocelulárnych karcinómov. Oblasti karcinómov z troch základných skupín, ktoré sa vyznačovali vysokým stupňom dezmozplázie, boli hodnotené ešte osobitne, pričom dezmozplázia bola definovaná ako pomer nádorovej strómy ku štruktúram tvoreným nádorovými bunkami väčší ako jedna.

Imunohistochemické vyšetrenia

Na imunohistochemickú analýzu expresie proteínu PD-L1 boli použité parafínové rezy bioptického materiálu a na revitalizáciu Pre-treatment Link a roztok „low pH“ (pH 6) pri 96 °C po dobu 20 min. Imunohistochemická reakcia prebiehala v automate Autostainer Link 48 s použitím kitu PD-L1 IHC 22C3 PharmDx (RTU) s monoklonálnou protilátkou anti-PD-L1 (klon 22C3) v riedení 1 : 50 s inkubáciou cez noc. Detekcia reakcie prebehla pomocou detekčného kitu EnVision Flex. Všetky uvedené reagenty a platformy boli zakúpené od spoločnosti Dako/Agilent, Dánsko. Každý beh v staineri prebiehal súčasne s použitím pozitívnej bunkovej kultúry (súčasť kitu), ako aj pozitívnej a negatívnej kontroly vlastného predtým verifikovaného a validovaného prípadu z nášho registra.

Prítomnosť lymfocytov v nádorovej stróme bola detegovaná imunohistochemickým dôkazom expresie antigénu CD3. Na revitalizáciu bol použitý Pre-treatment Link a roztok „high pH“ (pH 9) a imunohistochemická reakcia prebiehala v automate Autostainer Link 48 s monoklonálnou protilátkou anti-CD3 (polyklon). Detekcia reakcie prebehla pomocou detekčného kitu EnVision Flex, high pH (Link) K8000. Všetky uvedené reagenty a platformy boli zakúpené od spoločnosti Dako/Agilent, Dánsko.

Hodnotenie expresie PD-L1 v nádorových bunkách a TILs

Výsledok expresie PD-L1 bol vyjadrený kvalitatívne (pozitívny vs. negatívny výsledok) s použitím systému „nádorového proporčného skóre“ (tumour proportion score – TPS) [12], ktorý predstavuje

Tab. 1. Distribúcia prípadov skupiny grade 1 a grade 2 adenokarcinómov, skupiny grade 3 adenokarcinómov a skupiny skvamocelulárnych karcinómov rozdelených podľa hodnoty pozitivity PD-L1 v nádorových bunkách (TPS) a v tumor infiltrujúcich lymfocytoch v troch kategóriách percenta stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov (PST). V týchto prípadoch sa hustota T-lymfocytového infiltrátu v nádorovom centre neodlišovala od invazívneho okraja.

Grade 1 a grade 2 adenokarcinómy, PST v IM = PST v TC (n = 49)				
PST	PD-L1 v nádorových bunkách (TPS)			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	≥ 50 %	
< 10 % (n = 28)	24 (85,7 %)	3 (12,5 %)	1 (4,2 %)	4 (16,7 %)
10–49 % (n = 15)	8 (53,3 %)	6 (40 %)	1 (7,7 %)	7 (46,7 %)
≥ 50 % (n = 6)	4 (66,7 %)	1 (16,7 %)	1 (16,7 %)	2 (33,3 %)

Grade 3 adenokarcinómy, PST v IM = PST v TC (n = 27)				
PST	PD-L1 v nádorových bunkách (TPS)			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	≥ 50 %	
< 10 % (n = 5)	3 (60 %)	1 (20 %)	1 (20 %)	2 (40 %)
10–49 % (n = 7)	1 (14,3 %)	1 (14,3 %)	5 (71,4 %)	6 (85,7 %)
≥ 50 % (n = 15)	1 (6,7 %)	5 (33,3 %)	9 (60 %)	14 (93,3 %)

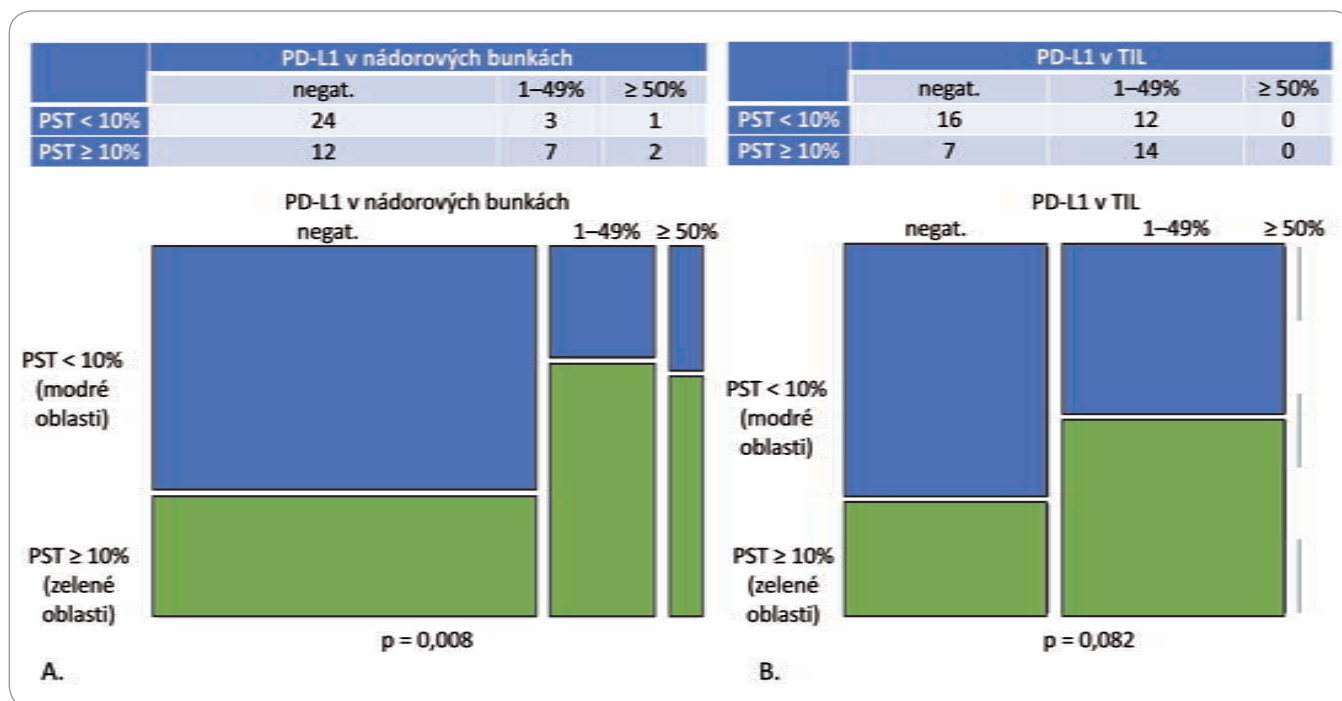
Skvamocelulárne karcinómy, PST v IM = PST v TC (n = 31)				
PST	PD-L1 v nádorových bunkách (TPS)			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	≥ 50 %	
< 10 % (n = 11)	8 (72,7 %)	1 (18,2 %)	2 (18,2 %)	3 (27,3 %)
10–49 % (n = 6)	3 (50 %)	2 (33,3 %)	1 (16,7 %)	3 (50 %)
≥ 50 % (n = 14)	4 (28,6 %)	5 (35,7 %)	5 (35,7 %)	10 (71,4 %)

Grade 1 a grade 2 adenokarcinómy, PD-L1 v TIL				
PST	PD-L1 v TIL			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	≥ 50 %	
< 10 % (n = 28)	16 (57,1 %)	12 (42,9 %)	0	12 (42,9 %)
10–49 % (n = 15)	6 (40 %)	9 (60 %)	0	9 (60 %)
≥ 50 % (n = 6)	1 (16,7 %)	5 (83,3 %)	0	5 (83,3 %)

Grade 3 adenokarcinómy, PD-L1 v TIL				
PST	PD-L1 v TIL			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	≥ 50 %	
< 10 % (n = 5)	2 (40 %)	3 (60 %)	0	3 (60 %)
10–49 % (n = 7)	3 (42,8 %)	4 (57,1 %)	0	4 (57,1 %)
≥ 50 % (n = 15)	7 (46,7 %)	8 (53,3 %)	0	8 (53,3 %)

Skvamocelulárne karcinómy, PD-L1 v TIL				
PST	PD-L1 v TIL			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	≥ 50 %	
< 10 % (n = 11)	8 (72,7 %)	3 (27,3 %)	0	3 (27,3 %)
10–49 % (n = 6)	2 (33,3 %)	4 (66,7 %)	0	4 (66,7 %)
≥ 50 % (n = 14)	5 (35,7 %)	7 (50 %)	2 (14,3 %)	9 (64,3 %)

TPS – nádorové proporčné skóre, PST – percento stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov, IM – invazívny okraj nádoru, TC – centrálna časť nádoru, TIL – tumor infiltrujúce lymfocyty, PD-L1 – ligand receptora programovanej bunkovej smrti 1



Obr. 1. Grade 1 a grade 2 adenokarcinómy, PST v IM = PST v TC (n = 49).

A. Mozaikový diagram, ktorý schematicky znázorňuje, že podiel grade 1 a grade 2 adenokarcinómov s PD-L1 negatívnymi nádorovými bunkami je v kategórii PST < 10 % relatívne ku kategórii PST ≥ 10 % vyšší. Tento pomer je obrátený v prípade PD-L1 pozitívnych prípadoch ($p = 0,008$).

B. Mozaikový diagram, ktorý schematicky znázorňuje, že podiel grade 1 a grade 2 adenokarcinómov s PD-L1 negatívnymi TIL, ako aj PD-L1 pozitívnymi TIL sa v kategórii PST < 10 % relatívne ku kategórii PST ≥ 10 % významne nelíši ($p = 0,082$).

PST – percento stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov, IM – invazívny okraj nádoru, TC – centrálna časť nádoru, PD-L1 – ligand receptora programovanej bunkovej smrti 1, TIL – tumor infiltrujúce lymfocyty

percentuálny podiel PD-L1 exprimujúcich nádorových buniek z celkovému počtu non-nekrotických nádorových buniek. Ako „PD-L1 pozitívna“ sa označovala nádorová bunka, ktorá vykazovala čiastočné alebo úplné membránové farbenie PD-L1, cytoplazmatická pozitivita do výsledku započítaná nebola. Výsledok bol považovaný za negatívny, ak menej ako 1 % nádorových buniek vykazovalo pozitivitu PD-L1 proteínu. Pozitívne výsledky boli na základe hodnoty TPS rozdelené do kategórie „1–49 %“ a kategórie „50 % a viac“. Analogickým spôsobom bola hodnotená expresia PD-L1 aj v imunitných bunkách prítomných v nádorovej stróme. Pri hodnotení dezplastických oblastí boli vymedzené osobitné kategórie TPS „1–9 %“ a „10–49 %“.

Hodnotenie množstva TILs

Hodnotené boli výlučne lymfocyty. Iné mononukleárne bunky ako makrofágy

a dendritické bunky, ako aj polymorfonukleárne leukocyty do výsledku zahrnuté neboli. Semikvantitatívne hodnotenie prítomnosti lymfocytov v nádorovej stróme bolo vykonané metódou „percenta stromálnych TIL“ (PST), ktorá je analogická metóde popísanej pri karcinóme prsníka [13]. Percento stromálnych TIL predstavuje percentuálny podiel plochy nádorovej strómy okupovanej lymfocytmi z celkovej plochy nádorovej strómy. Samostatne bol touto metódou hodnotený „invazívny okraj“ nádoru (invasive margin – IM), tj. kompartment nádorovej strómy bezprostredne naliehajúci na ložiská tumoru hraničiace s nenádorovým tkanivom a „centrálna časť“ nádoru (tumor center – TC), tj. kompartment nádorovej strómy naliehajúcej na ložiská tumoru centrálnne od invazívneho okraja. Na základe zhody alebo nezhody medzi obidvoma kompartmentmi nádorovej strómy boli jednotlivé karcinómy vo všetkých troch skupinách za-

radené do jednej z dvoch podskupín: „PST v IM = PST v TC“ a „PST v IM ≠ PST v TC“. V podskupine „PST v IM = PST v TC“ boli na základe hodnoty PST rozlišované tri kategórie: nádorová stróma s hodnotou PST < 10 % bola hodnotená ako nízke PST, s hodnotou PST 10–49 % ako stredne vysoké PST a s hodnotou PST ≥ 50 % ako vysoké PST. V podskupine „PST v IM ≠ PST v TC“ boli rozlišované dve kategórie: „PST v TC ≥ 10 % / PST v IM 10–49 %“ a „PST v TC 10–49 % / PST v IM ≥ 50 %“. Výsledky príslušných kategórií PST boli porovnávané s hodnotami TPS.

Štatistická analýza

Kontingenčné tabuľky distribúcie jednotlivých typov NSCLC rozdelených podľa hodnoty positivity PD-L1 v nádorových alebo imunitných bunkách v kategóriách PST ≥ 10 % a PST < 10 % boli prevedené do podoby mozaikového diagramu. Nulová hypotéza žiad-

neho vzťahu medzi uvedenými dvoma kategóriami PST bola testovaná Cochranovým-Armitageovým testom trendu, ktorý bol prevedený proti alternatívnej hypotéze, že podiel NSCLC s PD-L1 negatívnymi nádorovými alebo imunitnými bunkami v kategórii $PST \geq 10\%$ relatívne ku kategórii $PST \geq 10\%$ bude vyšší. V prípade PD-L1 pozitivity sa očakával obrátený pomer. Hodnota $p < 0,05$ bola pokladaná za štatisticky významnú. Analyzované dáta boli spracované vo výpočtovom prostredí R, verzia 3.5.0 s použitím knižnice DescTools.

Výsledky

Expresia PD-L1 v analyzovanom súbore NSCLC

Celkovo bolo do tejto štúdie zahrnutých 134 chirurgických resektátov pľúcnych karcinómov. V 87 prípadoch išlo o adenokarcinómy a v 47 prípadoch o skvamocelulárne karcinómy. Z 87 prípadov adenokarcinómov bola expresia PD-L1 v nádorových bunkách zistená v 38 prípadoch (43,7 %) a expresia PD-L1 v TIL v 45 prípadoch (51,7 %). Skupina skvamocelulárnych karcinómov zahŕňovala 47 prípadov, pričom pozitívny výsledok expresie PD-L1 v nádorových bunkách bol zistený v 22 prípadoch (46,8 %) a v imunitných bunkách v 27 prípadoch (57,4 %).

Asociácia medzi expresiou PD-L1 a PST v skupine grade 1 a grade 2 adenokarcinómov

Šesťdesiat adenokarcinómov bolo klasifikovaných ako dobre diferencované (grade 1) alebo menej diferencované (grade 2) formy. V 13 prípadoch (26,5 %) bola zistená expresia PD-L1 v nádorových bunkách a v 26 prípadoch (53 %) v TIL.

V podskupine „PST v IM = PST v TC“ bolo 49 prípadov, pričom prevažná časť prípadov ($n = 28$) patrila do kategórie nízkeho PST. Výsledky sú zhrnuté v tab. 1.

Pri analýze expresie PD-L1 v nádorových bunkách v tejto podskupine bolo zistené, že celková pozitivita je signifikantne vyššia v kategóriách s vyšším stupňom lymfocytovej infiltrácie ($p = 0,008$) (obr. 1A). V kategórii $PST \geq 10\%$ boli PD-L1 pozitívne len 4 z 28 prípadov (16,7 %), ale v kategó-

Tab. 2. Distribúcia prípadov skupiny grade 1 a grade 2 adenokarcinómov a skupiny skvamocelulárnych karcinómov rozdelených podľa hodnoty pozitivity PD-L1 v nádorových bunkách (TPS) a tumor infiltrujúcich lymfocytov v troch kategóriách percenta stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov (PST). V týchto prípadoch sa hustota T-lymfocytového infiltrátu v nádorovom centre odlišovala od invazívneho okraja.

Grade 1 a grade 2 adenokarcinómy, PST v IM \neq PST v TC (n = 11)				
PST (TC/IM)	PD-L1 v nádorových bunkách (TPS)			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	$\geq 50\%$	
< 10 % / 10–49 % (n = 9)	7 (77,8 %)	2 (22,2 %)	0	2 (22,2 %)
10–49 % / $\geq 50\%$ (n = 2)	1 (50 %)	1 (50 %)	0	1 (50 %)
PST (TC/IM)	PD-L1 v TIL			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	$\geq 50\%$	
< 10 % / 10–49 % (n = 9)	7 (77,8 %)	2 (22,2 %)	0	2 (22,2 %)
10–49 % / $\geq 50\%$ (n = 2)	1 (50 %)	1 (50 %)	0	2 (50 %)
Skvamocelulárne karcinómy, PST v IM \neq PST v TC (n = 16)				
PST (TC/IM)	PD-L1 v nádorových bunkách (TPS)			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	$\geq 50\%$	
< 10 % / 10–49 % (n = 10)	7 (70 %)	3 (30 %)	0	3 (30 %)
10–49 % / $\geq 50\%$ (n = 6)	3 (50 %)	2 (33,3 %)	1 (16,7 %)	3 (50 %)
PST (TC/IM)	PD-L1 v TIL			Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–49 %	$\geq 50\%$	
< 10 % / 10–49 % (n = 10)	4 (40 %)	6 (60 %)	0	6 (60 %)
10–49 % / $\geq 50\%$ (n = 6)	1 (16,7 %)	5 (83,3 %)	0	5 (83,3 %)

TPS – nádorové proporčné skóre, PST – percento stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov, IM – invazívny okraj nádoru, TC – centrálna časť nádoru, TIL – tumor infiltrujúce lymfocyty, PD-L1 – ligand receptora programovanej bunkovej smrti 1

rii $PST 1–49\%$ bola expresia PD-L1 zistená v 7 z 28 prípadov (46,7 %) a v kategórii $PST \geq 50\%$ v 2 zo 6 prípadov (33,3 %). Stúpajúca hodnota PST nekorelovala signifikantne so stúpajúcou hodnotou celkovej pozitivity PD-L1 imunitných buniek ($p = 0,082$) (obr. 1B). V kategórii nízkeho PST bola expresia PD-L1 v TIL zistená v 12 z 28 prípadov (42,9 %), v kategórii stredne vysoké PST v 9 z 28 prípadov (60 %) a v kategórii vysoké PST v 5 zo 6 prípadov (83,3 %).

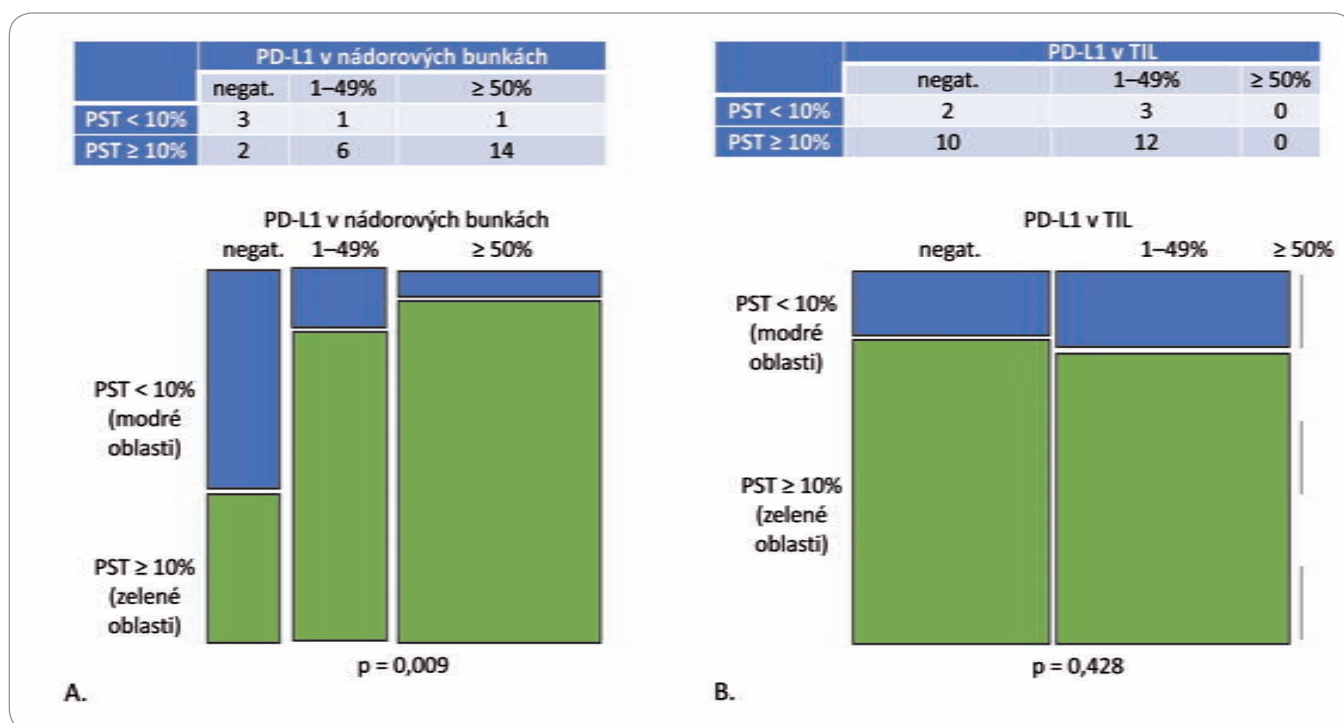
V podskupine „PST v IM \neq PST v TC“ bolo identifikovaných 11 adenokarcinómov – v 10 prípadoch patrili do kategórie „PST v TC $\geq 10\%$ / PST v IM 10–49 %“ s pozitívnym výsledkom PD-L1 v nádorových bunkách aj TIL v 2 prípadoch (22,2 %). V prípade dvoch adenokarcinó-

mov šlo o kategóriu „PST v TC 10–49 % / PST v IM $\geq 50\%$ “ s výsledkom pozitívnej expresie PD-L1 v nádorových bunkách a TIL s 50 prípadov. Výsledky sú zhrnuté v tab. 2.

Asociácia medzi expresiou PD-L1 a PST v skupine grade 3 adenokarcinómov

Dvadsaťsedem adenokarcinómov bolo klasifikovaných ako nízko diferencované (grade 3) formy. V 22 prípadoch (81,5 %) bola zistená expresia PD-L1 v nádorových bunkách a v 16 prípadoch (55,5 %) v TIL. Pre všetky prípady v tejto skupine platili kritéria „PST v IM = PST v TC“. Výsledky sú zhrnuté v tab. 1.

Podobne ako v prípade grade 1 a grade 2 adenokarcinómov, aj v prípade nízko diferencovaných adenokarcinómov



Obr. 2. Grade 3 adenokarcinómy, PST v IM = PST v TC (n = 27).

A. Mozaikový diagram, ktorý schematicky znázorňuje, že podiel grade 3 adenokarcinómov s PD-L1 negatívnymi nádorovými bunkami je v kategórii PST < 10 % relatívne ku kategórii PST ≥ 10 % vyšší. Tento pomer je obrátený v prípade PD-L1 pozitívnych prípadoch ($p = 0,009$).

B. Mozaikový diagram, ktorý schematicky znázorňuje, že podiel grade 3 adenokarcinómov s PD-L1 negatívnymi TIL, ako aj PD-L1 pozitívnymi TIL je v kategórii PST < 10 % relatívne ku kategórii PST ≥ 10 % porovnateľný ($p = 0,428$).

PST – percento stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov, IM – invazívny okraj nádoru, TC – centrálna časť nádoru, PD-L1 – ligand receptora programovanej bunkovej smrti 1, TIL – tumor infiltrujúce lymfocyty

bolo zistené, že celková pozitivita proteínu PD-L1 v nádorových bunkách je signifikantne vyššia v kategóriách s vyšším stupňom lymfocytovej infiltrácie ($p = 0,009$) (obr. 2A). V kategórii PST ≥ 10 % bola PD-L1 pozitivita zistená v 2 z 5 prípadoch (40 %), v kategórii PST 10–49 % v 6 zo 7 prípadov (85,7 %) a v kategórii PST ≥ 50 % v 14 z 15 prípadov (93,3 %), pričom v 9 prípadoch išlo o TPS s hodnotou ≥ 50 %. Taktiež v prípade nízko diferencovaných foriem adenokarcinómov nebola zistená asociácia medzi hodnotou PST a celkovou pozitivitou PD-L1 v imunitných bunkách ($p = 0,428$) (obr. 2B). V kategórii PST ≥ 10 % bola expresia PD-L1 v TIL zistená v 3 z 5 prípadov (60 %), v kategórii PST 1–49 % v 3 zo 7 prípadov (51,7 %) a v kategórii PST ≥ 50 % v 8 z 15 prípadov (53,3 %). Vzťah medzi expresiou PD-L1 v nádorových bunkách grade 3 adenokarcinómov a lymfocytovou infiltráciou strómy je zobrazený na obr. 3.

Asociácia medzi expresiou PD-L1 a PST v skupine skvamocelulárnych karcinómov

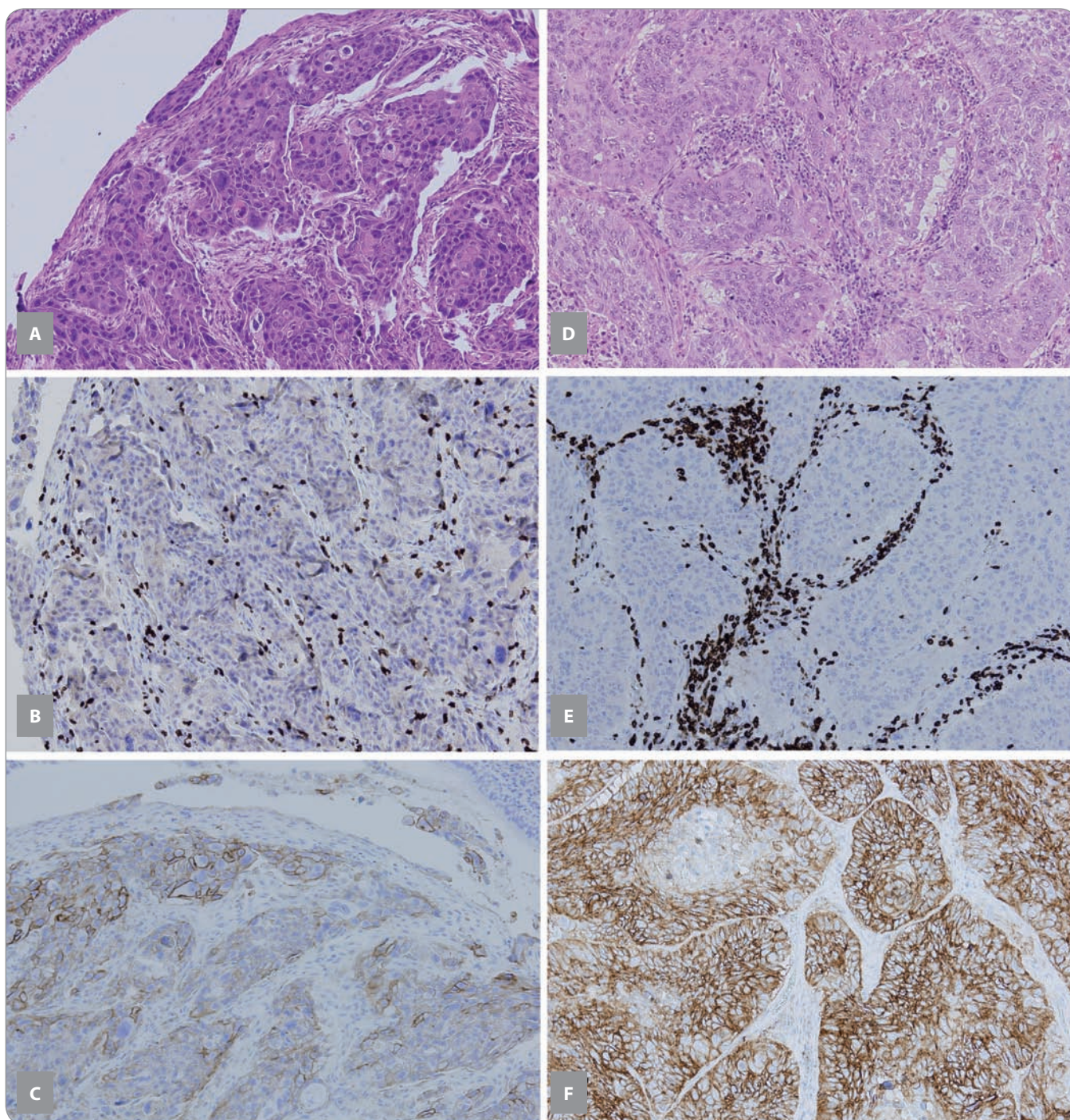
Súbor obsahoval 47 prípadov klasifikovaných ako skvamocelulárne karcinómy, pričom pozitivita PD-L1 proteínu v nádorových bunkách bola zistená v 22 zo 47 prípadov (46,8 %) a v TIL v 27 zo 47 prípadov (57,4 %).

V kategórii „PST v IM = PST v TC“ bolo 31 prípadov, z ktorých expresia PD-L1 v nádorových bunkách a v TIL bola zistená v 16 z 31 prípadov (51,6 %). Výsledky sú zhrnuté v tab. 1.

Celková pozitivita PD-L1 v nádorových bunkách bola v kategóriách PST 1–49 % a ≥ 50 % signifikantne vyššia v porovnaní s kategóriou PST ≥ 10 % ($p = 0,028$) (obr. 4A). V kategórii PST ≥ 10 % bola expresia PD-L1 v nádorových bunkách zistená v 3 z 11 prípadov (27,3 %), v kategórii PST 10–49 % v 3 zo 6 prípadov (50 %) a v kategórii PST ≥ 50 % 10 zo 14 prípadov (71,4 %). Celková pozitivita PD-L1 v TIL

bola v kategóriách PST 1–49 % a ≥ 50 % signifikantne vyššia v porovnaní s kategóriou PST ≥ 10 % ($p = 0,025$) (obr. 4B). V kategórii PST ≥ 10 % bola zistená expresia PD-L1 len v 3 z 11 prípadov (27,3%), ale v kategórii PST 10–49 % v 4 zo 6 prípadov (66,7 %) a v kategórii PST ≥ 50 % 9 zo 14 prípadov (64,3 %). Vzťah medzi expresiou PD-L1 v nádorových bunkách skvamocelulárnych karcinómov a lymfocytovou infiltráciou strómy je zobrazený na obr. 3.

V kategórii „PST v IM ≠ PST v TC“ bolo identifikovaných 19 skvamocelulárnych karcinómov. V 10 prípadoch patrili do kategórie „PST v TC ≥ 10 % / PST v IM 10–49 %“ s pozitívnym výsledkom expresie PD-L1 v nádorových bunkách v 3 prípadoch (30 %) a v TIL v 6 prípadoch (60 %). V 6 prípadoch išlo o kategóriu „PST v TC 10–49 % / PST v IM ≥ 50 %“, pričom expresia PD-L1 v nádorových bunkách bola zistená v 3 prípadoch (50 %) a v TIL v 5 prípadoch (83,3 %). Výsledky sú zhrnuté v tab. 2.



Obr. 3. Asociácia medzi infiltráciou nádorovej strómy T-lymfocyty a expresiou PD-L1 v nádorových bunkách nemalobunkového karcinómu pľúc.

A. Adenokarcinóm s predominantne solídnym rastovým vzorom (20x zväčšenie, hematoxylín a eozín).

B. Rovnaký adenokarcinóm z A., zobrazená je infiltrácia nádorovej strómy T-lymfocyty so stredne vysokou hodnotou PST (CD3 imunohistochemia).

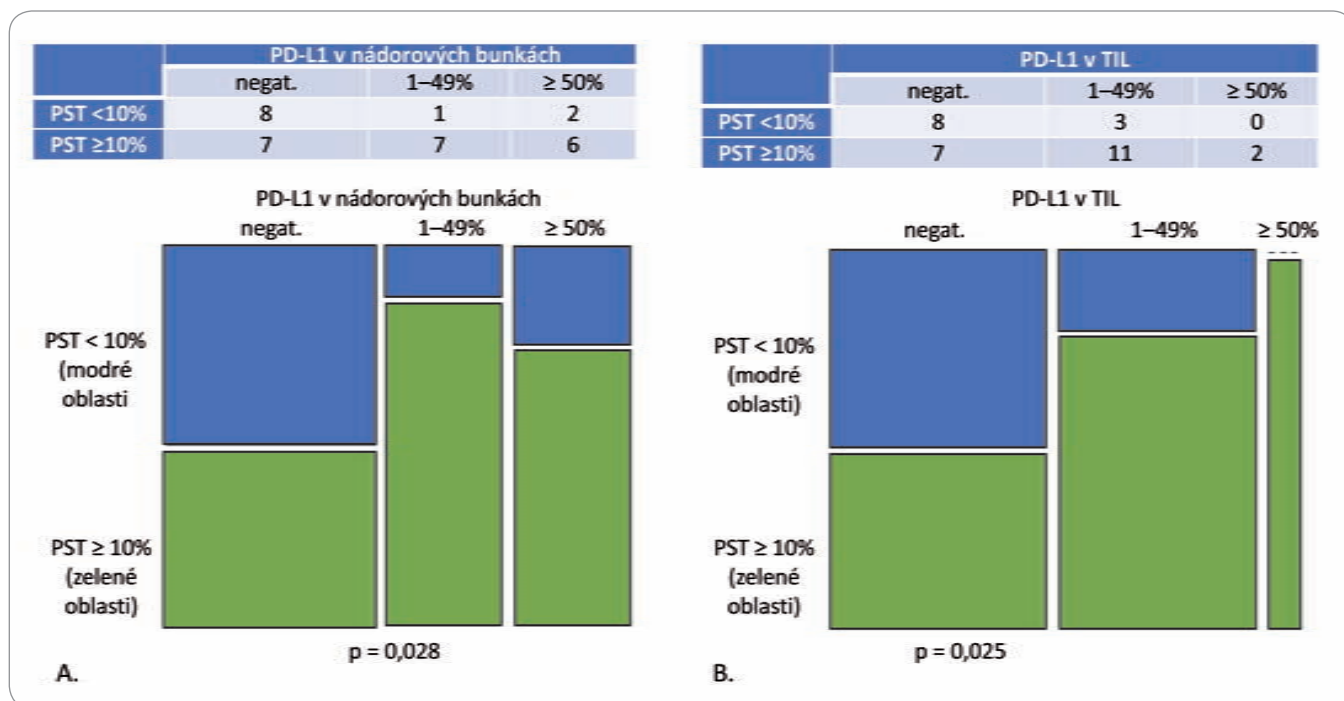
C. Rovnaký príklad uvedený v A., zobrazená je expresia PD-L1 v nádorových bunkách s hodnotou TPS 20–30 %.

D. Príklad skvamocelulárneho karcinómu (20x zväčšenie, hematoxylín a eozín).

E. Rovnaký príklad uvedený v D., zobrazená je infiltrácia nádorovej strómy T-lymfocyty s vysokou hodnotou PST (CD3 imunohistochemia).

F. Rovnaký príklad uvedený v D., zobrazená je expresia PD-L1 v nádorových bunkách s hodnotou TPS nad 90 % (E,F – PD-L1 imunohistochemia).

PD-L1 – ligand receptora programovanej bunkovej smrti 1, PST – percento stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov, TPS – nádorové prognózne skóre



Obr. 4. Skvamocelulárne karcinómy, PST v IM = PST v TC (n = 31).

A. Mozaikový diagram, ktorý schematicky znázorňuje, že podiel skvamocelulárnych karcinómov s PD-L1 negatívnymi nádorovými bunkami je v kategórii PST < 10 % relatívne ku kategórii PST ≥ 10 % vyšší. Tento pomer je obrátený v prípade PD-L1 pozitívnych prípadoch (p = 0,028).

B. Mozaikový diagram, ktorý schematicky znázorňuje, že podiel skvamocelulárnych karcinómov s PD-L1 negatívnymi TIL je v kategórii PST < 10 % relatívne ku kategórii PST ≥ 10 % vyšší. Tento pomer je obrátený v prípade PD-L1 pozitívnych prípadoch (p = 0,025).

PST – percento stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov, IM – invazívny okraj nádoru, TC – centrálna časť nádoru, PD-L1 – ligand receptora programovanej bunkovej smrti 1, TIL – tumor infiltrujúce lymfocyty

Tab. 3. Distribúcia dezplastických oblastí pľúcnych karcinómov rozdelených podľa hodnoty pozitivity PD-L1 v nádorových bunkách v troch kategóriách percenta stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov.

Desmoplastické oblasti pľúcnych karcinómov (n = 30)

PST	PD-L1 v nádorových bunkách (TPS)				Celková pozitivita PD-L1
	negat.	1–9 %	10–49 %	≥ 50 %	
< 10 % (n = 29)	27 (93,1 %)	2 (6,9 %)	0	0	2 (6,9 %)
10–49 % (n = 1)	1 (100 %)	0	0	0	0

TPS – nádorové proporčné skóre, PST – percento stromálnych tumor infiltrujúcich lymfocytov, PD-L1 – ligand receptora programovanej bunkovej smrti 1

Asociácia medzi expresiou PD-L1 a PST v dezplastických oblastiach

Celkovo bolo identifikovaných 30 karcinómov s vysokým stupňom dezplastácie. Tieto oblasti sa vyznačovali obzvlášť nízkou hodnotou PST a takmer absenciou expresie PD-L1. V 29 prípadoch bola zistená hodnota PST ≥ 10 %, pričom len dve z týchto oblastí (6,9 %) vykazovali pozitívitu PD-L1 proteínu v nádorových bun-

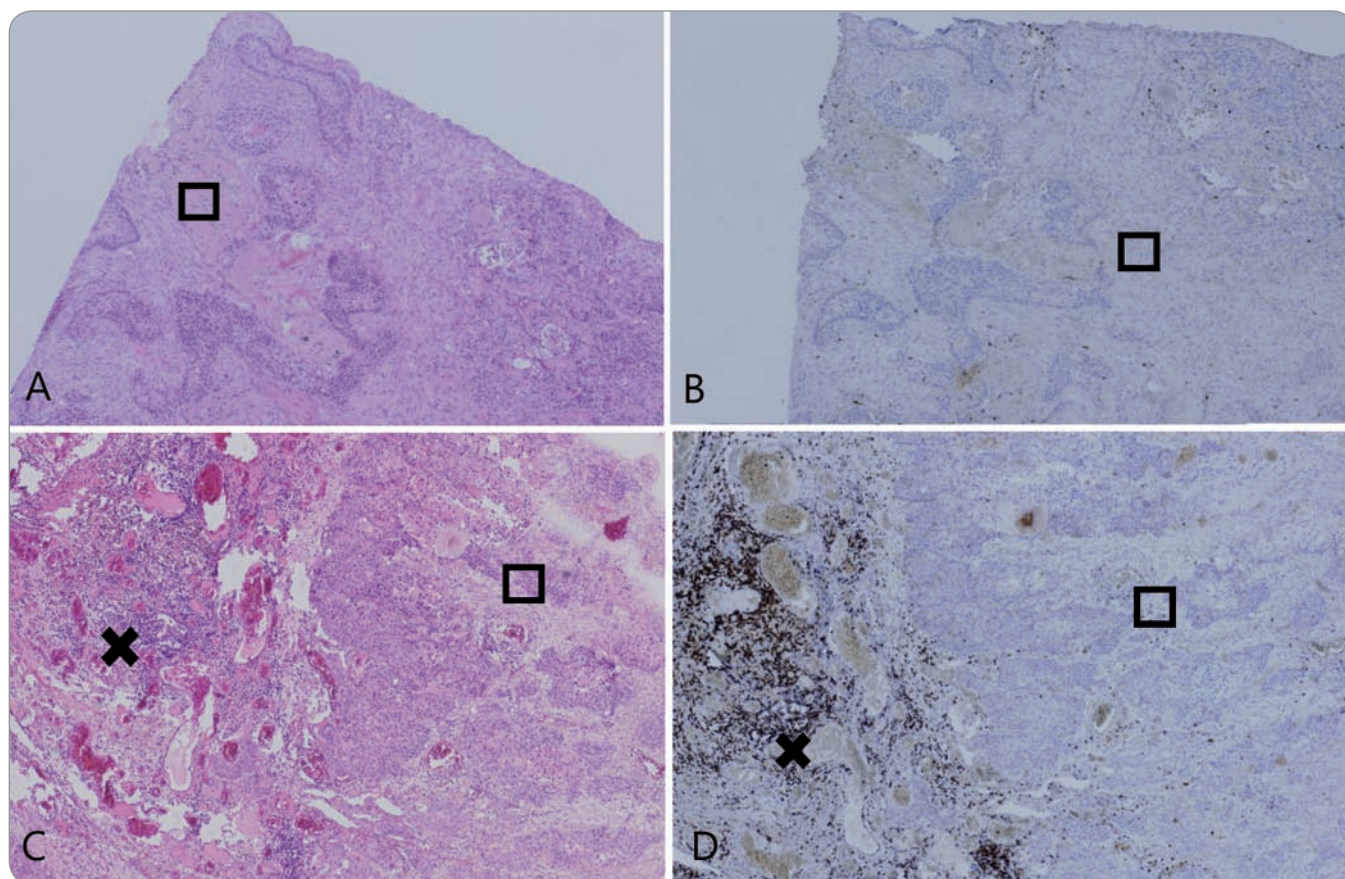
kách. Jedna dezplastická oblasť mala hodnotu PST 10–49 % s negatívnym dôkazom expresie PD-L1. Výsledky sú zhrnuté v tab. 3 a obr. 5 zobrazuje príklady dezplastických pľúcnych karcinómov vo vzťahu k lymfocytovej infiltrácii.

Diskusia

Predkladané dáta objasňujú viaceré aspekty nádorového mikroprostredia

NSCLC, ktoré by mohli byť využiteľné pri interpretácii klinickej odpovede pacientov s NSCLC liečených imunoterapiou, tj. mohli by mať potenciálne využitie pri jej indikovaní.

V roku 2015 Teng et al [14] navrhli klasifikovať nádorové mikroprostredie na základe prítomnosti expresie PD-L1 a infiltrácii nádorovej strómy T-lymfocytmi na štyri typy – ako



Obr. 5. Dezplastická nádorová stróma.

A, B. Príklad pľúcneho karcinómu s vysokým obsahom dezplastické nádorovej strómy (□) (10x zväčšenie, hematoxylín a eozín).
C, D. Dezplastická nádorová stróma (□) zabraňuje infiltrácii nádoru T-lymfocyty, ktoré zostávajú lokalizované peritumorálne (x) (10x zväčšenie, CD3 imunohistochemia).

nádorové mikroprostredie typu I označili také, v ktorom nádorové bunky vykazujú pozitívitu PD-L1 proteínu, pričom v nádorovej stróme sú prítomné TIL. Takýto stav signalizuje adaptívnu imunitnú rezistenciu a pacienti s týmto typom nádorového mikroprostredia vykazujú najlepšiu klinickú odpoveď pri podávaní inhibítorov imunitných kontrolných bodov. Nádorové mikroprostredie typu II je označované aj ako imunologicky „vypriahnuté“. Je charakterizované kombináciou PD-L1 negatívnych nádorových buniek ako aj nízkou až absentujúcou T-lymfocytovou infiltráciou, čo signalizuje imunologickú „ignoranciu“. Nádorové mikroprostredie typu III je PD-L1 pozitívne, ale stróma nie je infiltrovaná T-lymfocyty, čo naznačuje onkogénnu stimuláciu expresie PD-L1 v nádorových bunkách. Nádorové mikroprostredie typu IV je bez expresie PD-L1, ale s prítomnosťou TIL, čo naznačuje alter-

natívne cesty úniku spod imunitného dozoru [14].

Naše zistenia poukazujú na to, že v prognosticky odlišných skupinách adenokarcinómov je zastúpenie uvedených štyroch typov odlišné. V skupine lepšie diferencovaných, grade 1 a grade 2 adenokarcinómov patrilo 28 zo 49 prípadov (57,1 %) do kategórie PST ≥ 10 %. Z týchto 28 adenokarcinómov bola expresia PD-L1 v nádorových bunkách zistená v 4 z nich (16,7 %). V 24 prípadoch (49 %) mali teda pacienti nádorové mikroprostredie typu II s konfiguráciou „PD-L1 negatívny, TIL negatívny (nízky)“, čo by mohlo znamenať, že sú málo vhodnými kandidátmi pre imunoterapeutické postupy.

Pri analýze tejto skupiny adenokarcinómov bolo tiež zistené, že celková pozitivita PD-L1 v nádorových bunkách je vyššia v kategóriách PST 1–49 % a ≥ 50 % v porovnaní s kategó-

riou PST ≥ 10 % ($p = 0,008$). To je v súlade s výsledkami viacerých autorov, ktorí upozorňujú na možnú asociáciu medzi expresiou PD-L1 v nádorových bunkách a infiltráciou nádorovej strómy T-lymfocyty [15–17].

V skupine nízko diferencovaných, grade 3 adenokarcinómov patrilo 15 z 27 prípadov (55,5 %) do kategórie PST ≥ 50 %. Z týchto 15 adenokarcinómov bola expresia PD-L1 v nádorových bunkách zistená v 9 z nich (60 %). V 9 prípadoch mali teda pacienti nádorové mikroprostredie typu I, s konfiguráciou „PD-L1 pozitívny, TIL vysoký“, čo podporuje názor, že by mali byť vhodnými kandidátmi pre imunoterapeutické postupy. Podobne ako v prípade lepšie diferencovaných adenokarcinómov aj v prípade grade 3 foriem bola pozorovaná asociácia medzi expresiou PD-L1 v nádorových bunkách a stupňom infiltrácie nádorovej strómy imunitnými bun-

kami. Celková pozitivita PD-L1 proteínu bola vyššia v kategóriách PST 1-49 % a ≥ 50 % v porovnaní s kategóriou PST ≥ 10 % ($p = 0,009$).

S ohľadom na expresiu PD-L1 v TIL nebol v žiadnej z uvedených dvoch skupín adenokarcinómov rozdelených na základe stupňa diferenciácie zistený signifikantný vzťah medzi hodnotou PST a pozitivitou PD-L1 v TIL. Celková pozitivita PD-L1 proteínu v nádorových bunkách v nízko diferencovaných adenokarcinómoch bola vyššia než v prípade lepšie diferencovaných formách (81,5 vs 26,5%). Na túto asociáciu medzi expresiou PD-L1 a stupňom diferenciácie adenokarcinómov upozorňujú aj viacerí autori – expresia PD-L1 bola signifikantne asociovaná s nízko diferencovanými, grade 3 adenokarcinómami klasifikovanými ako predominantne solídne a s kratším celkovým prežívaním [18–23].

V skupine skvamocelulárnych karcinómov nebol zistený výrazný rozdiel v zastúpení jednotlivých kategórií PST – 11 prípadov patrilo do kategórie PST ≥ 10 % a 16 do kategórie PST ≥ 50 %. V skvamocelulárnych karcinómoch bola pozorovaná asociácia medzi celkovou pozitivitou PD-L1 v nádorových bunkách a hodnotou PST ($p = 0,028$). Taktiež v TIL bol podiel PD-L1 pozitívnych prípadov signifikantne vyšší v kategóriách s vyšším PST ($p = 0,025$).

Počas analýzy jednotlivých karcinómov sme pozorovali, že dezmozplastické oblasti, tj. časti nádoru s výrazným zastúpením nádorovej strómy, sa vyznačujú obzvlášť nízkou hodnotou PST a takmer absentujúcou expresiou PD-L1 v nádorových bunkách – z celkovo 30 identifikovaných dezmozplastických oblastí patrilo 29 z nich (96,7 %) do kategórie PST ≥ 10 %. V nich bola zistená expresia PD-L1 v nádorových bunkách v dvoch prípadoch (6,9 %), pričom išlo o kategóriu TPS 1–9 %. Podobné charakteristiky imunitne „vypriahnutého“ nádorového mikroprostredia bolo pozorované pri analýze metastatických uroteliálnych karcinómov od pacientov liečených atezolizumabom [24]. Mariathasan et al zistili, že migrácia imunitných buniek do nádorového centra je inhibovaná, ak došlo k aktivácii signálnej

dráhy TGF- β vo fibroblastoch lokalizovaných peritumorálne. Imunitné bunky, miesto toho aby infiltrovali nádorové centrum, zostali „uväznené“ v nádorovej stróme invazívneho okraja, bohatej na „s nádorom asociovaných fibroblastov“ a na kolagénové vlákna [24]. Aktivácia signálnej dráhy TGF- β však nevedie len k tvorbe mechanickej bariéry v podobe hustej vrstvy kolagénu – táto dráha zohráva významnú úlohu v procese adaptívnej imunitnej odpovede a jej aktivácia vedie k potlačeniu tvorby interferónu- γ , ktorý je zásadným induktorom expresie PD-L1 v nádorových bunkách. TGF- β tiež inhibuje funkciu cytotoxických CD8⁺ T-lymfocytov a indukuje v CD4⁺ T-lymfocytoch expresiu transkripčného faktora FOXP3, čím mení zastúpenie jednotlivých subpopulácií týchto buniek v neprospech Th1 lymfocytov a v prospech regulačných T-lymfocytov [25]. Blokovanie signálnej dráhy TGF- β tak predstavuje perspektívnu komplementárnu terapiu k podávaniu inhibítorov imunitných kontrolných bodov. Odstránenie mechanickej bariéry v podobe kolagénových vlákien by umožnilo kontakt imunitných buniek s bunkami nádorovými, ktorý, ako bolo demonštrované, je asociovaný s expresiou prediktívneho markera PD-L1. Nádorové mikroprostredie by sa tak hypoteticky zmenilo z imunitne „vypriahnutého“ typu II na typ I, ktoré vykazuje najvyššiu pravdepodobnosť klinickej odpovede pri podávaní inhibítorov kontrolných bodov. V súčasnosti prebiehajú predklinické štúdie, ktoré testujú kombinovanú terapiu zameranú na blokovanie signálnej dráhy PD-1/PD-L1 spolu s anti-TGF- β terapiou so zatiaľ superiornymi účinkami oproti monoterapii podávania inhibítorov imunitných kontrolných bodov [24,25].

Záver

Súhrnne, naša štúdia objasňuje mnohé aspekty nádorového mikroprostredia v NSCLC. Expresia PD-L1 má vzťah ku stupňu diferenciácie adenokarcinómov, pričom je vyššia v nízko diferencovaných podtypoch adenokarcinómov grade 3. V skupine adenokarcinómov ako aj skvamocelulárnych karcinómov je celková pozitivita PD-L1 proteínu v nádorových bunkách asociovaná s vyššou hodnotou

PST. Expresia PD-L1 v TIL je asociovaná s vyššou hodnotou PST v skvamocelulárnych karcinómoch, ale nie v skupine adenokarcinómov. Dezmozplastické oblasti sa vyznačujú obzvlášť nízkou hodnotou PST a nízkou expresiou PD-L1. Uvedené výsledky majú potenciál pochopiť zložitosť výsledkov liečby pacientov s NSCLC inhibítormi imunitných kontrolných bodov ovplyvňujúcimi signálne dráhy PD-1/PD-L1 a prispieť k zlepšeniu prediktívnej stratifikácie pacientov nielen v rámci existujúcich modalít imunoterapie, ale aj v rámci nových kombinovaných v súčasnosti v klinických štúdiách overovaných postupov.

Literatúra

1. Travis WD, Brambilla E, Burke AP et al (eds). WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th ed. Lyon: IARC 2015.
2. Bilek O, Bohovicová L, Demlová R et al. Non-small cell lung cancer – from immunobiology to immunotherapy. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 78–87. doi: 10.14735/amko20164578.
3. Zatloukalová, Pjehová M, Babčanová S et al. The role of PD-1/PD-L1 signaling pathway in antitumor immune response. *Klin Onkol* 2016; 29 (Suppl 4): 72–77. doi: 10.14735/amko20164572.
4. Schwartzman G, Ferrarotto R, Massarelli E. Checkpoint inhibitors in lung cancer: latest developments and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* 2016; 8(6): 460–473. doi: 10.1177/1758834016661164.
5. Fiala O, Šorejs O, Pešek M et al. Immunotherapy in the treatment of lung cancer. *Klin Onkol* 2017; 30 (Suppl 3): 22–31. doi: 10.14735/amko20173522.
6. Yan YF, Zheng YF, Ming PP et al. Immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer: current status and future directions. *Brief Funct Genomics* 2018; 18(2): 147–156. doi: 10.1093/bfpg/ely029.
7. Mathew M, Safyan RA, Shu CA. PD-L1 as a biomarker in NSCLC: challenges and future directions. *Ann Transl Med* 2017; 5(18): 375. doi:10.21037/atm.2017.08.04.
8. Gridelli C, Arzizzoni A, Barberis M et al. Predictive biomarkers of immunotherapy for non-small cell lung cancer: results from an Experts Panel Meeting of the Italian Association of Thoracic Oncology. *Transl Lung Cancer Res* 2017; 6(3): 373–386. doi: 10.21037/tlcr.2017.05.09.
9. Schalper KA, Brown J, Carvajal-Hausdorf D et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2015; 107(3): pii: dju435. doi: 10.1093/jnci/dju435.
10. Tokito T, Azuma K, Kawahara A et al. Predictive relevance of PD-L1 expression combined with CD8+ TIL density in stage III non-small cell lung cancer patients receiving concurrent chemoradiotherapy. *Eur J Cancer* 2016; 55(1): 7–14. doi: 10.1016/j.ejca.2015.11.020.
11. Solomon B, Young RJ, Bressel M et al. Prognostic significance of PD-L1+ and CD8+ immune cells in HPV+ oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Res* 2018; 6(3): 295–304. doi: 10.1158/2326-6066.
12. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D et al. PD-L1 Immunohistochemistry assays for lung cancer: results from phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol* 2017; 12(2): 208–222. doi: 10.1016/j.jtho.2016.11.2228.
13. Salgado R, Denkert C, Demaria S et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast can-

cer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015; 26(2): 259–271. doi: 10.1093/annonc/mdu450.

14. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A et al. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 2015; 75(11): 2139–2145. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0255.

15. Lin G, Fan X, Zhu W et al. Prognostic significance of PD-L1 expression and tumor infiltrating lymphocyte in surgically resectable non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8(48): 83986–83994. doi: 10.18632/oncotarget.20233.

16. He Y, Rozeboom L, Rivard CJ et al. PD-1, PD-L1 protein expression in non-small cell lung cancer and their relationship with tumor-infiltrating lymphocytes. *Med Sci Monit* 2017; 23(1): 1208–1216. doi: 10.12659/MSM.899909.

17. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest* 2014; 94(1): 107–116. doi: 10.1038/labinvest.2013.130.

18. Kim S, Kim MY, Koh J et al. Programmed death-1 ligand 1 and 2 are highly expressed in pleomorphic carcinomas of the lung: comparison of sarcomatous and carcinomatous areas. *Eur J Cancer* 2015; 51(17): 2698–2707. doi: 10.1016/j.ejca.2015.08.013.

19. Mori S, Motoi N, Ninomiya H et al. High expression of programmed cell death 1 ligand 1 in lung adenocarcinoma is a poor prognostic factor particularly in smokers and wild-type epidermal growth-factor receptor cases. *Pathol Int* 2017; 67(1): 37–44. doi: 10.1111/pin.12489.

20. Koh J, Go H, Keam B et al. Clinicopathologic analysis of programmed cell death-1 and programmed cell death-ligand 1 and 2 expressions in pulmonary adenocarcinoma: comparison with histology and driver oncogenic alteration status. *Mod Pathol* 2015; 28(9): 1154–1166. doi: 10.1038/modpathol.2015.63.

21. Cha YJ, Kim HR, Lee CY et al. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand-1 expression in lung adenocarcinoma and its rela-

tionship with p53 status. *Lung Cancer* 2016; 97(1): 73–80. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.05.001.

22. Shimoji M, Shimizu S, Sato K et al. Clinical and pathologic features of lung cancer expressing programmed cell death ligand 1 (PD-L1). *Lung Cancer* 2016; 98(1): 69–75. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.04.021.

23. Takada K, Okamoto T, Shoji F et al. Clinical significance of PD-L1 protein expression in surgically resected primary lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2016; 11(11): 1879–1890. doi: 10.1016/j.jtho.2016.06.006.

24. Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D et al. TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* 2018; 554(7693): 544–548. doi: 10.1038/nature25501.

25. Ravi R, Noonan KA, Pham V et al. Bifunctional immune checkpoint-targeted antibody-ligand traps that simultaneously disable TGF β enhance the efficacy of cancer immunotherapy. *Nat Commun* 2018; 9(1): 741. doi: 10.1038/s41467-017-02696-6.

Informace z České onkologické společnosti

Zápis ze schůze výboru České onkologické společnosti konané 14. 1. 2020 ve FN Motol v Praze naleznete na www.linkos.cz.

Novinky z genetiky, molekulární biologie a klinické onkologie sarkomů

Novel Aspects of Genetics, Molecular Biology and Clinical Oncology of Sarcomas

Houfková K., Hatina J.

Ústav biologie, LF UK v Plzni

Souhrn

Ve dnech 14.–17. listopadu 2018 se v Římě uskutečnila velká mezinárodní konference Connective Tissue Oncology Group Annual Meeting 2018 (CTOS 2018), která svedla dohromady na prostou většinu nejvýznamnějších specialistů jak na molekulární biologii, tak i klinickou onkologii sarkomů, především sarkomů měkkých tkání. Ve dnech 8.–10. května 2019 se potom v Bergenu konala regionální konference The 39th Plenary Meeting of the Scandinavian Sarcoma Group (SSGM 2019). Soubory otázek, které byly na obou konferencích diskutovány formou přednáškových či posterových sdělení, lze rozdělit do několika zastřešujících okruhů. Byl představen velký projekt zaměřený na objasnění germinální genetiky sarkomů; dosavadní výsledky ukazují na překvapivě velký význam genů kódujících proteiny, které zajišťují integritu telomer, jakož i existenci komplexních mechanismů genetické predispozice zahrnující polygenní dědičnost či modifikační geny. Problematice somatické genetiky sarkomů dominuje analýza vzniku a mechanismu účinku fúzních onkogenů odpovídajících za iniciaci značné části především pediatrických sarkomů. U karyotypicky komplexních sarkomů je evidentní snaha po patobiologické specifikaci do subtypů, ať už na základě specifické klinické charakterizace (uterinní leiomyosarkom vs. leiomyosarkom měkkých tkání), či specifických expresních profilů genů (molekulární subtypy nediferencovaného pleiomorfního sarkomu). Molekulární charakterizace může být vodítkem pro koncipování subtypově specifických terapeutických protokolů, jak je tomu v různém měřítku u obou shora zmíněných příkladů. Mezi další prominentní typy sarkomů, u nichž se podařilo transformovat základní molekulárně biologické poznatky do podoby úspěšné cílené terapie, patří např. gastrointestinální stromální tumor, infantilní fibrosarkom či inflamatorní myofibroblastický tumor, a rovněž u světlobuněčného sarkomu a dediferencovaného liposarkomu byly obdobné koncepty prezentovány, byť jejich dosavadní účinnost zůstává za očekáváním, a podobná situace zatím přetrvává u osteosarkomu. Z hlediska molekulárních struktur, na které lze zaměřit cílenou terapii, zaujímá v oblasti sarkomů měkkých tkání zcela zásadní postavení signální systém destičkového růstového faktoru, a to jak u vzácných typů založených na přímé iniciační mutační aktivaci (relativně malá část gastrointestinálních stromálních tumorů, infantilní hereditární myofibromatóza, dermatofibrosarcoma protuberans), u kterých cílená terapie využívá především nízkomolekulárních tyrozinkinázových inhibitorů, tak rovněž u širokého spektra obvyklých typů sarkomů, kde se součástí kombinační chemoterapie stává specifická blokující anti-PDGFR α -protilátka olaratumab. V oblasti klinické prognózy byl pozoruhodný vývoj zaznamenán zejména u tzv. prognostických nomogramů. Zajímavé výsledky byly rovněž prezentovány v oblasti odvození nových experimentálních modelů vzniku a progresu sarkomů.

Klíčová slova

sarkomy měkkých tkání – osteosarkom – genetická predispozice – molekulární subtypy – cílená terapie – prognostické nomogramy – experimentální modely sarkomatogeneze

Účast na obou konferencích i veškerá experimentální práce vedoucí k prezentovaným sarkomovým modelům byla podpořena projektem Grantové agentury České republiky 17-17636S.

Participation on both scientific conferences and all the experimental work leading to the presented sarcoma models were supported by the Czech Science Foundation project No. 17-17636S.

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.



doc. Ing. Jiří Hatina, CSc.

Ústav biologie

LF UK v Plzni

alej Svobody 1655/76

326 00 Plzeň

e-mail: jiri.hatina@lfp.cuni.cz

Obdrženo/Submitted: 20. 9. 2019

Přijato/Accepted: 6. 11. 2019

doi: 10.14735/amko202066

Summary

The Connective Tissue Oncology Group Annual Meeting 2018 (CTOS 2018) took place in Rome from 4 to 17 November 2018, and the 39th Plenary Meeting of the Scandinavian Sarcoma Group (SSGM 2019) was held in Bergen from 8 to 10 May 2019. These two large international conferences brought together an overwhelming majority of molecular and clinical specialists in the sarcoma field, especially those working on soft tissue sarcoma. Topics discussed on the conferences included, among others, sarcoma genetics, clinical and molecular subclassification, targeted therapy, clinical prognostication, and new experimental sarcoma models. A large ongoing international study on germinal sarcoma genetics was presented, the interim results of which revealed the extremely complex nature of genetic disposition to sarcoma, and, surprisingly, a rather prominent place among predisposing genes for those coding for structural telomere constituents. Fusion oncogenes dominate somatic sarcoma genetics, especially because of their origin and impact on sarcoma clinical behaviour, and are especially relevant for karyotypically simple paediatric sarcomas. A crucial issue in karyotypically complex sarcomas are the efforts being made to obtain a subclassification of sarcoma, other than those based on pathology, using either the clinical characteristics of sarcomas (uterine leiomyosarcoma vs. soft tissue leiomyosarcoma) or specific gene expression profiles (molecular subtypes in undifferentiated pleiomorphic sarcoma), which showed that molecular characterization can open the way for subtype specific therapies. Other examples of where this type of strategy can be applied include gastrointestinal stromal tumours, infantile fibrosarcoma, and inflammatory myofibroblastic tumours, where targeted therapy could be conceived based on the actionable mutations identified. Attempts in this direction have been made also for clear cell sarcoma and dedifferentiated liposarcoma, albeit the effectiveness of molecular-targeted treatments for these sarcomas is still poor, and progress in the treatment of osteosarcoma is still rather slow. Actually, the platelet-derived growth factor signalling system holds a prominent position in searches for targeted therapies, not only against rare sarcoma types, where are activated by mutations (some gastrointestinal stromal tumours, infantile hereditary myofibromatosis, and dermatofibrosarcoma protuberans), but also against other more usual sarcoma types, where the blocking anti-PDGFR α -antibody olaratumab has been successfully integrated into combinatorial chemotherapeutic regimens. In the field of clinical prognostication, remarkable progress in sarcoma nomograms was reported. Interesting results were also presented in the area of new experimental sarcoma models.

Key words

soft tissue sarcomas – osteosarcoma – chondrosarcoma – genetic predisposition – molecular subtypes – targeted therapy – prognostic nomograms – experimental sarcoma models

Genetika sarkomu

Germinální genetika sarkomů, tj. dědičná nádorová predispozice k sarkomu, představuje neobyčejně komplexní problematiku, a to nejen vzhledem k šíři různých konkrétních diagnóz, které lze v současnosti uvnitř rodiny mezenchymálních nádorů rozlišit (více než 70 různých typů [1]). Nejnovější vývoj v rámci projektu zaměřeného na zmapování genů zodpovědných za dědičnou nádorovou predispozici k sarkomu na konferencích Connective Tissue Oncology Group Annual Meeting 2018 (CTOS 2018) a The 39th Plenary Meeting of the Scandinavian Sarcoma Group (SSGM 2019) představila dr. M. Ballinger. Tento projekt nese označení International Sarcoma Kindred Study (ISKS) a ve své aktuální podobě zahrnuje 2 933 probandů postižených různými typy sarkomů, 2 623 jejich příbuzných 1. stupně, od nichž je k dispozici celkem 4 328 vzorků DNA a cca 600 histologických vzorků nádorové tkáně, a rovněž rodokmenovou informaci zhruba 105 000 příslušníků těchto rodin. Od 1 109 probandů již byla získána úplná genetická informace metodikou celogenomového sekvenování nové generace. Tyto imponující rozměry studie si vynutila řada kompli-

kujících faktorů genetiky sarkomu. Předeevším, až na jednu výjimku, o které se zmíníme později, nebyl dosud popsán žádný mendelisticky dědičný syndrom nádorové predispozice, který by se týkal výlučně či převážně sarkomu (ani jakožto široké skupiny mezenchymálních nádorů, ani žádného z jednotlivých konkrétních typů), jinými slovy neexistuje prakticky žádná sarkomová obdoba např. syndromu dědičné nádorové predispozice k nádorům prsu a vaječníku, familiární adenomatózní polypózy nebo rodinného melanomu. Na druhé straně jsou ovšem různé sarkomy stabilní součástí řady různých syndromů dědičné nádorové predispozice, vč. tří výše zmíněných, a rovněž např. Lynchova syndromu, Li-Fraumeniho syndromu či rodinného retinoblastomu. Jedním z průběžných výsledků projektu ISKS je stanovení relativních rizik pro vývoj sarkomu podmíněných evidentními či pravděpodobnými mutantními alelami (označovanými jako C3, C4 a C5 alelické varianty Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)) celé řady známých „nádorových“ genů (tab. 1).

Jeden aspekt se v uvedeném studii ukázal jako docela specifický pro různé typy

sarkomů, a to velmi významné postavení genů kódujících proteiny zodpovědné za integritu telomery (*POT1*, *TIN2*, *TRF1*). Tyto proteiny spolu navzájem interagují a spolu s dalšími proteiny (*TRF2*, *TPP1* a *RAP1*) tvoří tzv. „shelterin complex“, který chrání terminální části telomery. *POT1* má klíčové postavení, protože přímo interaguje jednak s telomerovou jednořetězcovou DNA, jednak prostřednictvím *TPP1* i s celým ochranným komplexem. *POT1* blokuje přístup telomerázy, a je-li tato funkce porušena, dochází k aberantnímu prodloužení telomer, což má za následek jejich destabilizaci, která může být důležitou součástí, či dokonce iniciátorem destabilizace karyotypu. Samotný *POT1* byl nezávisle identifikován jakožto kauzální mutovaný gen u čtyř španělských rodin segregujících celé spektrum nádorů vč. četných sarkomů, i velmi vzácných, jako je angiosarkom srdce či prsu [2]. Identifikovaná mutace (R117C) vede ke ztrátě afinity jak vůči telomeře, tak vůči *TPP1* a u nositelů mutace skutečně dochází jak k signifikantnímu prodloužení telomery, tak k nárůstu ohnisek poškozené DNA v oblasti telomery. Dosavadní výsledky projektu ISKS tento předchozí raritní nález potvrzují a rozšiřují, zejména se ukazuje,

že mutace v *POT1* genu predisponují obzvláště ke vzniku častých karyotypicky komplexních sarkomů, jako je osteosarkom nebo leiomyosarkom. V této souvislosti stojí ovšem za to poukázat na výsledky, které prokázaly, že např. u liposarkomu dochází naopak ke stabilizaci telomer aktivací telomerázy, a to buď bodovou mutací v promotoru genu pro katalytickou podjednotku telomerázy hTERT, jako je tomu u myxoidního liposarkomu [3], nebo v důsledku chromozomální translokace a zvýšení exprese *hTERT* genu, která byla prokázána u dediferencovaného liposarkomu [4]. Tato oblast tedy ještě zřejmě přinese řadu překvapivých výsledků.

Jinou komplikací dědičné nádorové predispozice k sarkomu je existence polygenní dědičné složky. Již předchozí publikované dílčí výsledky projektu ISKS ukázaly, že C3 varianty mají výraznou tendenci chovat se aditivně, tj. současné zdědění několika C3 variant v různých genech proporcionalně zvyšuje riziko vzniku sarkomu [5]. Přejedem mezi monogenním a polygenním způsobem dědičnosti je uplatnění tzv. genů modifikátorů, jejichž patologické alely samy nemusejí nutně vést ke zvýšenému riziku, popř. mohou mít svůj specifický fenotypový dopad, ale v kombinaci s patologickou variantou tumorového supresoru či onkogenu výrazně modifikují jejich fenotypový projev, penetranci a expresivitu. Také v tomto ohledu mohou sarkomy nabídnout výborný příklad – mutace v genech *EXT1* a *EXT2* predisponují ke vzniku mnohočetného benigního osteochondromu (mnohočetné hereditární exostózy), v kombinaci s pa-

Tab. 1. Přehled hlavních predisponujících lokusů ke vzniku sarkomu ze studie International Sarcoma Kindred Study.

Gen	Všechny případy (n = 1109)	Kontrola (n = 2571)	Celková odezva (interval spolehlivosti)	p-hodnota
<i>TP53</i>	18	0	∞ (8,4–∞)	< 0,0001
<i>POT1</i>	8	0	∞ (3,5–∞)	< 0,0001
<i>ATRIP</i>	6	0	∞ (2,5–∞)	0,001
<i>BRCA1</i>	4	1	9,3 (1,0–218,8)	0,031
<i>NF1</i>	10	3	7,8 (2,0–35,7)	0,001
<i>ERCC2</i>	10	5	4,7 (1,5–15,7)	0,004
<i>BRCA2</i>	16	10	3,8 (1,6–8,9)	0,001
<i>APC</i>	10	7	3,3 (1,2–9,7)	0,015
<i>ATM</i>	12	10	2,8 (1,1–7,0)	0,018
<i>TINF2</i>	5	0	∞ (2,0–∞)	0,002
<i>TERF1</i>	2	0	∞ (0,6–∞)	NS

NS – není signifikantní

tologickými variantami celé řady jiných genů (*PMS2*, *WRN*, *RECQ4*, *MLH3*, *FANCA*, *FANCL*, *BUB1B*, *XPC*, *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ERC*, *WT1*) ovšem signifikantně zvyšují riziko vzniku osteosarkomu a chondrosarkomu [5].

Somatické genetice sarkomů dominuje především téma fúzních onkogenů; současné představy o molekulární biologii a patologii sarkomů založených na fúzních onkogenech prezentovala na konferenci CTOS 2018 prof. Cristina R. Antonescu. Onkogeny aktivované genovou fúzí se pokládají za typickou vlastnost celé jedné skupiny sarkomů, které se vyznačují relativně stabilním karyotypem a relativně nízkým

věkem nástupu, který ovšem vykazuje značné rozpětí u různých konkrétních sarkomů, od novorozeneckých až po sarkomy vyskytující se v časně dospělosti. Biologickým důsledkem genové fúze je vznik chimérických onkoproteinů, které typicky kombinují specifické domény dvou různých proteinů; v této formě nejsou genové fúze nikterak specifické pro sarkomy, tento mutační mechanismus je velmi obvyklý i u značné části leukemií a lymfomů a rovněž u některých karcinomů (např. karcinomu prostaty). Dlouhou dobu se myslelo, že hlavním mechanismem vzniku fúzních onkogenů jsou reciproké translokace, u nichž dochází k translokačním zlomům uvnitř

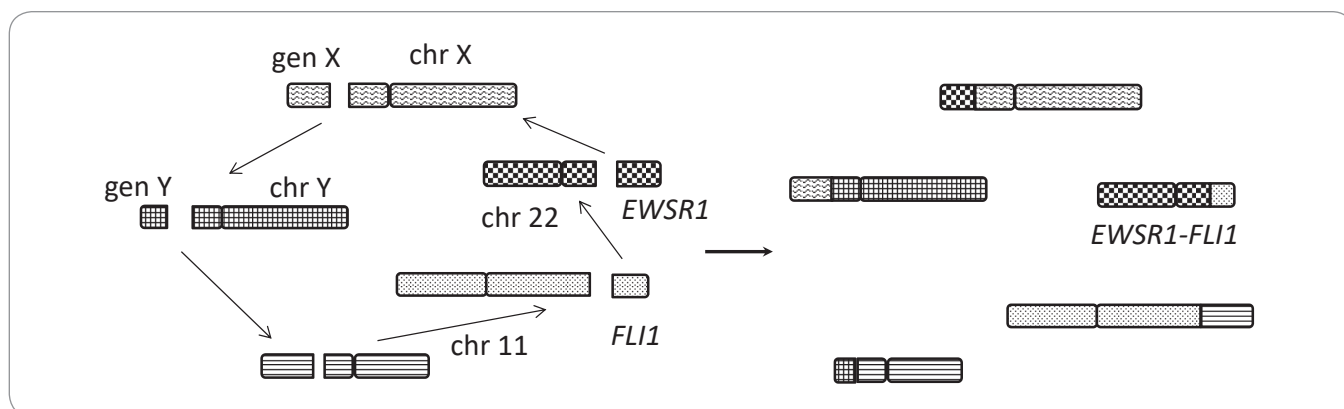


Schéma 1. Fúzní onkogeny jakožto výsledek komplexní chromozomální přestavby – chromoplexie. Upraveno podle [6].

Tab. 2. Sarkomy založené na fúzních onkogenech zahrnujících *EWSR1* gen.

<i>EWSR1</i> – <i>ETS (FLI1, ERG)</i>	Ewingův sarkom / primitivní neuroektodermální tumor
<i>EWSR1</i> – <i>WT1</i>	desmoplastický kulatobuněčný tumor
<i>EWSR1</i> – <i>NR4A3</i>	extraskelální myxoidní chondrosarkom
<i>EWSR1</i> – <i>DDIT3</i>	myxoidní / kulatobuněčný liposarkom
<i>EWSR1</i> – <i>ATF1</i>	světlobuněčný sarkom
<i>EWSR1</i> – <i>CREB1</i>	angiomatoidní fibrózní histiocytom
<i>EWSR1</i> – <i>POU5F1/</i> <i>PBX1/3ZNF444/KLF17</i>	myoepiteliální tumory
<i>EWSR1</i> – <i>TFCP2</i>	rhabdomyosarkom

zúčastněných onkogenů, popř. méně často inverze či intersticiální delecce. V době velmi nedávné byl objeven rozsáhlejší mechanismus strukturální přestavby karyotypů vedoucí k tvorbě fúzních onkogenů, tzv. chromoplexe, představující soubor chromozomálních přestaveb zahrnujících několik chromozomů, které jsou translokovány v jakési uzavřené „translokační smyčce“, tj. první chromozom s druhým, druhý s třetím, třetí se čtvrtým a čtvrtý zase s prvním (schéma 1) [6]. Zdá se, že se jedná o široce používaný mechanismus, jenž byl zatím prokázán u Ewingova sarkomu, který tvoří historicky, biologicky i klinicky jakýsi prototyp sarkomu závislého na fúzním onkogenu, a dále u synoviálního sarkomu, chondromyxoidního fibromu a fosfaturického mezenchymálního tumoru a již dříve také v komplexnější podobě u karcinomu prostaty. Odhaduje se, že o něco méně než polovina případů Ewingova sarkomu připadá na vrub chromoplexie, zbytek připadá na reciproké translokace, přičemž první skupina vykazovala skoro dvojnásobnou četnost relapsu – komplexní způsob chromozomálních přestaveb v podobě chromoplexického translokačního cyklu lze tudíž považovat za jeden ze znaků agresivity nádoru [6].

Ewingův sarkom představuje paradigmatický typ sarkomu závislého na fúzním onkogenu ještě z několika hledisek. Hlavními dvěma charakteristikami této skupiny sarkomů a genů zúčastněných na tvorbě fúzních onkogenů jsou promiskuita a heterogenita. Podkladem klasického Ewingova sarkomu je ge-

nová fúze mezi genem *EWSR1* a jedním z genů kódujících transkripční faktory Ets-rodiny, nejčastěji *FLI1* (90 %), méně často *ERG* (5–8 %) a výjimečně *ETV1*, *FEV* či *E1AF* (souhrnně 1–2 %). *EWSR1* kóduje RNA-vazebný protein s kryptickou transkripčně aktivační doménou, která je mnohem silnější než přirozené transkripčně aktivační domény Ets-faktorů, fúzní onkogen tedy kombinuje tuto silnou transkripčně aktivační doménu původem *EWSR1* s DNA-vazebnou doménou Ets-faktorů a tento aberantní transkripční faktor vede k rozsáhlé deregulaci transkripce v buňce, která je podkladem maligní transformace.

Jedním z možných vysvětlení těchto dramaticky různých četností vzniku různých fúzních onkogenů jsou vzájemné orientace transkripce zúčastněných genů; zatímco *EWSR1* a *FLI1* jsou transkribovány v témže směru (oba od centromery k telomeře), *ERG* je transkribován v opačném směru. Výsledkem chromozomální přestavby musí být kontinuální biologicky smysluplná kódující sekvence. Jsou-li oba zúčastněné geny orientovány na svých chromozomech opačně, je složitější tuto souvislou „správnou“ kódující sekvenci v důsledku chromozomální přestavby získat, a skutečně zatímco *EWSR1-FLI1* může být výsledkem jak reciproké translokace, tak chromoplexie, *EWSR1-ERG* vzniká výhradně na podkladě chromoplexie [6,7].

Řada dalších typů sarkomů na podkladě fúzních onkogenů vykazuje tuto molekulární heterogenitu, přičemž jeden z konkrétních fúzních onkogenů obvykle vysoce převažuje. Například in-

flamatorní myofibroblastický tumor zahrnuje více než deset alternativních fúzních onkogenů obsahujících gen pro tyrozinovou kinázu ALK, synoviální sarkom je iniciován fúzí genu *SS18* a jednoho z genů *SSX* lokalizovaných na X chromozomu (*SSX1*, *SSX2* nebo *SSX4*; je zajímavé, že *SSX3*, který je jako jediný transkribován v opačném směru, zatím jakožto součást fúzního onkogenu identifikován nebyl [7]) a u alveolárního rhabdomyosarkomu existuje heterogenita v obou genech (*PAX3/PAX7* a *FOXO1/NCOA1* [7]). Na druhou stranu *EWSR1* se účastní tvorby fúzních onkogenů u podstatně širšího souboru sarkomů než je Ewingův sarkom (tab. 2) a současně Ewingův sarkom vykazuje nápadné morfologické i klinické podobnosti se sarkomy, jejichž podkladem jsou jiné fúzní onkogeny, např. *CIC-DUX4* (ve srovnání s klasickým Ewingovým sarkomem prognosticky horší a s výraznou preferencí pro měkké tkáně) či *BCOR-CCNB3* (prognosticky srovnatelný s klasickým Ewingovým sarkomem, s výraznou tkáňovou preferencí pro kost); všechny tyto tři typy jsou v současnosti řazeny do rodiny Ewingova sarkomu (Ewing- and Ewing-like tumours [8]).

V některých případech může dokonce prakticky jeden a tentýž fúzní onkogen tvořit podklad různých typů sarkomů, např. *EWSR1* fúzovaný s geny pro transkripční faktory *ATF/CREB* (tab. 3). Jak je možné vysvětlit tuto fenotypovou variabilitu? Hlavním možným vysvětlením jsou odlišné sekundární mutace typické pro každý jednotlivý typ nebo rozdíly v buněčných typech, u nichž dochází k prvotní chromozomální přestavbě a iniciaci sarkomogeneze.

Je zajímavé, že použití celogenomového sekvenování nové generace umožnilo detekovat fúzní onkogeny i u typů sarkomů s komplexním karyotypem, jako leiomyosarkom, dediferencovaný liposarkom [4] nebo nediferencovaný pleiomorfni sarkom, není ovšem dosud jasné, jaká je jejich patobiologická funkce v iniciaci sarkomogeneze těchto komplexních sarkomů, na rozdíl od předešle diskutované skupiny převážně pediatrických sarkomů se stabilním karyotypem, kde všechno hovoří pro to, že fúzní onkogeny hrají naprosto klíčovou

úlohu, představují tzv. „driver-mutace“. Rovněž vzhledem ke značné nestabilitě karyotypicky komplexních sarkomů není jasné, jestli fúzní onkogeny přetrvávají např. v jistém klonu sarkomových buněk, nebo jestli jsou kontinuálně vytvářeny a ztráceny.

Molekulární subtypy sarkomů

Odhlédneme-li od zajímavých molekulárně genetických aspektů zmíněných výše, je nepochybné, že stanovení kauzální mutace, např. ve formě kritického fúzního onkogenu, je klíčové pro stanovení diagnózy. Se stále se prohlubujícím porozuměním molekulární biologii i klinickému chování sarkomů přitom pozorujeme stále jemnější a podrobnější diagnostické členění, kdy se dříve jednotná diagnostická skupina ukazuje jako heterogenní a rozpadá se do jemnějších, homogennějších a molekulárně i klinicky lépe definovaných podskupin. Zajímavý vývoj v tomto směru byl pozorován např. u embryonálního rhabdomyosarkomu (prof. C. R. Antonescu, CTOS 2018). Na rozdíl od alveolárního rhabdomyosarkomu s jeho dobře definovanými fúzními onkogeny *PAX3/PAX7-FOXO1/NCOA1* u embryonálního rhabdomyosarkomu doposud žádné molekulárně či patologicky definované podskupiny známy nebyly, obecnou genetickou charakteristikou byla absence chromozomálních přestaveb a zásadní onkogenní funkce bodových mutací v klíčových onkogenech a tumorových supresorových genech. V poslední době byla definována nová patologická skupina označená jako vřetenobuněčný/sklerozující rhabdomyosarkom, jejíž molekulární charakteristika opět prozradila značnou úroveň heterogenity. Jedna část těchto převážně pediatrických nádorů je opět iniciována fúzními onkogeny mezi geny kódujícími transkripční faktory podílející se významně na diferenciaci kosterního svalu (*SRF, TEAD1, VGLL2*) a transkripčními korepresory *CITED* a *NCOA2* – výsledkem je transkripční represe genů, které by normálně měly být v průběhu diferenciaci kosterního svalu aktivovány, tedy diferenciaci a sarkomogeneze. Druhá skupina vřetenobuněčného/sklerozujícího rhabdomyosarkomu má svůj mo-

Tab. 3. Sarkomy založené na fúzních onkogenech mezi *EWSR1* genem a geny pro transkripční faktory ATF-CREB rodiny.

<i>EWSR1 – ATF1</i>	světlobuněčný sarkom / angiomatoidní fibrózní histiocytom hyalinizující světlobuněčný sarkom pediatrický mezoteliom myxoidní intrakraniální mezenchymální tumor
<i>EWSR1 – CREB1</i>	světlobuněčný sarkom angiomatoidní fibrózní histiocytom primární plicní myxoidní mezenchymální tumor
<i>EWSR1 – CREM</i>	myxoidní intrakraniální mezenchymální tumor světlobuněčný sarkom

lekulární podklad v inaktivujících bodových mutacích v genu kódujícím klíčový a hierarchicky nadřazený transkripční faktor diferenciaci kosterního svalu *MyoD1* (nejčastější je bodová mutace změny smyslu L122R v DNA-vazebné doméně). Podstatné je, že se tyto dva typy vřetenobuněčného/sklerozujícího rhabdomyosarkomu podstatně liší prognózou – zatímco subtyp založený na fúzních onkogenech je prognosticky příznivý, u *MyoD1*-mutovaných nádorů se jedná o velice agresivní typ spojený s vysokou a časnou mortalitou.

Z nádorů s komplexním karyotypem se už dlouhou dobu spekuluje o jisté molekulární dichotomii u leiomyosarkomu, přesněji opakovaně se objevují názory, že uterinní leiomyosarkom není biologicky ani klinicky totožný s leiomyosarkomem měkkých tkání. V době velmi nedávné byla provedena komplexní transkriptomická a genomická analýza v rámci projektu The Cancer Genome Anatomy (TCGA), která poskytla těmto hypotézám částečnou oporu [9]. Přestože uterinní leiomyosarkom a leiomyosarkom měkkých tkání si jsou svým expresním profilem a mutačním vzorem navzájem bližší než každý z nich vůči jakémukoliv jinému typu sarkomu, přece se v segregáční analýze řadí do odlišných skupin, a bylo možné identifikovat molekulární dráhy, které jsou typické pro každý z nich. U uterinního leiomyosarkomu tak byla významně aktivnější dráha aktivovaná poškozenou DNA (DNA damage response pathway), zatímco leiomyosarkom měkkých

tkání měl signifikantně aktivnější signální dráhu aktivovanou hypoxií a transkripčním faktorem *HIF1α*. Je také už delší dobu známá rozdílná aktivita steroidních receptorů; výše uvedená studie TCGA prokázala specifickou hypometylaci cílových genů pro estrogenový receptor (ERα) specificky u uterinního leiomyosarkomu a zvýšená exprese a aktivita samotného estrogenového, jakož i progesteronového receptoru u uterinního leiomyosarkomu vedla již k několika malým klinickým studiím testujícím prospěšnost integrace inhibitorů aromatáz do různých léčebných protokolů [10]. Tyto výsledky byly na konferenci CTOS 2018 rozšířeny o imunohistochemickou analýzu velkého souboru nádorů shromážděných v podobě „tissue microarrays“ (TMA) (přednáška dr. I. M. Schaefer) (tab. 4), která potvrdila signifikantní rozdíly v četnosti mutací klíčových tumorových supresorových genů a v expresi steroidních receptorů mezi oběma subtypy leiomyosarkomu. Za povšimnutí stojí jeden rozpor mezi uváděnou studií TCGA a výsledky imunohistochemické analýzy TMA – zatímco první z nich identifikovala značnou frekvenci delecí *TP53* genu, v imunohistochemické studii TMA prezentované na konferenci byl naopak nalezen ve velké většině případů aberantně exprimovaný p53 prozrazující jeho stabilizaci specifickými bodovými mutacemi. Zatím není jasné, co by mohlo být příčinou tohoto rozdílu, jedná se ovšem o otázku, která je svými důsledky, zejména s ohledem na možnou perspektivní terapii, docela

Tab. 4. Výsledky imunohistochemické analýzy leiomyosarkomů měkkých tkání a uterinních leiomyosarkomů.

	Všichni případy	Leiomyosarkom měkkých tkání	Uterinní leiomyosarkom	Primární tumor	Recidiva [#]
Imunoprofilace	100 % (n = 712)	52 % (n = 358)	50 % (n = 354)	44 % (n = 312)	56 % (n = 400)
Inaktivní forma					
p16	16 %	13 % *	19 % *	18 %	14 %
RB1	89 %	93 % *	84 % *	87 %	90 %
p16 (w/ponechaný RB1)	5 %	4 %	7 %	7 %	4 %
TP53	87 %	90 %	84 %	84 %	89 %
PTEN	41 %	48 %	32 % *	46 % *	39 % *
PTEN + TP53	35 %	44 %	25 % *	38 %	33 %
PTEN + p16 (W/ponechaný RB1)	1 %	2 %	0 %	1 %	1 %
Středně vysoká/vysoká exprese					
ER/PR	34 %	15 % *	54 % *	28 % *	39 % *
ER/PR (w/inaktivní PTEN)	9 %	6 % *	13 % *	12 % *	1 % *

* p < 0,05; # zahrnuje lokální recidivy a vzdálené recidivy
ER – estrogenový receptor, PR – progesteronový receptor

důležitá, poněvadž stabilizovaný bodově mutovaný p53 může být přístupný navrácení do nativní konformace specifickými malými molekulami [11] (autoři výše uvedené přednášky dokonce spekulovali o budoucí možnosti této léčby), což samozřejmě u deletovaného p53 nepřichází v úvahu.

Není asi nikterak překvapující, že jednou ze sarkomových diagnóz, která přímo volala po identifikaci molekulárních subtypů, je nediferencovaný pleiomorfni sarkom (undifferentiated pleomorphic sarcoma – UPS), diagnóza, která je často přijímána vylučovacím způsobem a je tudíž ze své podstaty heterogenní. Ostatně už výše citovaná komplexní studie TCGA prokázala kontinuum mezi nediferencovaným pleiomorfni sarkomem a myxofibrosarkomem. Problematiku heterogenity UPS objasnila ve své přednášce na konferenci CTOS 2018 dr. M. Toulmondé, která podrobila sérii 26 primárních nádorových vzorků diagnostikovaných s tímto typem sarkomu komplexní expresní (RNA sekvenování) i genomové (celoexomové sekvenování) a proteomické analýze. Vzorky nediferencovaného pleiomorfniho sarkomu se na základě zejména expresní

analýzy rozpadly do tří skupin, dvou vyhraněně odlišných a mezi nimi jedné intermediární. Jedna ze skupin v sobě nesla část expresního profilu prozrazujícího aktivní zánětlivou reakci (pojmenovaná jako „hot-nádory“). Tato skupina měla signifikantně vyšší hladinu bodových mutací; není vyloučeno, že zde existuje oboustranná příčinná souvislost s aktivní zánětlivou reakcí – kyslíkové a dusíkové radikály vylučované zánětlivými buňkami mají prokazatelnou mutagenní aktivitu, současně vysoká úroveň bodových mutací a z toho vyplývající prezentace nádorových antigenů může přilákat do prostředí nádoru imunokompetentní buňky. Druhá, vyhraněně odlišná skupina nádorů, nazvaná případně „cold“, vykazovala výrazně vyšší strukturální chromozomální nestabilitu (copy number alteration, tj. rozsáhlejší delece a amplifikace) a byla prognosticky signifikantně méně příznivá. Jednou ze signálních molekul specificky aktivovaných v této skupině je FGFR2, receptorová tyrozinová kináza, pro niž jsou k dispozici specifické nízkomolekulární inhibitory v pokročilé fázi vývoje, a skutečně jeden z těchto inhibitorů (JNJ-42756493) významně inhi-

boval proliferaci „cold-UPS“ buněčných linií i primárního xenotransplantačního modelu; tento efekt byl vysoce specifický, u „hot-UPS“ experimentálních modelů jej nebylo možné detekovat. Naopak signální dráhy typické pro „hot“ podskupinu zahrnovaly transkripční faktor Myc a dále faktory asociované s epitelálně-mezenchymální tranzicí. Vzhledem k vysoké imunitní infiltraci by se v tomto případě nabízel imunoterapeutický postup, např. formou protilátek proti klíčovým inhibitorům T lymfocytů (tzv. checkpoint inhibitory – CTLA-4, PD-1 či PD-1L [12]), o nichž se dnes diskutuje v souvislosti s většinou nádorů, vč. sarkomů (např. právě probíhající studie IMMUNOSARC [13] či možné uplatnění imunomodulátoru mifamutridu, které se pozvolna začíná stále více prosazovat u osteosarkomu – viz dále).

Molekulární biologie sarkomů jakožto cesta k identifikaci racionální personalizované terapie

Příklad molekulárních subtypů nediferencovaného pleiomorfniho sarkomu ukazuje možnou hlavní aplikaci molekulární biologie sarkomogeneze, totiž mož-

nou identifikaci optimální protinádorové terapie, která by byla přesně přizpůsobena molekulárním změnám v nádorových buňkách a přesně na tyto změny zacílena [14]. Bohužel už výše uvedené příklady sarkomů založených na fúzních onkogenech naznačily, že pro většinu z nich je podobná strategie zatím nedostupná, poněvadž hlavní funkční kategorií proteinů, kterých se vznik fúzních onkogenů týká, jsou aberantní transkripční faktory a v současné době není k dispozici žádná klinicky zralá strategie jejich inhibice. Již současné použití cílené terapie u karcinomů a hematologických malignit prozrazuje, že naopak v zásadě dobře zvládnutá je farmakologická inhibice různých onkogenních kináz. Bohužel jen nemnoho sarkomů je molekulárně založeno právě na aberantní kinázové aktivitě. Nicméně takové příklady také existují a u některých z nich byl na konferenci prezentován pozoruhodný terapeutický pokrok.

Poměrně velká pozornost byla na konferenci CTOS 2018 věnována infantilnímu fibrosarkomu (satelitní sympozium vedené dr. G. S. Demetrim, dr. S. DuBoisem a prof. J. Y. Blayem, přednáška pronesená dr. N. Federmanem). Jedná se o vzácný novorozenecký až dětský nádor, jehož metastatická kapacita je sice omezená, který ale roste rychle a lokálně invazivně, což při radikálním operativním zásahu s sebou často nese trvalou invalidizaci dítěte, a pro nějž nebyl k dispozici spolehlivý chemoterapeutický režim, nehledě na obecnou problematičnost klasické chemoterapie u dětí takto nízkého věku. Již koncem 90. let 20. století byla u infantilního fibrosarkomu odhalena fúze genu pro transkripční faktor *ETV6* a genu *NTRK3* kódujícího tyrozínovou kinázu TRKC [15]; v tomto případě, přestože se genové fúze účastní gen pro transkripční faktor, je její dopad odlišný než u příkladů citovaných výše, poněvadž *ETV6* přispívá do výsledného fúzního onkogenu, resp. onkoproteinu toliko svým promotorem a dimerizační doménou, a *NTRK3* dodává intracelulární doménu vč. katalytické domény receptorové tyrozinkinázy *TRKC*. Výsledkem fúze tedy není globální deregulace transkripce, ale konstitutivně aktivní kináza. TRKC je jednou z trojice receptorových

kináz pro neurotrofní růstové faktory, zbylé dvě jsou TRKA a TRKB, kódované geny *NTRK1* a *NTRK2* [16], jejichž genové fúze byly v nádorech rovněž identifikovány, vč. infantilního fibrosarkomu (např. *TMP3-NTRK1*, *PDE4DPI-NTRK1*, *SQSTM1-NTRK1* nebo *LMNA-NTRK1* [17,18]; 5'-fúzní partner vždy musí dodávat promotor aktivní v mezenchymálních buňkách, jelikož uvedené kinázy slouží jako receptory pro neurotrofní růstové faktory jsou fyziologicky exprimovány v nervové tkáni, a nějakou formu dimerizační či oligomerizační domény – dimerizace jakékoliv receptorové kinázy ligandem je nezbytnou součástí jejich fyziologické aktivace [16]. Fúzní onkoproteiny zahrnující TRK-receptorové kinázy jsou nalézány v celém spektru nádorů, vč. velmi obvyklých karcinomů (např. plic, prsu, kolorekta, pankreatu aj.), melanomu či akutní lymfoblastické a myeloidní leukemie či gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST), vždy ovšem tvoří pouze výraznou menšinu případů, typicky kolem 5 %. Naproti tomu u infantilního fibrosarkomu a několika dalších dětských nádorů (jako dětský sekretující karcinom prsu či mezoblastický nefrom) jsou *NTRK*-fúzní onkogeny prakticky definiční a vyskytují se ve více než 90 % případů [16]. Podstatné je rovněž, že máme k dispozici velmi dobré nízkomolekulární inhibitory entrectinib a larotrectinib. U infantilního fibrosarkomu znamenalo nasazení těchto inhibitorů opravdový průlom v léčbě, především v neoadjuvantním a částečně i adjuvantním režimu ve spojení se šetrnou a neinvalidizující chirurgickou léčbou, při velmi příznivém profilu vedlejších účinků.

Existuje několik dalších typů mezenchymálních nádorů, u kterých léčba zahrnuje či je přímo postavena na využití cílených kinázových inhibitorů. Příkladem, který není možné opominout, je samozřejmě GIST, jeden z paradigmatických příkladů cílené protinádorové terapie [14]. Přestože GIST lze rovněž zařadit ke spektru nádorů, u nichž je malá část případů způsobena shora uvedenými *NTRK*-fúzními onkogeny, a tudíž i citlivá vůči entrectinibu nebo larotrectinibu, v naprosté většině případů je mutační mechanismus odlišný a spočívá v bodových aktivačních mutacích

genů pro receptorové tyrozinkinázy c-Kit (80–85 % případů) a PDGFRa (10 % případů), a bylo šťastnou shodou okolností, že se velice záhy zjistilo, že většina těchto nádorů je citlivá vůči jednomu z prvních dostupných kinázových inhibitorů imatinibu. V současné době existují s touto léčbou již bohaté zkušenosti a do popředí se tak dostává otázka terapeutické rezistence a jejího adekvátního řešení, ať se už jedná o primárně rezistentní nádory (např. nádory nesoucí specifickou mutaci PDGFRa D842V), nebo pokud se týče vývoje sekundární rezistence v důsledku selekce klonů nesoucích specifické mutace v ATP-vazebné doméně nebo aktivační smyčce c-Kit nebo PDGFRa. Novou nadějí pro tyto pacienty jsou kinázové inhibitory nové generace, jednak avapritinib (BLU-285 – přednáška na konferenci CTOS 2018, dr. M. Heinrich), jednak DCC-2618 (přednáška na konferenci CTOS 2018, dr. S. George). Obě přednášky prezentovaly výsledky klinických studií fáze I zahrnující pacienty s pokročilým GIST s historií několika linií předchozí standardní terapie a obě prokázaly akceptovatelný profil toxicity a velmi povzbudivou klinickou účinnost.

V léčbě sarkomů nachází uplatnění rovněž crizotinib, duální inhibitor kináz ALK a MET. V případě ALK je zjevnou aplikací inflamatorní myofibroblastický tumor (viz výše) a v případě MET je to světlobuněčný sarkom. Ten je sice založen na translokacích t(12;22)(q13;q12) či t(2;22)(q32.3;q12), které vedou k vytvoření fúzních onkogenů *EWSR1-ATF*, resp. *EWSR1-CREB1* (tab. 3), nedochází tedy k přímé ligand-nezávislé aktivaci kinázy jako např. u infantilního fibrosarkomu, nicméně tento aberantní transkripční faktor aktivuje, pravděpodobně s výrazným přispěním jiného transkripčního faktoru MTF, gen kódující tyrozínovou kinázu MET. Výsledky prezentované malé klinické studie (přednáška na konferenci CTOS 2018, dr. P. Schöffski) jsou ovšem dosti skromné, jen u necelých 4 % pacientů došlo k objektivní částečné klinické odpovědi, nicméně u značné části (60 %) došlo ke stabilizaci onemocnění. Tato studie ovšem trpěla některými koncepčními nedostatky, jednak u pacientů nebyla analyzována a pou-

žita jako vstupní kritérium exprese/aktivity MET, jednak jsou dnes již k dispozici účinnější inhibitory MET-kinázy než crizotinib, takže definitivní závěr ještě není možné učinit. Poslední ze skupiny kinázových inhibitorů, které byly na konferenci diskutovány, jsou inhibitory CDK4 (abemaciclib a ribociclib) u dediferencovaného liposarkomu; podkladem je zde notorická amplifikace části chromozomu 12 (12q13-q15), která zahrnuje *CDK4* gen a rovněž gen pro inhibitor p53 *MDM2*, vůči němuž jsou také k dispozici specifické farmakologické inhibitory (např. nutliny nebo SAR405838). Obě dvě skupiny inhibitorů byly nezávisle samostatně testovány (přednášky na konferenci CTOS 2018, dr. M. Gounder a dr. M. A. Dickson) a výsledky obou studií prezentovaných na konferenci jsou opět relativně střídavé, s nejčastější odpovědí ve formě stabilizace onemocnění. Vystává proto myšlenka kombinace obou inhibitorů, otázkou ovšem je, jestli taková terapie nebude zatížena příliš vysokou toxicitou.

System destičkového růstového faktoru jakožto terapeutický cíl sarkomů měkkých tkání

Zcela specifické a do jisté míry výjimečné postavení v sarkomagenezí má signální systém destičkového růstového faktoru (platelet-derived growth factor – PDGF). Lidský genom nese celkem čtyři *PDGF* geny, označované jako *A*, *B*, *C* a *D*. Signálně aktivní ligand je dimer, a to buď homodimer, nebo heterodimer *PDGFAB*. K dispozici jsou dva geny pro receptory, *PDGFRA* a *PDGFRB* (receptory samotné se označují jako α a β), přičemž tak jako u všech tyrozinkinázových receptorů prvním krokem transdukce signálu je vazba ligandu a ligandem zprostředkovaná dimerizace receptoru, jejímž výsledkem tedy mohou být tři formy aktivovaného receptoru ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$ a $\beta\beta$). Existují přitom dosti komplexní preference mezi dostupnými pěti ligandy a třemi receptorovými komplexy [19].

PDGF je jedním z nejsilnějších mitogenů pro mezenchymální buňky a má klíčové kauzální postavení u několika typů karyotypicky jednoduchých sarkomů. Již byla řeč o aktivačních somatických mutacích *PDGFRA* u asi 10 % GIST.

Germinální aktivační mutace u *PDGFRB* jsou podkladem vzácného syndromu dědičné nádorové predispozice (zřejmě jediného, který se manifestuje výlučně ve formě sarkomu – viz výše) – hereditární infantilní myofibromatózy [20,21]. Jedná se o nádory tvořené aktivovanými fibroblasty, které mohou vznikat v jakémkoli věku, ovšem často jsou pediatrické, a jejichž klinické chování velmi závisí na výchozí tkáni. Pokud vznikají v kůži, podkoží, svalu či kosti, je jejich chování často indolentní a dochází u nich často dokonce ke spontánní regresi, pokud se vyvíjejí ve vnitřních orgánech, jsou často agresivní a spojené s vysokou mortalitou. Žádná standardní terapie nebyla pro tyto nádory formulována, na konferenci CTOS 2018 byly prezentovány výsledky izraelské skupiny s klasickou chemoterapeutickou léčbou (poster dr. M. Manisterski) spočívající v kombinaci nízkodávkovaného metotrexátu a vinblastinu, přičemž ze čtyř pediatrických pacientů s postižením vnitřních orgánů tři přežili (jeden ovšem zaznamenal relaps onemocnění po vysazení chemoterapie) a jeden zemřel. Možná je rovněž také cílená léčba kinázovými inhibitory imatinibem nebo sunitinibem, s nímž byla u pozoruhodné kazuistiky úspěšná brněnská skupina [22].

Samotný ligand PDGFB má kauzální postavení v případě dermatofibrosarcoma protuberans, kožního sarkomu iniciovaného translokací t(17;22)(q22;q13), jejímž výsledkem je fúzní gen mezi genem pro kolagen 1A1 a právě *PDGFB* genem. Translokační zlom je u kolagenového genu velmi variabilní, podstatné je, že jeho promotor řídí transkripci fúzního onkogenu. U *PDGFB* je naproti tomu translokační zlom lokalizován vždy v prvním intronu. Kolagenový promotor je samozřejmě v mezenchymálních buňkách velmi aktivní, výsledkem je tedy masivní nadprodukce PDGFB-faktoru. Také v tomto případě je u lokálně pokročilých nebo metastatických nádorů, které se ovšem vyskytují velmi vzácně, indikován imatinib [23].

Zatímco výše uvedené příklady se vždy týkají jen zcela specifické, geneticky přesně definované a početně zpravidla malé skupiny pacientů, signální

system PDGF se v nedávné době stal cílovou strukturou terapie sarkomů měkkých tkání v této široké specifikaci, tj. napříč různými typy a vč. obvyklých karyotypicky komplexních typů. Stalo se tak v podobě zavedení terapeutické protilátky proti PDGFRa olaratumabu. Jedná se o lidskou monoklonální protilátku třídy IgG1, která specificky a s vysokou afinitou rozeznává extracelulární ligand-vazebnou doménu PDGFRa, čímž zabraňuje vazbě ligandu a aktivaci receptoru. V *in vitro* a *in vivo* podmínkách olaratumab signifikantně inhiboval růst řady sarkomových buněčných linií [24] a překvapivě dobrého výsledku bylo dosaženo v kombinované klinické studii fáze I/II (studie JGDG), u které kombinace olaratumabu a doxorubicinu prakticky zdvojnásobila celkovou dobu přežití oproti monoterapii doxorubicinem u souboru pacientů s pokročilými sarkomy měkkých tkání [25]. Na konferenci CTOS 2018 byla představena návazná studie (přednáška dr. S. Bauer), u které byl kombinován olaratumab s kombinací chemoterapií doxorubicinem a ifosfamidem. Studie fáze I, která byla předmětem přednášky, zahrnovala 15 pacientů (3 se synoviálním sarkomem, 3 s maligními tumory z pochvy periferního nervu (malignant peripheral nerve sheath tumours – MPNST), 3 s liposarkomem, 2 s leiomyosarkomem, 2 se světlobuněčným sarkomem a 2 s nediferencovaným pleomorfním sarkomem). Plánovaná kombináční chemoterapie zahrnovala šest cyklů s podáním olaratumabu (15 mg/kg) 1. a 8. den, doxorubicinu (75 mg/m²) 1., 2. a 3. den a ifosfamidu (20 g/m²) 1., 2., 3. a 4. den, následovanými monoterapií olaratumabem až do progresu. V rámci výsledků studie fáze I nebyla přidavkem olaratumabu zaznamenána zvýšená toxicita oproti publikované toxicitě kombináční chemoterapie samotné [26]. Z pacientů, kteří dokončili plánovaný režim, zaznamenal pouze 1 progresi, u 5 došlo k částečné odpovědi (z čehož ovšem 1 progredoval při monoterapii olaratumabem), u 6 došlo ke stabilizaci onemocnění (klinická odpověď 25 %, kontrola onemocnění 69 %). U 3 pacientů umožnila dosažená klinická odpověď následnou operaci.

Bude nepochybně zajímavé sledovat tuto studii v delším časovém horizontu,

aby bylo možné vyhodnotit důsledky pro celkové přežití. Lze rovněž doufat, že tato nová kombinace pomůže osvětlit některé z ne zcela jednoznačně interpretovatelných závěrů studie JGDG, např. ne zcela snadno vysvětlitelný nesoulad mezi jen poměrně skromným zvýšením doby do progresu a poměrně razantním zvýšením celkového přežití, jakož i nemožnost prokázat jakýkoliv vztah mezi expresí PDGFRa v nádoru a léčebnou odpovědí [25].

Otevře molekulární biologie osteosarkomu dveře k nové terapii?

Jedním z častých typů sarkomů, u kterých by zavedení nových terapeutických postupů bylo skutečně na místě, je osteosarkom. Pro tyto pacienty zůstává základní léčebný protokol prakticky nezměněn od 70. let, kdy byla formulována základní kombinací chemoterapie metotrexátem, doxorubicinem a cisplatinou a u refrakterních a relapsujících nádorů gemcitabinem a docetaxelem. Jedinou inovací, která ovšem stále zůstává pojmána jako experimentální léčba, je doplnění této polychemoterapie imunomodulační látkou mifamurtidem, který pravděpodobně stimuluje tumoricidní aktivitu alveolárních makrofágů a snižuje tak pravděpodobnost růstu a progresu plicních metastáz [26]; přestože se jedná o experimentální léčbu, většina na osteosarkom specializovaných účastníků konference SSGM 2019 se spíše přiklání k názoru, že je tato imunomodulační léčba klinicky přínosná.

Neblahou vlastností osteosarkomu je náhlý explozivní růst a poměrně rychlá progresu, takže naprostá většina nádorů je diagnostikována jakožto „high grade“ a u většiny pravděpodobně již v době diagnózy byly založeny mikrometastázy. Jedná se rovněž o sarkom s vyhraněně nestabilními karyotypy s desítkami, možná stovkami numerických a strukturálních chromozomových aberací a polyklonálním vývojem [27]. Svými vlastnostmi osteosarkom docela překvapivě připomíná serózní „high grade“ ovariální karcinom, a možná právě to bylo impulzem k tomu, že v nedávné době byl osteosarkom podrobně geneticky

analyzován na aktivitu enzymatických komplexů DNA-reparační dráhy homologní rekombinací (tzv. BRCAness, podle *BRCA-1* a *BRCA-2* genů) a skutečně se zjistilo, že tato reparační dráha je porušena u značné části osteosarkomů, což samozřejmě hned vyvolalo naději na možné léčebné uplatnění PARP-inhibitorů [28]. Přestože se zprvu zdálo, že se jedná o skoro univerzální vlastnost osteosarkomu, situace asi bude o mnoho složitější a zejména heterogennější. Na konferenci SSGM 2019 prezentoval poměrně rozsáhlou experimentální studii citlivosti etablovaných osteosarkomových buněčných linií vůči PARP-inhibitoru BMN 673 prof. O. Myklebost a zjistil jednak značnou heterogenitu, jednak, aspoň prozatím, nemožnost předpovědět citlivost na základě jakékoli molekulárně biologické charakteristiky. Studie právě publikovaná na primárních osteosarkomových liniích udržovaných ve formě xenotransplantátů (patient derived xenografts – PDX), viz dále, tento nálezní potvrdila [29]. Bez identifikace spolehlivého prediktivního markeru lze tudíž o této terapii uvažovat jen obtížně.

Prognostické nomogramy sarkomů měkkých tkání

Viděli jsme již, že jak v případě Ewingova sarkomu, rhabdomyosarkomu i nediferencovaného pleomorfního sarkomu nese v sobě molekulárně genetická charakterizace, ať už v jakékoliv podobě (mutační mechanismus, konkrétní „driver“ mutace, molekulární subtyp charakterizovaný specifickým expresním profilem), také významnou prognostickou informaci. Stanovení prognózy onemocnění na základě takové molekulárně genetické informace je v oblasti sarkomu měkkých tkání ovšem přinejlepším záležitostí klinických studií a pro standardní odhad prognózy onemocnění jsou určující klinické a patologické charakteristiky. Ty je možné kombinovat v podobě tzv. prognostických nomogramů. Klasický prognostický nomogram představuje grafický prognostický nástroj, kdy je každá nezávislá prognosticky významná charakteristika vynesena na své podélné ose a její přímá či konvertovaná kvantitativní hodnota je převedena

do podoby bodového skóre [30]. Pravděpodobnost, že k definované klinické události (celkové přežití, sarkom-specifické přežití, přežití bez metastatického rozsevu apod.) dojde v předem stanoveném časovém okamžiku, je odvozena od celkového bodového součtu po sečtení bodového příspěvku všech zohledněných klinických charakteristik [31,32]. Některé z klinických ukazatelů vstupují do prognostických nomogramů jakožto kvantitativní veličiny (typicky např. věk pacienta), některé kvantitativní proměnné mohou být někdy naopak dichotomizovány (např. velikost nádorů může do prognostických nomogramů vstupovat jako kvantitativní veličina nebo nádory mohou být např. diferencovány a odlišně bodově ohodnoceny podle toho, jestli nedosahují určité arbitrárně stanovené hodnoty, např. 15 cm, nebo ji naopak přesahují [33]). Některé ze vstupních proměnných mají duální charakter samy o sobě (např. fokality – unifokální vs. multifokální nádory), některé jsou ze své podstaty kvalitativní a bodové ohodnocení je jim přiděleno specificky v rámci daného nomogramu (u sarkomů typicky histopatologický typ). Rovněž záleží na tom, jestli je konstruován obecný nomogram, nebo nomogram specializovaný pouze na určitou podskupinu. První sarkomový nomogram [34] měl obecný charakter, novější nomogramy jsou už specializované. K této specializaci může u sarkomů docházet ve dvou ohledech – jednak jsou k dispozici nomogramy omezené jen na specifický histopatologický typ (např. synoviální sarkom [35] či uterinní leiomyosarkom [36]) či histopatologickou rodinu (liposarkom [37]), jednak byly konstruovány nomogramy specializované na určité anatomické místo prezentace nádoru (retroperitoneální sarkomy [38] a končetinové sarkomy [39]). Důsledkem této specializace je možnost vzít při konstrukci nomogramu v úvahu specifické proměnné, které mají dominantní postavení jen u určité skupiny sarkomů. Např. u retroperitoneálního liposarkomu byly při konstrukci specializovaného liposarkomového nomogramu rozlišeny případy, kdy chirurgická resekce mohla být zaměřena jen na nádor jako takový, od případů, kdy předmětem resekce musel

být také nějaký vnitřní orgán, s vyšším bodovým ohodnocením druhé z možností [37]. Někdy se dokonce může jednat o odlišnou formu distribuce společné kvantitativní proměnné. Například u současného nomogramu zaměřeného na končetinové sarkomy je velikost nádoru zohledněna jakožto kvantitativní proměnná s lineární distribucí [40], zatímco současný nomogram konstruovaný pro retroperitoneální sarkomy nahlíží na velikost nádoru jako na kvantitativní proměnnou s nelineární distribucí – extrémně velké nádory dosahují nižšího bodového ohodnocení než nádory s velikostí 30 cm, což je hraniční hodnota, do které je distribuce lineární [41]. Příčinou je skutečnost, že obzvláště velké retroperitoneální sarkomy jsou z velké většiny dobře diferencované liposarkomy s příznivějším klinickým průběhem než jiné typy sarkomů, jako např. dediferencovaný liposarkom či leiomyosarkom [42]. Tento poslední příklad rovněž ilustruje interakci různých proměnných, které, ač *a priori* stanovené jako nezávislé, se navzájem podmiňují. Konstrukce nomogramů je statisticky poměrně komplexní problém, kvalita každého nomogramu je určena především dvěma ukazateli – kalibrací a diskriminací [40,42]. Kalibrace je grafický výraz validace prognostické hodnoty nomogramu, kdy na jedné ose vynášíme vypočítanou předpokládanou hodnotu veličiny (např. celkové přežití), na druhé ose hodnotu reálnou – u ideálního nomogramu bychom tak měli získat přímkou se směrnicí 45°. Diskriminace je pravděpodobnost, že z náhodně vybrané dvojice pacientů se předpokládá událost, jejíž pravděpodobnost nomogram stanovuje (smrt, rekurence, metastáza apod.) objeví dříve u pacienta s vyšším bodovým součtem, a tudíž vyšší vypočítanou pravděpodobností. Ideální diskriminace dosahuje hodnoty 1 (tj. 100 %), diskriminace 0,5 (50 %) znamená nulovou prognostickou hodnotu nomogramu. Spolehlivost nomogramu je zejména dána jeho externí validací, tj. spolehlivý nomogram dosahuje podobné kalibrace a diskriminace u etnický a geograficky různých populací pacientů ošetřovaných v různých specializovaných centrech [43].

Příspěvky na konferenci CTOS 2018 se týkaly tří aspektů vývoje prognostických nomogramů sarkomů měkkých tkání. Nevyhnutelná interakce různých proměnných byla zohledněna ve specifické modifikaci nomogramu pro končetinové sarkomy, tzv. dynamickém prognostickém nomogramu (přednáška prof. D. Callegaro). Jak toto označení již nechává tušit, tou hlavní proměnnou, jejíž interakce s ostatními je předmětem této modifikace, je čas; zatímco klasické nomogramy, o nichž jsme diskutovali výše, umožňují jednorázový odhad úmrtí, rekurence či metastatického rozsevu na základě hodnot jednotlivých proměnných zjištěných v okamžiku operace, tento dynamický nomogram umožňuje opakovanou kalkulaci po 12, 24 a 36 měsících, a to na základě jak vstupních klinických dat v okamžiku operace, tak i klinického vývoje od okamžiku operace po provedení opakované kalkulace. Druhým aspektem je integrace molekulárně genetické informace; v našem dosavadním textu jsme prognostické nomogramy dávali do jakéhosi protikladu k molekulárně genetickým a molekulárně biologickým faktorům odhadu prognózy, a to čistě z důvodu logického členění textu. Lze ovšem téměř s jistotou předpovědět, že tato hranice se bude v budoucnu čím dále tím více stírat a molekulárně geneticky či biologicky založené charakteristiky individuálních nádorů se stanou jedněmi z proměnných prognostických nomogramů. Jakousi předzvěstí tohoto vývoje byla přednáška dr. I. Wei, která ukázala možnosti integrace konkrétní mutační informace (tři nejčastější mutace *CTNNB1* genu či wt-alela či jiná mutace) do prognostického nomogramu rekurence desmoidní fibromatózy; podstatné přitom je, že začleněním této molekulární proměnné došlo ke zvýšení diskriminace z hodnoty 0,707, dosažené pouze s klinickými proměnnými, na 0,729 u všech pacientů a 0,744 u pacientů s primárně diagnostikovanou desmoidní fibromatózou. Konečně, třetí oblastí, ve které prognostické nomogramy sarkomů doznaly v poslední době významného rozvoje, je jejich aplikační forma. Cílem je co nejvíce rozšířit a usnadnit jejich praktické použití v každodenní klinické praxi. Sar-

kulátor je jedna z takových aplikačních inovací (www.sarcuator.com). Jedná se o volně dostupnou aplikaci vyvinutou pro smartphony a tablety, která je určena dospělým pacientům po resekci retroperitoneálního a končetinového sarkomu. Poskytuje odhad onkologických výsledků na základě věku pacienta, stadia onemocnění a velikosti a histologie nádoru. Po vložení těchto specifických kovariátů do aplikace je uživateli vykalkulována pravděpodobnost celkového přežití, bezpříznakového přežití nebo výskytu vzdálených metastáz po resekci primárního sarkomu. Konceptně podobná, i když v detailech odlišná, a nikoliv široce dostupná aplikační forma byla vyvinuta také specificky pro myxoidní liposarkom (poster dr. D. D. McMillan). Jedním z příkladů uplatnění Sarkulátoru je studie prezentovaná v přednášce dr. S. Pasqualiho, jejímž cílem bylo pokusit se redefinovat postavení adjuvantní chemoterapie v léčbě končetinových sarkomů měkkých tkání. Dosavadní klinické studie poskytly velmi rozporuplné výsledky; poslední velká randomizovaná klinická studie [41] neprokázala klinický benefit kombinační adjuvantní chemoterapie doxorubicinem a ifosfamidem. Jestliže ovšem totožní pacienti byli *ex post* stratifikováni na základě Sarkulátorem kalkulovaného odhadu pravděpodobnosti 8letého celkového přežití (jako hraniční hodnota bylo zvoleno 60 %), pak u vysoce rizikových pacientů (tzn. s kalkulovanou pravděpodobností celkového 8letého přežití pod 60 %) byl efekt adjuvantní terapie statisticky významný.

Nové experimentální modely sarkomu měkkých tkání

Jedním z problémů experimentální onkologie sarkomů obecně je nedostatek vhodných experimentálních modelů; ostatně to bylo také téma našich příspěvků. Na konferenci CTOS 2018 jsme posterovou formou prezentovali naše dosavadní výsledky získané analýzou progresivní série fibrosarkomových buněčných linií odvozených z fibrosarkomu indukovaného hlubokým poraněním u v-jun transgenické myši [42,43], zejména výsledky transkriptomické analýzy. Tento experimentální systém zahrnuje relativně málo transformovanou

sarkomovou linii JUN-2 s nízkou úrovní proliferace, motility a invazivity, z ní odvozenou dceřinou linii JUN-2fos3, která si zachovává nízkou úroveň proliferace, ale došlo u ní k výrazné manifestaci buněčné motility a invazivity, a vysoce transformovanou sarkomovou linii JUN-3 s vysokou úrovní proliferace, motility i invazivity. Tato unikátní sestava sarkomových buněčných linií nám umožnila identifikovat v jediné transkriptomické analýze jak geny zodpovědné za proliferaci (kontrastní expresní profil u JUN-3 oproti JUN-2 a JUN-2fos3), tak geny zodpovědné za motilitu a invazivitu (kontrastní expresní profil u JUN-3 a JUN-2fos3 oproti JUN-2). Ukázalo se tak, že JUN-3 sarkomové buňky disponují značnou autokrinní aktivací jak buněčné proliferace, tak motility; jeden z těchto autokrinních motilitních faktorů, chemokin Ccl8, může být farmakologicky inhibován, a skutečně tato inhibice signifikantně snižuje motilitu této sarkomové buněčné linie. Autokrinní regulace buněčné proliferace má zřejmě komplexnější charakter; JUN-3 buňky skutečně specificky nadměrně exprimují řadu růstových faktorů (amfiregulin, epiregulin, fibroblastové růstové faktory 10 a 13, hepatocytární růstový faktor) či receptorů (rovněž výše diskutovaný PDGFR α) a jejich proliferace není závislá na obsahu séra v médiu, na druhou stranu jimi kondiciované médium specificky inhibuje růst JUN-2 sarkomových buněk. To by mohlo otevřít cestu k objasnění interakce nezávislých nádorových klonů v komplexních nádorech vč. klasického fenoménu klonální dominance. Na konferenci SSGM 2019 jsme potom formou komentovaného posteru tento model rozšířili o další progresivní sarkomovou sérii založenou na velice obvyklé preadipocytární buněčné linii 3T3L1. Francouzská skupina publikovala spontánní transformaci této preadipocytární buněčné linie *in vivo* do dediferencovaného liposarkomu, ze kterého byla odvozena příslušná buněčná linie LM3D [44]. Opět jsme postupovali cestou celogenomové transkriptomické analýzy, která nám poskytla vhled do možných základních mechanismů vzniku a progresu nádorů tukové tkáně. Obecnější význam by mohl mít bioinformaticky identifi-

kovaný průnik transkriptomických profilů obou agresivních sarkomových linií, tj. JUN-3 a LM3D, který jsme označili jako „sarcoma progression signature“. Celkem se nám podařilo identifikovat 95 souhlasně transkripčně aktivovaných genů a 78 souhlasně transkripčně reprimovaných genů, které by mohly ukrývat obecnější informaci o biologických mechanismech progresu sarkomu. Prvotní analýza aktivovaných genů odhalila přítomnost překvapivě různorodé skupiny genů, které byly v různém kontextu publikovány jakožto inhibitory klasické, tzv. konvenční Wnt/ β -kateninové signální dráhy (Dickkopf-2 a -3, Apcc1, Meg3, Fibulin-5, Ints6, Msx1), a současně též aktivaci exprese genu kódujícího receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (Ror-2); to by napovídalo, že během progresu sarkomů (na rozdíl od mnohých karcinomů) dochází k utlumení klasické Wnt/ β -kateninové signální dráhy a k jejímu nahrazení tzv. nekonvenční Wnt5a/Ror-2 signální dráhou [45]. To by potvrzovala i přítomnost některých genů, které byly publikovány jakožto aktivované právě touto nekonvenční Wnt5a/Ror-2 signální dráhou, mezi aktivovanými geny našeho „sarcoma progression signature“, jako je gen pro onkoprotein c-jun anebo geny pro metaloproteinázy matrix, konkrétně MMP-16. Podle stejné logiky by farmakologické aktivátory konvenční Wnt/ β -kateninové dráhy mohly představovat slibné kandidáty pro novou chemoterapii pokročilých sarkomů; za zmínku v tomto ohledu stojí např. bortezomib [46].

Obecným problémem klasických buněčných kultur jsou arteficiální podmínky růstu nádorových buněk, které nemohou napodobit komplexní mikroprostředí nádoru [47]. Jednou z možností, jak zmírnit tento problém, jsou xenotransplantační modely, kdy se nativní fragmenty nádorů přímo implantují přísně imunodeficientní myši, tzv. PDX (patient-derived xenografts). Tuto techniku využila i skupina, která popsala molekulární subtypy nediferencovaného pleomorfního sarkomu pro analýzu účinnosti FGFR2 – specifických inhibitorů u tzv. „cold-UPS“ nádorů, nebo nedávná studie hledající nové te-

rapeutické možnosti u osteosarkomu (viz výše) [29]. Skupina z belgické univerzity v Leuvenu (projekt XenoSarc – poster na konferenci CTOS 2018, dr. A. Wozniak) se takto zaměřila na celou škálu sarkomů měkkých tkání zahrnující myxofibrosarkom, dediferencovaný liposarkom, synoviální sarkom, MPNST, leiomyosarkom, epitelioidní hemangioendoteliom, mezenchymální chondrosarkom, rhabdomyosarkom a nediferencovaný pleomorfní sarkom. Celkem se v současnosti jedná o 30 xenotransplantačních modelů, a současně s nimi je připravována i odpovídající tissue microarray, takže by mělo být možné současně analyzovat jednotlivé sarkomy imunohistochemicky i funkčním testem. Samozřejmě že metodika PDX je o mnoho komplikovanější a zejména experimentálně méně přístupná než klasické buněčné kultury. Skupina z milánského Istituto Nazionale dei Tumori (poster na konferenci CTOS 2018, dr. C. Colombo) se pokusila tento problém zmírnit současným odvozením xenotransplantátů i klasických buněčných linií ze vzorků získaných po chirurgickém odstranění retroperitoneálně lokalizovaných dediferencovaných liposarkomů a podle prezentovaných výsledků se zdá, že úspěšně; ze tří dediferencovaných liposarkomů se podařilo odvodit paralelně oba modely a využít je pro zatím základní screening chemosenzitivity. Jinou možností, jak zachovat komplexní nádorové interakce a současně získat experimentálně přístupnější model, než jsou xenotransplantáty, je použít trojrozměrné buněčné kultivace. Skupina z německé kliniky Helios (poster na konferenci CTOS 2018, dr. M. Gaebler) se zaměřila právě tímto směrem. Jedná se o tzv. sarkomové organoidy, tedy trojrozměrné mikronádory kultivované v komplexní extracelulární matrix (tzv. Matrigel); tento systém se označuje PD3D (patient-derived 3D-culture). Smyslem je získat experimentálně schůdný systém, který bude např. přístupný dlouhodobé kultivaci s cílem identifikovat potenciálně terapeuticky využitelné mutace každého individuálního sarkomového pacienta a na základě toho formulovat individualizovanou terapii, nebo použít tento systém jakožto screeningovou platformu pro identifikaci nových farmakologicky zajímavých molekul.

Primární buněčné kultury klinických sarkomů představují metodicky poměrně nelehký úkol; vzhledem k histopatologické variabilitě je obtížné definovat kultivační podmínky tak, aby se podařilo ustanovit primární buněčné kultury s rozumnou úspěšností u různých pacientů se sarkomy. Pozoruhodného úspěchu, prezentovaného formou přednášky a komentovaného posteru na konferenci SSGM 2019, dosáhla v tomto ohledu švédská skupina z Karolinska Institutet [48], která s více než 50% úspěšností kultivovala primární nádorové kultury odvozené z aspirátů získaných tenkou jehlou nebo z chirurgicky získaných vzorků několika typů sarkomů (Ewingova sarkomu, embryonálního rhabdomyosarkomu, alveolárního sarkomu měkkých tkání, angiosarkomu). Primární buněčné kultury byly následně podrobeny expresní analýze a současně testovány na citlivost vůči farmakologické knihovně zahrnující 525 farmakologicky aktivních látek a následně konfrontovány s pozorovanou odpovědí pacientů na empiricky podanou chemoterapii. Dosavadní výsledky (rozsah studie je zatím malý – 14 primárních buněčných kultur) ukazují na velmi dobrou schopnost předpovědět klinickou rezistenci a v jednom případě rovněž senzitivitu. Prezentovaným cílem projektu je tento kultivační a screeningový systém v blízké budoucnosti použít jakožto platformu pro *in vitro* test chemosenzitivity a podle něj modifikovat, či dokonce formulovat individualizovanou terapii.

Literatura

- Fletcher CD, Unni KK, Mertens F (eds). WHO classification of tumours of soft tissue and bone. 4th ed. Lyon: IARC Press 2013.
- Calvete O, Martinez P, Garcia-Pavia P et al. A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in TP53-negative Li-Fraumeni-like families. *Nat Commun* 2015; 6: 8383. doi: 10.1038/ncomms9383.
- Koelsche C, Renner M, Hartmann W et al. TERT promoter hotspot mutations are recurrent in myxoid liposarcomas but rare in other soft tissue sarcoma entities. *J Exp Clin Cancer Res* 2014; 33(1): 33. doi: 10.1186/1756-9966-33-33.
- Delepaul L, Lesluyes T, Pérot G et al. Recurrent TRIO fusion in nontranslocation-related sarcomas. *Clin Cancer Res* 2017; 23(3): 857–867. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0290.
- Ballinger ML, Goode DL, Ray-Coquard I et al. Monogenic and polygenic determinants of sarcoma risk: an international genetic study. *Lancet Oncol* 2016; 17(9): 1261–1271. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30147-4.
- Anderson ND, de Borja R, Young MD et al. Rearrangement bursts generate canonical gene fusions in bone and soft tissue tumors. *Science* 2018; 361(6405): 8419. doi: 10.1126/science.aam8419.
- Mertens F, Antonescu CR, Mitelman F. Gene fusions in soft tissue tumors: recurrent and overlapping pathogenic themes. *Genes Chromosomes Cancer* 2016; 55(4): 291–310. doi: 10.1002/gcc.22335.
- Specht K, Hartmann W. Ewing-Sarkome und Ewing-artige Sarkome. *Pathologie* 2018; 39(2): 154–163. doi: 10.1007/s00292-018-0421-2.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive and integrated genomic characterization of adult soft tissue sarcomas. *Cell* 2017; 171(4): 950–965. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.014.
- George S, Serrano C, Hensley ML et al. Soft tissue and uterine leiomyosarcoma. *J Clin Oncol* 2017; 36(2): 144–150. doi: 10.1200/JCO.2017.75.9845.
- Synnott NC, Bauer MR, Madden S et al. Mutant p53 as a therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer: preclinical investigation with the anti-p53 drug, PK11007. *Cancer Lett* 2018; 414: 99–106. doi: 10.1016/j.canlet.2017.09.053.
- Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V et al. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med* 2018; 50(12): 165. doi: 10.1038/s12276-018-0191-1.
- Broto JM, Hindi N, Redondo A et al. IMMUNOSARC: A collaborative Spanish (GEIS) and Italian (ISG) Sarcoma Groups phase I/II trial of sunitinib plus nivolumab in selected bone and soft tissue sarcoma subtypes – results of the phase I part. *Ann Oncol* 2019; 30 (Suppl 5): v683-v709. doi: 10.1093/annonc/mdz283.
- Dufresne A, Brahma M, Karanian M et al. Using biology to guide the treatment of sarcomas and aggressive connective-tissue tumours. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15(7): 443–458. doi: 10.1038/s41571-018-0012-4.
- Knezevich SR, McFadden DE, Tao W et al. A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet* 1998; 18(2): 184–187. doi: 10.1038/ng0298-184.
- Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15(12): 731–747. doi: 10.1038/s41571-018-0113-0.
- DuBois SG, Laetsch TW, Federman N et al. The use of neoadjuvant larotrectinib in the management of children with locally advanced TRK fusion sarcomas. *Cancer* 2018; 124(21): 4241–4247. doi: 10.1002/cncr.31701.
- Davis JL, Lockwood CM, Albert CM et al. Infantile NTRK-associated mesenchymal tumors. *Pediatr Dev Pathol* 2018; 21(1): 68–78. doi: 10.1177/1093526617712639.
- Papadopoulos N, Lennartsson J. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. *Mol Aspects Med* 2018; 62: 75–88. doi: 10.1016/j.mam.2017.11.007.
- Cheung YH, Gayden T, Campeau PM et al. A recurrent PDGFRB mutation causes familial infantile myofibromatosis. *Am J Hum Genet* 2013; 92(6): 996–1000. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.026.
- Martignetti JA, Tian L, Li D et al. Mutations in PDGFRB cause autosomal-dominant infantile myofibromatosis. *Am J Hum Genet* 2013; 92(6): 1001–1007. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.04.024.
- Mudry P, Slaby O, Neradil J et al. Case report: rapid and durable response to PDGFR targeted therapy in a child with refractory multiple infantile myofibromatosis and a heterozygous germline mutation of the PDGFRB gene. *BMC Cancer* 2017; 17(1): 119. doi: 10.1186/s12885-017-3115-x.
- Noujaim J, Thway K, Fisher C et al. Dermatofibrosarcoma protuberans: from translocation to targeted therapy. *Cancer Biol Med* 2015; 12(4): 375–384. doi: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0067.
- Lowery CD, Blosser W, Dowless M et al. Olaratumab exerts antitumor activity in preclinical models of pediatric bone and soft tissue tumors through inhibition of platelet-derived growth factor receptor α . *Clin Cancer Res* 2018; 24(4): 847–857. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-1258.
- Antoniou G, Lee AT, Huang PH et al. Olaratumab in soft tissue sarcoma – current status and future perspectives. *Eur J Cancer* 2018; 92: 33–39. doi: 10.1016/j.ejca.2017.12.026.
- Meyers PA, Chou AJ. Muramyl tripeptide-phosphatidyl ethanolamine encapsulated in liposomes (L-MTP-PE) in the treatment of osteosarcoma. *Adv Exp Med Biol* 2014; 804: 307–321. doi: 10.1007/978-3-319-04843-7_17.
- Baumhoer D. Die klonale Evolution des Osteosarkoms. *Pathologie* 2016; 37 (Suppl 2): 163–168. doi: 10.1007/s00292-016-0200-x.
- Kovac M, Blattmann C, Ribi S et al. Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat Commun* 2015; 6: 8940. doi: 10.1038/ncomms9940.
- Loh AH, Stewart E, Bradley CL. Combinatorial screening using orthotopic patient derived xenograft-expanded early phase cultures of osteosarcoma identify novel therapeutic drug combinations. *Cancer Letters* 2019; 442: 262–270. doi: 10.1016/j.canlet.2018.10.033.
- Balachandran VP, Gonen M, Smith JJ et al. Nomograms in oncology: more than meets the eye. *Lancet Oncol* 2015; 16(4): 173–180. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71116-7.
- Eilber FC, Kattan MW. Sarcoma nomogram: validation and a model to evaluate impact of therapy. *J Am Coll Surg* 2007; 205 (Suppl 4): S90–S95. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2007.06.335.
- Tattersall HL, Callegaro D, Ford SJ et al. Staging, nomograms and other predictive tools in retroperitoneal soft tissue sarcoma. *Chin Clin Oncol* 2018; 7(4): 36. doi: 10.21037/cco.2018.08.01.
- Anaya DA, Lahat G, Wang X et al. Postoperative nomogram for survival of patients with retroperitoneal sarcoma treated with curative intent. *Ann Oncol* 2009; 21(2): 397–402. doi: 10.1093/annonc/mdp298.
- Kattan MW, Leung DH, Brennan MF. Postoperative nomogram for 12-year sarcoma-specific death. *J Clin Oncol* 2002; 20(3): 791–796. doi: 10.1200/JCO.2002.20.3.791.
- Canter RJ, Qin LX, Maki RG et al. A synovial sarcoma-specific preoperative nomogram supports a survival benefit to ifosfamide-based chemotherapy and improves risk stratification for patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14(24): 8191–8197. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0843.
- Zivanovic O, Jacks LM, Iasonos A et al. A nomogram to predict postresection 5-year overall survival for patients with uterine leiomyosarcoma. *Cancer* 2012; 118(3): 660–669. doi: 10.1002/cncr.26333.
- Dalal KM, Kattan MW, Antonescu CR et al. Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of the retroperitoneum, extremity, or trunk. *Ann Surg* 2006; 244(3): 381–391. doi: 10.1097/01.sla.0000234795.98607.00.
- Gronchi A, Miceli R, Shurell E et al. Outcome prediction in primary resected retroperitoneal soft tissue sarcoma: histology-specific overall survival and disease-free survival nomograms built on major sarcoma center data sets. *J Clin Oncol* 2013; 31(13): 1649–1655. doi: 10.1200/JCO.2012.44.3747.
- Callegaro D, Miceli R, Bonvalot S et al. Development and external validation of two nomograms to predict overall survival and occurrence of distant metastases in adults after surgical resection of localised soft-tissue sarcomas of the extremities: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2016; 17(5): 671–680. doi: 10.1016/S1470-2045(16)00010-3.
- Raut CP, Miceli R, Strauss DC et al. External validation of a multi-institutional retroperitoneal sarcoma nomogram. *Cancer* 2016; 122(9): 1417–1424. doi: 10.1002/cncr.29931.
- Woll PJ, Reichardt P, Le Cesne A et al. Adjuvant chemotherapy with doxorubicin, ifosfamide, and leucovorin for resected soft-tissue sarcoma (EORTC

62931): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(10): 1045–1054. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70346-7.

42. Hatina J, Hájková L, Peychl J et al. Establishment and characterization of clonal cell lines derived from a fibrosarcoma of the H2-K/v-jun transgenic mouse. *Tumour Biol* 2003; 24(4): 176–184. doi: 10.1159/000074427.

43. Peychl J, Hatina J, Reischig J et al. Vztah motility a invazivity transformovaných buněk-model H2-K/V-JUN fibrosarkomových buněčných linií. *Klin Onkol* 2003; 16(5): 223–226.

44. Mariani O, Brennetot C, Coindre JM et al. JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. *Cancer Cell* 2007; 11(4): 361–374. doi: 10.1016/j.ccr.2007.02.007.

45. Endo M, Nishita M, Fujii M et al. Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 2015; 314: 117–148. doi: 10.1016/bs.ircmb.2014.10.003.

46. Qiang YW, Hu B, Chen Y et al. Bortezomib induces osteoblast differentiation via Wnt-independent activa-

tion of beta-catenin/TCF signaling. *Blood* 2009; 113(18): 4319–4330. doi: 10.1182/blood-2008-08-174300.

47. Witz IP. Tumor–microenvironment interactions: dangerous liaisons. *Adv Cancer Res* 2008; 100: 203–229. doi: 10.1016/S0065-230X(08)00007-9.

48. Brodin BA, Wennerberg K, Lidbrink E et al. Drug sensitivity testing on patient-derived sarcoma cells predicts patient response to treatment and identifies c-Sarc inhibitors as active drugs for translocation sarcomas. *BrJCancer* 2019; 120(4): 435–443. doi: 10.1038/s41416-018-0359-4.

PERSONALIA

Vzpomínka na prof. MUDr. Vítězslava Kolka, DrSc.

V lidském životě přicházejí chvíle, které nás bolestně zaskočí a kterým nemůžeme porozumět. K takové patřil i den (30. 1. 2020), v němž se uzavřel neopakovatelný životní příběh profesora Vítězslava Kolka. Nečekaně zemřel a zarmoutil tím všechny své blízké.

V profesoru Vítězslavu Kolkovi odešel dobrý člověk, zanícený pneumolog, který se neustále pokoušel pro obor vybojovat důstojné postavení, vynikající lékař, pedagog, vědec, kolega a přítel.

Českou pneumologii díky hlubokým znalostem, jazykové vybavenosti, pohotovosti a osobnímu charizmatu dostal do povědomí nejen v ČR, ale i v evropském a světovém měřítku. Mladým lékařům důsledně vštěpoval kvalitní lidskou medicínu a učil je i vědecké práci. Dokázal lidi motivovat a inspirovat. Jeho odborný záběr byl velmi široký. Věnoval se problematice sarkoidózy, intervenční bronchologii, pneumoniím, pneumoon-

kologii a dalším. Byl autorem a spoluautorem celé řady knih, vědeckých publikací a přednášek v ČR i v zahraničí.

Od roku 1999 byl přednostou Kliniky nemocí plicních a tuberkulózy Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc. Dvě volební období byl předsedou České pneumologické a ftizeologické společnosti České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně a řadu let jejím místopředsedou. Byl také předsedou České aliance proti chronickým respiračním nemocem. Určité období pracoval jako proděkan a měl na starosti výuku zahraničních studentů.

Zanechal tu všechno, co ho těšilo a co měl rád – rodinu, domov, přátele, kliniku se svými kolegy a žáky a také své pacienty. Zanechal tu také kolegy a přátele z ČR a dalších zemí. Žádnými slovy se nedá vyjádřit ztráta, kterou znamená jeho smrt.



Nedokončené dílo profesora Kolka zůstane inspirací pro ty, kteří v něm budou pokračovat. Nutí nás vážit si života a využít ho do posledních chvil, jak se to podařilo jemu.

*prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc.
Klinika nemocí plicních a tuberkulózy
LF MU a FN Brno*

Prof. MUDr. Stanislav Špánik, CSc. – 60-ročný

V septembri 2019 oslávil významné životné jubileum prednosta Internej kliniky Vysokej školy zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety a Onkologického ústavu sv. Alžbety v Bratislave prof. MUDr. Stanislav Špánik, CSc., popredný predstaviteľ slovenskej onkológie a vysokoškolský pedagóg.

Stanislav Špánik sa narodil 4. septembra 1959 v Bratislave. Štúdium medicíny začal v roku 1978 na Lekárskej fakulte hygienickej Univerzity Karlovej v Prahe, ktoré napokon ukončil v roku 1984 na Lekárskej fakulte UK (LF UK) v Bratislave. V roku 1987 získal špecializáciu z internej medicíny I. stupňa, v roku 1991 špecializáciu z hematológie a transfúziológie a v roku 1994 špecializáciu z klinickej onkológie. V roku 1995 obhájil na LF UK v Bratislave dizertačnú prácu vo vednom odbore vnútorné lekárstvo s názvom „Liečba mykotických infekcií pacientov s nádorovými chorobami“ a získal titul kandidáta lekárskej vied (CSc.). V roku 1996 obhájil na Fakulte zdravotníctva a sociálnej práce (FZaSP) Trnavskej univerzity habilitačnú prácu s názvom „Epidemiológia, etiológia, rizikové faktory a liečba mykotických infekcií v onkológii“ v odbore Verejné zdravotníctvo – epidemiológia neinfekčných chorôb. V roku 2002 získal na tejto univerzite titul profesora v odbore Verejné zdravotníctvo.

V roku 1984 začínal svoju profesionálnu kariéru ako sekundárny lekár na hematologicko-transfúznom oddelení a chemoterapeutickom oddelení Ústavu klinickej onkológie v Bratislave, od roku 1990 pôsobil na internom oddelení, neskôr na Internej klinike Národného onkologického ústavu. Od roku 1996 pôsobí na Onkologickom ústave sv. Alžbety, najskôr ako primár, neskôr vo funkcii prednostu Internej onkologickej kliniky OÚSA.

Prof. Špánik má za sebou bohatú publikačnú, prednáškovú a vedecko-výskumnú činnosť. Absolvoval viacero študijných pobytov v USA (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center v New Yorku a Mayo Clinic v Rochestri). V oblasti vedecko-výskumnej činnosti bol spoluriešiteľom 3 výskumných úloh v rámci VEGA projektov, 4 EORTC štúdií a 85 medzinárodných klinických štúdií. Je autorom viacerých kapitol v monografiách, zostavovateľ a spoluautor vysokoškolských učebníc a skript zameraných na onkologickú problematiku.

Prof. Špánik je aktívny v pedagogickej činnosti. Od roku 2004 pôsobí na Vysokej škole zdravotníctva a sociálnej práce (VŠZaSP) sv. Alžbety, kde vyučuje študijný predmet prevencia a klinika onkologických ochorení, a od roku 2008 na Fakulte verejného zdravotníctva Slovenskej zdravotníckej univerzity (SZU). V rokoch 1996–2000 pôsobil aj na FZaSP Trnavskej univerzity, kde vyučoval internú medicínu a klinickú onkológiu. Od roku 2008 pôsobí aj na I. onkologickej klinike LF UK a OÚSA vyučujúc onkologickú propedeutiku pre slovenských i zahraničných poslucháčov fakulty.

Je členom Slovenskej lekárskej spoločnosti, Slovenskej hematologicko-transfúziologickej spoločnosti, členom ESMO (European Society of Medical Oncology), ASCO (American Society of Clinical Oncology) a ASH (American Society of Hematology). Od roku 2019 je prezidentom Slovenskej onkologickej spoločnosti.

V rokoch 2012–2016 bol hlavným odborníkom Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky (MZ SR) pre klinickú onkológiu. V apríli 2016 ho vláda SR vymenovala do funkcie štátneho tajomníka MZ SR.

Okrem iného je predsedom Správnej rady VŠZaSP sv. Alžbety, členom vedeckej rady VŠZaSP sv. Alžbety a členom ve-



deckej rady Lekárskej fakulty SZU v Bratislave, členom redakčnej rady časopisu MEMO (Magazine of European Medical Oncology) a predsedom redakčnej rady časopisu Onkológia. Od roku 2019 je aj členom redakčnej rady časopisu Českej a Slovenskej onkologickej spoločnosti – Klinická onkológia.

Pre prof. Špánika je vo voľných chvíľach prioritou rodina. S manželkou Beátkou, tiež úspešnou a u pacientov obľúbenou lekárkou, má troch dospelých synov a dcéru, ktorá obdarila rodinu vnúčatami. Raz do týždňa hráva so synmi sálový futbal, pri ktorom, ako sám hovorí, si dokonale vyčistí hlavu. Rád odpočíva v prírode a rád cestuje.

Vážený pán profesor, milý Stanko. Pri príležitosti Tvojho významného životného jubilea Ti, nielen vo svojom mene, ale iste aj v mene všetkých Tvojich spolupracovníkov, kolegov, celej obce slovenských onkológov, prajem veľa úspechov v ďalšej tvorivej práci, ale i v osobnom živote v kruhu širokej rodiny a priateľov.

Ad multos annos

*prof. MUDr. Dalibor Ondruš, DrSc.
prednosta I. onkologickej kliniky
LF UK a OÚSA v Bratislave*

Aktuality z odborného tisku

Cabazitaxel versus Abiraterone or Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer

de Wit R, de Bono J, Sternberg CN et al.

N Engl J Med 2019; 381(26): 2506–2518. doi: 10.1056/NEJMoa1911206.



Na účinnost a bezpečnost kabazitaxelu ve srovnání s inhibitory androgenní syntézy či signalizace (abirateron nebo enzalutamid) u pacientů s metastatickým kastrálně rezistentním karcinomem prostaty, kteří byli dříve léčeni docetaxelem, se zaměřila analýza, v níž byl v poměru 1 : 1 u pacientů, kteří byli dříve léčeni docetaxelem a ARTA (androgen receptor axis target therapy – abirateron nebo enzalutamid), podán intravenózně kabazitaxel (v dávce 25 mg/m²) 1× za 3 týdny plus prednison denně nebo jiný ARTA, než pacient v předchozí léčbě užíval (buď 1 000 mg abirateronu plus prednison denně nebo 160 mg enzalutamidu denně). Celkově bylo randomizováno 255 pacientů. Při mediánu sledování 9,2 měsíce byla u 95 ze 129 pacientů (73,6 %) ve skupině s kabazitaxelem zaznamenána progresse nebo úmrtí ve srovnání se 101 ze 126 pacientů (80,2 %) ze skupiny, která dostávala ARTA (HR 0,54; 95% CI 0,40–0,73; p < 0,001). Medián celkového přežití byl 13,6 měsíce s kabazitaxelem a 11,0 měsíce s ARTA (HR 0,64; 95% CI 0,46–0,89; p = 0,008). Medián přežití bez progresse byl 4,4 měsíce u kabazitaxelu a 2,7 měsíce u ARTA. Nežádoucí účinky stupně ≥ 3 se vyskytly u 56,3 % pacientů, kteří byli léčeni kabazitaxelem, a u 52,4 % pacientů, kteří dostávali inhibitor androgenní signalizace. Kabazitaxel významně zlepšil řadu klinických výstupů ve srovnání s inhibitory androgenního receptoru (abirateron nebo enzalutamid) u pacientů s metastatickým karcinomem prostaty rezistentním na kastraci, kteří byli dříve léčeni docetaxelem a jiným inhibitory zaměřeným na androgenní signalizaci (abirateron nebo enzalutamid).

Dietary Supplement Use During Chemotherapy and Survival Outcomes of Patients With Breast Cancer Enrolled in a Cooperative Group Clinical Trial (SWOG S0221)

Ambrosone CB, Zirpoli GR, Hutson AD.

J Clin Oncol 2019; JCO1901203. doi: 10.1200/JCO.19.01203.



I přes rozšířené používání doplňků stravy během léčby zhoubných nádorů existuje jen málo vědeckých údajů týkajících se jejich bezpečnosti nebo účinnosti. Vzhledem k obavám, že některé doplňky, zejména antioxidanty, by mohly snížit cytotoxicitu chemoterapie, byla provedena prospektivní studie, která byla doplňkovou k terapeutické studii. Pacientky s karcinomem prsu, které byly náhodně zařazeny do metronomické studie s cyklofosfamidem, doxorubicinem a paclitaxelem, byly dotázány na použití doplňků stravy a vitaminů při zahájení léčby a během ní (n = 1 134). Zdá se, že použití jakéhokoli antioxidačního doplňku (vitaminy A, C a E, karotenoidy, koenzym Q10) jak před léčbou, tak během ní, může být spojeno se zvýšeným rizikem recidivy (upravený poměr rizik [adjHR] 1,41; 95% CI 0,98–2,04; p = 0,06) a v menší míře i úmrtí (adjHR 1,40; 95% CI 0,90–2,18; p = 0,14). Užívání vitaminu B12 před chemoterapií i během ní bylo významně spojeno s horším přežitím bez známek onemocnění (adjHR 1,83; 95% CI 1,15–2,92; p < 0,01), ale i s celkovým přežitím (adjHR 2,04; 95% CI 1,22–3,40; p < 0,01). Použití preparátů železa během chemoterapie bylo významně spojeno s rizikem recidivy (adjHR 1,79; 95% CI 1,20–2,67; p < 0,01), používalo se jak před léčbou, tak během ní (adjHR 1,91; 95% CI 0,98–3,70; p = 0,06). Výsledky byly podobné i pro celkové přežití. Použití multivitaminů nebylo spojeno s významným dopadem na přežití. Tyto výsledky ukazují, že je třeba užívání těchto přípravků u onkologických pacientů velmi zvažovat a pacienty na tato rizika při zahájení terapie upozornit. Řada z nich totiž užívá potravinové doplňky bez konzultace s lékařem.

Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer

Tie J, Cohen JD, Wang Y et al.

JAMA Oncol 2019. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.3616.



Adjuvantní chemoterapie u pacientů s karcinomem tlustého střeva stadia III zabraňuje recidivě eradikací minimálního zbytkového onemocnění. U některých pacientů však po dokončení standardní adjuvantní léčby stále existuje vysoké riziko recidivy. Pooperační analýza cirkulující nádorové DNA (ctDNA) může detekovat minimální reziduální onemocnění. Tato australská multicentrická, populační kohortová biomarkerová studie hodnotila 100 po sobě jdoucích pacientů s nově diagnostikovaným karcinomem

kolorekta stadia III v období od 1. listopadu 2014 do 31. května 2017. Pacienti, u kterých byla mimo kolorektální karcinom diagnostikována jiná malignita v posledních 3 letech, byli vyloučeni. Medián sledování byl 28,9 měsíce (rozmezí 11,6–46,4 měsíce). Po chirurgickém zákroku a následně po chemoterapii byly odebrány vzorky sérové plazmy a analyzovány masivním paralelním sekvenováním. K analýze bylo způsobilých 96 pacientů; medián věku 64 let (rozmezí 26–82 let); 49 (51 %) byli muži. V nádorové tkáni těchto nemocných byla identifikována alespoň jedna somatická mutace. Cirkulující nádorová DNA byla detekovatelná ve 20 z 96 (21 %) postchirurgických vzorků a byla spojena s nižším přežíváním bez recidivy (HR 3,8; 95% CI 2,4–21,0; $p < 0,001$) a v 15 z 88 (17 %) vzorků po chemoterapii. Odhadovaný 3letý interval bez známek recidivy byl 30 %, pokud byla ctDNA po chemoterapii stále detekovatelná, a 77 %, pokud již ctDNA nebyla detekovatelná (HR 6,8; 95% CI 11,0–157,0; $p < 0,001$). Výsledky naznačují, že analýza ctDNA po operaci je slibným prognostickým markerem kolorektálního karcinomu stadia III a může definovat podskupinu pacientů, u které existuje vysoké riziko recidivy i přes dokončení standardní adjuvantní léčby.

Association of Prior Antibiotic Treatment With Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With Cancer

Pinato DJ, Howlett S, Ottaviani D et al.

JAMA Oncol 2019. doi: 10.1001/jamaoncol.2019.2785.



Střevní dysbióza zhoršuje odpověď na checkpoint inhibitory a zdá se, že by mohla být způsobena širokospektrální antibiotickou (ATB) terapií. Zhodnotit, zda existuje souvislost mezi terapií ATB podávanými souběžně s imunoterapií (cATB) nebo před jejím zahájením (pATB – do 30 dní před zahájením imunoterapie), celkovým přežitím (OS) a léčebnou odpovědí u pacientů se zhoubnými nádory léčenými imunoterapií v běžné klinické praxi, si dala za cíl prospektivní multicentrická kohortová studie, do které bylo zařazeno 196 pacientů léčených v období 2015–2018. Mezi 196 pacienty (137 mužů a 59 žen, medián věku 68 [27–93] let) s nemalobuněčným karcinomem plic ($n = 119$), melanomem ($n = 38$) a dalšími typy nádorů ($n = 39$) byla předchozí pATB terapie (HR 7,4; 95% CI 4,3–12,8; $p < 0,001$), ale nikoli současná cATB terapie (HR 0,9; 95% CI 0,5–1,4; $p = 0,76$) spojena s horším OS (2 vs. 26 měsíců pro terapii pATB vs. žádná pATB terapie) (HR 7,4; 95% CI 4,2–12,9) a vyšší pravděpodobností rezistence vůči imunoterapii (21 z 26 [81 %] vs. 66 z 151 [44 %]; $p < 0,001$). OS u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (2,5 vs. 26 měsíců; $p < 0,001$), melanomem (3,9 vs. 14 měsíců; $p < 0,001$) a dalšími typy nádorů (1,1 vs. 11 měsíců; $p < 0,001$) bylo trvale horší u těch, kteří dostávali antibiotickou léčbu do 30 dní před zahájením imunoterapie, oproti těm, kteří ji neměli. Tato studie naznačuje, že terapie ATB do 30 dnů před zahájením léčby imunoterapií, ale nikoli současně s ní je spojena s horší odpovědí na léčbu a OS u neselektovaných pacientů léčených imunoterapií v běžné klinické praxi.

Články vybrala a komentovala

MUDr. Jana Halámková, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

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.

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
prof. MUDr. Ladislav Dušek, Ph.D., Brno
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc., Praha
prof. 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

Čestní členové redakční rady

doc. MUDr. Juraj Kaušitz, CSc., Bratislava
prof. MUDr. Jan Klasterský, Brusel
prof. RNDr. Jan Kovařík, DrSc., Brno

výkonný redaktor

prof. MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.

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

prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc., Praha
doc. MUDr. Alexandra Kolenová, Ph.D., Bratislava
Andrea Lancía, M.D., Rome
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 Mladosičiová, 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

prof. MUDr. Ivan Koza, DrSc., Bratislava
doc. MUDr. Jozef Mardiak, CSc., Bratislava
MUDr. Zdeněk Mechl, CSc., Brno

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

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
prof. MUDr. Stanislav Špánik, CSc.

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 nebo www.klinickaonkologie.cz.

Nakladatel: Ambit Media, a.s., Prusíkova 2577/16, Stodůlky, 155 00 Praha 5, tel./fax: +420 222 352 573/572.

Odpovědná redaktorka: Mgr. Barbora Kovářová, e-mail: barbora.kovarova@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 2019 činí 540 Kč (22 eur).

Informace o předplatném a objednávky předplatitelů: www.predplatne-ambit.cz

Informace o podmínkách inzerce poskytuje a objednávky přijímá: Josef Seher, e-mail: josef.seher@ambitmedia.cz, tel.: +420 733 675 008.

Rukopisy vkládejte do redakčního systému: <http://redakce2.ambitmedia.cz/ko>; případné dotazy směřujte na e-mail klinickaonkologie@mou.cz

Redakce časopisu Klinická onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, e-mail: klinickaonkologie@mou.cz.

Pokyny pro autory naleznete na www.linkos.cz v sekci časopisu nebo na www.klinickaonkologie.cz.

Toto číslo vychází 15. 2. 2020

www.terapie.digital



**OPDIVO® – imunoterapie,
která dává šanci více pacientům**

OPDIVO®
(nivolumab)



ZKRÁCENÉ INFORMACE O PŘÍPRAVKU

▼ Tento léčivý přípravek podléhá dalšímu sledování.

Název přípravku: OPDIVO 10 mg/ml koncentrát pro infuzní roztok. **Složení:** Nivolumabum 10 mg v 1 ml koncentrátu. **Indikace:** **Melanom:** v monoterapii/kombinaci s ipilimumabem u pokročilého (neresekovatelného nebo metastatického) melanomu u dospělých. **Adjuvantní léčba melanomu:** monoterapie k adjuvantní léčbě dospělých s melanomem s postižením lymfatických uzlin nebo metastázami po kompletní resekci. **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; v kombinaci s ipilimumabem terapie pokročilého RCC v první linii u dospělých se středním nebo vysokým rizikem. **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 rekurentního nebo metastazujícího SCCHN progresujícího při nebo po léčbě platinovými deriváty u dospělých. **Uroteliální karcinom (UC):** monoterapie lokálně pokročilého neresekovatelného nebo metastazujícího UC u dospělých po selhání léčby platinovými deriváty. **Dávkování a způsob podání*:** **Monoterapie:** buď 240 mg i.v. infuzí (30 min) každé 2 týdny (všechny indikace) nebo 480 mg i.v. infuzí (60 min) každé 4 týdny (pouze indikace melanom a renální karcinom). **Kombinace s ipilimumabem:** **Melanom:** 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 (30 min) každé 2 týdny nebo 480 mg (60 min) každé 4 týdny, první dávka za 3 týdny (240 mg), resp. 6 týdnů (480 mg), a pak dále každé 2 týdny, resp. 4 týdny. **RCC:** 3 mg/kg nivolumabu i.v. infuzí (30 min) s ipilimumabem 1 mg/kg i.v. infuzí (90 min) každé 3 týdny u prvních 4 dávek, dále nivolumab i.v. infuzí 240 mg (30 min) každé 2 týdny nebo 480 mg (60 min) každé 4 týdny, první dávka za 3 týdny (240 mg), resp. 6 týdnů (480 mg), a pak dále každé 2 týdny, resp. 4 týdny. Léčba vždy pokračuje, dokud je pozorován klinický přínos nebo dokud ji pacient snáší, u adjuvantní léčby melanomu po dobu max.12 měsíců. Další podrobnosti viz SPC. **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. 5 měsíců po poslední dávce). Podle závažnosti NÚ se nivolumab vysadí a podají se kortikosteroidy. Po zlepšení se dávka kortikosteroidů snižuje postupně po dobu min. 1 měsíce. V případě závažných, opakujících se nebo život ohrožujících imunitně podmíněných NÚ musí být nivolumab trvale vysazen. U pacientů s výchozím ECOG ≥ 2 , s aktivními mozgovými metastázami, očním melanomem, autoimunitním onemocněním, symptomatickým intersticiálním plicním onemocněním a u pacientů, kteří již užívali systémová imunosupresiva, je třeba přípravek používat jen s opatrností. **Interakce:** Nivolumab je humánní monoklonální protilátka, která není metabolizována cytochromem P450 (CYP) ani jinými enzymy metabolizujícími léky. Je třeba se vyhnout podávání systémových kortikosteroidů nebo jiných imunosupresiv na počátku a před zahájením léčby. Lze je nicméně použít k léčbě imunitně podmíněných nežádoucích účinků. **Těhotenství a kojení:** Nivolumab se nedoporučuje podávat během těhotenství a fertilním 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, hypokalémie, lymfopenie, leukopenie, trombocytopenie, anémie, hyperkalcémie, hypokalcémie, hypomagnezémie, hyponatremie; u kombinace s ipilimumabem dále i hypotyreóza, hypertyreóza, snížená chuť k jídlu, bolest hlavy, dyspnoe, kolitida, zvracení, bolest břicha, artralgie, muskuloskeletální bolest, horečka, hypoglykémie a zvýšený celkový bilirubin. Další podrobnosti k NÚ, zvláště imunitně podmíněným, viz SPC. **Předávkování:** Pacienti musí být pečlivě monitorováni s ohledem na příznaky nežádoucích účinků a zahájena vhodná symptomatická léčba. **Uchovávání:** Uchovávejte v chladničce (2 °C – 8 °C) v původním obalu, aby byl přípravek chráněn před světlem. Chraňte před mrazem. **Dostupná balení:** 4 ml nebo 10 ml koncentrátu v injekční lahvičce, 1 injekční lahvička. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Bristol-Myers Squibb EEIG, Dublin, Irsko. **Registrační číslo:** EU/1/15/1014/001-003. **Datum poslední revize textu:** leden 2020. Přípravek je hrazen z veřejného zdravotního pojištění v indikaci pokročilý maligní melanom v monoterapii, pokročilý renální karcinom v monoterapii, nemalobuněčný karcinom plic a klasický Hodgkinův lymfom.

Název přípravku: YERVOY 5 mg/ml koncentrát pro infuzní roztok. **Složení:** Ipilimumabum 5 mg v 1 ml koncentrátu. **Terapeutické indikace:** **Melanom:** Monoterapie pokročilého (neresekovatelného nebo metastazujícího) melanomu u dospělých a dospívajících ve věku 12 let a starších; v kombinaci s nivolumabem léčba pokročilého (neresekovatelného nebo metastazujícího) melanomu u dospělých. **Renální karcinom (RCC):** V kombinaci s nivolumabem terapie pokročilého RCC v první linii u dospělých se středním nebo vysokým rizikem. **Dávkování a způsob podání:** **Melanom:** **Monoterapie:** Indukční režim: 3 mg/kg i.v. infuzí (90 min) každé 3 týdny, celkem 4 dávky. Celý indukční režim (4 dávky) je třeba dodržet dle tolerance, bez ohledu na vzhled nových lézí nebo růst existujících lézí. **Kombinace s nivolumabem:** 3 mg/kg ipilimumabu i.v. infuzí (90 min) s 1 mg/kg nivolumabu i.v. infuzí (30 min) každé 3 týdny u prvních 4 dávek, dále nivolumab v monoterapii i.v. infuzí 240 mg (30 min) každé 2 týdny nebo 480 mg (60 min) každé 4 týdny, první dávka za 3 týdny (240 mg), resp. 6 týdnů (480 mg), a pak dále každé 2 týdny, resp. 4 týdny. **RCC:** 1 mg/kg ipilimumabu i.v. infuzí (30 min) s nivolumabem 3 mg/kg i.v. infuzí (30 min) každé 3 týdny u prvních 4 dávek, dále nivolumab i.v. infuzí 240 mg (30 min) každé 2 týdny nebo 480 mg (60 min) každé 4 týdny, první dávka za 3 týdny (240 mg), resp. 6 týdnů (480 mg), a pak dále každé 2 týdny, resp. 4 týdny. U kombinované léčby léčba pokračuje, dokud je pozorován klinický přínos nebo dokud ji pacient snáší. Další podrobnosti viz SPC. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku. **Zvláštní upozornění:** Imunitně podmíněné nežádoucí účinky, které mohou být závažné nebo život ohrožující, se mohou týkat GIT, jater, kůže, nervové, endokrinní nebo jiné orgánové soustavy. Pokud není identifikována jiná etiologie, je nutno průjem, zvýšenou frekvenci stolic, krvavou stolicí, zvýšení jaterních testů, vyrážku a endokrinopatii považovat za zánětlivé a související s ipilimumabem. U pacientů se závažnou aktivní autoimunitní chorobou, kde je další imunitní aktivace potenciálně bezprostředně život ohrožující, se přípravek nemá podávat. **Interakce:** Ipilimumab je lidská monoklonální protilátka, která není metabolizována cytochromem P450 (CYP) ani jinými enzymy metabolizujícími léky. Je třeba se vyhnout podávání systémových kortikosteroidů nebo jiných imunosupresiv na počátku a před zahájením léčby. Lze je nicméně použít k léčbě imunitně podmíněných nežádoucích účinků. **Použití antikoagulantů zvyšuje riziko GIT krvácení; pacienti se současnou léčbou antikoagulantů musí být pečlivě monitorováni. Těhotenství a kojení:** Ipilimumab se nedoporučuje podávat během těhotenství a fertilním ženám, které nepoužívají účinnou antikoncepci. Není známo, zda se ipilimumab vylučuje do lidského mléka. **Nežádoucí účinky:** *Velmi časté:* snížená chuť k jídlu, průjem, zvracení, nauzea, vyrážka, svědění, únava, reakce v místě injekce, pyrexie, v kombinaci s nivolumabem dále i hypotyreóza, hypertyreóza, bolest hlavy, dyspnoe, kolitida, bolest břicha, artralgie, muskuloskeletální bolest, zvýšení AST, ALT, celkového bilirubinu, alkalické fosfatázy, lipázy, amylázy, kreatininu, dále hyperglykémie, hypoglykémie, lymfopenie, leukopenie, neutropenie, trombocytopenie, anémie, hypokalémie, hypomagnezémie, hyponatremie. **Další nežádoucí účinky – viz SPC. Předávkování:** Pacienti musí být pečlivě monitorováni s ohledem na příznaky nežádoucích účinků a zahájena vhodná symptomatická léčba. **Uchovávání:** Uchovávejte v chladničce (2 °C – 8 °C) v původním obalu, aby byl přípravek chráněn před světlem. Chraňte před mrazem. **Dostupná balení:** 10 ml nebo 40 ml koncentrátu v injekční lahvičce, 1 injekční lahvička. **Držitel rozhodnutí o registraci:** Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG, Dublin, Irsko. **Registrační číslo:** EU/1/11/698/001-2. **Datum poslední revize textu:** leden 2020. Přípravek je hrazen z veřejného zdravotního pojištění v indikaci pokročilý maligní melanom v monoterapii.

Výdej těchto léčivých přípravků je vázán na lékařský předpis. Dříve, než je předepíšete, přečtěte si, prosím, úplné znění příslušného Souhrnu údajů o přípravku. Podrobné informace o těchto přípravcích jsou uveřejněny na webových stránkách Evropské lékové agentury (EMA) <http://ema.europa.eu> nebo jsou dostupné u zástupce držitele rozhodnutí o registraci v ČR: Bristol-Myers Squibb spol. s r. o., Budějovická 778/3, 140 00 Praha 4, tel.: +420 221 016 111, www.b-ms.cz.

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

1506CZ2000400-01 datum schválení 24. 1. 2020