

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Prognostické a prediktivní faktory u  
bronchogenního karcinomu**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

Autor: MUDr. Ivona Grygárková

Pracoviště: Klinika plicních nemocí a tuberkulózy

Školitel: prof. MUDr. Vítězslav Kolek, DrSc.

Olomouc 2014

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: **MUDr. Ivona Grygárková**

Název disertační práce: **Prognostické a prediktivní faktory u bronchogenního karcinomu**

Pracoviště: Klinika plicních nemocí a tuberkulózy, FN a LF UP v Olomouci

Školitel: Prof. MUDr. Vítězslav Kolek, DrSc.

Klinika plicních nemocí a tbc

Fakultní nemocnice a Lékařské fakulty

Univerzity Palackého Olomouc

Rok obhajoby disertační práce: **2014**

**Klíčová slova:** bronchogenní karcinom, prognostické faktory, prediktivní faktory, adjuvantní chemoterapie, tubulin  $\beta$ III, EGFR mutace, ALK translokace

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: **MUDr. Ivona Grygárková**

Title of the doctoral thesis: **Prognostic and predictive factors in bronchogenic carcinoma**

Department: **Department of Pneumology, University Hospital  
Palacky University Olomouc**

Supervisor: **prof. MUDr. Vítězslav Kolek, DrSc.**

The year of presentation: **2014**

**Klíčová slova:** bronchogenic carcinoma, prognostic factors, predictive factors, adjuvant chemotherapy, tubulin  $\beta$ III, EGFR mutations, ALK translocation

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně pod vedením školitele prof. MUDr. Vítězslava Kolka, DrSc. Všechny použité literární a odborné zdroje řádně cituji a uvádím v seznamu použité literatury.

V Olomouci 25.1.2014

.....

Děkuji svému školiteli, prof. MUDr. Vítězslavu Kolkovi, DrSc. za odborné vedení, cenné rady a lidský přístup při zpracování disertační práce.

Děkuji Doc. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D. z Laboratoře experimentální medicíny UP v Olomouci za pomoc při vyšetřování biomarkerů z nádorové tkáně pacientů a MUDr. et MVDr. Jozefu Škardovi, Ph.D. lékaři Ústavu klinické a experimentální patologie FN Olomouc za pomoc při vyšetřování exprese  $\beta$ III tubullinu v nádorové tkáni operovaných pacientů

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Langové, PhD., odborné asistentce Ústavu lékařské biofyziky LFUP Olomouc za pomoc při statistickém zpracování výsledků této práce.

V neposlední řadě děkuji všem, kteří mi umožnili absolvovat doktorský studijní program a kteří mne po dobu studia podporovali, zejména mé rodině.

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1. Bronchogenní karcinom</b> .....	<b>9</b>
1.1.1. Epidemiologie.....	9
1.1.2. Etiologie.....	9
1.1.3. Klinický obraz a diagnostika.....	11
<b>1.2 Morfologická diagnostika bronchogenního karcinomu</b> .....	<b>12</b>
1.2.1. Malobuněčný bronchogenní karcinom (SCLC).....	12
1.2.2. Nembuněčný bronchogenní karcinom (NSCLC).....	13
<b>1.3 Prognostické faktory u bronchogenního karcinomu</b> .....	<b>15</b>
1.3.1. Stadium onemocnění.....	15
1.3.2. Grading nádoru .....	19
1.3.3. Invaze tumoru do okolí, krevních a lymfatických cév.....	19
1.3.4. Gen KRAS.....	20
1.3.5. Gen BRAF.....	22
1.3.6. Gen C-MYC.....	22
1.3.7. VEGF ( vaskulární endoteliální růstový faktor ).....	23
1.3.8. $\beta$ tubulin třídy III (TUBB3).....	25
1.3.9. MikroRNA.....	26
1.3.10. Ostatní prognostické faktory.....	29
<b>1.4. Prediktivní faktory u bronchogenního karcinomu</b> .....	<b>31</b>
1.4.1. Histologický typ nádoru.....	32
1.4.2. Expze ERCC1(excision repair cross-complemating group 1).....	33
1.4.3. Expze RRM1 ( Ribonucleotide Reduktase Subunit M1).....	33
1.4.4. Thymidilát syntetáza ( TS ).....	34
1.4.5. BRCA1 ( Breast cancer susceptibilty gene 1).....	34
1.4.6. EGFR ( Receptor pro epidermální růstový faktor).....	35
1.4.7. Gen ALK (anaplastic lymphoma kinase).....	40
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>43</b>
<b>3. METODIKA</b> .....	<b>44</b>
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>46</b>
4.1. Klinické charakteristiky souboru.....	46
4.2. Chirurgická resekce.....	49
4.3. Adjuvantní chemoterapie .....	51
4.4. Výsledky sledování souboru.....	53

<b>5. SOUHRNÉ VÝSLEDKY A DISKUSE.....</b>	<b>74</b>
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>79</b>
<b>7. ABSTRAKT .....</b>	<b>81</b>
<b>8 . SUMMARY.....</b>	<b>86</b>
<b>9 . PŘEHLED ZKRATEK.....</b>	<b>91</b>
<b>10. LITERATURA.....</b>	<b>93</b>
<b>11. SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK.....</b>	<b>109</b>

## 1 ÚVOD

Bronchogenní karcinom je celosvětově stále nejčastějším onkologickým onemocněním [1]. Společně s karcinomem mammy, kolorekta a žaludku tvoří více než 40% všech malignit. Incidence tohoto onemocnění má stoupající tendenci hlavně u žen. Bronchogenní karcinom dělíme podle morfologie a biologického chování na skupinu malobuněčných plicních karcinomů - Small Cell Lung Cancer (SCLC), které tvoří zhruba 20% všech plicních karcinomů a skupinu nemalobuněčných plicních karcinomů - Non Small Cell Lung Cancer, které se pak dělí na další histologické subtypy. Pro malobuněčné karcinomy je charakteristický rychlý růst a časně metastazování. Vzdálené metastázy jsou přítomny často v době diagnózy, a proto je prognóza tohoto onemocnění nepříznivá. Nemalobuněčné karcinomy plic rostou i metastazují později a prognóza onemocnění závisí na stadiu nemoci.

Problémem zůstává časná diagnostika onemocnění, která by umožnila vyléčení pacientů. Časná stadia této nemoci bývají bezpříznaková, proto je tento nádor u více než poloviny nemocných diagnostikován v době přítomnosti vzdálených metastáz, s nemožností radikální chirurgické léčby.

Hlavním etiologickým faktorem vzniku bronchogenního karcinomu je kouření cigaret. I přes výrazný pokrok v diagnostice i terapii v posledních letech, jsou výsledky léčby tohoto onemocnění stále neuspokojivé. Navzdory vývoji nových cytostatik nedošlo k výraznému prodloužení života nemocných, proto v poslední době dochází ke snaze o „personalizaci“ léčby, která je založena na výsledcích vyšetření molekulárně genetických charakteristik nádorových buněk. Hlavně u NSCLC je v současné době vyšetřována řada markerů, které mohou určovat prognózu a predikovat účinnější léčbu pro konkrétního pacienta.

Tato práce se zabývá sledování souboru 75 radikálně odoperovaných pacientů s NSCLC ve stadiu IB-IIIa v letech 2006 -2011, kterým byly následně podány 4 cykly adjuvantní chemoterapie ve složení platinový derivát + vinorelbin. Na základě histologie nádoru, jeho gradingu, případného postižení pleury nebo prokázané angioinvaze, hodnoty  $\beta$ -TubulinuIII, přítomnosti EGFR mutací, amplifikace genu EGFR či ALK-translokace jsme se pokoušeli zjistit, zda lze predikovat neúspěch této adjuvantní kombinace a zda lze na podkladě těchto vyšetření stanovit prognózu onemocnění, případně predikovat relaps onemocnění.



## 1.1. Bronchogenní karcinom

### 1.1.1. Epidemiologie

Jako bronchogenní karcinom se označují nádory plic a průdušek. Jedná se o časté nádory s vysokou mortalitou. Celosvětově je bronchogenní karcinom nejčastěji se vyskytujícím maligním onemocněním, v r. 2008 byl diagnostikován u 1.61 milionů lidí, což bylo 13% ze všech zhoubných onemocnění. Nejvyšší incidence je v Severní Americe, východní Asii a západní Evropě, nejnižší pak ve východní, západní a střední Africe. V počtu onemocnění na 100000 obyvatel je Česká republika na 13 místě s incidencí 34/100000 obyvatel. Na prvních 3 místech se umísťuje Maďarsko ( 52/100000), Francouzská Polynésie ( 43,6/100000) a USA (42,1/100000) [2]. V České republice došlo k nárůstu tohoto onemocnění u mužů od 20.let minulého století, u žen asi o 30 let později. Zatímco u mužů v ČR v posledních letech dochází k mírnému poklesu incidence 1980:97,6/100000, 2010:89,9/100000, u žen počet nových onemocnění stoupl za posledních 30 let více než trojnásobně 1980:10,6/100000, 2010:35,3/100000. V ČR je bronchogenní karcinom 3.nejčastější malignitou u mužů ( po karcinomu prostaty a kolorekta) i u žen (po karcinomu prsu a kolorekta). U mužů v ČR je však výrazně nejčastější příčinou úmrtí na malignitu 77,8/100000 obyvatel ( karcinom kolorekta 43,9/100000, karcinom prostaty 26,1/100000) , u žen je 3.nejčastější příčinou úmrtí na malignitu po karcinomu prsu a karcinomu kolorekta, ale zde jsou rozdíly zcela minimální ( karcinom prsu 30,9/100000, karcinom kolorekta 30,0/100000, bronchogenní karcinom 29,1/100000). Největší incidence i mortalita je v Karlovarském a Ústeckém kraji, nejnižší ve Zlínském kraji a na Vysočině. [3] V USA bronchogenní karcinom zaujímá 1.místo v mortalitě na zhoubná onemocnění u mužů i u žen. Na tuto diagnózu zde zemře každým rokem více nemocných než na karcinom střeva, prsu a prostaty dohromady [4].

### 1.1.2. Etiologie

Výjimečně lze u familiárních případů, kdy se rakovina plic opakuje ve více generacích najít zárodečnou mutaci některého ze známých tumor supresorických genů ( APC, RB1, NF2, MSH2). Roli genetických a epigenetických faktorů při vzniku rakoviny plic ukázala i studie publikovaná online v časopise Nature Genetics. Bylo uvedeno, že variace tří lokusů v genomu (dva na chromozomu 6 a jeden na chromozomu 10) je asociována s plicním karcinomem u žen nekuřáček v Asii [5]. V buňkách bronchogenního karcinomu byly pozorovány různé abnormality, jak na úrovni cytogenetické ( chromozomální aberace), molekulárně genetické i

molekulárně cytogenetické. Nejčastější genetickou alterací v primárním nádoru jsou mutace v genu p53, které se zjišťují sekvenční analýzou DNA i na úrovni exprese proteinu v nádoru (imunohistochemicky). Tento gen lokalizovaný na 17. chromozómu kóduje onkosupresorový protein p53, který reguluje apoptózu a buněčný cyklus. Mutovaný gen přestává indukovat expresi proteinu p53 a tím dochází k urychlení proliferace, inhibici diferenciac buněk, apoptózy a usnadnění angiogeneze. S horším přežíváním jsou spojena i detekce bodových mutací v onkogenu K-ras ( lokalizovaný na 6. chromozómu, kóduje G-protein zodpovídající za přenos extracelulárního signálu do jádra) nebo overexprese erbB-2. Z dalších endogenních faktorů se na vzniku bronchogenního karcinomu může podílet zvýšená aktivita cytochromu P450 (CYP) . Jde o rodinu klíčových enzymů účastnících se metabolismu cizorodých látek. V posledních desetiletích byla zkoumána souvislost vzniku rakoviny plic s různými genetickými polymorfismy CYP. Gen CYP2A6 kóduje enzym zodpovědný za mechanismus metabolismu nikotinu v lidském organismu na kotinin [6]. Osoby s delecí tohoto genu metabolizují nikotin na kotinin jen minimálně. CYP je zapojen i do metabolismu estrogenů a může hrát roli i v rozdílném riziku vzniku bronchogenního karcinomu podle pohlaví, speciálně u mladších žen. Z celkového počtu nemocných tvoří ženy nekuřačky 15-20%, zatímco muži nekuřáci jen 10% [7,8,9]. V některých studiích byla v krvi žen s NSCLC nalezena vyšší hodnota estrogenů než u kontrolního souboru zdravých žen stejného věku[10]. Dalšími několika studiemi se věnovalo souvislosti přítomnosti polymorfismu CYP a vznikem rakoviny plic v mladším věku [11,12]. CYP19A1 kóduje aromatázu, klíčový enzym v biosyntéze estradiolu. Jeho mutace může vést ke zvýšení nebo snížení aktivity aromatáz, haplotypy CCA a ACA byly nalezeny u pacientů s bronchogenním karcinomem. Zatímco CCA se vyskytuje signifikantně častěji u všech pacientů, pak ACA u nekuřáků a žen nekuřaček. [13].

Z exogenních příčin se mohou na vzniku tohoto nádoru uplatňovat vlivy biologické ( viry), ionizující záření, azbest, těžké kovy, radon, chlorované uhlovodíky, polycyklické aromatické uhlovodíky, nitrosaminy, ale nejzávažnějším rizikovým faktorem je aktivní kouření cigaret. Podle Cancer Prevention Study II zvyšuje kouření cigaret riziko onemocnění rakovinou plic u mužů 24,2x a u žen 12,5x [14]. Na světě je asi 1 miliarda mužů kuřáků a 250 milionů žen kuřaček. V České republice byla provedena řada specializovaných šetření ke zjištění prevalence kouření v populaci, v současnosti jde o dotazníková šetření prováděná Ústavem zdravotnických informací a statistiky ( ÚZIS ČR). Jde o dotazníky HIS- Health Interview Survey, šetření se provádí každé 3 roky. Poslední výzkum byl proveden v r. 2011 a výsledky se vždy srovnávají s předchozími lety. U mužů došlo k poklesu prevalence kuřáků z 49% v

r.1985 na 37% v r.1998, u žen za toto období nedošlo k výrazné změně, 28% kuřaček v r.1985 a 26% v r.1998 [15]. V r.2011 byl potvrzen další pokles celkové prevalence u mužů na 26,9% a u žen na 21,3% [16]. Naopak k vzestupu prevalence kuřáctví dochází u adolescentů [17], nejvyšší je ve věkové skupině 15-24 let, 33,7%, výraznější pokles pak nastává u občanů starších 55 let. Kouření cigaret je preventabilním faktorem a jeho omezování ve vyspělé společnosti může významně přispět ke zlepšení zdravotního stavu populace.

### **1.1.3. Klinický obraz a diagnostika**

Časná stadia bronchogenního karcinomu jsou bezpříznaková, onemocnění bývá velmi často zjištěno náhodně při předoperačním vyšetření nebo preventivní prohlídce. U pokročilých stadií nemoci se mohou vyskytovat příznaky obecné, jako je únava, slabost, váhový úbytek a subfebrilie. Z lokálních příznaků bývá až v 80 % přítomen kašel, dušnost u centrálních lézí, atelektázy nebo fluidotoraxu, hemoptýza při erozi cévy, recidivující pneumonie za maligní stenózou bronchu, při invazi tumoru do pleury, žeber nebo hrudní stěny pak bolesti na hrudníku. Při postižení n.laryngeus recurrens tumorom nebo postiženými lymfatickými uzlinami se objevuje chrapot, dysfagické potíže při útlaku jícnu tumorom nebo zvětšenými uzlinami.. Prvním projevem onemocnění mohou být i příznaky mimoplicní při generalizaci onemocnění ( CNS, skelet, játra, nadledviny). Mohou se vyskytnout i paraneoplastické syndromy, které jsou častější u malobuněčného karcinomu a jsou způsobeny produkcí biologicky aktivních látek nádorovými buňkami nebo se jedná o reakci nenádorových buněk na přítomnost nádoru. Zde řadíme syndrom nepřiměřené sekrece ADH, Cushingův syndrom, hyperkalcémii, hypertrofickou plicní osteoartropatii ( paličkovité prsty), paraneoplastické kožní projevy ( dermatózy, erytémy, Acantosis nigrans, dermatomyozitis), paraneoplastické neurologické syndromy ( neuropatie, encefalomyelopatie, myelitis, paraneoplastická cerebelární degenerace, polyneuropatie, myastenia gravis) a hematologické paraneoplastické projevy ( anémie, leukocytóza, trombocytóza, migrující tromboflebitidy)

Na základě anamnézy, klinického vyšetření a zobrazovacích metod (CT, PET/CT, MR, scintigrafie) lze vyslovit podezření na bronchogenní karcinom, které musíme potvrdit morfologicky. Nejdůležitější metodou pro morfologickou verifikaci tumoru je bronchoskopie. Kromě základní flexibilní bronchoskopie nebo videobronchoskopie máme dnes možnost využití řady dalších metod a navigačních systémů k přesnější diagnostice. K detekci premalignit a časných maligních lézí se používá autofluorescenční bronchoskopie, kdy na podkladě změněné aktivity chromoforů dochází ke změně pozorovaného světla na tmavě červené. Další metodou je Narrow band imaging, vyšetřování úzkým svazkem světla

k hodnocení normální a patologické vaskularizace sliznice. K upřesnění stagingu s možností ověření postižení mediastinálních uzlin můžeme využít endobronchiální sonografii (EBUS) a ověření malých periferních ložisek umožňuje elektromagneticky navigovaná bronchoskopie, která využívá nízkofrekvenčního elektromagnetického pole, dat virtuální bronchoskopie a vlastní bronchoskopie. Neendoskopickou metodou používanou k morfoloickému ověření periferních lézí je pak transparietální biopsie plic pod CT, skiagrafičkou nebo sonografickou kontrolou. Pokud se ani jednou z těchto metod nepodaří prokázat etiologii ložiska, je nutno použít některou z chirurgických metod. Buď mediastinoskopii k ověření postižení mediastinálních uzlin, zejména kontralaterálních nebo videotorakoskopii k ověření ložiska, v případě solitární drobné léze pak i torakotomii s resekci v rozsahu závislém na peroperační histologii. Vyšetření onkologických markerů se také běžně používá při diagnostice onemocnění, ale používají se pak spíše k monitoraci dynamiky onemocnění [18]. Jde o CEA (karcinoembryonální antigen) a CA 19-9 u adenokarcinomů, NSE (neuronspecifická enoláza) u malobuněčného karcinomu, CYFRA 21-1 (senzitivita pro spinocelulární karcinom 55%, adenokarcinom 28%, velkobuněčný karcinom 35%), TPA (tkáňový polypeptidový antigen) a SCC (antigen karcinomu ze skvamózních buněk).

## **1.2. Morfoloická diagnostika bronchogenního karcinomu.**

Podle klasifikace WHO existuje řada plicních karcinomů plic, charakterizovaných podle různých morfoloických a růstových vlastností [19]. Klasifikace nádorů plic prodělává v poslední době dynamický rozvoj. Je to podmíněno jednak novinkami v oblasti molekulární patogeneze, ale hlavně rozšiřujícími se možnostmi morfoloické diagnostiky, která je doplňována imunohistochemií. Přesné morfoloické zařazení je hlavním předpokladem identifikace pacientů vhodných pro jednotlivé druhy protinádorové léčby. Z praktického klinického hlediska dělíme bronchogenní karcinom na dva základní typy s rozdílným biologickým chováním a to malobuněčný plicní karcinom (SCLC) a nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC)

### **1.2.1. Malobuněčný bronchogenní karcinom (Small Cell Lung Cancer , SCLC)**

Jde o nádor vysokého stupně malignity, který tvoří kolem 20% všech bronchogenních karcinomů. Je charakterizován rychlým růstem a časným metastazováním, takže možnost chirurgické léčby je značně omezená. Lokalizován bývá převážně centrálně, obvykle je senzitivní k chemoterapii i radioterapii, ale doba léčebné odpovědi je krátká a i léčba recidiv

je málo úspěšná. Morfologicky jde o špatně diferencovaný neuroendokrinní karcinom, tvořený malými buňkami s velmi malým množstvím cytoplasmy. Četné jsou apoptózy, mitotická aktivita je vysoká, jádra jsou bez jadérek. Proliferační aktivita Ki67 přesahuje 80%[20]. Asi 10% tvoří kombinované malobuněčné karcinomy s příměsí nemalobuněčné komponenty ( spinocelulární karcinom, velkobuněčný karcinom nebo adenokarcinom). Po chemoterapii stoupá jejich zastoupení až na 30%, ale chování těchto nádorů je stejné jako u čistých SCLC.[20]. V některých případech nelze jednoznačně rozlišit malobuněčný karcinom od nemalobuněčného. Zde může s upřesněním diagnózy pomoci imunohistochemické vyšetření s průkazem přítomnosti neuroendokrinních markerů ( synaptofyzin, chromogranin, NSE, CD56/NCAM). Pozitivita těchto markerů svědčí pro neuroendokrinní diferenciaci nádorových buněk a umožňuje určení diagnózy malobuněčného karcinomu. Morfologická diagnostika u SCLC zůstává stěžejním vyšetřením a pro klinickou praxi je i základním prognostickým a prediktivním faktorem.

### **1.2.2. Nemalobuněčný bronchogenní karcinom (Non Small Cell Lung Cancer, NSCLC)**

Nemalobuněčné plicní karcinomy tvoří kolem 80%, jejich růst je většinou pomalejší než u SCLC a dělíme je na další histologické subtypy, z důvodu odlišné odpovědi na dané léky. Podle klasifikace WHO z r.2004 se rozlišují tři hlavní typy nemalobuněčného karcinomu plic a to spinocelulární karcinom, adenokarcinom a velkobuněčný karcinom. Kromě toho pak existují i méně obvyklé karcinomy. Spinocelulární ( dlaždicobuněčný karcinom) je nádor vycházející z bronchiálního epitelu, jeho histologická diagnóza je založena na přítomnosti mezibuněčných můstků a/nebo keratinizaci. Existuje několik variant spinocelulárního karcinomu - papilární, světlobuněčný, malobuněčný a bazaloidní karcinom. Většinou tyto varianty obsahují i oblasti typického dlaždicobuněčného karcinomu. Imunohistochemicky tento nádor exprimuje různé typy cytokeratinů, včetně cytokeratinu 5/6. Typická je pozitivita p63, exprese p40 je důležitá k rozlišení adenokarcinomu, u kterého je p40 negativní [20]. Pozitivita TTF1 je vzácná a pouze fokální. Spinocelulární karcinom je v ČR stále nejčastěji zastoupeným nemalobuněčným karcinomem plic. Adenokarcinom- v USA je nejčastějším histologickým typem karcinomu plic jak u mužů, tak i u žen [21]. V České republice je druhým nejčastějším nádorem celkově, nejčastějším histologickým typem u žen, ale v posledních letech je zaznamenán nárůst počtu adenokarcinomů. Zejména v pneumoonkologických centrech se jedná již o nejčastější typ NSCLC např. Pneumologická klinika 2.LFU, FN Motol a FN Olomouc [22,23]. V roce 2012 byl na Klinice plicních nemocí

a tbc FN Olomouc diagnostikován adenokarcinom u více než 58% pacientů s NSCLC [23]. Adenokarcinomy plic představují širokou skupinu odlišných nádorových jednotek. V posledních letech došlo ke změnám v klasifikaci adenokarcinomů, dříve klasifikovaných jako bronchioloalveolární karcinom (BAC), kdy došlo k nahrazení názvem adenokarcinom s převážně lepidickým způsobem růstu. Nejnovější klasifikace adenokarcinomů plic vznikla podle doporučení IASCLC ( International Association for Study of Lung Cancer), ATS ( American Thoracic Society) a ERS ( European Respiratory Society). Byly nově zavedeny termíny adenokarcinoma in situ (AIS) – nádor 3cm a menší ( dříve BAC), který se dále může dělit na nemucinózní, mucinózní a smíšený mucinózní/nemucinózní. Další jednotkou je minimálně invazivní adenokarcinom (MIA)- nádor 3 cm a menší s predominantně lepidickým způsobem růstu s ložiskem invaze 0,5 cm nebo menším. Opět se může vyskytovat ve variantě nemucinózní, mucinózní a smíšené. Pokud je invaze větší než 0,5 cm, pak již hovoříme o invazivním adenokarcinomu. Ten se dělí na následující podskupiny: s predominantně lepidickým způsobem růstu, predominantně acinární, predominantně papilární, predominantně mikropapilární a predominantně solidní s hlenotvorobou. Variantami invazivního karcinomu jsou: invazivní mucinózní adenokarcinom ( původně mucinózní varianta BAC), koloidní, fetální a enterický [20]. Diagnóza plicního adenokarcinomu se opírá o rozpoznání žlázné diferenciace a použití markerů odlišující adenokarcinom od spinocelulárního karcinomu. Nejčastějšími markery jsou histochemický průkaz hlenotvorby užitím alciánové modři, imunohistochemická reakce proti TTF-1, ale ta může být v 10-15% případů negativní, napsinu A, surfaktanovému proteinu, cytokeratinu 7. Jaderná pozitivita p63 se vyskytuje u 20-30% adenokarcinomů, ale je jen slabá a fokální. Vzorek, který nemá jednoznačné diagnostické známky adenokarcinomu, ale imunohistochemická vyšetření odpovídají tomuto typu nádoru je označován jako nemalobuněčný karcinom, nejspíše adenokarcinom. Adenoskvamózní karcinom obsahuje komponentu spinocelulárního karcinomu i adenokarcinomu, přičemž minoritní složka musí tvořit aspoň 10% nádoru. Velkobuněčný karcinom je vzácnějším nádorem. Jde o nediferencovaný karcinom tvořený velkými buňkami s jádérky a vysokou mitotickou aktivitou [24]. Představuje méně než 10% bronhogenních karcinomů [25]. Ještě vzácnějším pak je mukoepidermoidní karcinom, kdy jsou v nádoru přítomny buňky dlaždicové, hlenotvorné a intermediární. Histologicky je tento nádor identický se stejnojmenným nádorem slinných žláz [20].

### 1.3. Prognostické faktory u bronchogenního karcinomu

Prognostické faktory jsou data, která umožňují odhadnout další průběh onemocnění bez ohledu na zvolenou terapii. Patří sem zejména stadium onemocnění, grading tumoru, invaze tumoru do pleury nebo angioinvaze, exprese VEGF, kvalita života, váhový úbytek, hodnoty onkomarkerů, LDH, anémie, přítomnost amplifikace genu C-MYC, KRAS mutace [26]. Řada z nich může mít kromě prognostického významu i význam prediktivní. Dalšími prognostickými faktory vyšetřenými z nádorové tkáně pak jsou exprese  $\beta$ -Tubulinu III, u malobuněčného karcinomu úroveň exprese neuroendokrinních markerů. Zvýšená exprese ERCC1 nebo zvýšená exprese RRM1 jsou příznivým prognostickým ukazatelem u časných stadií NSCLC [27].

#### 1.3.1. Stadium onemocnění

U malobuněčného karcinomu je z praktického hlediska vhodné používat zjednodušenou klasifikaci, která byla původně zavedena americkými odborníky sdruženými ve VALG (Veterans Administration Lung Cancer Group). Tato klasifikace pak byla zrevidována v r.1999 a pozměněna pracovní skupinou IASLC a používá dělení na limitovanou formu onemocnění (limited disease -LD) a extenzivní formu onemocnění (extensive disease -ED) [28]. U limitované formy onemocnění je postiženo jedno plicní křídlo s postižením stejnostranných nebo i kontralaterálních mediastinálních uzlin, mohou být postiženy i supraklavikulární uzliny a může být přítomen i pleurální výpotek na postižené straně. Jde tedy o takový rozsah postižení, které lze zahrnout do jednoho ozařovacího pole. Asi 30% pacientů s malobuněčným plicním karcinomem je diagnostikováno s tímto rozsahem onemocnění. Onemocnění přesahující rozsahem LD se označuje jako extenzivní. U limited disease se udává střední doba přežití bez léčby asi 3 měsíce, při použití chemoterapie 12-14 měsíců a při kombinaci chemoterapie s radioterapií dochází k jejímu prodloužení na 16-20 měsíců. U extensive disease se medián přežití pacientů bez léčby pohybuje kolem 6 týdnů, s použitím chemoterapie dochází k jeho prodloužení na 7-8 měsíců. 2 roky přežívá asi 5% pacientů s SCLC [29]. Pro určení rozsahu, způsobu léčby a prognózy u NSCLC je používána TNM klasifikace, která přesně definuje klinická stadia onemocnění. TNM klasifikace s vývojem diagnostických i léčebných trendů prošla inovací a přehodnocením. V současné době je v platnosti klasifikace z roku 2009 (sedmá v pořadí) [30]. V této klasifikaci je nově rozlišováno 5 skupin velikosti nádoru, kdy hranice velikosti jsou 2,3,5 a 7 cm. Došlo i ke

změně hodnocení satelitního nádorového uzlu ve stejném laloku z původního T4 na T3, i satelitního nádorového uzlu v jiném laloku z M1 na T4 a tím i snížení stadia onemocnění. Přítomnost pleurálního výpotku je nově hodnocena jako M1a, stejně jako postižení plic metastázami. Vzdálené metastázy jsou hodnoceny jako M1b [31]. Podrobná klasifikace a stadia onemocnění jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.



**Tabulka 1: Parametry nové TNM klasifikace**

<b>T</b>	<b>Primární tumor</b>
TX	Primární tumor nelze hodnotit nebo byla prokázána přítomnost maligních buněk ve sputu nebo bronchiálním výplachu, ale nádor nebyl prokázán zobrazovacími vyšetřeními nebo bronchoskopicky
T0	Primární tumor neprokázán
TIS	Karcinom in situ
T1	Tumor dosahující maximálně 3 cm v největším rozměru. Tumor je obklopen plicní tkání nebo viscerální pleurou. Bronchoskopické šíření proximálním směrem nepřesahuje lobární bronchus ( nešíří se do hlavního bronchu)
T1a	Nádor do 2 cm v největším rozměru
T1b	Nádor větší než 2 cm, ale ne větší než 3 cm v největším rozměru
T2	Nádor větší než 3 cm, ale ne větší než 7 cm, nebo postihuje hlavní bronchus nebo je spojen s atelektázou nebo obstrukční pneumonitidou, která nepostihuje celou plíci
T2a	Nádor větší než 3cm, ale ne větší než 5 cm v největším rozměru
T2b	Nádor větší než 5cm, ale ne větší než 7 cm v největším rozměru
T3	Nádor větší než 7 cm nebo postihuje některou z následujících struktur –hrudí stěnu, bránici, n.phrenicus, med.pleuru, parietální pleuru nebo nádor v hlavním bronchu do 2 cm od kariny nebo s přidruženou atelektázou nebo obstrukční pneumonitidou postihující celou plíci nebo satelitní nodule ve stejném laloku
T4	Nádor jakékoliv velikosti s postižením mediastina, srdce, velkých cév, trachey, n.laryngeus recurrens, jícen, tělo obratle, karinu nebo satelitní nodule v jiném laloku stejnostranné plíce než primární nádor
<b>N</b>	<b>Postižení regionálních lymfatických uzlin</b>
NX	Regionální uzliny nelze hodnotit
N0	Regionální uzliny bez metastáz
N1	Metastázy v ipsilaterálních peribronchiálních a/nebo ipsilaterálních hilových uzlinách a uzlinách intrapulmonálních
N2	Metastázy v ipsilaterálních mediastinálních uzlinách a/nebo subkarinálních mízních uzlinách
N3	Metastázy v kontralaterálních mediastinálních uzlinách, kontralaterálních hilových, ipsilaterálních nebo kontralaterálních skalenických nebo supraklavikulárních uzlinách
<b>M</b>	<b>Vzdálené metastázy</b>
M0	Bez vzdálených metastáz
M1a	Satelitní nádorový uzel v kontralaterálním laloku nebo přítomnost nodulů na pleuře nebo maligní pleurální nebo perikardiální výpotek
M1b	Vzdálené metastázy

**Tabulka č.2: Zařazení do klinických stadií podle stávající klasifikace**

okultní karcinom	TX	N0	M0
stadium 0	TIS	N0	M0
stadium IA	T1a, T1b	N0	M0
stadium IB	T2a	N0	M0
stadium IIA	T2b	N0	M0
	T1a,T1b,T2a	N1	M0
stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
stadium IIIA	T1a,b, T2a,b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
stadium IIIB	T4	N2	M0
	jakékoliv T	jakékoliv N	M0
stadium IV	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

Mezi lety 1990 a 2010 došlo v ČR ke snížení počtu nemocných diagnostikovaných ve stadiu I a II z 30% na 16% a to určitě vzhledem k přesnější diagnostice, proto klesá i počet nediodagnostikovaných onemocnění [3]. Procentuální počet zastoupení klinických stadií v r. 1990 a 2010 je uveden v tabulce č.3.

**Tabulka č.3: Procentuální zastoupení jednotlivých stadií v letech 1990 a 2010**

	1990	2010
stadium I	16,3%	10,2%
stadium II	13,6%	5,8%
stadium III	23,3%	23,9%
stadium IV	29,9%	51,1%
neznáno	16,9%	9%

Přežívání pacientů je nejvyšší u počátečních stadiích onemocnění, kdy pro stadium I se udává pětileté přežití v rozmezí 60-70%, u st.II 30-50% a u st.IIIA 10-30%. Data v USA z

National Cancer Institute's Surveillance Epidemiology and End Results udávají následující pětileté přežívání pacientů, kteří byli diagnostikováni mezi lety 1998-2000. Stadium IA 49%, IB 45%, IIA 30%, IIB 31%, IIIA 14%, IIIB 5% a st.IV 1% [32]. Stadium onemocnění v době diagnózy je tedy významným prognostickým faktorem dlouhodobého přežití nemocných.

### **1.3.2. Grading nádoru**

Gradingem nádoru označujeme stupeň jeho předpokládané agresivity a diferenciaci. Grading je založen na hodnocení proliferační aktivity a stupně diferenciaci nádorových buněk. Při stanovení diferenciaci buňky se opíráme o nukleoplazmatický poměr, který narůstá s mírou anaplazie, velikost a pravidelnost buňky, schopnost formovat určité struktury (např. žlázné tubuly), stupeň soudržnosti s ostatními buňkami a přítomnost nebo nepřítomnost jádérka nebo více jadérek. Proliferační aktivitu lze sledovat různými metodami, nejčastěji stanovením mitotického indexu a imunohistochemickými metodami (Ki67) [33]. Na základě gradingu se maligní nádory rozdělují do 4 skupin podle narůstajícího stupně anaplazie (G1-G4), u adenokarcinomu plic je grading třístupňový GI-III [20]. Vyšší stupeň gradingu znamená horší prognózu onemocnění.

### **1.3.3. Invaze tumoru do okolí, krevních a lymfatických cév**

Invaze nádorových buněk z primárního nádoru do okolí a cév závisí na schopnosti nádoru aktivovat proteolytické enzymy, které rozpouštějí bazální membrány a vazivovou tkáň [34]. Patří zde matriční metallo-proteolytické enzymy (MMP –matrix metalloproteinázy), jako např. kolagenáza IV. Zvýšená aktivita těchto enzymů zvyšuje šanci nádorové buňky na proniknutí přes bazální membránu. Za fyziologických podmínek jsou MMP regulovány specifickými inhibitory, např. TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases). Pokud v nádorových buňkách dojde ke ztrátě exprese TIMP, dojde ke zvýšení aktivity proteolytických enzymů a tím k navýšení agresivního potenciálu buněk. Kromě MMP je důležitý i systém u-PA (urokinase- typ-plasminogen-activator-systém), který se skládá ze serinové protézy plazminu, jejich aktivátorů t-PA a u-PA a inhibitorů alfa2-antiplasminu PA1 a PA2 (PA- plasminogenní aktivátor) [35]. Plasmin je za normálních podmínek aktivován u-PA, ten je kontrolován oběma inhibitory PA1 a PA2. Výpadek těchto inhibitorů má za následek zvýšení invaze nádorových buněk a metastazování. Vysoká koncentrace u-PA v nádorové tkáni je nepříznivým prognostickým faktorem [36]. Po invazi do sliznice pronikají nádorové buňky do lymfatických a krevních cév. Těmi buď cestují s proudem tekutin nebo se usadí a množí se. Invaze do okolí i do cév zhoršuje prognózu pacienta, protože dochází k šíření nemoci.

#### 1.3.4.Gen KRAS

KRAS gen patří do rodiny savčích RAS genů. Před více než 40 lety byly objeveny vysoce onkogenní RNA viry, které způsobovaly nádory Harvey a Kirsten myšního sarkomu. Ty indukují vznik sarkomů a erytroleukémii u krys [37]. Tyto virové onkogeny byly pojmenovány HRAS a KRAS. Spojitost těchto genů s karcinomy u lidí byla zjištěna na základě studií přenosu genu, kdy byly zjištěny transformující a mutované formy KRAS v buněčných liniích karcinomu plic a tlustého střeva. Stejným způsobem byl identifikován v neuroblastomu 3.člen této rodiny NRAS. Tyto RAS geny kódují proteiny, které patří do tzv. superrodiny guanosin-5'-trifosfatáz (GTPáz). V normálních klidových buňkách je RAS vázán na guanosindifosfát (GDP) a není aktivní. K přechodné tvorbě aktivní formy RAS vázané na guanosintrifosfát (GTP) způsobují extracelulárními podněty (např.epidermální růstový faktor). Tento aktivovaný komplex se váže na celou řadu efektorových cílů (kinázy RAF). KRAS je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 12. Mutované geny KRAS postihují oblast regulující úroveň enzymatické aktivity a tím dochází k trvalé aktivitě proteinu KRAS nezávislé na stimulu. Například mutace kodonu, který kóduje aminokyselinu glycin (aminokyselina bez postranního řetězce) v pozici 12, vede k začlenění jiné aminokyseliny s postranním řetězcem. Tím je narušena hydrolýza GTP a zpětné uvedení KRAS do inaktivního stavu. Nepřetržitá aktivace KRAS pak vede ke zvýšení proliferace a snížení apoptózy. Až 90% mutací se vyskytuje v kodonech 12 (90%), 13 a 61 [38,39], v menším počtu pak i v kodonu 146 [40]. Většinou jsou spojené s kouřením a převážně se vyskytují u adenokarcinomů a v kavkazské populaci[38,41]. Spojitost s kouřením prokázala nedávná analýza, kdy u kuřáků nebo bývalých kuřáků se vyskytovala KRAS mutace v 26% případů, zatímco u nekuřáků jen v 6% případů[42]. Pro přesnou charakteristiku nádorových buněk se stále častěji využívá cytogenetického vyšetření jádra na řezech nádorovou tkání metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Používají se fluorescenčně značené DNA sondy, které sekvenčně odpovídají detekovanému úseku na chromozomu. Sondy jsou za specifických podmínek hybridizovány na tkáňové preparáty, které jsou fixovány na podložním skle. Počet kopií genu přítomného v jednotlivých nádorových buňkách je stanoven při odečítání počtu fluorescenčních signálů. Míra exprese genu se stanovuje histologickou metodou –imunohistochemickou reakcí na úrovni proteinů (IHC). Přítomnost exprimovaných proteinů je prokazována pomocí specifických protilátek s navázanými chemickými sloučeninami umožňujícími jejich vizualizaci. Identifikaci bodových mutací v oblasti genu, která vede k aktivaci proteinu umožňují metody molekulární diagnostiky. Nejcitlivější je polymerázová řetězová reakce v reálném čase (QPCR) s alelicky specifickými primery (např.

Kity K-RAS TheraScreen DxS), je možné i využití senzitivních, ale časově náročných DNA hybridizačních technik (K-ras Strip Assay) [43]. Mutace KRAS se vyskytují zhruba asi u 20% pacientů s NSCLC. Slebos a kol. zkoumali u pacientů s NSCLC vztah mezi pozitivitou KRAS, charakteristikou nádoru a přežíváním. Nádory u pacientů s pozitivní KRAS mutací byly menší, hůře diferencované. Soubor tvořilo 23 žen a 46 mužů s NSCLC ve stadiích IA-IIIa. Z celkového počtu 19 pacientů s mutací zemřelo 12 během sledovaného období ve srovnání s 16 z 50 pacientů bez mutace, což bylo statisticky významné ( $p=0.002$ ) a tento rozdíl v prognóze mezi těmito 2 skupinami byl také zaznamenán v trvání doby bez příznaku onemocnění [44]. V roce 2005 byly zveřejněny výsledky metaanalýzy, která v 28 nezávislých studiích porovnávala prognostický význam KRAS mutace. V této analýze bylo zařazeno 3620 pacientů a bylo prokázáno horší přežití u těch, kteří měli mutaci [45]. V další analýze byl KRAS statisticky velmi významným prognostickým faktorem u adenokarcinomů, u spinocelulárních karcinomů se to nepotvrdilo. V r.2007 v Kanadě bylo vyšetřováno 450 pacientů s resektovaným NSCLC ve stadiu IB-II, kteří byli následně léčeni adjuvantní chemoterapií ve složení cisplatinu + vinorelbin nebo byli jen sledováni. Z této skupiny mělo přítomnu mutaci KRAS 117 pacientů, ale nebylo zde prokázáno horší celkové přežití ve srovnání s pacienty bez mutací [46,47]. I další studie z r.2008 ale nepotvrdily mutaci genu KRAS jako nezávislý prognostický faktor. [48]. Skupina autorů v Plzni vyšetřovala mutaci genu KRAS společně s mutací genu EGFR a PIK3CA u 223 pacientů se spinocelulárním karcinomem. V tomto souboru byla prokázána mutace genu KRAS u 16 z 215 pacientů (7,4%), U těchto pacientů nebyl prokázán rozdíl v době do progresse onemocnění (PFS – progression free survival), ale byla prokázána kratší doba přežití pacientů s mutací KRAS (OS – overall survival) [49]. Prognostický význam mutací genu KRAS u NSCLC zatím zůstává neobjasněn.

Narozdíl od prognostické role KRAS mutací byl potvrzen jejich prediktivní význam pro léčbu inhibitory tyrozinkináz u NSCLC. Analýza vzorků pacientů zařazených do studie fáze III TRIBUTE, kdy byli nemocní s pokročilým NSCLC léčeni v I.linii kombinací chemoterapie a placeba nebo kombinací chemoterapie a erlotinibu ukázala, že mutace KRAS byla nalezena přibližně u 21% nádorů. Pacienti s mutací měli signifikantně horší celkové přežití i kratší dobu do progresse [50]. Tyto horší výsledky byly rovněž zaznamenány u pacientů s pokročilým NSCLC s KRAS mutací v randomizované studii fáze III BR.21 léčených ve druhé nebo třetí linii erlotinibem versus placebem [51]. Ke stejným závěrům dospěla metaanalýza, která shrnovala výsledky 22 studií. Do této metaanalýzy bylo zařazeno 1470 pacientů s NSCLC, KRAS mutace byla detekována u 231, tedy v 16% případů. I zde

bylo potvrzeno, že přítomnost mutací KRAS je negativním prediktivním faktorem pro léčbu NSCLC inhibitory tyrozinkinázy [42]. Většina studií dokázala, že KRAS mutace a mutace genu EGFR se vzájemně vylučují, mají tzv. mutační exkluzivitu, proto je klinický význam KRAS vyšetření u NSCLC velmi nízký.

### **1.3.5.Gen BRAF**

U zdravých buněk je BRAF součástí vysoce regulované distální dráhy, která zprostředkovává účinky receptorů pro růstový faktor. Gen BRAF kóduje nereceptorovou serin/threonin kinázu. Ta je v signální dráze aktivována za proteinem Ras, s kinázovou doménou, která má podobnou strukturu jako jiné proteinkinázy včetně receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) a HER2 receptoru. [52,53]. Kináza BRAF navazuje na aktivovaný KRAS a přenáší signál dále směrem k jádru. Somatické mutace BRAF byly prokázány v různých typech solidních nádorů, hlavně v maligním melanomu [54]. Dále taky v papilárním karcinomu štítné žlázy[55], sporadicky v kolorektálních karcinomech [56], low-grade serózním karcinomu vaječníku[57] a plicních karcinomech[58]. V genu BRAF je mutace nejčastěji detekována v kodonu 600, kde dochází k záměně aminokyseliny valin za kyselinu glutamovou –mutace V600E. Tím dojde k aktivaci kinázy BRAF, která se stává nezávislá na signalizaci z EGFR a tím podporuje transformaci buňky v nádorovou. Tato mutace se vyskytuje u 1,5-2,8% adenokarcinomu plic. Nádory s mutací V600E se často vyznačují mikropapilárními rysy a jsou spojeny s horší prognózou onemocnění [59,60]. Ve studii fáze II BRF 113928 byli pacienti s touto mutací léčeni dabrafenibem. Zařazení byli pacienti se st.IV NSCLC, u kterých došlo k progresi po předchozí chemoterapii. Dabrafenib byl podáván perorálně 2x denně v dávce 150 mg. Kontroly nemoci bylo dosaženo u 60% z nich, parciální regrese ve 40% případů, stabilizace onemocnění u 20% nemocných. K progresi onemocnění došlo u 30% pacientů s touto terapií. [61]. Dabrafenib je v současnosti používán k terapii metastatického melanomu s mutací BRAF V600E. Přítomnost této mutace v nádoru je prediktivním faktorem této léčby. Mutace BRAF a KRAS se vyskytují současně u téhož pacienta jen velmi vyjimečně (0,6%).

### **1.3.6.Gen C-MYC**

Gen C-MYC je lokalizován v oblasti 8q24 . C-MYC protoonkogen kóduje jaderný protein, který je exprimován u řady buněčných typů. Je zodpovědný za růst buněk a regulace G1 fáze buněčného cyklu a rovněž je zahrnut v myeloidní diferenciaci. K jeho změnám dochází

v souvislosti s maligní transformací, kdy dochází k jeho amplifikaci nebo translokaci s jiným genem. Nejčastější aberaci představuje translokace t(8;14) (q24;q32), jejímž následkem je fúze genu C-MYC a genu pro těžký řetězec imunoglobulinu H (IgH). Tato translokace se vyskytuje velmi často u maligního Burkittova lymfomu [62]. Protoonkogen C-MYC kóduje transkripční faktor C-MYC, který hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu a hraje klíčovou úlohu v mnoha buněčných procesech jako je buněčný růst, proliferace, buněčná diferenciaci a apoptóza. Ke zvýšené expresi C-MYC v nádorových buňkách dochází prostřednictvím různých mechanismů, jako je amplifikace genu, chromozomální translokace, jaderným polymorfismem v regulační oblasti, mutacemi v nadřazených signálních drahách a mutacemi, které zvyšují stabilitu proteinů [63,64,65]. MYC je onkogen, u kterého se amplifikace vyskytuje nejčastěji. Amplifikace MYC byla nalezena u řady nádorů i u karcinomu plic. Zvýšená exprese jeho produktu transkripčního faktoru C-MYC je spojena s vyšší agresivitou nádoru a špatnou prognózou. [66]. Amplifikace MYC se vyskytuje u malobuněčného i nemalobuněčného karcinomu plic. Výskyt je častější u SCLC a její přítomnost u pacientů s relabujícím SCLC je spojena s kratším přežitím [67]. K detekci translokací zahrnujících C-MYC se v současné době používá fluorescenční in-situ hybridizace ( FISH).

### **1.3.7. VEGF ( vaskulární endoteliální růstový faktor )**

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) je nejdůležitějším proangiogenním faktorem ve vývoji nádoru. Nádor, který přesáhne určitou velikost ( 1mm<sup>3</sup> ) potřebuje systém cév k dodávání živin a kyslíku. V r.1980 byl izolován VEGF jako silný stimulátor růstu endotelových cév, který aktivuje tyrozinkinázové receptory na povrchu buněk endotelu a je tak hlavním regulátorem normálního i patologického růstu cév. VEGF je produkován nádorem zejména při hypoxii. Nádorové cévy jsou nevyzrálé s nepravidelným prouděním v cévní síti, proto je průnik cytostatik k nádorové buňce obtížný [68]. Angiogeneze je nutná k růstu i metastázování nádoru. U nemocných s nádory je hladina VEGF zvýšena jak v tělesném oběhu, tak i v nádorové tkáni. Vysoká produkce VEGF je spojena s horší prognózou onemocnění. VEGF je glykoprotein vážící heparin. Patří do podskupiny cytokinů, která je odvozena od destičkového růstového faktoru. VEGF se primárně váže na dva receptory nacházející se na vaskulárních endotelových buňkách vyvíjejících se tkání, a to VEGF- receptor 1( VEGFR-1) a VEGF-receptor-2 (VEGFR-2). Vazbou VEGF na receptor se aktivují signální cesty a tím i stimulace angiogeneze. Protilátky proti VEGF se váží na VEGF,

tím znemožní jeho vazbu na receptory nebo blokují přímo receptory [43]. Touto cestou dochází k regresi nově vytvořených cév, v úvodní fázi potom k normalizaci krevního řečiště v nádoru, v jehož důsledku pak dochází i k lepšímu průniku protinádorových léků. V další fázi pak zabraňují vzniku nových cév, čímž znemožňují růst nádoru i metastáz. Protože po ukončení léčby se růst nádorových cév obnovuje, je nutno léčit těmito léky až do progresu onemocnění. Prvním lékem registrovaným v I.linii léčby NSCLC je bevacizumab (Avastin). Jedná se o humanizovanou verzi myší protilátky třídy IgG a je z 93% lidského a ze 7% myšího původu. Po nitrožilním podání dochází k blokování vazby VEGF na receptor a tím k inhibici angiogeneze, ale také ke snížení intersticiálního tlaku v nádoru a tím i lepšímu průniku nízkomolekulárních cytostatik. Bevacizumab je indikován v I.linii léčby nemocných s NSCLC jiného histologického typu než predominantně z dlaždicových buněk v kombinaci se standardním platinovým režimem chemoterapie. Po ukončení chemoterapie při léčebné odpovědi pokračuje léčba až do progresu onemocnění. Účinnost a bezpečnost tohoto preparátu byla prokázána v několika studiích [69]. V americké studii E4599 byl v jednom rameni podáván bevacizumab každé 3 týdny v dávce 15 mg/kg s chemoterapií ve složení CBDCA, paklitaxel, v druhém rameni byli pacienti léčeni jen chemoterapií. V rameni s bevacizumabem byl dosažen větší počet léčebných odpovědí ( 35% vs.15%), delší přežití bez progresu (6,2 vs 4,5 měsíce) i delší celkové přežití (12,3 vs.10,3 měsíce). Ještě výraznější posun v délce přežití došlo u podskupiny nemocných s adenokarcinomem – 14,2 měsíce[70] . V další studii fáze III AVAiL byl bevacizumab podáván ve dvou různých dávkách 7,5 mg/kg nebo 15 mg/kg každé 3 týdny s chemoterapeutickým režimem cisplatina + gemcitabin. Ve srovnávacím rameni bylo s chemoterapií podáváno placebo. Větší četnosti léčebných odpovědí bylo dosaženo v rameni s bevacizumabem a to u dávky 7,5 mg/kg než ve srovnání s placebem ( 34% vs.20%) i delšího přežití bez progresu (6,8 vs.6,2 měsíce), ale v této studii nedošlo k statisticky významnějšímu prodloužení celkového přežití ( 13,6 vs.13,1 měsíce). To mohlo být způsobeno, tím, že skoro dvě třetiny nemocných byli dále léčeni jinou protinádorovou terapií [71]. Ve studii fáze IV SAiL byl bevacizumab přidán k jakémukoli standardnímu režimu chemoterapie první linie. Do této studie bylo zařazeno více než 2000 nemocných. Bylo dosaženo četnosti odpovědi 50,8%, střední doby do progresu 7,8 měsíce a doby středního celkového přežití 15,3 měsíce. Vzhledem k riziku krvácení byli vyřazeni nemocní s dlaždicobuněčným karcinomem, z dalších nežádoucích účinků byla nejčastěji pozorována hypertenze [72]. Exprese VEGF koreluje s prognózou u řady nádorů, ale není prediktivním faktorem, protože doposud nebyl prokázán vztah mezi expresí VEGF a účinností terapie



### 1.3.8. $\beta$ tubulin třídy III (TUBB3)

$\beta$  tubulin třídy III je protein o molekulové hmotnosti 50kD. Je kódovaný genem lokalizovaným na dlouhém raménku 16. chromozomu. Jako člen tubulinové „rodiny“ se podílí na tvorbě mikrotubulů. V současné době je pokládán za jeden z markerů časných fází neuronální diferenciace, a to jak za vývojových podmínek, tak i ve tkáni nádorové [73]. TUBB3 u NSCLC je jak prognostickým, tak i prediktivním faktorem. Vysoká exprese TUBB3 je spojena s horší odpovědí na léčbu chemoterapií, rychlejší progresí onemocnění a kratší dobou přežití nemocných.  $\beta$  tubulin společně s  $\alpha$  tubulinem jsou stavebními prvky mikrotubulu. Tyto dva tubuliny se slučují do heterodimeru. Oba tyto tubuliny vytvářejí lineární vlákno se střídajícími se podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ , které je označováno jako protofilamentum. Mikrotubulus je tvořen z 13 protofilament, jeden jeho konec je označován jako (-) zakončený jen  $\alpha$  tubuliny, druhý konec (+) jen  $\beta$  tubuliny. Mikrotubulus roste jen na plusovém konci. Klíčovou úlohu při růstu nebo rozpadu mikrotubulů hraje přeměna GTP na GDP. Vazba GTP k  $\alpha$  tubulinu je stabilní, ale při vazbě k  $\beta$  tubulinu může být GTP hydrolyzován na GDP, čímž dochází ke změně mechanické vlastnosti  $\beta$  tubulinu. TUBB3 ovlivňuje tvorbu mitotického vřeténka. Pomocí látek, které jsou používány jako protinádorové léky je možné mikrotubuly buď stabilizovat pomocí paklitaxelu nebo naopak depolymerizovat například pomocí kolchicinu [74]. TUBB3 ovlivňuje tvorbu mitotického vřeténka a proběhla řada studií zaměřených na možnost predikce lepší odpovědi určitých cytostatik v adjuvantní chemoterapii [75]. Inhibici polymerace mikrotubulů způsobují Vinca alkaloidy, které se váží na buněčné mikrotubuly a blokují jejich funkci. Místem vazby je mikrotubulární protein tubulin, specificky se váží na obě jeho podjednotky  $\alpha$  i  $\beta$  během S fáze buněčného cyklu. Po tomto navázání je ukončena formace mikrotubulů, je vyvolána jejich depolymerizace a rozpuštění mitotického vřeténka. Výsledkem je zástava mitózy. Taxany se také váží na mikrotubuly, ale vazebné místo je jiné. Navázání taxanů inhibuje depolymerizaci mikrotubulů, která normálně v buňce nastává na konci buněčného dělení. Buňky s nerozloženými tubuly se přestávají dělit a růst. Řada studií prokázala prognostický význam exprese TUBB3, ale další studie zkoumaly TUBB3 jako prediktivní faktor přežití u pacientů s resektovaným NSCLC. Seve a kol. publikovali signifikantní prodloužení celkového přežití pacientů s vysokou expresí TUBB3, který byla podána chemoterapie ve složení cisplatina + vinorelbin ve srovnání s pacienty, kteří nepodstoupili adjuvantní léčbu [76]. V řadě studií bylo prokázáno, že vysoká exprese TUBB3 je spojená s rezistencí nádorových buněk na paklitaxel (NSCLC, karcinom ovária, karcinom prostaty, karcinom prsu) a u karcinomu pankreatu

s rezistencí na docetaxel.[77,78,79,80]. V řadě dalších studií pak bylo potvrzeno, že u pacientů s pokročilým NSCLC je nízká exprese TUBB3 spojena s odpovědí na léčbu a lepšími klinickými výsledky, pokud jsou léčeni preparáty, které inhibují depolymerizaci mikrotubulů [81,82,83,84,85]. Výsledky těchto studií naznačují, že  $\beta$ -tubulin třídy III by mohl být dobrým prediktivním faktorem, s možností vybrat spávnou léčbu pro konkrétního pacienta.

### **1.3.9.MikroRNA**

MikroRNA (miRNA) byla poprvé popsána v r. 1993 týmem Victora Ambrose. Byl identifikován gen, který nekódoval protein, ale krátkou molekulu RNA. Ta se vázala na netranslatovanou oblast mRNA jiného genu a tlumila jeho translaci. V r.2000 byla získána řada poznatků o funkci miRNA a jejich roli při vývoji maligních onemocnění. MiRNA patří mezi významné regulátory genové exprese a kontrolují fyziologické i patologické procesy v organismu. U maligních onemocnění miRNA fungují jako nádorové supresory a onkogeny. Poprvé popsal nádorově supresorickou funkci miR-15 a miR-16 profesor Carlo Croce u chronické lymfatické leukémie (CLL) [86]. MiRNA je definována jako krátká ( 21-23 nukleotidů) dlouhá jednořetězcová RNA. Vzniká z dlouhého primárního transkriptu (pri-miRNA) a vlásenkové prekurzorové struktury ( pre-miRNA) účinkem ribonukleáz v cytoplasmě a jádře. Její hlavní funkcí je post-traskripční regulace genové exprese. V současné době je známo více než 1000 miRNA v lidském genomu, ale předpokládá se, že jejich počet je daleko vyšší. MiRNA hrají zásadní roli v procesech, jako je vývoj, diferenciaci, proliferace, apoptóza a podílejí se na biologii nádorových kmenových buněk, angiogenezi, epiteliálně mezenchymálním přechodu, metastazování a rezistenci k lékům. Typickým příkladem je miR-21, k jehož nadměrné expresi dochází u většiny nádorových onemocnění, např. u karcinomu prsu, kolorekta, pankreatu, neuroblastomu, leukémii a lymfomu [87,88]. MiR-21 cílí na několik nádorově supresorových genů včetně PTEN s cílem zvýšení proliferace a omezení apoptózy [89]. Transkripci řady nádorově supresorových miRNA potlačuje protoonkogen MYC, včetně jejich třídy let-7. Snížená exprese let-7 miRNA byla zaznamenána u řady malignit a je spojena se špatným přežitím. Terčem třídy let-7 je gen RAS, který se podílí na buněčném růstu, diferenciaci a přežití. Řada miRNA této třídy se nachází v oblasti genomu, která je detekována u pacientů s karcinomem plic [90]. K identifikaci miRNA slouží různé molekulárně biologické přístupy, od přímé genetiky, klonování miRNA až po sekvenování [86]. Mitogenní signály jsou k cílovým buňkám vedeny pomocí transmembránových receptorů s tyrozin-kinázovou aktivitou (RTK) na základě jejich

interakcí s růstovými faktory a cytosiny. Pokud dojde k navýšení hladin povrchových RTK receptorů, vykazují buňky zvýšenou senzitivitu i k nízkým koncentracím růstových signálů a tím dochází ke zvýšení replikace. Zvýšená exprese nebo konstitutivní aktivace receptorových tyrozin-kináz byla zjištěna u řady solidních nádorů. Jde o receptorovou rodinu ErbB, receptor pro vaskulární endoteliální faktor (VEGFR – vascular endothelial growth factor receptor), receptor pro růstový faktor odvozený od krevních destiček (PDGFR- platelet-derived growth factor receptor) a c-MET [91]. K narušené regulaci těchto povrchových receptorů a jejich signálních drah přispívá deregulovaná exprese miRNA v nádorových buňkách, dochází k nezávislosti na produkci růstových signálů a tím k abnormální buněčné proliferaci. Ve dvou pracích byla popsána snížená hladina miR-7 a miR-128, které mají schopnost přímo tlumit signalizaci EGFR, a to u buněčných linií karcinomu prsu, kolorekta a plic [92,93]. Podle několika studií může identifikace specifických expresních profilů miRNA v séru pacientů vést k detekci karcinomu plic v časném stadiu. Byla nalezena signifikantně zvýšená exprese miR-1254 a miR-574-5p v séru pacientů s časným stadiem NSCLC oproti sérům zdravých dárců. Dále byla publikována skupina 11 sérových miRNA ( miR-486, miR-22, miR-30d, miR-21, miR-26b, let-7i, miR-378, miR-1, miR-206, miR-146b a miR-499), jejichž exprese byla více než pětinasobně změněna u déle přežívajících pacientů ( průměr 49,54 měsíců) ve srovnání s krátce přežívajícími pacienty ( průměr 9,54 měsíců). Bylo zjištěno, že miR-21 je významný sérový prognostický biomarker u pacientů s NSCLC a zároveň je i prediktivním biomarkerem senzitivity k chemoterapii s cisplatinou [94]. Hennessey et al. publikovali dvě sérové miRNA a to miR-15b a miR-27b, pomocí kterých odlišili se 100% senzitivitou a 84% specifitou nemocné s NSCLC od zdravých kontrol [95]. Byla provedena i řada studií se sledováním exprese různých miR v séru, ale proběhly i studie ke stanovení expresního profilu miRNA ve sputu. Byla zjištěna signifikantně vyšší exprese miR-21 u pacientů s NSCLC oproti zdravým kontrolám [96]. Další studie se zaměřily na časnou detekci histologických podtypů NSCLC. U adenokarcinomu byly nalezeny čtyři miRNA se zvýšenou hladinou ( miR-21, miR-182, miR-200b, miR-375) a tři miRNA se sníženou hladinou ( miR-486, miR-26 a miR-145) v porovnání se zdravou plicní tkání. U spinocelulárního karcinomu byla nalezena zvýšená hladina tří miRNA ( miR-126, miR-139, miR-429) a snížená hladina také tří miRNA ( miR-205, miR-210, miR-708) [86]. S přítomností mozkových metastáz je asociováno asi deset miRNA, a to například miR-145\*a miR-328. Byly identifikovány i specifické profily miRNA, které významně korelovaly buď s prognózou onemocnění nebo s odpovědí na protinádorovou terapii. Yanaihara et al. identifikovali osm miRNA spojených s přežíváním pacientů s adenokarcinomem plic. Vysoké exprese miR-155, miR-17-3p, miR-

106a, miR-93, miR-21 a nízké exprese let-7a-2, let-7b a miR-145 jsou asociovány se špatnou prognózou. MiR-155 a let-7a-2 mají prognostický význam, ukázalo se, že pacienti s vysokou expresí miR-155 nebo nízkou expresí let-7a-2 vykazují signifikantně kratší přežívání [97]. U spinocelulárního karcinomu bylo zjištěno, že vysoká hladina miR-146b je spojena s kratším přežitím než nízká hladina této miR. Se špatnou prognózou je asociována i zvýšená exprese miR-130a a snížená exprese miR-451 [98]. U pacientů po radikální chirurgické resekci NCSLC st.I Duncavage popsal asociaci recidivy nádorů s expresí miR-7, let-7<sup>a</sup>, MiR-21, miR-155, miR-210 a miR-221. Nádory s relapsem měly mnohonásobně nižší hladinu miR-221 než nádory, u kterých k relapsu nedošlo [99]. Byly zkoumány i expresní profily miRNA u pacientů senzitivních a rezistentních na pooperační radioterapii. U radiosenzitivní skupiny bylo nalezeno 5 zvýšených miRNA ( miR-126, let-7a, miR-495, miR-451, miR-128b) a sedm snížených miRNA ( miR-130a, miR-106b, miR-19b, miR-22, miR-15b, miR-17-5p, miR-21) [100]. Jedna z velmi mála studií byla zaměřena na expresní profil miRNA u SCLC. S chemorezistencí SCLC by signifikantně asociovány miR-92a\*, miR-147 a miR-574-5p. S kratší dobou přežití korelovala vyšší hladina miR-92a-2\* [101]. Jako potenciální terapeutický cíl se jeví miR-21, jejíž exprese významně redukuje u buněk NSCLC jejich růst, invazivitu a posiluje apoptózu. Dalším slibným terapeutickým cílem je miR-145, jejichž ektopická exprese vede u buněčných linií NSCLC k zástavě buněčného cyklu [86]. Léčbu na miRNA lze zacílit dvěma způsoby: redukcí miRNA, kdy dochází k inaktivaci těch miRNA, jejichž exprese je v nádorech zvýšená nebo nadměrná a na substituci miRNA. Při substituci jde o opětovné vnesení miRNA, jejichž exprese je snížena nebo jsou depletovány z nádorových buněk. Byly prováděny studie na myších modelech nemalobuněčného karcinomu plic s aktivovaným KRAS, kdy mimetikum miRNA miR-34a nebo let-7 vytvořilo komplex s neutrální lipidovou emulzí, což vedlo k 60% redukcí rozsahu nádoru [89]. Další rozvoj studia molekulární patologie nádorů by mohl vést k identifikaci biomarkerů vhodných pro časný záchyt onemocnění nebo recidivy nemoci, ke stanovení prognózy a zvýšení efektivity chemoterapie a cílené léčby. Zapojení miRNA do klíčových signálních drah karcinomu plic ukazuje, že mohou kromě prognostického a prediktivního potenciálu být i slibnými terapeutickými cíli při léčbě NSCLC.

### **1.3.10. Ostatní prognostické faktory**

Úbytek na váze se vyskytuje zejména u pokročilých forem nemoci a je spojen s horší prognózou onemocnění. Ke kachexii dochází v mnoha případech při progresi onemocnění a

kromě nechutenství se uplatňuje systémový efekt různých cirkulujících cytokinů, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ) a řada dalších působků [102]. Čím větší je ztráta hmotnosti a čím závažnější malnutrice, tím vyšší je riziko komplikace protinádorové léčby. Nádorovou kachexii lze charakterizovat jako syndrom, který zahrnuje ztrátu tělesné hmotnosti, anorexii, astenii, svalovou atrofii a často i anémii. Často je přítomna u onkologických nemocných již v době diagnózy. Ztráta hmotnosti může nepříznivě ovlivňovat výkonnostní stav a kvalitu života pacientů, kteří také hůře snášejí chemoterapii [103,104]. Za významný je považován váhový úbytek o více než 10% z původní hmotnosti za posledních 6 měsíců. V laboratorním obrazu svědčí pro malnutrici snížená koncentrace některých proteinů, jako jsou albumin, transferin a prealbumin. Hypalbuminémie je také považována za významný negativní prognostický faktor. Stav výživy nemocného kromě prognostického faktoru může být dle brněnských autorů, kteří hodnotili 122 pacientů s bronchogenním karcinomem i prediktivním faktorem [105].

Věk nepředstavuje signifikantní prognostický faktor u karcinomu plic, protože toto onemocnění se vyskytuje ve vyšším věku, má ale význam ve spojení s výkonnostním stavem pacienta a rozsahem onemocnění [106]. Více než 50% plicních karcinomů je diagnostikováno ve věku nad 65 let. Starší nemocní reagují hůře na chemoterapii, častěji u nich dochází k relapsu onemocnění i počet dosažených remisí je menší. Někdy se vzhledem k přidruženým onemocněním nebo komplikacím z předchozích cyklů chemoterapie podávají nižší léčebné dávky, což má za následek horší léčebné výsledky.

Stav výkonnosti (performance status-PS) hodnotí celkový stav pacienta, používá se k volbě léčby a hodnocení kvality života. Pacienti v celkově špatném stavu obvykle snášejí terapii hůře a mají z ní menší prospěch. S klesající fyzickou zdatností se snižuje i přínos chemoterapie, proto vždy musíme zvážit možný profit z léčby pro daného pacienta [107]. K hodnocení stavu výkonnosti se používá Karnofského skóre nebo WHO klasifikace. Karnofského skóre má hodnoty od 100 do 0, kde 100 je normální stav a 0 je smrt. WHO stupnice používá hodnocení 0-4 ( normální stav až trvalé upoutání na lůžko). Tabulka 4 a 5.

**Tabulka č.4:Karnofského škála**

100%	normální aktivita, bez projevů nemoci
90%	schopen normální aktivitám přítomny minimální znaky nebo příznaky nemoci
80%	s úsilím schopen normální aktivity, přítomny znaky nebo příznaky nemoci
70%	soběstačný, neschopen normální aktivity nebo práce
60%	potřebuje občasnou pomoc, ale převážně je soběstačný
50%	potřebuje výraznou pomoc a častou lékařskou péči
40%	nesoběstačný, vyžaduje zvláštní péči a pomoc
30%	zcela nesoběstačný, je indikována hospitalizace, ale bezprostřední úmrtí nehrozi
20%	nemohoucí, nutná hospitalizace, nutná aktivní podpůrná léčba
10%	moribundní
0%	Smrt

**Tabulka č.5: PS dle WHO klasifikace**

0	schopen normální tělesné aktivity
1	neschopen těžké fyzické námahy, může vykonávat lehčí práci
2	soběstačný, ale neschopen práce, tráví více než 50% denní doby mimo lůžko
3	omezeně soběstačný, přes den tráví na lůžku více než 50% denní doby
4	zcela nesoběstačný, trvale upoután na lůžko

Dalším prognostickým faktorem je pohlaví pacienta. V řadě studií bylo prokázáno lepší přežití žen s bronchogenním karcinomem a to u SCLC i NSCLC. Příčiny nejsou zcela známy, je možný podíl pohlavních hormonů na regulaci nádorového růstu [108,109,110].

Rasa může rovněž ovlivňovat prognózu nemocných s bronchogenním karcinomem. Jsou prokázány rozdíly mezi asijskou a kavkazskou populací u SCLC i NSCLC v celkovém přežívání, četnosti léčebných odpovědí, výskytem toxicity při léčbě chemoterapií i cílené léčbě. Prokázala to i velká studie nemocných s SCLC, do které bylo zařazeno 4782 pacientů, z toho 71,7% s extensive disease. V této skupině bylo jen 2,5% nekuřáků, šetření ukázalo, že asijská rasa představuje příznivý prognostický faktor. V této studii se rovněž prokázalo, že nekuřáci dosáhli delšího celkového přežití (13,6 měs. vs. 9,9 měs.) a dvouleté přežití (17% vs.

7%) než kuřáci [111]. V Kalifornii byla provedena analýza 19702 pacientů s NSCLC ve st. I. U asijského etnika bylo prokázáno snížení rizika úmrtí ve srovnání s jinými etniky. V dalších studiích bylo prokázáno u asijského etnika delší celkové přežívání u st. III a IV bez závislosti na anamnéze kouření [112].

Laktát dehydrogenáza (LDH) je buněčný enzym, který se podílí na přeměně pyruvátu na laktát v posledním kroku anaerobní glykolýzy. Do krve se dostává z běžného obratu buněk. Je také produkována nádorovými buňkami, zvýšenou aktivitu můžeme nalézt ve výpotku karcinomatózního původu. Hladina LDH v séru maligních pacientů koreluje s horší prognózou, rezistencí k chemoterapii i radioterapii u řady maligních procesů. V klinickopatologických studiích je zvýšená hladina LDH v séru spojována s rezistencí a vyšším počtem relapsů po chemoterapii u lymfomů [113], karcinomů prsu a ovariálních karcinomů [114,115] a také u malobuněčného karcinomu plic [116,117].

Anémie je charakterizována poklesem hladiny hemoglobinu pod fyziologickou mez (120 g/l u žen, 135 g/l u mužů). Je častým nálezem u pacientů s nádorovým onemocněním a výraznou měrou se může podílet na snížení kvality života onkologických nemocných a v některých případech může mít dopad i na úspěšnost léčby. Může být způsobena krevními ztrátami nebo infiltrací kostní dřeně. V důsledku hypoxie při anémii dochází v tumoru ke genové instabilitě a vznikají tak agresivnější tumory. Hypoxií je také stimulována angiogeneze a nádory tak získávají větší potenciál k metastazování. Anémie je negativním prognostickým faktorem, je spojena s horším stavem výkonnosti pacienta a může výrazně omezit i léčebné možnosti [118,119].

## **1.4. Prediktivní faktory u bronchogenního karcinomu**

V posledních letech stoupá počet výsledků molekulárního výzkumu patogeneze maligního onemocnění. Objevují se nová protinádorová léčiva, jejichž mechanismus účinku je specifický pro určitý typ nádoru. Prediktivní faktory umožňují předpovědět účinnost konkrétní léčebné modalit u nemocných, kteří daný faktor mají ve srovnání s účinností terapie u nemocných bez tohoto faktoru [26]. Tím dochází k individualizaci terapie. Prediktivní faktory se mohou vztahovat k frekvenci léčebných odpovědí, délce přežití nebo doby do progresu. Některé mají jak prediktivní, tak i prognostický význam. Mezi prediktory účinnosti chemoterapie patří histologický typ nádoru, exprese 1 ribonukleotid reduktázy

(RRM1), ERCC1, Thymidylát syntetázy (TS), BRCA1 ( breast cancer susceptibility gene 1),  $\beta$  tubulin třídy III, genové polymorfismy. Mezi prediktory účinnosti cílené biologické léčby řadíme mutace genu EGFR, mutace genu KRAS, zlom genu ALK.

#### **1.4.1. Histologický typ nádoru**

Do r. 2004 nebyl zaznamenán rozdíl účinnosti kombinované chemoterapie u jednotlivých histologických typů NSCLC. K léčbě se používaly kombinace platinových derivátů ( cisplatina CDDP nebo karboplatina CBDCA) s cytostatikem III.generace ( gemcitabin, vinorelbin, paklitaxel, docetaxel). V roce 2004 byly publikovány výsledky studie fáze III JMEN. Pacienti s NSCLC byli randomizováni do dvou ramen a ve II.linii léčby jim byl podáván docetaxel nebo pemetrexed. Původně byl medián přežívání bez statistické významnosti v obou ramenech ( 8,3 vs. 7,9 měsíce)[120]. Ale v roce 2007 Peterson a kol. publikovali retrospektivní analýzu této studie se zaměřením na účinnost pemetrexedu v závislosti na histologickém typu nádoru. Ve skupině adenokarcinomu a velkobuněčného karcinomu se prokázalo signifikantně delší přežití při léčbě pemetrexedem než u skupiny pacientů se spinocelulárním karcinomem ( velkobuněčný ms 12,8 měsíce, adenokarcinom ms 9 měsíců, spinocelulární ms 6,3 měsíce) [121]. Na základě výše uvedených studií je pemetrexed indikován ve druhé linii léčby u pacientů s jiným histologickým typem než predominantně dlaždicobuněčným a docetaxel ve druhé linii léčby u pacientů se spinocelulárním karcinomem. V roce 2008 pak byla publikována studie fáze III JMDB autora Scagliotiho a kol., která srovnával účinnost dvou léčebných kombinací ( cisplatina + pemetrexed a cisplatina + gemzar) u jednotlivých histologických typů nádoru. Studie prokázala lepší celkové přežití u adenokarcinomu při použití kombinace pemetrexed + cisplatina. Medián přežití v této skupině byl 12,6 vs. 10,9 měsíce. U velkobuněčného karcinomu byl tento rozdíl ještě větší: 10,4 vs. 6,7 měsíce. U spinocelulárního karcinomu naopak byla účinnější kombinace cisplatina + gemzar 10,8 vs. 9,4 měsíce [122]. Proto i v I.linii u pacientů s jiným histologickým typem než predominantně dlaždicobuněčným je indikována léčba kombinací cisplatina + pemetrexed, která prokazatelně u těchto typů nádoru dává pacientům šanci na delší přežití než jiné léčebné kombinace. Ve studii JMEN se podával pemetrexed nebo placebo nemocným, kteří po čtyřech cyklech kombinované chemoterapie neměli prokázanou progresi onemocnění a tato léčba pokračovala až do progresu. I zde pacienti s nedlaždicobuněčným karcinomem, kteří byli léčeni pemetrexedem dosáhli statisticky významného prodloužení celkového přežití (15,5 vs. 10,3 měsíce), přežití bez progresu (4,4 vs.1,8 měsíce). U pacientů s adenokarcinomem bylo dosaženo přežití bez



progrese 4,6 měsíce a celkového přežití 16,8 měsíce [123,124]. Následně tato data byla potvrzena ve studii fáze III PARAMOUNT, kdy z původně 939 pacientů po první linii cisplatinou s pemetrexedem, 539 u kterých nedošlo k progresi onemocnění pokračovalo v léčbě pemetrexedem nebo placebem. V rameni maintenance ( udržovací ) terapie s pemetrexedem bylo dosaženo signifikantně lepšího celkového přežívání ( 13,9 vs.11,0 měs.)[125,126].

#### **1.4.2. Exprese ERCC1(excision repair cross-complementing group 1)**

ERCC1 je nukleáza, která se podílí na syntéze a opravě poškozené DNA platinovými cytostatiky. Protinádorová aktivita platinových komplexů vyplývá z jejich schopnosti vytvářet na DNA kovalentní adukty [127]. Cisplatinou tvoří různé typy těchto aduktů, čímž inhibuje syntézu DNA, což je základem její protinádorové aktivity. Vzniklá DNA poškození jsou opravována především mechanismem nukleotidové excize ( nukleotide excision repair – NER) za účasti reparačních proteinů. V mnoha studiích bylo prokázáno spojení rezistence k cisplatině se schopností buňky opravit poškozenou DNA. V liniích těchto rezistentních buněk byl nalezen významně vyšší transkript genu ERCC1 [128]. V retrospektivní studii 56 pacientů s pokročilým NSCLC, kteří byli léčeni kombinací cisplatinou, gemcitabin byl medián přežití významně delší u pacientů s nízkou expresí ERCC1 (61,6 měsíce) ve srovnání s pacienty s vysokou expresí ERCC1 ( 20,4 měsíce) [129]. V několika studiích bylo prokázáno významně delší přežití pacientů po kompletní resekci nádorů s nepřítomností ERCC1, kterým byla podávána cisplatinou jako součást adjuvantní chemoterapie[130]. Hladina exprese ERCC1 je prediktorem účinnosti chemoterapie založené na bázi cisplatinou, vysoká exprese ERCC1 je zodpovědná za rezistenci k tomuto léčivu.

#### **1.4.3. Exprese RRM1 ( Ribonucleotide Reduktase Subunit M1)**

RRM1 gen kóduje regulační podjednotku ribonukleotidové reduktázy. RRM1 je klíčovým enzymem zapojeným do syntézy DNA a jeho exprese ovlivňuje odpověď nádoru na gemcitabin zřejmě prostřednictvím enzymu cytidin deaminázy [131]. V roce 2004 byla publikována studie Rosella a spol., kteří sledovali výši exprese ERCC1 a RRM1 u pacientů s pokročilým NSCLC. Pacienti byli léčeni různými chemoterapeutickými kombinacemi: gemcitabin + cisplatinou, gemcitabin + cisplatinou + vinorelbin nebo gemcitabin + vinorelbin, následně kombinací vinorelbin + ifosfamid. V rameni gemcitabin + cisplatinou vykazovali pacienti s nízkou expresí RRM1 signifikantně delší medián přežívání než pacienti s vysokou

expresí RRM1 ( 13,7 měs. vs 3,6 měs.) [132]. Vliv úrovně exprese RRM1 na účinnost gemcitabinu byla prokázána i v jiných studiích. V randomizované studii fáze III Raynoldse a spol. u pacientů s NSCLC s PS 2, kteří byli léčeni buď kombinací CBDCA + gemcitabin nebo gemcitabinem v monoterapii se potvrdilo delší přežívání pacientů s nižší expresí RRM1 [133]

#### **1.4.4. Thymidilát syntetáza ( TS )**

Thymidilát syntetáza je klíčovým enzymem v metabolismu DNA. Jeho hlavní úlohou je tvorba thymidilátu, který je následně inkorporován do DNA. Tento enzym byl dříve zkoumán v účinnosti fluoropyrimidinů (5-fluorouracilu) u nádoru gastrointestinálního traktu. Vysoké hladiny tohoto enzymu u některých nádorů jsou jednou z příčin lékové rezistence. Zkoumaly se i hladiny TS u NSCLC. U pacientů s resekovaným NSCLC byly nalezeny vyšší hladiny TS u spinocelulárního karcinomu než u adenokarcinomu[134]. Navíc v buněčných nádorových liniích rezistentních na antifoláty byly nalezeny vysoké exprese TS. Tato data korelují s klinickou rezistencí k pemetrexedu. U adenokarcinomu a velkobuněčného karcinomu je nízká hladina TS spojena s vyšší účinností pemetrexedu[135].

#### **1.4.5. BRCA1 ( Breast cancer susceptibility gene 1)**

BRCA1 je tumor supresorový gen. Protein vytvořený z tohoto genu je v multiproteinových komplexech, které jsou významné pro udržení stability genomu. Je součástí komplexů řídících reparační procesy indukované DNA poškozením, účastní se aktivace transkripce a regulace buněčného cyklu. Jeho poškození způsobuje hromadění mutačních změn v buňce a může vyústit v její maligní transformaci. Je známo, že mutace genu BRCA1 způsobuje predispozici ke vzniku nádoru prsu, ovaria a v poslední době i karcinomu prostaty. V poslední době stoupá zájem o BRCA1 jako prognostický nebo prediktivní faktor i u jiných nádorů, i NSCLC. Bylo zjištěno, že nízká exprese BRCA1 je spojena s delším přežitím pacientů s kompletně resekovaným NSCLC. BRCA1 hraje klíčovou roli při opravě DNA a také ovlivňuje aktivitu mitotického vřeténka. Z těchto důvodů nízká exprese BRCA1 může predikovat lepší přežívání při léčbě cytostatiky poškozující DNA ( cisplatina), zatímco zvýšená exprese BRCA1 může ukazovat benefit při použití chemoterapeutik, které působí na tubulin ( taxany) [136,137].

#### **1.4.6. EGFR ( Receptor pro epidermální růstový faktor)**

Tento receptor je kódován genem EGFR, který je lokalizován na chromozomu 7 (7p13-q22)[138]. Receptory lokalizované v buněčné membráně hrají klíčovou roli v udržení homeostázy vnitřního prostředí buňky. Jednou z mnoha skupin těchto receptorů jsou receptory c-erbB/HER. Jde o transmembránové receptory s kinázovou aktivitou. K jejich aktivaci dochází po navázání peptidových růstových faktorů na jejich extracelulární doménu a tím k jejich oligomerizaci. Aktivace receptoru vede ke spuštění intracelulární signální kaskády, která ve svém důsledku může ústít v nekontrolovanou proliferaci, zvýšení invazivního růstu, metastazování a indukci angiogeneze. Aberantní aktivace c-erbB receptorů může být způsobena zvýšenou produkcí růstových faktorů, zvýšenou syntézou těchto receptorů ( overexpresí), zmnožením genů pro tyto receptory ( amplifikací) a mutacemi těchto genů, které vedou k tvorbě abnormálních receptorů. Může docházet i k různým kombinacím těchto možností [139]. Epidermální růstový faktor (EGF) je peptid, který je tvořen z 53 aminokyselin. Jeho kódující sekvence jsou umístěny na chromozomu 4q25. EGFR je protein, jehož struktura se skládá z extracelulární domény tvořené 621 aminokyselinami. Tato extracelulární doména je často glykosylovaná a obsahuje ligand vazebnou oblast. Dalšími součástmi receptoru jsou hydrofobní transmembránová oblast z 23 aminokyselin a intracelulární doména z 542 aminokyselin. Intracelulární doména obsahuje tyrozinovou kinázu. EGFR byl poprvé identifikován a klonován z mamárních a žaludečních karcinomů. EGFR je ve zvýšené míře exprimován u řady nádorů, u NSCLC až 60-80%. Nadměrná exprese EGFR byla v řadě studií spojena se špatnou prognózou onemocnění [140,141]. Po vazbě signální molekuly (ligandu) na extracelulární doménu EGFR, dojde nejdříve ke změnám samotného receptoru – tvorbě homodimerů nebo heterodimerů. Heterodimery jsou více mitogenní a poskytují vyšší množství fosfotyrozinových zbytků pro vazebné partnery. Tím dochází ke zvýšení tyrozin kinázové aktivity a fosforylaci tyrozinových zbytků, následně se indukují další buněčné pochody, kterými se přenáší signál pomocí kaskády MAPK a PI3K.. Konečným výsledkem tohoto procesu je zvýšení proliferace nádorových buněk, aktivace angiogeneze, metastazování a vznik rezistence k chemoterapii a radioterapii [142]. Zvýšená exprese EGFR a jeho ligandů může být detekovatelná již v nemaligních lézích, které způsobují apokrinální signalizaci časného stadia formování nádoru. Nárůst exprese EGFR lze prokázat u celé řady epitelových malignit (Ca prsu, plic, vaječnicků, prostaty, hlavy a krku, močového měchýře). Kromě vysoké exprese mají aktivující charakter i mutace přítomné v tyrozinokinázové doméně receptoru. Této oblasti odpovídají exony 18-24 genu EGFR. Více

než 90% aktivačních mutací v genu EGFR nastává v exonu 19 a 21 a jsou standardně testovány. V případě exonu 19 jde o mutace typu delecí nejméně tří nukleotidů. V exonu 21 je nejčastěji popisována bodová mutace 858, aminokyseliny, která znamená záměnu leucinu za arginin- L858R [143]. Asi ve 4% se vyskytují další aktivační mutace v exonu 18 při substituci glycínu za serin, alanin nebo cystein. V důsledku těchto mutací dochází k permanentní aktivaci tyrozinkinázové domény EGFR, bez závislosti na ligandu a následně fosforylaci dalších proteinů v signální dráze EGFR. Výskyt aktivačních mutací je častější u žen, nekuřáků, adenokarcinomu a v asijské populaci [144,145,146,147]. V kavkazské populaci se vyskytují mutace EGFR asi u 10-15% pacientů, v asijské populaci se vyskytuje u 30-60% pacientů. Tyto mutace jsou spojeny s lepší odpovědí na léčbu inhibitory tyrozinkinázy (TKI). Existují i mutace s negativním vlivem na působení TKI. Ty jsou umístěny hlavně v exonu 20 genu EGFR. Jde o bodové mutace a inserce. Příkladem je bodová mutace T790M v exonu 20 a bodová mutace D762Y v exonu 19 [148]. Přítomnost mutací v nádorových buňkách se standardně vyšetřuje u adenokarcinomů, NSCLC, spíše adenokarcinomů a NSCLC NOS. Spinocelulární karcinomy se standardně netestují, protože výskyt EGFR mutací je u tohoto histologického typu vzácný. Při molekulárně biologickém vyšetření je analyzována nukleová kyselina, převážně DNA. Vyšetření může být provedeno z primárního tumoru i metastázy, maligního výpotku i laváže. Základním krokem je polymerázová řetězová reakce (PCR-polymerase chain reaction). Cílem této reakce je amplifikace zvoleného úseku DNA s jeho následným přímým sekvenováním [43].

Ovlivnění EGFR cílenou biologickou léčbou se jeví jako perspektivní u pacientů s NSCLC. U nádorových buněk dochází k poruše regulace signální dráhy EGFR-TK, což má za následek nekontrolovatelný růst buněk. Inhibitory EGFR lze rozdělit do dvou skupin: monoklonální protilátky a inhibitory tyrozinkinázy. Monoklonální protilátky jsou vysokomolekulární a neprocházejí buněčnými membránami ani hematoencefalickou bariérou. Váží se na extracelulární doménu, čímž zabraňují navázání ligandu, dimerizaci a aktivaci receptoru, následně pak dochází k degradaci receptoru s blokováním intracelulárních signálních kaskád [149,150]. Tímto způsobem je inhibována jednak proliferace a migrace nádorových buněk a dále je podporován proces apoptózy. Jednou z prvních zástupců této skupiny byla humanizovaná monoklonální protilátka třídy IgG proti proteinu HER2, trastuzumab (Herceptin), která našla uplatnění při léčbě karcinomu prsu a HER2 pozitivního metastatického karcinomu žaludku. S touto protilátkou proběhly i studie zaměřené na léčbu NSCLC. Ve studiích se kombinoval trastuzumab s taxany, ale nebyla potvrzena účinnost trastuzumabu v léčbě NSCLC [151,152]. Další zkoumanou monoklonální protilátkou je

cetuximab ( Erbitux). Jde o chimérickou (myší/lidská) protilátku třídy IgG blokující aktivaci EGFR vazbou na jeho extracelulární doménu. Navíc stimuluje degradaci EGFR a protinádorovou imunitní odpověď. Je indikován k léčbě pacientů s metastazujícím karcinomem kolorekta exprimujícím EGFR a vyjazujícím gen KRAS divokého typu v I. i II.linii léčby v kombinaci s chemoterapií nebo i samostatně u pacientů po selhání chemoterapie na bázi oxaliplatiny a irinotekanu. V léčbě NSCLC se v monoterapii jeho účinky nepotvrdily. Ve studii fáze II a III FLEX u pacientů s NSCLC ve st.IIIB a IV, EGFR pozitivních po přidání cetuximabu k chemoterapii ve složení cisplatina + vinorelbin došlo k prodloužení přežití pacientů ve srovnání s těmi, kteří byli léčeni pouze chemoterapií (11,3 vs.10,1 měsíce) [153]. V další studii po přidání cetuximabu k chemoterapii ve složení CBDCA, paklitaxel v I.linii léčby pokročilého a metastatického NSCLC se nepotvrdil efekt cetuximabu na léčbu NSCLC ve srovnání s účinností při léčbě ca kolorekta [154,155]. Cetuximab není registrován v České republice pro léčbu NSCLC.

Druhou skupinou inhibitorů EGFR tvoří inhibitory tyrozinkinázové fosforylace v intracelulární doméně EGFR. Jde o látky s nízkou molekulární hmotností, které přechází přes cytoplazmatickou membránu a váží se na intracelulární doménu EGFR. Zde soutěží o vazbu s molekulou ATP, tím brání aktivaci efektorových proteinů fosforylací a inhibují signální dráhy směřující z EGFR do jádra. Běžně jsou v léčbě NSCLC užívané dva preparáty: gefitinib (Iressa) a erlotinib (Tarceva). Význam mutací EGFR jako prediktoru dobré odpovědi na inhibitory tyrozinkinázy byl poprvé popsán v r. 2004 autory Lynchem a Paezem a následně byl potvrzen řadou studií [156-160]. Gefitinib (Iressa) je nízkomolekulární synteticky připravený anilinochinazolinový derivát, který patří do skupiny selektivních inhibitorů tyrozinkinázy receptoru pro epidermální růstový faktor. Ve dvou studiích IDEAL-1 a IDEAL-2, ve kterých byli pacienti léčeni ve druhé nebo třetí linii, bez ohledu na mutační statut EGFR, gefitinibem v dávce 250 mg nebo 500 mg, se četnost léčebných odpovědí pohybovala v rozmezí 9-19% a ovlivnění symptomů v rozmezí 35-43%[161,162]. Na základě těchto výsledků byl gefitinib povolen v USA a Japonsku k léčbě NSCLC v monoterapii po selhání standardní chemoterapie. Následovala studie fáze III ISEL, která porovnávala gefitinib s nejlepší podpůrnou léčbou u pacientů s progresí po první nebo druhé linii chemoterapie. Bylo prokázáno pouze statisticky nevýznamné prodloužení přežití v rameni s gefitinibem (5,4 vs.5,1 měs.), ale staticky významné vyšší procento odpovědi na léčbu (8% vs.1,3%) a delší doba do progresu [163]. Tato studie ale ukázala vyšší odpověď na léčbu u pacientů s prokázanou EGFR mutací ( 37,5 vs. 2,6%) a tím upozornila na výhodu této léčby pro určitou konkrétní skupinu pacientů. Navíc v dalších studiích INTACT-1 a INTACT-2, ve

kterých se srovnával efekt léčby kombinací chemoterapie založené na platině a gefitinibu se samotnou chemoterapií také nedošlo ke zlepšení přežití pacientů [164,165]. Na základě těchto výsledků byla pozastavena registrace tohoto preparátu. V r. 2008 byly zveřejněny výsledky studie INTEREST, kde se srovnávala účinnost gefitinibu v dávce 250 mg/den ve II.linii léčby se standardně používaným docetaxelem v dávce 75 mg/m<sup>2</sup>. Do této studie bylo zařazeno 1466 pacientů a výsledkem bylo prokázání non-inferiority gefitinibu v porovnání s docetaxelem při hodnocení celkového přežití. Střední doba přežití pro gefitinib byla 7,6 měsíců a pro docetaxel 8 měsíců. Navíc v této studii i pacienti, u kterých se předpokládala lepší odpověď na léčbu TKI (asiati, nekuřáci, adenokarcinom, ženské pohlaví) profitovali z obou léčebných modalit. V obou skupinách byla dosažena shodná doba do progresu, ale kvalita života byla signifikantně vyšší ve skupině pacientů léčených gefitinibem [166,167]. Tato data vedla k obnově registračního řízení tohoto preparátu. Následovala studie fáze III IPASS (Iressa Pan-Asia study), která zkoumala účinek gefitinibu u nepředléčených pacientů. Studie probíhala v Asii, pacienti v této studii byli selektováni – nekuřáci nebo nekouřící 15 let s adenokarcinomem. Nemocní byli léčeni buď gefitinibem nebo kombinací CBDCA s docetaxelem. V celém souboru bylo dosaženo lepší celkové odpovědi u pacientů léčených gefitinibem (43% vs. 32%), tento rozdíl se zvýraznil u pacientů s pozitivní EGFR mutací (71,2% vs. 47,3%) [168]. Na základě této studie se stala mutace EGFR prediktivním faktorem lepší odpovědi na léčbu TKI než chemoterapií. Gefitinib byl registrován rozhodnutím EMEA pro I.linii léčby 1.7.2009 u pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým NSCLC s přítomností aktivační mutace EGFR. V České republice probíhal program časného přístupu, k dispozici je gefitinib v této indikaci od února 2011 [169-171].

Druhý TKI erlotinib (Tarceva) je rovněž synteticky připravený anilinocinazolinový derivát, který silně inhibuje intracelulární fosforylaci HER1/EGFR receptoru. Účinnost a bezpečnost tohoto preparátu v léčbě NSCLC byla potvrzena v randomizované, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované studii BR21. Do této studie bylo zařazeno 731 pacientů s lokálně pokročilým nebo metastazujícím NSCLC s progresí onemocnění po léčbě chemoterapií. V jedné skupině byli pacienti léčeni erlotinibem v dávce 150 mg/den, ve druhé skupině dostávali placebo. Celkové přežití bylo signifikantně delší ve skupině s erlotinibem (6,7 vs. 4,7 měsíce), v této skupině byl i vyšší počet pacientů žijících déle než 1 rok (31,2% vs. 21,5%) [172]. V této studii měli prospěch z léčby erlotinibem všechny skupiny pacientů, tedy i muži, kuřáci i pacienti bez aktivačních mutací EGFR. V r. 2009 byly prezentovány výsledky studie SATURN, dvojitě zaslepené randomizované studie fáze III s erlotinibem v udržovací léčbě ve srovnání s placebem u nemocných s pokročilým NSCLC bez progresu po I.linii léčby

režimem s platinou. Pacienti s progresí po I.linii chemoterapie mohli být zařazeni do paralelní studie TITAN, kde byla srovnávána účinnost erlotinibu s docetaxelem nebo pemetrexedem. Ve studii SATURN podávání erlotinibu v udržovací léčbě zvýšilo dobu bez progresu (12,3 týdnů vs. 11,1 týdnů) [160,173], celkové přežití (12 měsíců vs 11 měsíců) a rovněž v této studii se ukázal benefit z této léčby i u pacientů bez mutací EGFR. U studie TITAN nebyl pozorován signifikantní rozdíl v celkovém přežití jednotlivých skupin (5,3 měsíce u erlotinibu a 5,5 měsíce v rameni s chemoterapií), ani v 1-ročním přežití ( 26% u erlotinibu a 24% u chemoterapie), ani v době do progresu ( 6,3 týdnů u erlotinibu a 8,6 týdnů u chemoterapie). Léčba s erlotinibem byla v této studii lépe tolerována [174]. Udržovací léčbě byla věnována i další studie ATLAS, která porovnávala podání bevacizumabu samotného nebo společně s erlotinibem u nemocných po ukončení I.linie léčby chemoterapie s bevacizumabem u nemocných s pokročilým nebo metastatickým NSCLC. I zde přidání erlotinibu k terapii zlepšilo přežití bez progresu ( PFS ) [175,176]. V České republice je erlotinib schválen pro II. a III.linii léčby u pacientů bez závislosti na mutačním statusu, nově od prosince 2013 i do I.linie léčby NSCLC u pacientů s aktivační EGFR mutací. Mutace EGFR jsou podle poznatků ze studií s erlotinibem i gefitinibem častější u nekuřáků s adenokarcinomem, předpokládá se, že nekuřáci a pacienti s mutací profitují z léčby erlotinibem. Četnost mutací se snižuje s rostoucím počtem vykouřených cigaret. Vyšší pravděpodobnost výskytu mutací je interval zanechání kouření 25 let a méně než 10 balíčků za rok [177]. Většina pacientů, kteří jsou léčeni inhibitory tyrozinkinázy získá do jednoho roku rezistenci [178]. Je popsáno několik mechanismů rezistence, ale mezi nejvýznamnější patří sekundární bodová mutace genu EGFR T790M v exonu 20 a amplifikace genu C-MET [179,180]. Jedná se o bodovou substituci thyminu za cytosin v nukleotidu 2369, což má za následek záměnu treoninu za metionin v kodonu 790. Tato mutace zasahuje do ATP vazebného místa, kde ztíží vazbu TKI, ale nezasahuje do vazby ATP. Buňky se senzitivní mutací L858R a současně rezistentní mutací T790M byly stokrát méně citlivé vůči erlotinibu než ty, u kterých byla prokázána jen rezistentní mutace. Maheswaran s kolektivem zjistili analýzou nádorových buněk cirkulujících v krvi přítomnost T790M mutace u 38% pacientů, kteří nebyli léčeni TKI. Mutantní alela byla přítomna pouze v malé populaci buněk, a proto nezabraňovala v odpovědi na léčbu TKI, ale byla spojena s kratší dobou do progresu onemocnění. PFS byl u pacientů s touto mutací 7,7 měsíce, zatímco u pacientů bez mutace 16,5 měsíce [181]. Předpokládá se, že při léčbě TKI získává tato rezistentní mutace prostor pro vlastní expanzi. Podobně se chovají i další mutace D761Y, L747S a T854A, ale jejich výskyt je velmi vzácný. Zástupcem nové generace TKI je afatinib (Giotrif), který ireverzibilně inhibuje receptor pro epidermální

růstový faktor typu 2 (HER2) a spučasně i EGFR. Je účinný jak u aktivačních mutací EGFR, ale i u mutace T790M. Jeho účinnost byla prokázána ve studii fáze III LUX-Lung. Zde byl afatinib v dávce 40 mg 1x denně srovnáván s chemoterapií cisplatina + pemetrexed u nově diagnostikovaných pacientů s adenokarcinomem plic ve st.IIIB a IV s přítomnosti EGFR mutace. V rameni s afatinibem došlo ke statisticky významnějšímu prodloužení doby bez příznaků onemocnění (PFS)- medián 11,1 vs.6,9 měsíce u pacientů s chemoterapií. U pacientů s delecí v exonu 19 a s mutací L858R byl medián PFS 13,6 měsíce. Ve skupině s afatinibem byl vyšší i počet objektivních odpovědí (56% vs. 23%) [182,183]. Afatinib byl schválen Evropskou komisí koncem září 2013 v monoterapii k léčbě pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým NSCLC s mutacemi EGFR, kteří doposud nebyli léčeni inhibitory tyrozinkináz. Druhým mechanismem získané rezistence je amplifikace genu C-MET. Jde o protoonkogen kódující receptor pro hepatocytární růstový faktor (HGFR) s tyrozinkinázovou aktivitou, který se nachází v chromozomální oblasti 7q31. Je amplifikován u řady nádorů. U NSCLC se získanou rezistencí k TKI ja tato amplifikace nalezena asi u 20% případů [184]. Signální dráka spuštěná hepatocytárním růstovým faktorem (HGF) se podílí mimo jiné i na onkogenezi, progresi nádoru a podporuje buněčnou invazivitu vedoucí k metastazování. Amplifikace C-MET aktivuje HER3 a PI3-Akt signální dráhu nezávisle na stimulaci EGFR. V současnosti je C-MET u NSCLC jedním z nadějných prediktivních markerů a slibnou se jeví léčba zaměřená na současnou blokaci EGFR i C-MET [185]. Probíhají studie s tivantinibem, kdy se ve studii fáze II kombinace tivantinibu s erlotinibem proti erlotinibu s placebem potvrdilo prodloužení PFS a zlepšení celkového přežití u pacientů s tivantinibem [186]. Nyní probíhají studie fáze III. Účinným lékem u pacientů s amplifikací C-MET je crizotinib, lék indikovaný u pacientů s ALK přestavbou [187].

#### **1.4.7. Gen ALK (anaplastic lymphoma kinase)**

Gen ALK ( anaplastic lymphoma kinase) je u člověka lokalizován na chromozomálním úseku 2p23. Tento gen kóduje tyrozinkinázový receptor, který patří do skupiny inzulinových receptorů. ALK protein obsahuje extracelulární, transmembránovou a intracelulární oblast. Gen ALK je tkánově specifický, v průběhu vývoje ve exprimován v nervové soustavě a reguluje zde správný růst a vývoj. V dospělosti je exprimován v mozku a ve varlatech [188]. Přestavba genu ALK byla poprvé nalezena v r. 1994 jako součást translokace t(2;5)(p23;q35). Tato translokace vede k expresi fúzního proteinu NPM1-ALK, způsobující anaplastický velkobuněčný lymfom [189]. U NSCLC byla přestavba genu ALK nalezena v r. 2004. Jde o



paracentrickou inverzi mezi oblastmi 2p21 a 2p23, kterou se kinázová doména dostane na počátek genu EML4 a následně je exprimován fúzní protein EML4-ALK. Gen ALK se štěpí v místě exonu 20, den EML4 nejčastěji v exonech 6 a 13. Podle typu štěpení existují různé varianty EML4-ALK fúzního proteinu. U NSCLC představuje EML4-ALK 99% všech translokací, méně častými jsou TFG-ALK, KIF5B-ALK [190]. Frekvence translokací ALK se pohybuje od 2 do 7% všech pacientů s diagnostikovaným NSCLC [191-195]. Translokace EML4-ALK vede k aktivaci kinázy ALK a k potlačení apoptózy buněk s těmito změnami. Podobně jako mutace EGFR stoupá četnost fúzí EML4-ALK u osob s adenokarcinomy, nekuřáků, slabších kuřáků, žen a asiátů a u osob mladšího věku [196-198]. U silných kuřáků se tato alterace vyskytuje vzácněji [199]. Mutace EGFR a ALK jsou u NSCLC vzájemně exklusivní, současný výskyt těchto dvou mutací se popisuje jen asi u 1% nemocných. Stejně vzácný je i současný výskyt KRAS mutace a ALK translokace [200-202]. U nemocných s translokací ALK se častěji vyskytuje postižení pleury nebo perikardu a generalizace do jater. K detekci genových fúzí ALK se u NSCLC používají metody imunohistochemické (IHC), metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH) a real-time polymerázová řetězová reakce (RT-PCR). Nejjednodušší a nejlevnější metodou je IHC, ale nezachytí pozitivitu všech FISH ALK pozitivních případů. RT-PCR je zase metoda velice náročná na materiál, proto byla jako „zlatý standard“ pro ALK diagnostiku zvolena metoda FISH. ALK lze vyšetřit pomocí FISH break-apart sondy a translokační sondy EML4-ALK. Pomocí první jmenované sondy lze detekovat všechny varianty ALK přestaveb, pomocí druhé pouze translokaci EML4-ALK, ta však tvoří naprostou většinu translokací. Vyšetřování na přítomnost translokace ALK jsou nemocní s adenokarcinomy, velkobuněčnými karcinomy, smíšenými tumory, obsahující složku adenokarcinomu a s blíže nespecifikovanými NSCLC. Translokace ALK je prediktivním faktorem léčby crizotinibem. Crizotinib (preparát Xalkori) je tyozinkinázový inhibitor s účinností na signální dráhy aktivované ALK, MET a ROS1. Původně byl vyvinut jako selektivní inhibitor C-MET, ale později byla zjištěna i schopnost inhibice ALK. Klinický účinek tohoto preparátu u NSCLC byl potvrzen v klinických studiích. Studie fáze I PROFILE 1001 prokázala 61% četnost léčebných odpovědí a dobu do progresu 10 měsíců bez závislosti na věku, pohlaví, PS a linii léčby. Déle než 1 rok žilo 81% pacientů. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo ve studii fáze II PROFILE 1005. Studie se účastnilo 12 států, zařazeni byli pacienti s ALK pozitivním NSCLC s progresí po jedné a více liniích léčby. Kompletní remise byla zaznamenána u 4 pacientů (2%), partiální remise u 151 pacientů (58%), stabilizace onemocnění u 69 pacientů (27%), pouze u 19 pacientů (7%) došlo k progresi onemocnění, medián PFS byl 8 měsíců [203,204]. Následovala studie fáze III PROFILE

1007, srovnávající účinek crizotinibu s chemoterapií docetaxel nebo pemetrexed u pacientů s ALK translokací, kteří v I.linii léčby dostávali chemoterapii s platinovým derivátem. Nemocní léčení crizotinibem měli delší PFS (7,7 vs. 3,0 měsíce), větší počet léčebných odpovědí (65% vs 20%) při dobré toleranci léčby. V této studii sice nebyly zaznamenány rozdíly v době přežití, (20,3 měsíce u crizotinibu vs. 22,8 měsíce u chemoterapie), ale to mohlo být způsobeno tím, že 86% nemocných po chemoterapii bylo následně léčeno crizotinibem. [205-209]. I přes počáteční léčebný úspěch dojde u nemocných dříve nebo později k progresi onemocnění. Nejčastěji se vyskytuje generalizace do CNS, pak do jater a skeletu [210]. Příčinou bývají tzv. rezistentní mutace C1156Y a L1196M popsány japonskými autory, později byla popsána ještě řada dalších mutací. Proto jsou nyní vyvíjeny a testovány inhibitory ALK druhé generace, např. AP26113 asi s desetkrát větší účinností a AF802 [211]. V České republice byla možnost léčit ALK pozitivní pacienty crizotinibem ve II. nebo III.linii v rámci programu časného přístupu. Na základě těchto zkušeností jsme sami mohli vidět dobrou snášenlivost léčby a dobré léčebné odpovědi [212]. V současné době je tento přípravek v ČR registrován pro léčbu nemocných s již dříve léčeným pokročilým NSCLC s pozitivním průkazem mutace EML4-ALK. Od 1.3.2014 má stanovenou úhradu a lze jej tedy použít k léčbě pacientů s prokázanou ALK translokací ve druhé nebo třetí linii léčby.

## 2. CÍL PRÁCE

V posledních letech došlo k vývoji řady nových protinádorových léčiv, která jsou účinná jen u specifického typu nádoru nebo pacientů. Dochází k individualizaci léčby onkologických nemocných, která je umožněna zejména velkým rozvojem molekulárně biologických metod. K prognóze onemocnění, tzn. předpokládanému průběhu nemoci bez ohledu na zvolenou léčbu se můžeme vyjádřit na základě prognostických faktorů. Řada z nich je známa již delší dobu ( stadium nemoci, grading tumoru, angioinvaze nádoru, prorůstání nádoru do pleury, celkový stav pacientů, laboratorní odchylky), některé byly objeveny v posledních letech ( exprese VEGF, amplifikace genu C-MYC, BRAF mutace, mikroRNA) [18,20,26,32,43,48,59,60, 61,67,68,69,71,75,86,102,103,104,107,110,111,115].

Prediktivní faktory nám pak mohou poskytovat prospektivní informaci o pravděpodobném účinku přesně specifikované léčby [76,77,84,122,124,126,129,133,135,137,145,151,157, 159,168,173,182,197,200,]. Velký nárůst těchto faktorů se objevil s rozvojem molekulárně biologických a genetických vyšetření, jejich počet stále narůstá. Některé markery mohou mít jak prognostický, tak i prediktivní význam.

Cílem práce bylo sledovat výskyt těchto markerů u skupiny pacientů s radikálně odoperovaným NSCLC ve st.IB-IIIa, následně léčených adjuvantní chemoterapií ve složení vinorelbin plus platinový derivát. U pacientů byla hodnocena doba do progresu, celkové přežívání a jejich vztah k jednotlivým sledovaným parametrům (stadium onemocnění, grading tumoru, angioinvaze, prorůstání tumoru do pleury, hladina tubulinu  $\beta$ III, přítomnost EGFR mutace, amplifikace, ALK translokace, přítomnost KRAS mutace, BRAF mutace, a amplifikace C-MET nebo jeho delece).

V souboru jsme sledovali, zda parametry pohlaví, kouření, angioinvaze, invaze tumoru do pleury, stadium onemocnění, hladina tubulinu  $\beta$ III, přítomnost jednotlivých mutací nebo volba platinového derivátu ovlivňují prognózu přežívání. Dále jsme zkoumali, zda lze posoudit prediktivní význam sledovaných parametrů při použití historických údajů o přežívání bez adjuvantní chemoterapie.

### 3.METODIKA

Do studie byli zařazeni pacienti, kteří v letech 2005-2011 prodělali radikální resekci nemalobuněčného plicního karcinomu ( NSCLC) ve stadiu IB-IIIa, a kterým byla následně podána adjuvantní chemoterapie. Všichni pacienti před operací absolvovali vyšetření pozitronovou emisní tomografií ( PET) a následně u nich byla provedena radikální chirurgická operace, tzn. výkon v rozsahu nejméně lobektomie s negativní resekcí linií a lymfadenektomií. V odstupu 4-6 týdnů po hrudní operaci byla zahájena adjuvantní chemoterapie. V plánu bylo podání 4 cyklů chemoterapie ve složení cisplatina nebo karboplatina (CBDCA) v kombinaci s vinorelbinem. Cisplatina se podávala intravenózně ( i.v.) v den 1 v dávce 80mg/m<sup>2</sup>, každé 3 týdny, CBDCA i.v. v dávce AUC 5, rovněž v intervalu 21 dnů. Vinorelbin se v r. 2005 podával i.v. den 1. a 8. každého cyklu v dávce 30 mg/m<sup>2</sup>. V letech 2006-2008 se vinorelbin osmý den cyklu podával v perorální formě (p.o.) v dávce 60 mg/m<sup>2</sup> ( preparát Navelbine oral). Od r. 2009 se používala v adjuvantní léčbě jen perorální forma vinorelbínu v dávce 60 mg/m<sup>2</sup> den 1 a 8. Po ukončení adjuvantní chemoterapie byli pacienti pravidelně v tříměsíčních intervalech sledováni v naší pneumoonkologické ambulanci. Pokud nebyly klinické známky recidivy nebo generalizace onemocnění, provádělo se každý rok kontrolní CT plic, nadledvin a jater, případně scintigrafie skeletu. V případě podezření na recidivu nebo metastatické postižení, byli nemocní vyšetřováni neprodleně.

U všech pacientů patolog zhodnotil přesnou velikost nádoru, postižení lymfatických uzlin, grading nádoru, vztah tumoru a pleury, přítomnost nebo nepřítomnost angioinvaze. Pokud to bylo možné stanovil i hodnotu tubulinu  $\beta$  III. K detekci byla použita metoda nepřímé imunohistochemie. Vyšetření bylo prováděno na tkáních fixovaných ve formalinu a zalitých v parafinu. Řezy silné 5  $\mu$ m byly uchyceny na silanizovaná skla (3-aminopropyl-triethoxysilan, Sigma, USA), odparafinovány a zavodněny. Epitopy antigenů byly revitalizovány v 10 mM citrátovém pufru (pH 6,0) v mikrovlném generátoru po dobu 20 minut při 700 W. Byla použita monoklonální protilátka, anti-tubulin III, která působila hodinu při 21°C. Byl použit detekční systém DAKO En Vision (Dako Cytomation, Dánsko) a exprese proteinů byla vizualizovaná pomocí 3,3'-diaminobenzidinu.

Poté byl vzorek tumoru odeslán do Laboratoře experimentální medicíny. Zde byla po získání DNA z parafinového bločku vyšetřována přítomnost EGFR mutací, amplifikací EGFR, ALK translokací, KRAS mutací, mutací BRAF a C-MET mutací nebo amplifikací. Po získání DNA kolonkovou metodou byly pomocí polymerázové řetězové reakce ( PCR) s měřením nárůstu

množství cílové sekvence v reálném čase, kitem PNAClamp EGFR do r. 2012 a poté kitem cobas EGFR Mutation Test, testovány v genu EGFR mutace: delece v exonu 19, substituce G719X (G719S,G719A,G719C) v exonu 18, substituce S768I a T790M v exonu 20, inzerce v exonu 20, substituce L858R v exonu 21. Amplifikace genu EGFR byla vyšetřována metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s použitím sondy LSI EGFR1 přímo značené SpectrumOrange a centromerické sondy pro chromozom 7 značené SpectrumGreen, stanovil se počet kopií genu EGFR1 a chromozomu 7. S použitím sondy LSI ALK Spectrum Green ( počátek genu ALK;ALK1)/SpectrumOrange (konec genu ALK; ALK2) byl stanoven počet kopií genu ALK a translokace distální části genu ALK. Kitem *therascreen* KRAS PCR Kit (QUIGEN) se vyšetřovaly mutace genu KRAS ( kodon 12:Ala, Asp, Arg, Cys, Ser, Val a kodon 13:Asp). Kitem BRAF p.Val600Glu ( IntellMed) byla vyšetřována přítomnost mutace V600E genu BRAF. Metodou FISH pak C-MET amplifikace nebo delece C-MET.

V souboru jsme sledovali, zda parametry pohlaví, kouření, angioinvaze, invaze tumoru do pleury, stadium onemocnění, hladina tubulinu  $\beta$ III, přítomnost jednotlivých mutací nebo volba platinového derivátu ovlivňují prognózu a přežívání. Dále jsme zkoumali, zda lze posoudit prediktivní význam sledovaných parametrů při použití historických údajů o přežívání bez adjuvantní chemoterapie.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí long rank testu.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Klinické charakteristiky souboru

Do studie bylo zařazeno 75 pacientů, u kterých byla v letech 2005-2011 provedena radikální chirurgická resekce pro NSCLC ve stadiu IB-IIIa. V souboru bylo 50 mužů a 25 žen, věkový průměr 64 let se příliš nelišil od mediánu 65 let (29 -78 let). Nejčastějším histologickým typem byl spinocelulární karcinom, který se vyskytl u 42 nemocných, druhým nejčastěji zastoupeným nádorem byl adenokarcinom, u 25 pacientů, ten byl ale nejčastějším nádorem u žen, velkobuněčný karcinom se vyskytl u 8 pacientů. Viz tabulky č.6-8, Graf č.1,2

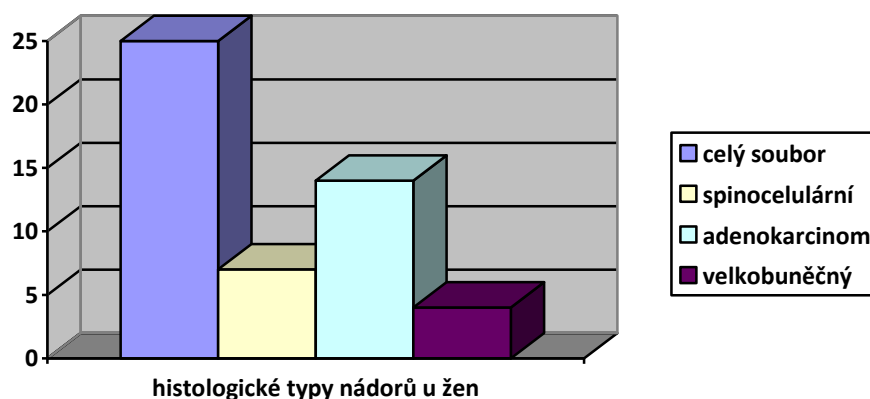
**Tabulka č.6: Histologické typy nádoru a jejich zastoupení v závislosti na pohlaví**

	celkový počet	muži	ženy
Spinocelulární karcinom	42 (56%)	35 (46,7%)	7 (9,3%)
Adenokarcinom	25 (33,33%)	11 (14,7%)	14 (18,6%)
Velkobuněčný karcinom	8 (10,66%)	4 (5,3%)	4 (5,3%)

**Tabulka č.7: Histologické typy nádorů u žen**

	Celkový počet	Spinocelulární	Adenokarcinom	Velkobuněčný
Ženy	25	7 (28%)	14 (56%)	4 (16%)

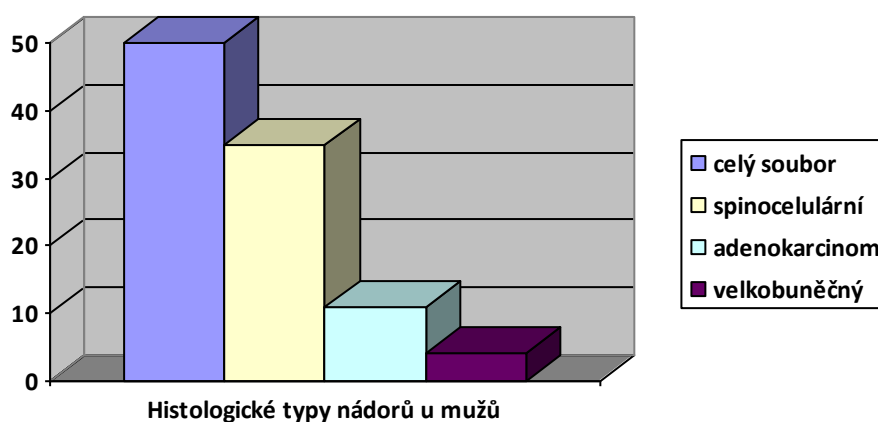
**Graf č.1: Histologické typy nádorů u žen**



**Tabulka č.8: Histologické typy nádorů u mužů**

	<b>Celkový počet</b>	<b>Spinoceleulární</b>	<b>Adenokarcinom</b>	<b>Velkobuněčný</b>
<b>Muži</b>	<b>50</b>	<b>35 (70%)</b>	<b>11 (22%)</b>	<b>4 (8%)</b>

**Graf č.2: Histologické typy nádorů u mužů**



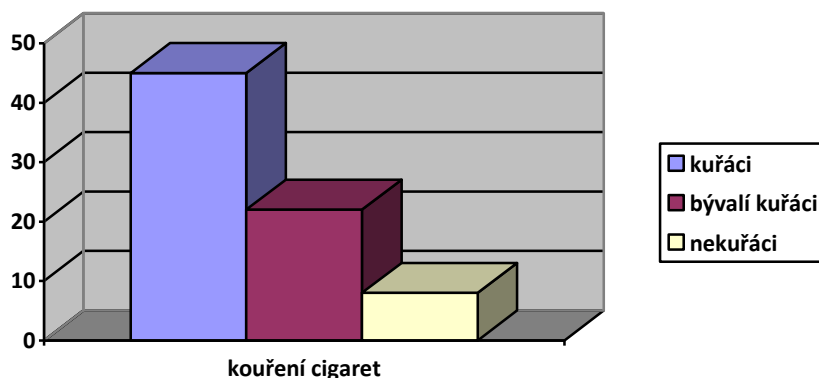
Pacienti byli rozděleni do stadií na základě definitivního histologické vyšetření postižení mediastinálních ( N2) a spádových (N1) uzlin s použitím TNM klasifikace. Nejčasteji byli operováni pacienti se stadiem onemocnění IB 35 x, ve stadiu IIA 8x , ve stadiu IIB 13x a 19 pacientů bylo operováno ve stadiu IIIA. Zastoupení jednotlivých stadií onemocnění je znázorněno v tabulce č.9.

**Tabulka č.9: Zastoupení jednotlivých stadií onemocnění**

	<b>celkový počet</b>	<b>muži</b>	<b>ženy</b>
<b>stadium IB</b>	<b>35 (46,66%)</b>	<b>26</b>	<b>9</b>
<b>stadium IIA</b>	<b>8 (10,66%)</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>stadium IIB</b>	<b>13 (17,33%)</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
<b>stadium IIIA</b>	<b>19 (25,33%)</b>	<b>10</b>	<b>9</b>

Kuřáci tvořili 60% celého souboru ( 45 nemocných). Bývalí kuřáci, pacienti, kteří přestali kouřit déle než 1 rok před stanovením diagnózy představovali necelých 30% všech nemocných ( 22 pacientů) a nekuřáků bylo 8 (10,7%). Podrobné rozdělení zobrazuje graf č.3 a tabulka č.10.

**Graf č.3: Rozdělení souboru dle kouření cigaret**



**Tabulka č.10: rozdělení souboru podle kouření cigaret**

	celý soubor	muži	ženy
<b>kuřáci</b>	<b>45 (60%)</b>	<b>31 (41,3%)</b>	<b>14 (18,7%)</b>
<b>bývalí kuřáci</b>	<b>22 (29,3%)</b>	<b>16 (21,3%)</b>	<b>6 (8%)</b>
<b>nekuřáci</b>	<b>8 (10,7%)</b>	<b>3 (4%)</b>	<b>5 (6,7%)</b>

Pokud bychom pacienty rozdělili podle pohlaví, tak ve skupině mužů tvořili kuřáci 62%, bývalí kuřáci 32% a nekuřáci pouze 6%. I u žen tvořily kuřačky více než polovinu souboru – 56%, bývalé kuřačky 24% a nekuřačky 20%. Viz.tabulka č.11.



**Tabulka č.11: rozdělení podle pohlaví a kouření**

	<b>muži</b>	<b>ženy</b>
<b>celkový počet</b>	<b>50</b>	<b>25</b>
<b>kuřáci</b>	<b>31 (62%)</b>	<b>14 ( 56%)</b>
<b>bývalí kuřáci</b>	<b>16 (32%)</b>	<b>6 (24%)</b>
<b>nekuřáci</b>	<b>3 ( 6%)</b>	<b>5 (20%)</b>

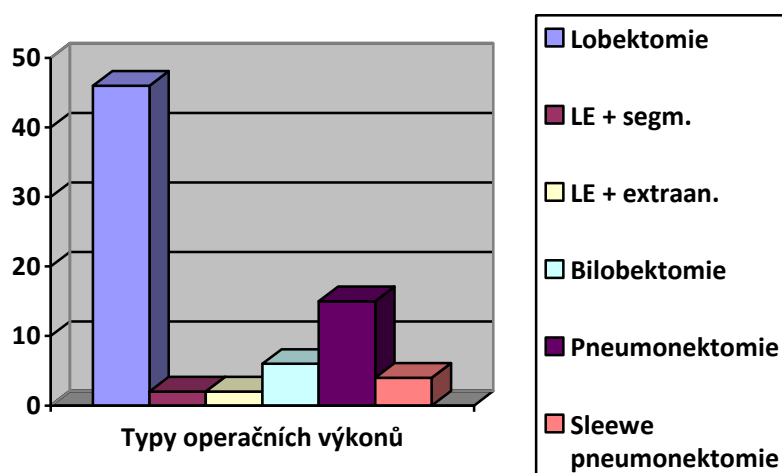
#### **4.2 Chirurgická resekce**

U 5 pacientů se před operací nepodařilo ověřit etiologii suspektního, PET pozitivního ložiska. U těch byl diagnostikován bronchogenní karcinom peroperačním histologickým vyšetřením, po kterém následovala radikální resekce. Šlo o pacienty ve stadiu IB s malým periferním ložiskem. Další dva pacienti s PET pozitivními kontralaterálními uzlinami byli nejdříve odesláni na mediastinoskopii, k histologickému ověření eventuálního postižení těchto uzlin. V jednom případě se jednalo o sarkoidózu uzlin, u druhého pacienta byly zvětšené a FDG akumulující uzliny histologicky bez metastatického postižení. U všech pacientů byla provedena radikální resekce ( výkon v rozsahu minimálně lobektomie ) s histologicky negativní resekční linií ve smyslu přítomnosti nádorových buněk. Všichni pacienti měli provedenu systematickou mediastinální lymfadenektomii, která spočívá v odstranění veškeré tukové lymfatické tkáně mediastina. Jednalo se tedy o disekci celé sítě lymfatických cév a uzlin spolu s tukovou tkání blokově. Uzliny v preparátu byly označeny podle klasifikace uzlin. Tato metoda umožňuje nejpřesnější stanovení stadia onemocnění. Nejčastějším chirurgickým výkonem byla lobektomie ( 50 pacientů), u 5 pacientů bronchoplastická, z důvodu omezení rozsáhlejšího výkonu pro špatné funkční parametry. U dalších čtyřech pacientů byla lobektomie rozšířena o segmentektomii nebo extraanatomickou resekci z dalšího laloku pro prorůstání tumoru do druhého laloku. Druhým nejčastějším výkonem byla pneumonektomie, která byla provedena u 15 pacientů, u 6 pacientů bilobektomie a 4 pacienti měli resekční výkon v rozsahu rozšířené ( sleewe) pneumonektomie, ve dvou případech i s parciální resekci perikardu. Pravostranná pneumonektomie, která byla provedena u 5 pacientů, byla méně častým výkonem,, 14 pacientům byla odstraněna plíce levá. Počty výkonů jsou uvezeny v tabulce č.12 a grafu č.4

**Tabulka č.12: Typy operací**

<b>Lobektomie</b>	<b>50 (66,7%)</b>
<b>Bilobektomie</b>	<b>6 (8%)</b>
<b>Pneumonektomie</b>	<b>15 (20%)</b>
<b>Sleewe pneumonektomie</b>	<b>4 (5,3%)</b>

**Graf č.4: typy operačních výkonů**



U 20 pacientů došlo v pooperačním průběhu ke komplikacím, které většinou nebyly závažné. U třech pacientů šlo o infekci v oblasti operační rány, u 5 pacientů se jednalo o komplikace kardiální ( 3x ataka fibrilace síní, 1x infarkt myokardu, 1x kardiální selhání ), které se zvládly konzervativní léčbou. U 8 pacientů byla nutná déle trvající pooperační drenáž pro protrahovaný únik vzduchu (air leak), u 3 přetrvával PNO i přes drenáž a byla u nich provedena chemická pleurodéza hypertonickým roztokem glukózy. Pouze jeden pacient ze souboru byl reoperován pro hemotorax. Pooperační komplikace jsou zobrazeny v tabulce č.13.

**Tabulka č.13: Pooperační komplikace**

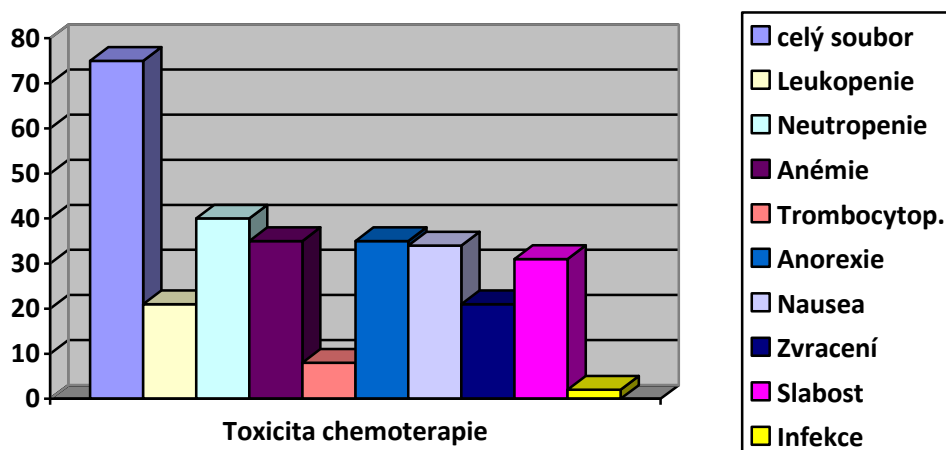
<b>Komplikace celkem</b>	<b>20 (26,7%)</b>
<b>Kardiální komplikace</b>	<b>5 (6,7%)</b>
<b>Infekční komplikace</b>	<b>3 (4%)</b>
<b>Air leak</b>	<b>8 (10,7)</b>
<b>PNO</b>	<b>3 (4%)</b>
<b>Hemotorax</b>	<b>1 (1,3%)</b>

### 4.3 Adjuvantní chemoterapie

Po dechové rehabilitaci a zhojení operační rány byla u pacientů zahájena adjuvantní chemoterapie v odstupu 4-6 týdnů od resekčního výkonu. U všech pacientů bylo plánováno podání 4 cyklů chemoterapie ve složení platinový derivát ( cisplatina nebo CBDCA) společně s vinorelbinem. Cisplatina se podávala v dávce 80 mg/m<sup>2</sup> den 1 každého cyklu, CBDCA pak v dávce AUC 5 ( area under the curve – plocha pod křivkou plazmatických koncentrací v čase od startu infuze), rovněž den 1 každého cyklu. Vinorelbin se do r.2006 podával den 1 a 8 v intravenózní infuzi (i.v.) v dávce 30 mg/m<sup>2</sup>, v letech 2006-2008 den 8 v perorální formě ( Navelbine oral) v dávce 60 mg/m<sup>2</sup>. Od r.2009 se podával vinorelbin pouze v orální formě v den 1 i 8 v dávce 60 mg/m<sup>2</sup>. Chemoterapie byla podávána v třítydenních cyklech. Všichni pacienti užívali setrony jako prevenci možných nežádoucích účinků gastrointestinálních. Před každým podáním chemoterapie se kontrolovaly hodnoty krevního obrazu ( den 1 a 8), podání chemoterapie bylo odloženo, pokud došlo k poklesu Hemoglobinu ( Hb) pod 100 g/l , Leukocytů ( Leu) pod 4,0 x 10<sup>9</sup>/l, absolutnímu počtu granulocytů pod 1,5 x 10<sup>9</sup>/l a počtu Trombocytů ( Trombo) pod 100 x 10<sup>9</sup>/l. Kombinací cisplatina s vinorelbinem jsme léčili 17 pacientů ( 22,7%), u 58 pacientů ( 77,3%) jsme použili kombinaci vinorelbinu s karboplatinou. CBDCA jsme volili u pacientů starších, kardiaků, diabetiků a u pacientů s renální insuficiencí. Všechny 4 cykly adjuvantní chemoterapie byly podány 70 pacientům. Tři pacienti odmítli podání 4.cyklu chemoterapie, u jednoho pacienta byla chemoterapie ukončena po 2 cyklech pro infekční komplikace s nutností hospitalizace a u dalšího pacienta byla chemoterapie ukončena po 3.cyklu pro hematologickou toxicitu. Podání chemoterapie bylo odloženo u 24 pacientů ( 32%), většinou pro hematologickou toxicitu, u 4 pacientů

(5,3%) jsme byli nuceni dávky cytostatik redukovat na 50%, rovněž s ohledem na hematologickou toxicitu. Pouze 3 pacienti museli být hospitalizováni z důvodu nežádoucích účinků. Jeden pacient pro febrilní neutropenii a dva pro infekční komplikaci ( pneumonii). Nejčastějším nežádoucím účinkem chemoterapie byla neutropenie, která se vyskytla ve více než polovině případů, Dalšími, již méně častými nežádoucími účinky byla leukopenie, anémie, trombocytopenie, anorexie, nauzea, zvracení, slabost a infekce. Dyspeptické potíže byly čtenější u pacientů, kterým byla podávána cisplatina. Čtyři pacienti s neutropenií gr. 4 byli léčeni růstovými faktory, u 3 pacientů bylo nutné korigovat hodnoty hemoglobinu podáním transfuze. Podrobné rozdělení toxicity je zobrazeno grafem č. 5.

**Graf č. 5: Toxicita adjuvantní chemoterapie**



Podrobnější rozdělení toxicity chemoterapie zobrazují tabulky č. 14,15,16

**Tabulka č.14: Hematologická toxicita**

	Leukopenie			Neutropenie			Anémie		Trombocytop.	
	gr.2	gr.3	gr.4	gr.2	gr.3	gr.4	gr.2	gr.3	gr.2	gr.3
<b>počet</b>	16	1	4	17	18	5	16	3	4	4
<b>procento</b>	21,3	1,3	5,3	22,7	24	6,7	21,3	4	5,3	5,3

**Tabulka č.15: Gastrointestiální toxicita**

	Anorexie		Nausea		Zvracení	
	gr.2	gr.3	gr.2	gr.3	gr.2	gr.3
<b>počet</b>	<b>20</b>	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>9</b>
<b>procento</b>	<b>26,7</b>	<b>20</b>	<b>25,3</b>	<b>20</b>	<b>16</b>	<b>12</b>

**Tabulka č.16: Ostatní toxicita**

	Slabost gr.2	Slabost gr.3	Infekce gr.2	Infekce gr.3
<b>počet</b>	<b>21</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>procento</b>	<b>28</b>	<b>13,3</b>	<b>0</b>	<b>2,7</b>

Po ukončení adjuvantní chemoterapie byli pacienti sledováni v pneumoonkologické poradně naší ambulance v intervalu třech měsíců. Každý rok bylo provedeno kontrolní CT plic, nadledvin a jater k vyloučení recidivy nebo generalizace onemocnění. V případě nových změn na RTG nebo klinických potíží, bylo provedeno CT dříve, případně doplněna další vyšetření (scintigrafie skeletu, CT nebo magnetická rezonance mozku).

#### **4.4. Výsledky sledování souboru**

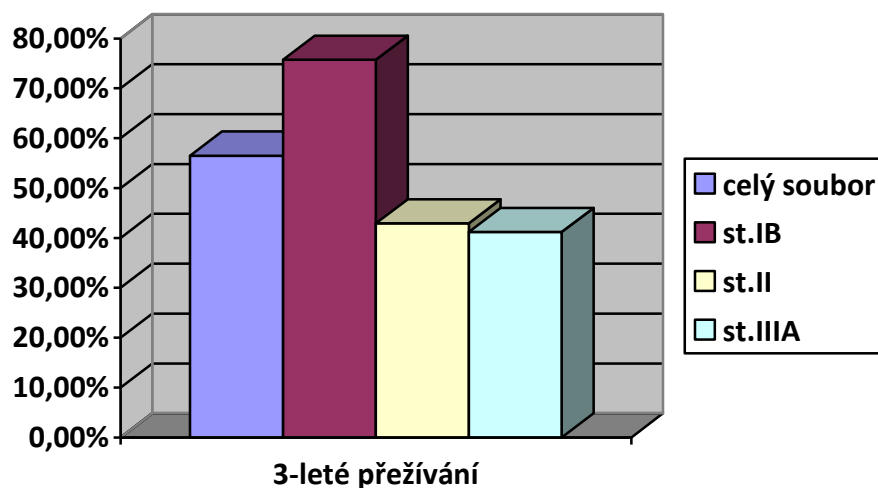
Přežívání souboru pacientů bylo sledováno k datu 31.10.2013. K tomuto datu zemřelo celkem 36 pacientů (48%), z toho na progresi bronchogenního karcinomu 27 nemocných (36%). U čtyřech pacientů se vyskytl duplicitní karcinom ( 1x karcinom močového měchýře společně s karcinomem prostaty, 1x karcinom hrtanu, 1x světlobuněčný karcinom ledviny a 1x karcinom tlustého střeva). Karcinom střeva byl zachycen v časném stadiu onemocnění a byl radikálně odoperován, ostatní 3 maligní onemocnění měla špatný průběh a byla příčinou úmrtí pacientů. Šest pacientů zemřelo na jiné než maligní onemocnění ( 3 pacienti na infarkt myokardu, 2 na plicní embolii a 1 na akutní CMP s krvácením do mozku). Během sledovacího období došlo k relapsu onemocnění u 34 nemocných, pouze v jednom případě se

jednalo o lokální recidivu a ve dvou případech o generalizaci do mediastinálních uzlin. V těchto případech došlo po radikální zevní radioterapii ke kompletní remisi onemocnění. U ostatních pacientů došlo ke vzdálené generalizaci 8x do CNS, 7x do plic a na pleuru, 6x do skeletu, u zbylých 10 pacientů se jednalo o mnohočetné metastatické postižení více orgánů. 39,65% pacientů v souboru dosáhlo 5-letého přežívání (hodnoceno 58 pacientů), 3-letého přežívání pak 56,2% (hodnoceno z 69 pacientů). Jsou zde patrné rozdíly v přežívání v závislosti na stadiu onemocnění, jak zobrazuje tabulka č. 16 a graf č.6 a 7

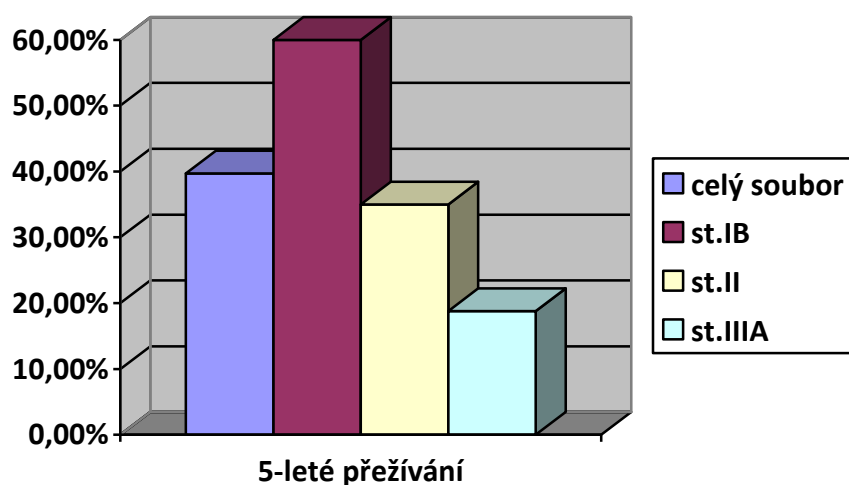
**Tabulka č.16: 5-leté a 3-leté přežívání celého souboru dle stadia onemocnění**

	<b>Celý soubor</b>	<b>IB</b>	<b>II</b>	<b>IIIA</b>
<b>3-leté přežívání</b>	<b>56,5%</b>	<b>75,7%</b>	<b>42,9%</b>	<b>41,2%</b>
<b>5-leté přežívání</b>	<b>39,7%</b>	<b>60%</b>	<b>35%</b>	<b>18,8%</b>

**Graf č.6:3-leté přežívání celého souboru pacientů dle stadia onemocnění**



**Graf č.7: 5-leté přežívání celého souboru pacientů dle stadia onemocnění**



Pokud bychom vyřadili pacienty, u kterých byla příčina úmrtí jiná, než bronchogenní karcinom ( embolie, CMP, IM), pak jsou výsledky 5-leté a 3-letého přežití lepší, jak je zobrazeno v tabulce č.17.

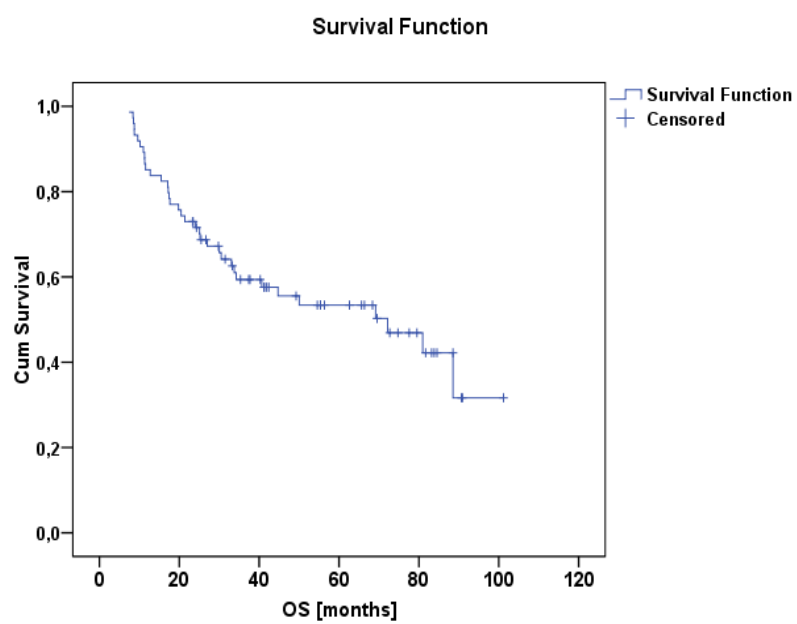
**Tabulka č.17: 3-leté a 5-leté přežití pacientů po vyřazení nemocných, jejichž příčinou úmrtí nebyl bronchogenní karcinom**

	Celý soubor	IB	II	IIIA
<b>3-leté přežívání</b>	<b>62,9%</b>	<b>81,5%</b>	<b>50%</b>	<b>46,7%</b>
<b>5-leté přežívání</b>	<b>44%</b>	<b>70,6%</b>	<b>36,8%</b>	<b>21,4%</b>

Očekávaný medián celkového přežití je u celého souboru, se zařazením pacientů, kteří zemřeli z jiných příčin 72,16 měsíce. Pokud jsme ze statistického zpracování vyřadili pacienty, kteří umřeli z jiných příčin, než na bronchogenní karcinom, pak očekávaného mediánu OS nebylo dosaženo, očekávaný průměr OS činí 69,46 měsíce. Medián doby do progresu onemocnění je 60,62 měsíce. Medián celkového přežití (OS) a doby do progresu ( PFS) ukazují grafy č.8-10

### Graf č.8: Celkové přežití (OS) celého souboru:

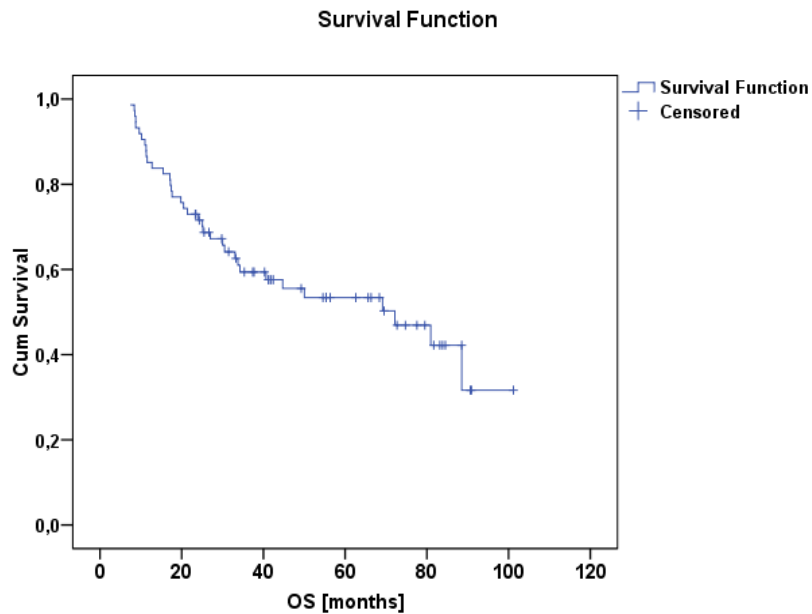
Očekávaný medián OS 72,16 měsíce, 95% konfidenční interval = 95CI: 50,78;69,36





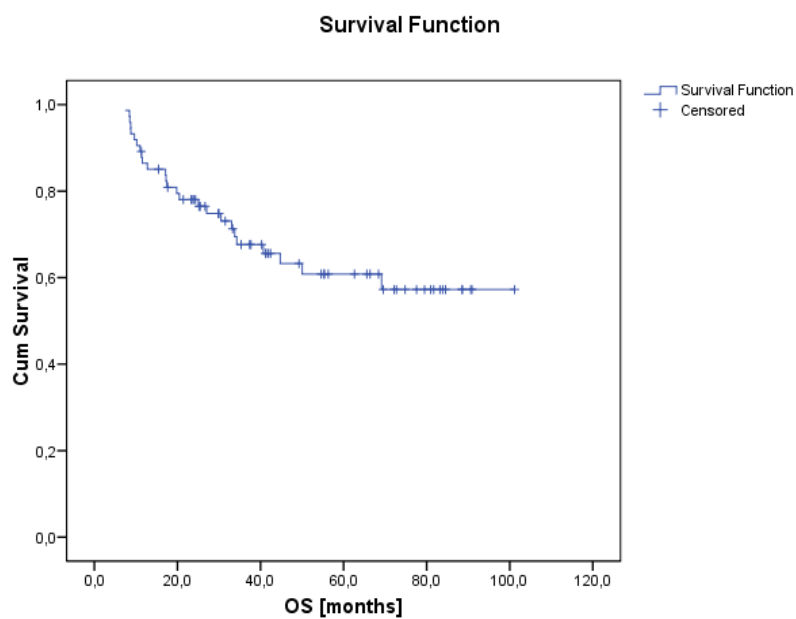
### Graf 9.: Doba bez progresu PFS celého souboru

Očekávaný medián doby do progresu celého souboru 60,62 měsíce, 95CI: 26,3;94,86



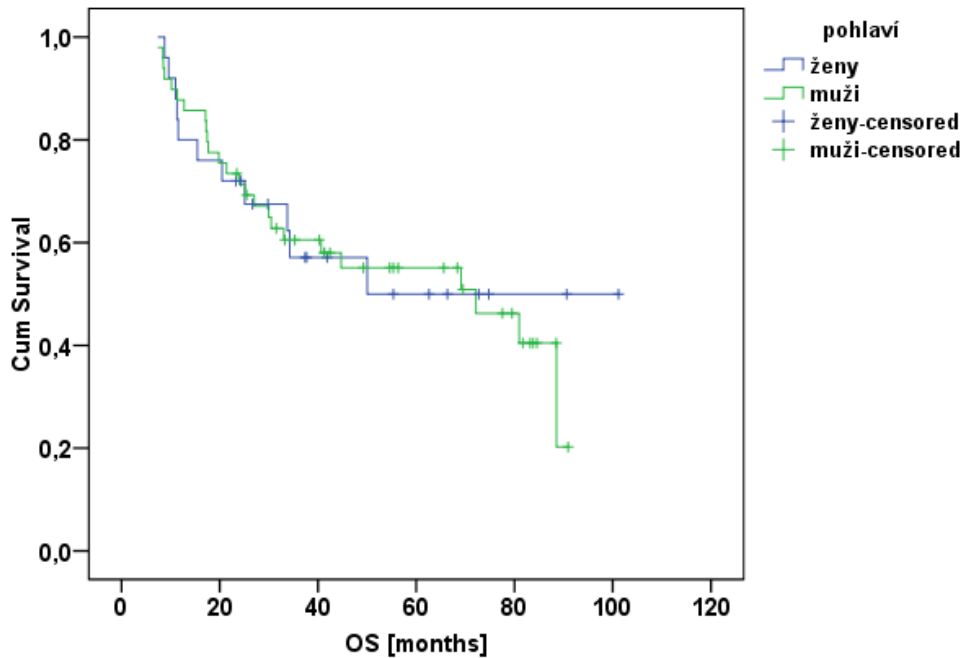
### Graf č.10: Celkové přežití souboru po vyřazení pacientů, kteří neumřeli na progresi karcinomu plic

Očekávaný medián celkového přežití nebyl zatím dosažen,

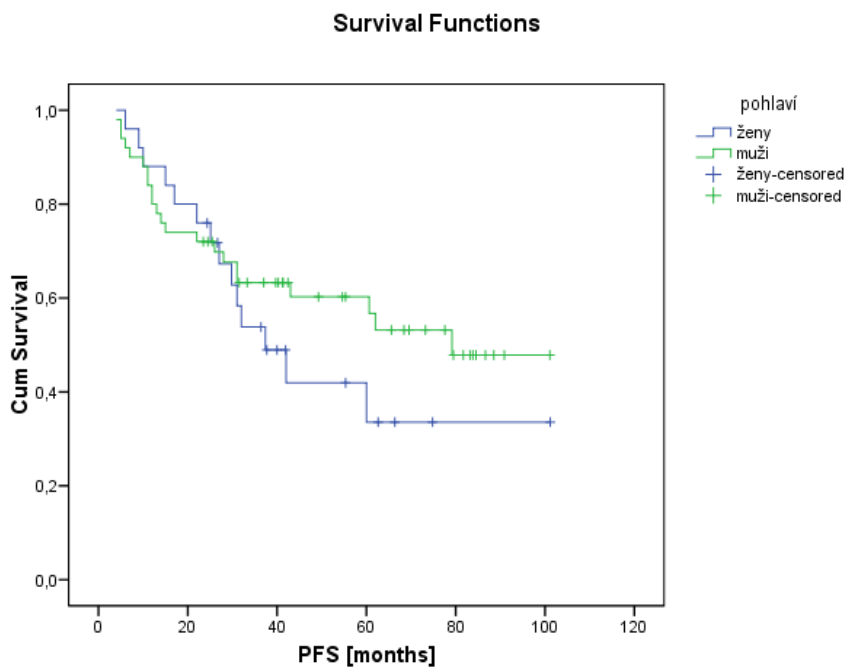


Pokud jsme srovnávali OS a PFS v závislosti na pohlaví, tak nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi muži a ženami. Porovnání mužů a žen bylo provedeno long rank testem, Zobrazení v grafech č.11 a 12.

**Graf č.11: Celkové přežití v závislosti na pohlaví (p 0,841)**



**Graf č.12: Doba do progresse v závislosti na pohlaví (p 0,330):**

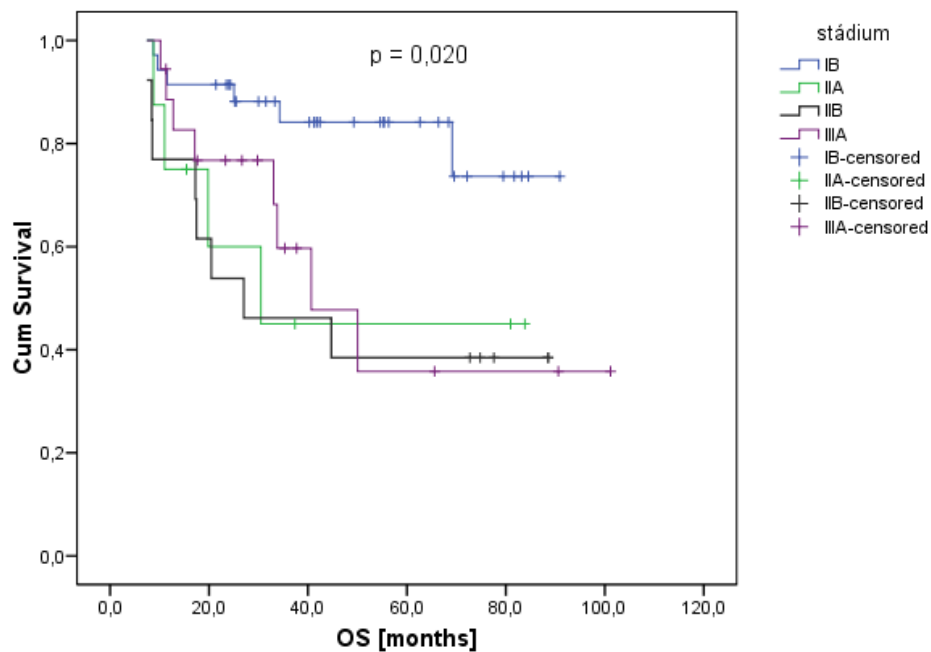


Při srovnání celkového přežití a doby dogrese u jednotlivých stadií onemocnění, bylo celkové přežití i doba dogrese signifikantně delší u st.IB, mezi ostatními stadii onemocnění (IIA, IIB, IIIA) nebyl nalezen signifikantní rozdíl v celkovém přežití ani v době dogrese onemocnění.

Viz.grafy 13 a 14.

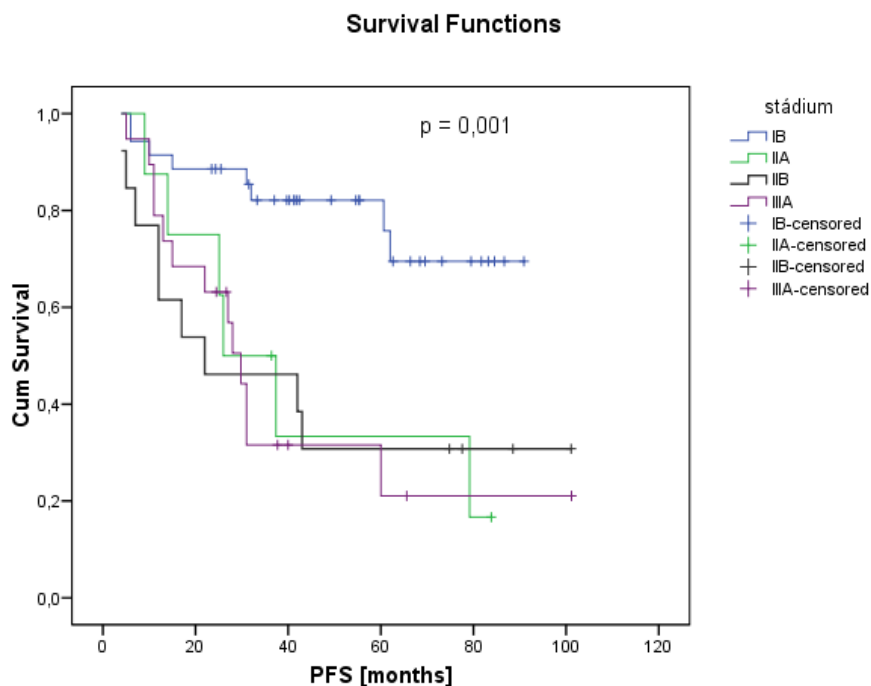
### Graf č.13: Celkové přežití –srovnání jednotlivých stadií onemocnění

Log rank testem byla prokázána statisticky významná závislost mezi pravděpodobností přežití a stádiem nemoci,  $p = 0,020$ .



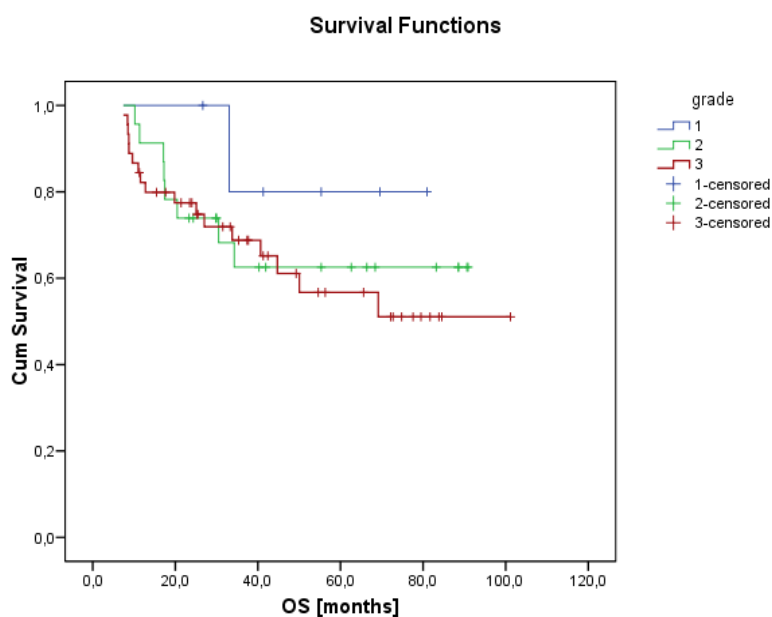
### Graf č.14: Doba do progresu – srovnání jednotlivých stádií onemocnění

Log rank testem byla prokázána statisticky významná závislost mezi pravděpodobností výskytu progresu a stádiem nemoci,  $p = 0,001$ .

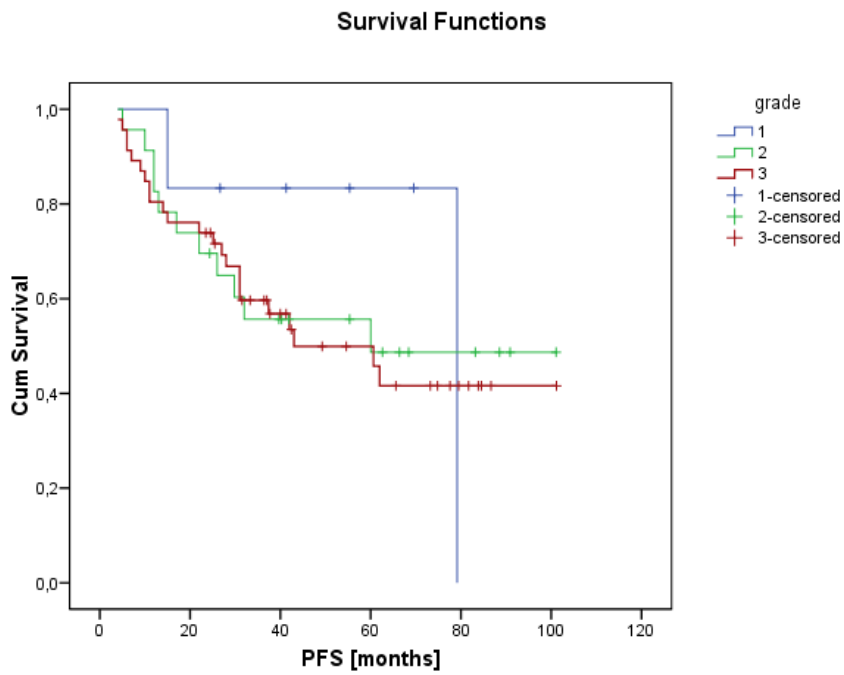


Pokud jsme srovnávali celkové přežití a dobu do progresu v závislosti na diferenciaci nádoru (grade 1-3), nezaznamenali jsme signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami, viz. graf č.15 a 16.

### Graf č.15: Celkové přežití podle diferenciacie nádoru ( $p 0,531$ )



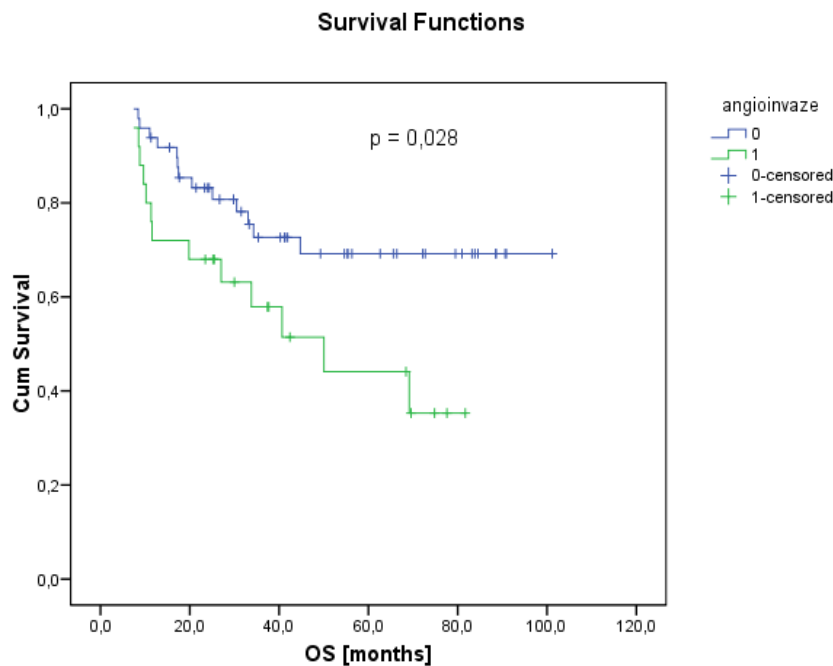
**Graf č.16: Doba do progresu podle diference nádoru (p 0,726)**



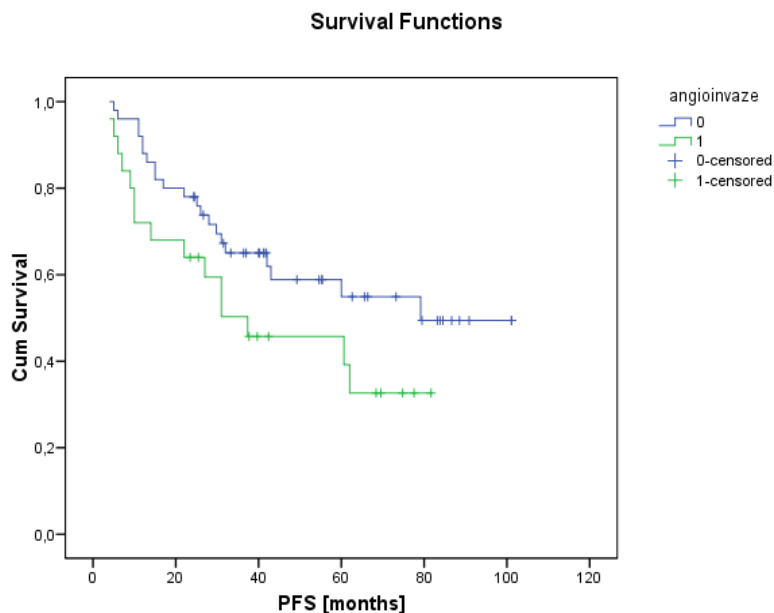
Angioinvaze byla prokázána u 26 pacientů. Bylo prokázáno signifikantně delší celkové přežívání u pacientů bez angioinvaze. Viz.grafy č.17 a 18.

### Graf č.17: Celkové přežití v závislosti na přítomnosti angioinvaze

Log rank testem byly prokázány statisticky významně vyšší pravděpodobnosti přežití u pacientů bez angioinvaze,  $p = 0,028$ .

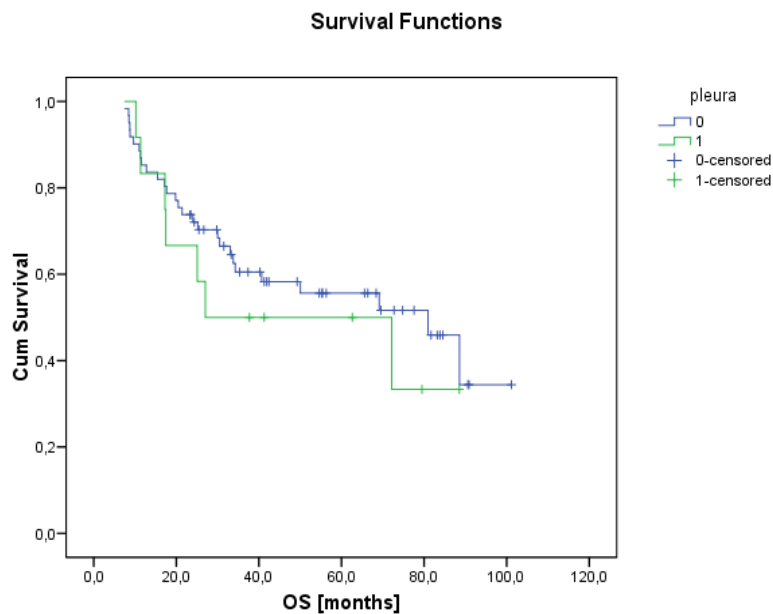


### Graf č.18: Doba do progresu v závislosti na přítomnosti angioinvaze (p 0,089)

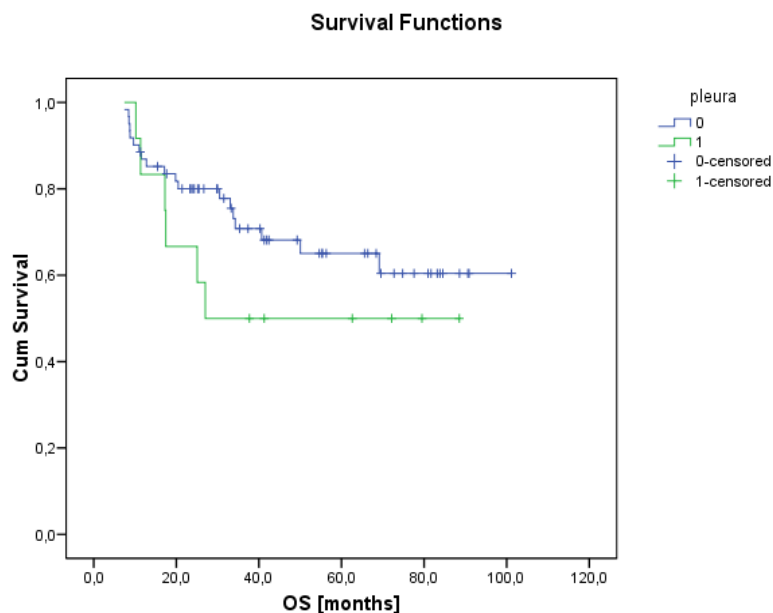


Při srovnávání celkového přežití a doby do progresu podle přítomnosti nebo nepřítomnosti invaze do pleury, která byla prokázána u 12 pacientů jsme nezjistili signifikantní rozdíl. Graf č.19 a 20

**Graf č.19: Celkové přežití v závislosti na přítomnosti invaze do pleury (p 0,459)**



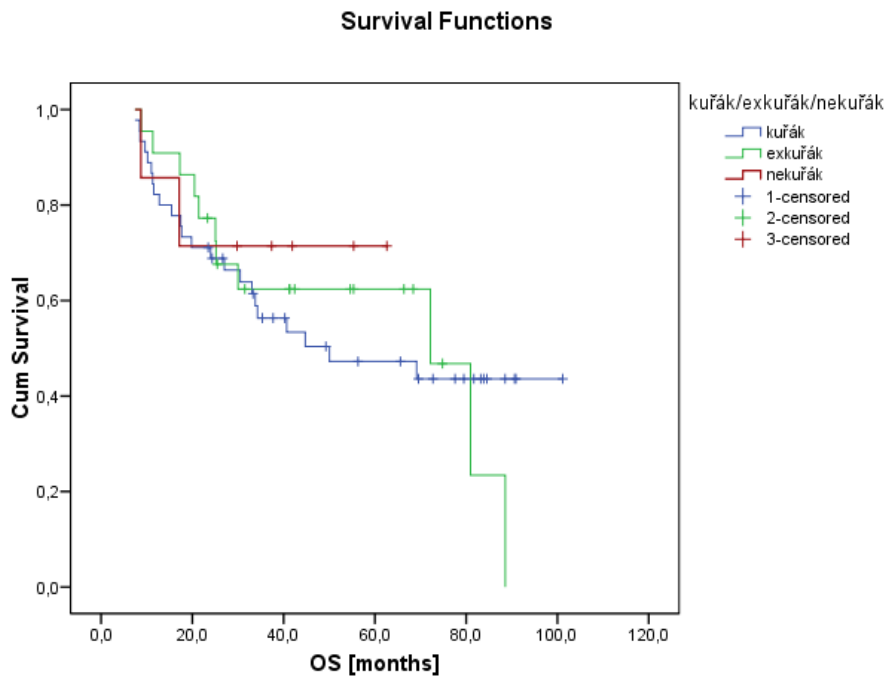
**Graf č.20: Doba do progresu v závislosti na přítomnosti invaze do pleury (p 0,750)**



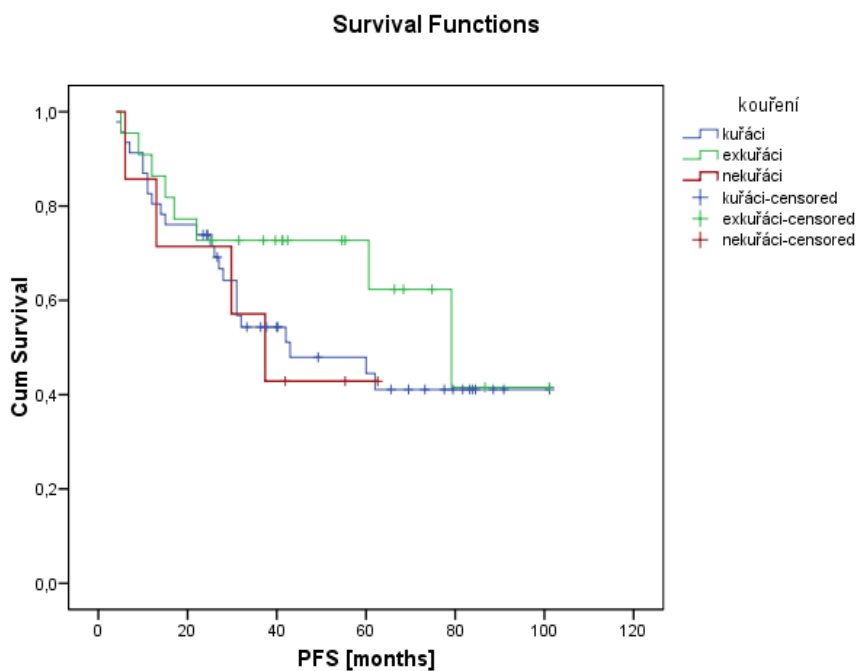
Rovněž jsme nezjistili signifikantní rozdíly v celkovém přežití a v době do progresu onemocnění ve vztahu ke kouření. Pacienti byli rozděleni do skupin kuřáků, bývalých kuřáků

( přestali kouřit 12 měsíců před stanovením diagnózy bronchogenního karcinomu) a nekuřáků. Viz.graf č.21 a 21.

**Graf č.21: Celkové přežívání v závislosti na kouření cigaret (p 0,840)**



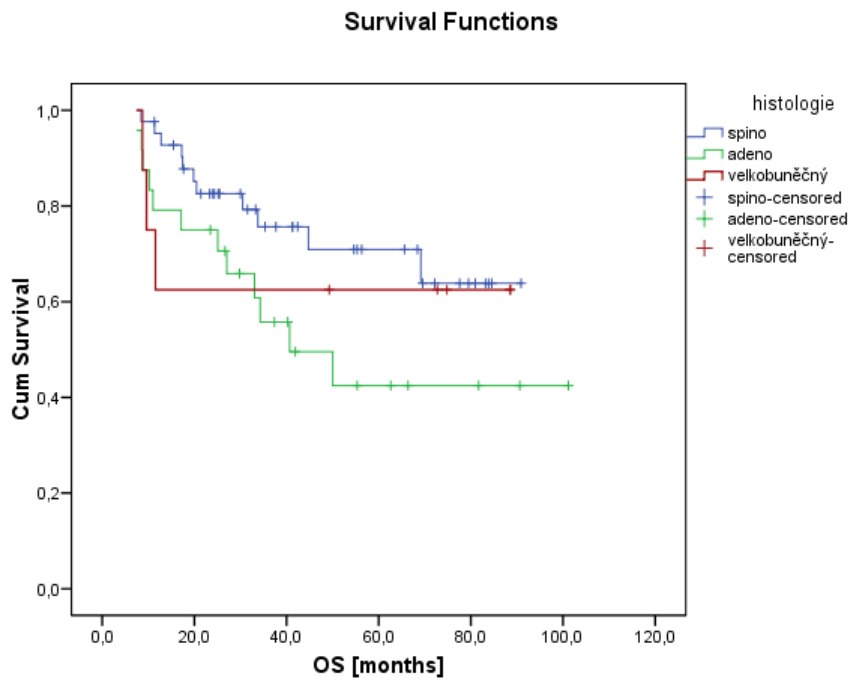
**Graf č.22: Doba do progresse v závislosti na kouření cigaret (p 0,483)**



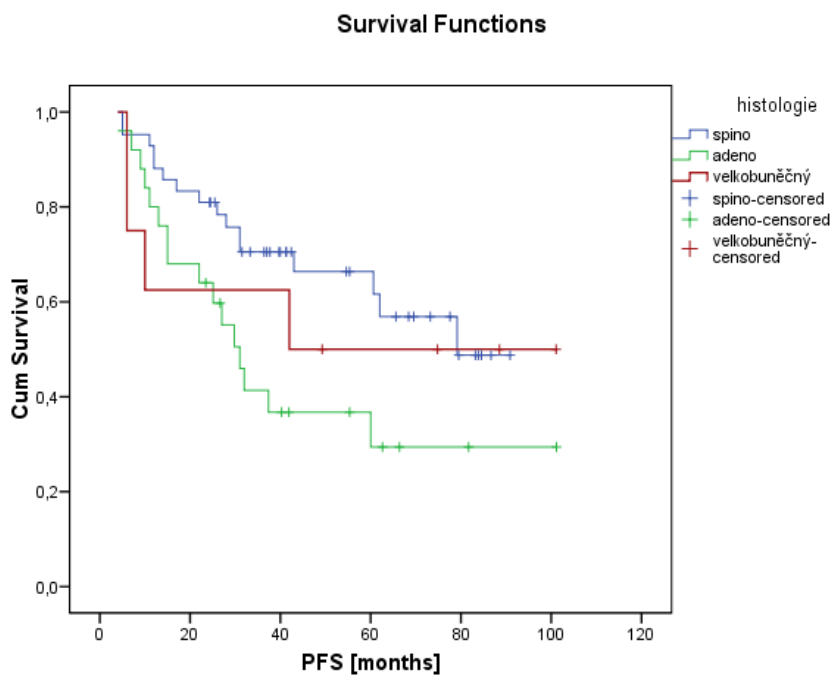


Nezjistili jsme ani signifikantní rozdíly v celkovém přežití a době do progresu u jednotlivých histologických typů nádorů. Viz.grafy č.23 a 24.

**Graf č.23: Celkové přežití dle histologie nádoru (p 0,180)**

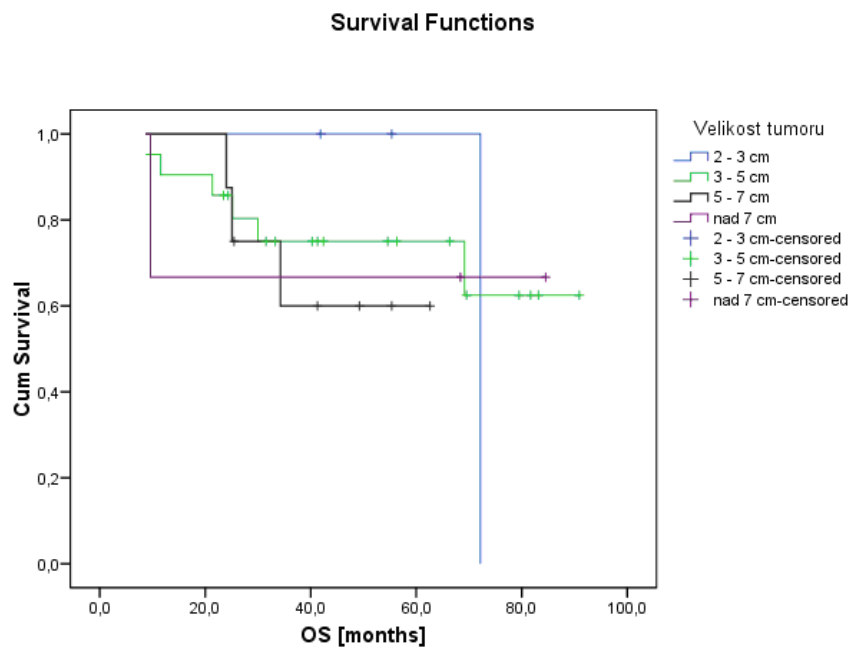


**Graf č.24: Doba do progresu dle histologie nádoru (p 0,081)**

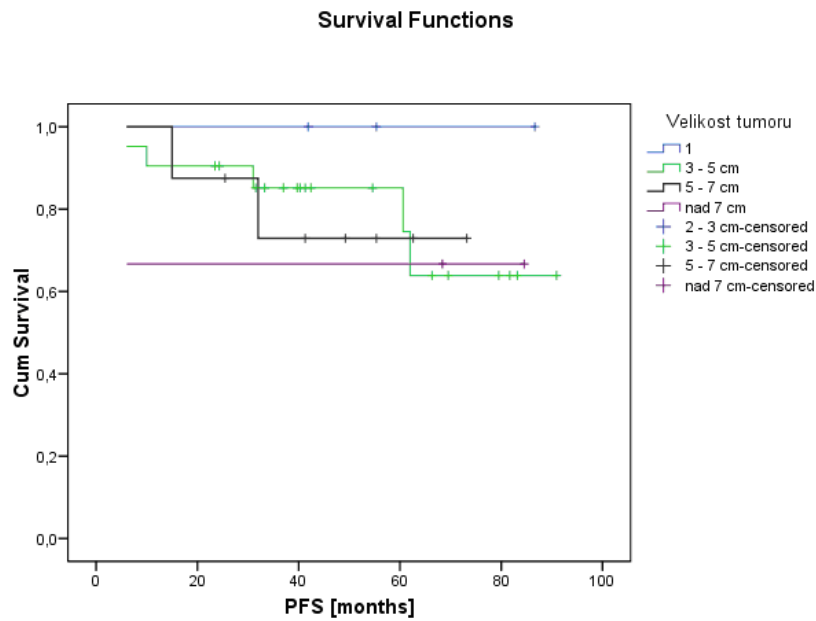


Pacienti, u kterých nebyla prokázána generalizace do N1 nebo N2 uzlin jsme rozdělili do skupin podle velikosti nádoru: 2-3 cm, 3-5cm, 5-7 cm a nad 7 cm. Ani zde nebylo prkázáno siginikantně delší celkové přežití ani doba do progrese u žádné skupiny. Viz.graf č.25 a 26.

**Graf č.25: Celkové přežití dle velikosti nádoru (p 0,919)**

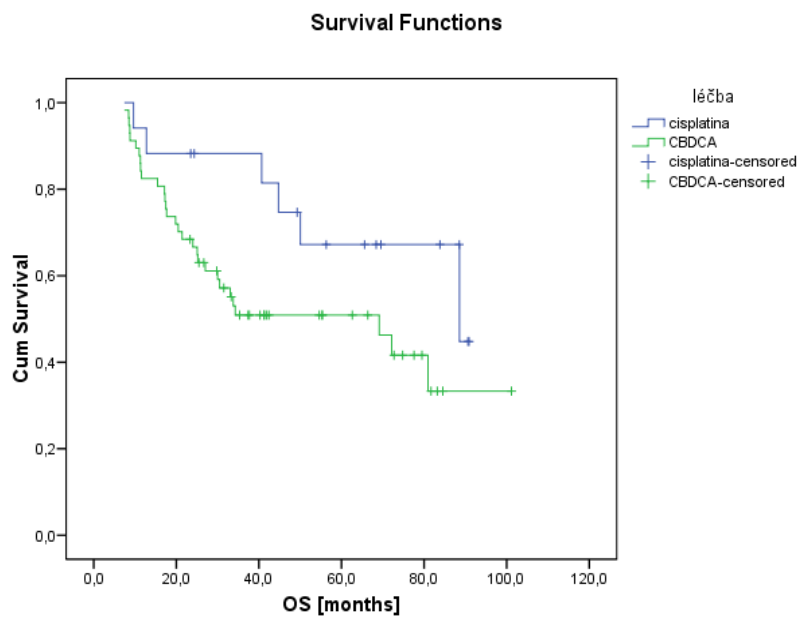


**Graf č.26: Doba do progresu dle velikosti nádoru (p 0,619)**

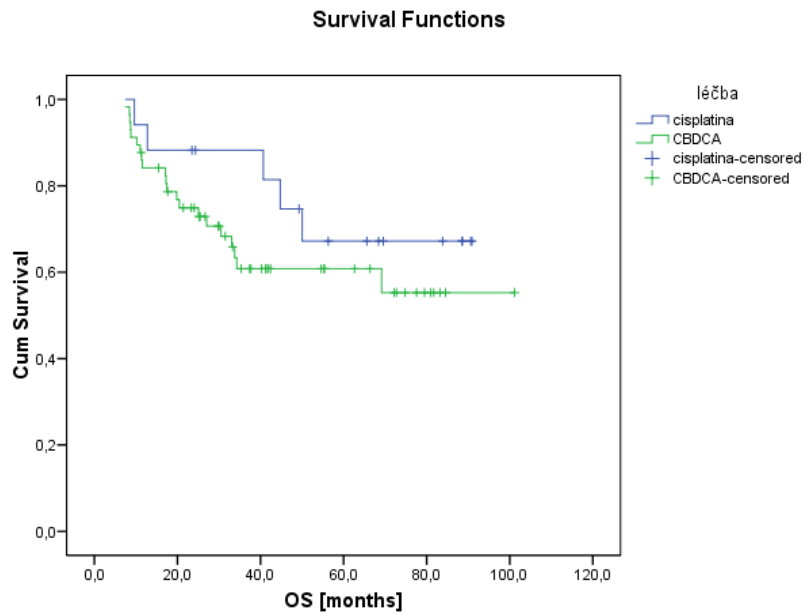


Neprokázali jsme ani signifikantní rozdíl v celkovém přežití a době do progresu v závislosti na podaném platinovém derivátu ( cisplatina nebo karboplatina). Viz.grafy 27 a 28.

**Graf č.27: Celkové přežití v závislosti na podaném platinovém derivátu (p 0,76)**

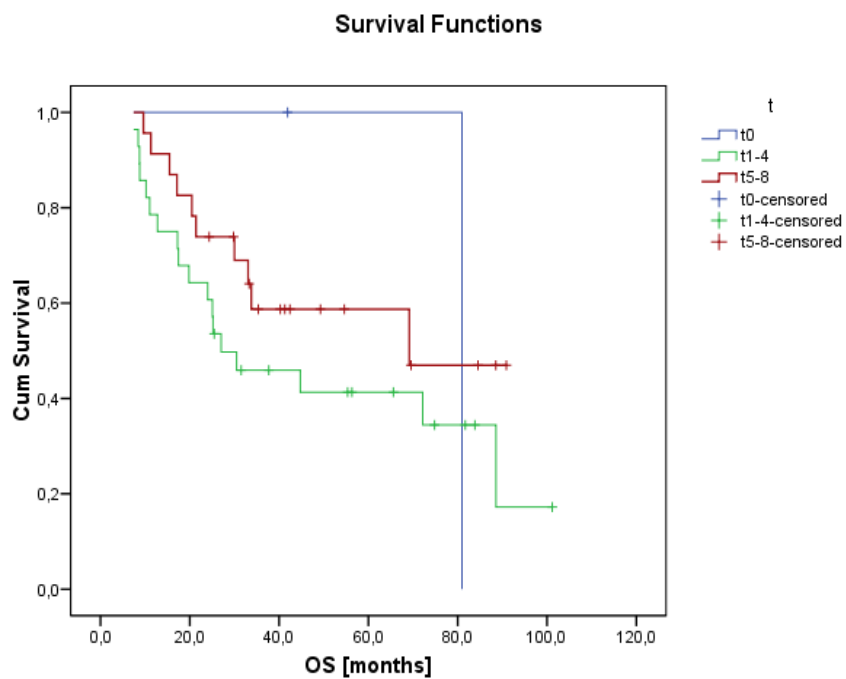


**Graf č.28: Doba do progresu v závislosti na podaném platinovém derivátu (p 0,331)**

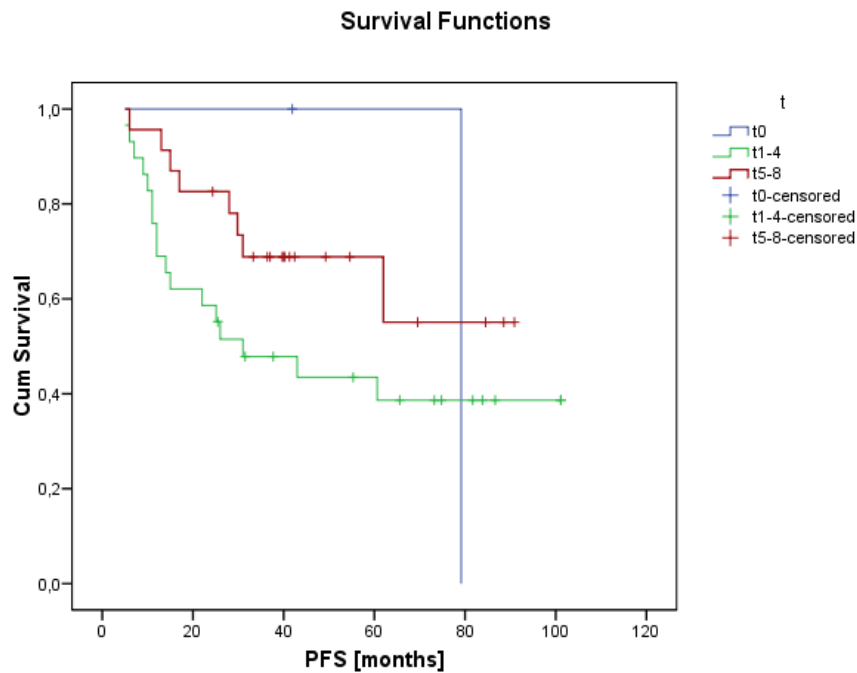


U 54 pacientů byla stanovena hladina exprese tubulinuβ III. Exprese byla rozdělena na tři hladiny nízká, střední a vysoká. Nebyl prokázán význam hladiny exprese tubulinuβ III na celkové přežívání souboru a dobu do progresu. Viz graf.č.29 a 30.

**Graf č.29: Celkové přežití v závislosti na hladině tubulinuβ III (p 0,380)**

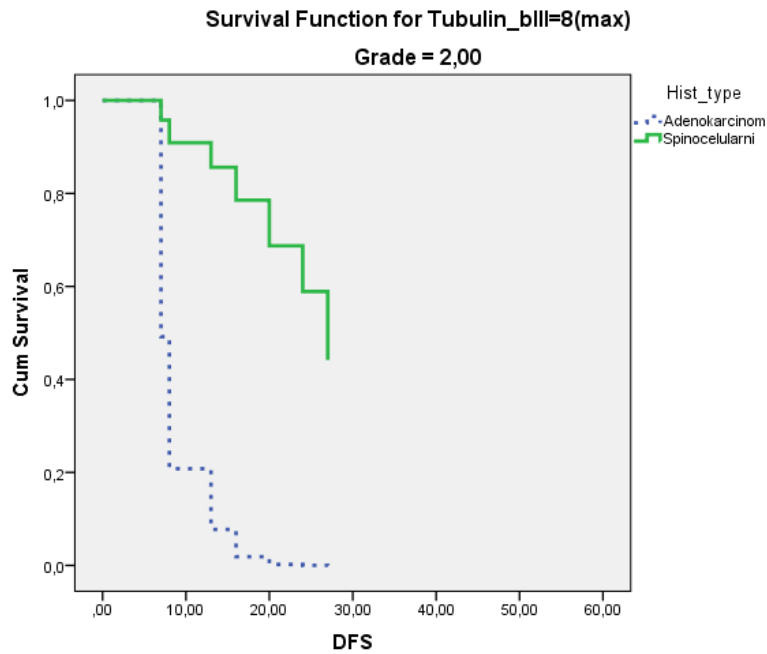


**Graf č.30: Doba do progresu v závislosti na hladině tubulinuβ III (p 0,242)**

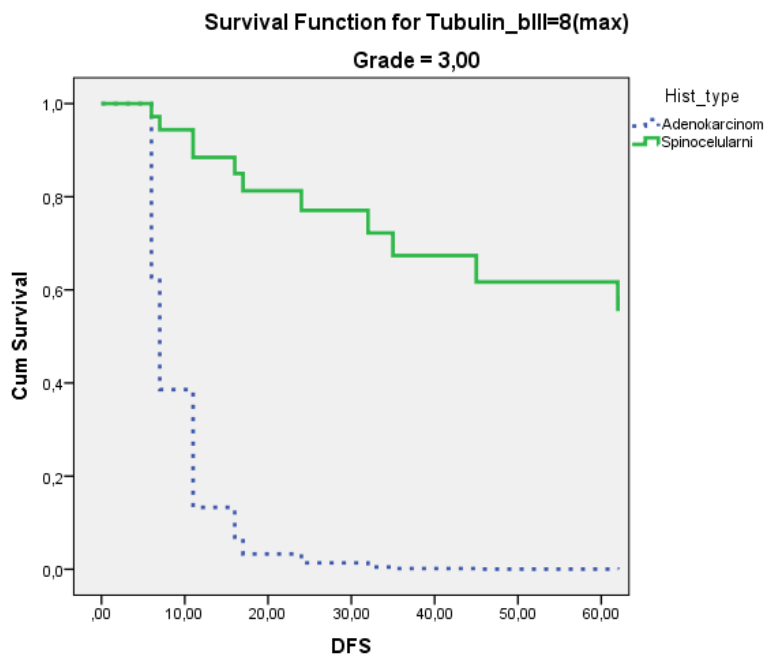


Dále jsme sledovali vztah exprese tubulinuβ III, gradingu a histologického typu nádoru. V našem souboru pacienti se spinocelulárním karcinomem grade 2 a 3 měli delší bezpříznakové období ( disease free interval) než pacienti s adenokarcinomem grade 2 a 3. K hodnocení byla použita multivariantní coxová analýza. Viz.graf č.31 a 32. Medián celkového přežití u pacientů s vysokou expresí TUBB3 činil 49 měsíců pro spinocelulární karcinom a 45 měsíců pro adenokarcinom.

**Graf č.31: Disease free interval pacientů grade 2 a vyšší expresi tubulinuβ III**



**Graf.č.32: Disease free interval pacientů grade 3 a vyšší expresi tubulinuβ III**



V celém souboru byla vyšetřována přítomnost EGFR mutací, bez ohledu na histologický typ nádoru. Pozitivní EGFR mutace se vyskytla v pěti případech ( 6,7%). Šlo o ženy, všechny měly histologickou diagnózu adenokarcinomu. Mutace EGFR ve skupině adenokarcinomů tvořily 20% případů. Dvě pacientky byly nekuřačky, tři ještě v době stanovení diagnózy kouřily. Ve třech případech šlo o delecí v exonu 19 ( 2x grade nádoru 3, 1 x grade 2), u jedné o mutaci v exonu 18 G719X ( grade nádoru 2) a u jedné o mutaci L858R v exonu 21 ( grade nádoru 1). Kromě pacientky s mutací L858R, která žije bez příznaku onemocnění, u všech ostatních pacientek došlo k progresi onemocnění – medián progresse od operace činil 28 měsíců. Vždy se jednalo o generalizaci do více orgánů. U třech pacientek, kterým jsme nasadili při progresi inhibitory tyrozinkinázy ( erlotinib) došlo k parciální regresi nálezu. Ta trvala 8 a 14 měsíců, poslední pacientka je léčna erlotinibem zatím 8 měsíců. Medián celkového přežití této skupiny EGFR pozitivních pacientek je 36 měsíců.

Pozitivní KRAS mutace byla nalezena u 11 pacientů (14,7%) . Mutace KRAS se nejčastěji vyskytují v kodonu 12 a 13 exonu 1. Nejčastějšími mutacemi jsou způsobeny záměny Glycinu za Alanin, Asparagin, Valin a Cystin. V našem souboru šlo 4x o mutaci Gly12Val, 3x o mutaci Gly12 Asp, 3x o mutaci Gly12Cys a 1x o mutaci Gly13Asp. Z těchto 11 pacientů bylo osm mužů a tři ženy. Ve skupině nebyl žádný nekuřák, šest kuřáků a pět bývalých kuřáků. Nepřevažoval žádný histologický typ, pětkrát byl zastoupen adenokarcinom, čtyřikrát o spinocelulární karcinom a dvakrát velkobuněčný karcinom. Šest pacientů žije bez příznaků nemoci, jeden pacient zemřel na duplicitní karcinom ledviny a u čtyřech pacientů došlo ke generalizaci onemocnění, medián doby do progresse činil 12 měsíců. Tři z těchto pacientů měli mutaci Gly12Cys.

ALK translokace byla prokázána u jedné pacientky, kuřačky s adenokarcinomem. I u této nemocné došlo po 60 měsících od operace ke generalizaci na pleuru a do skeletu. V rámci programu časného přístupu je nemocná léčena od ledna 2012 crizotinibem, kontrolní PET/CT ukázalo kompletní remisi onemocnění a léčba pokračuje.

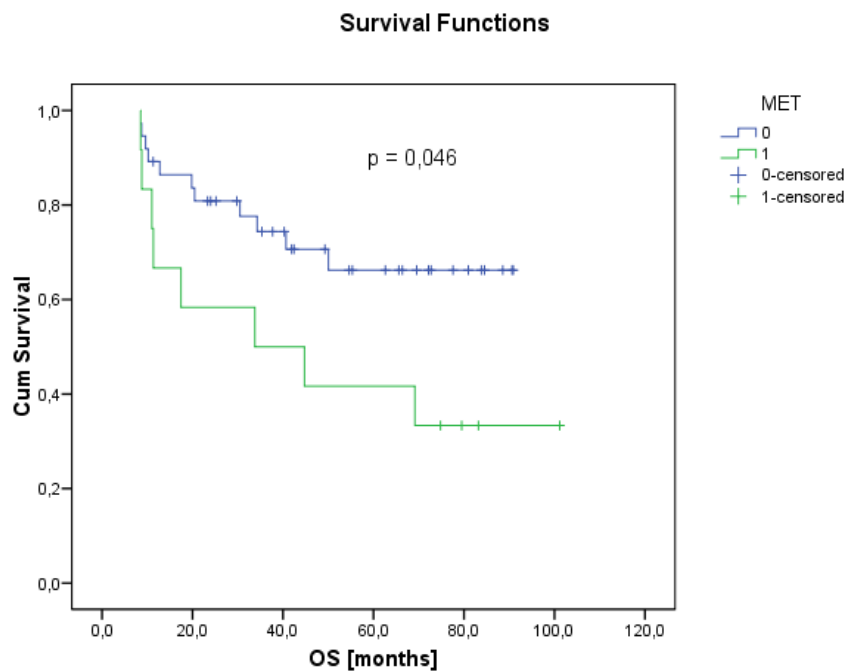
U jednoho pacienta jsme zjistili pozitivní mutaci genu BRAF. Šlo o muže se spinocelulárním karcinomem, grade 2, se stadiem IIIA onemocnění. Již tři měsíce od ukončení adjuvantní chemoterapie došlo u něj ke generalizaci do skeletu, následně do CNS a jater. Pacient zemřel 11 měsíců od operace. U tohoto pacienta byla navíc prokázána i amplifikace genu C-MET.

U 60 pacientů ze souboru se vyšetřovala přítomnost mutace genu C-MET. Přítomnost této mutace byla prokázána ve 13 případech. Dvanáctkrát šlo o amplifikaci tohoto genu v jednom případě o jeho delecí. V této skupině bylo deset kuřáků a tři bývalí kuřáci, převažoval spinocelulární karcinom ( 8 pacientů), 4 pacienti měli diagnostikovaný adenokarcinom a

v jednom případě se jednalo o velkobuněčný karcinom. Pacienti s mutací genu C-MET měli signifikantně horší celkové přežití, v době do progresu nebyly signifikantní rozdíly nalezeny.. Viz. graf č.33 a 34.

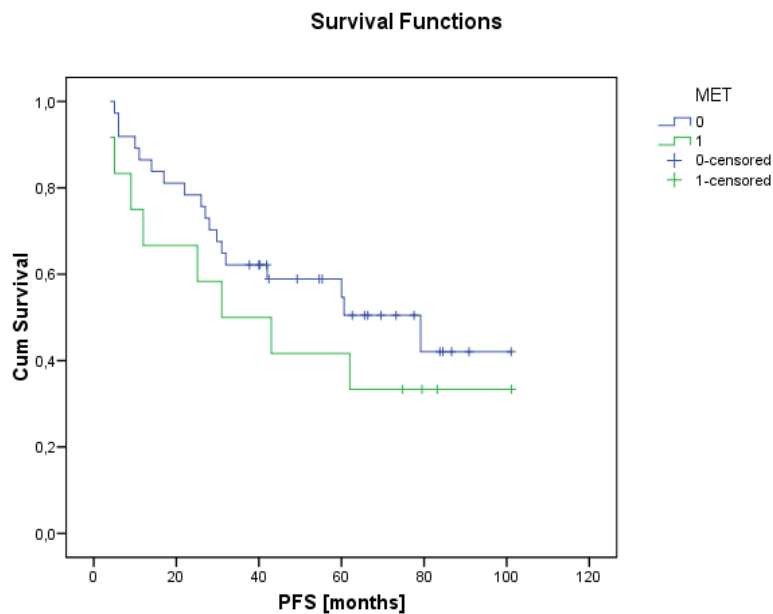
### Graf č.33: Celkové přežití dle pozitivivity mutace genu C-MET

Log-rank testem bylo prokázáno statisticky významně horší celkové přežívání pacientů s MET,  $p = 0,046$ .





**Graf č.34: Doba do progresu dle pozitivivity mutace genu C-MET (p 0,338)**



Medián celkového přežití u pacientů s mutací genu C-MET byl pro spinocelulární karcinom 54 měsíce a 50 měsíců pro adenokarcinom.

V celém souboru pacientů se pouze v jednom případě prokázaly současně dvě mutace. Šlo o muže se spinocelulárním karcinomem, který měl prokázanou amplifikaci genu C-MET a pozitivní mutaci BRAF. U tohoto pacienta došlo ke generalizaci onemocnění již tři měsíce po ukončení adjuvantní léčby a zemřel necelý rok od operace.

## 5.SOUHRNÉ VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve studii bylo hodnoceno 75 pacientů, 70 pacientů mělo diagnostikovaný bronchogenní karcinom před operací, 5 pacientů jsme odeslali k resekcímu výkonu s neověřeným PET pozitivním ložiskem. Všichni pacienti měli v rámci předoperačního vyšetření provedenou bronchoskopii, PET/CT vyšetření. Skupinu tvořilo 50 mužů a 25 žen. Nejčastěji zastoupeným histologickým typem nádoru byl spinocelulární karcinom, který byl nalezen u 42 pacientů (56%). Ten je zatím i nejčastějším histologickým typem karcinomu plic v ČR [3]. U mužů byl spinocelulární karcinom nejčastějším typem nádoru ( 70%), u žen se potvrdil jako nejčastější typ adenokarcinom (56%). Kuřáci představovali nadpoloviční většinu souboru ( 60%), necelou třetinu tvořili bývalí kuřáci, kteří přestali kouřit více než 12 měsíců před stanovením diagnózy bronchogenního karcinomu. Nekuřáci byli zastoupeni 10,7%. Ze souboru žen s bronchogenním karcinomem tvořily nekuřačky 20%, u mužů bylo nekuřáků jen 6%, což koreluje s udávanými daty [7]. Stadium onemocnění bylo stanoveno dle TNM klasifikace, na základě hodnocení velikosti tumoru patologem a histologického vyšetření lymfatických uzlin. NSCLC ve stadiu IB jsme diagnostikovali u 35 pacientů, 21 pacientů mělo onemocnění ve stadiu II a 19 pacientů s pozitivními stejnostrannými mediastinálními uzlinami ve stadiu IIIA. Dále patolog vyšetřoval přítomnost angioinvaze a vztah tumoru k pleuře. Nejčastějším resekcímu výkonem byla lobektomie u 50 pacientů, následovala pneumonektomie u 15 pacientů z toho se jednalo 5x o pravostrannou pneumonektomii a 10 x o levostrannou pneumonektomii. Méně častými výkony byly bilobektomie, u 6 pacientů, a rozšířená pneumonektomie u 4 pacientů. V pooperačním období došlo u pěti pacientům ke kardiálním komplikacím, kterým předcházela výkon v rozsahu lobektomie. V jednom případě musel být pacient po pneumonektomii reoperován pro hemotorax. Ve třech případech byla provedena chemická pleurodéza hypertonickým roztokem glukózy pro přetrvávající pneumotorax.

Vzhledem k výsledkům metaanalýz velkých studií, kterén potvrdily pozitivní vliv adjuvantní chemoterapie na relativní snížení rizika úmrtí i absolutní zlepšení přežití pacientů s radikálně resekováným nemalobuněčným karcinomem plic [75], jsme nesestavili kontrolní skupinu pacientů, kteří by byli po radikálním výkonu jen sledováni, bez další terapie. Na našem pracovišti je adjuvantní chemoterapie podávána u všech pacientů s resekováným karcinomem ve st.IB-III A, výjimku tvoří nemocní s déle trvajícími a závažnějšími pooperačními komplikacemi, starší, polymorbidní pacienti. Počet těchto pacientů je příliš malý a soubory by nebylo možné porovnat, proto vycházíme z dat studie ANITA s adjuvantní chemoterapií s vinorelbinem. Všem pacientům byla podána kombinovaná adjuvantní chemoterapie ve

složení platinový derivát s vinorelbinem. Chemoterapie byla zahájena v odstupu 4-6 týdnů po resekci, platinový derivát se podával den 1 každého třítydenního cyklu, vinorelbin pak den 1 a 8. S možností podávání tabletové formy vinorelbinu jsme postupně přecházeli na tuto formu terapie, což představovalo větší komfort pro pacienty, bez navýšení toxického profilu léčby. Původně plánované 4 cykly této adjuvantní chemoterapie nebyly dokončeny u 5 pacientů, z toho u dvou pro komplikace této léčby, další 3 pacienti odmítli 4. cyklus léčby. Podání chemoterapie bylo odloženo u 24 pacientů, většinou pro hematologickou toxicitu a u 4 pacientů jsme z těchto důvodů přikročili k redukci dávky cytostatik. Nejčastějším nežádoucím účinkem byla hematologická toxicita, u více než 50% pacientů jsme zaznamenali pouze neutropenii (53,4%), v jednom případě šlo o febrilní neutropenii s nutností hospitalizace. Po ukončení adjuvantní léčby byli pacienti pravidelně sledováni v pneumoonkologické poradně naší kliniky.

Přežívání souboru pacientů bylo sledováno k datu 31.10.2013. K tomuto datu zemřelo celkem 36 pacientů (48%). K progresi základního onemocnění došlo u 27 nemocných a to pouze v jednom případě došlo k lokální recidivě, zbytek případů představovalo generalizované onemocnění. U čtyřech pacientů jsme zaznamenali duplicitní malignitu (1x karcinom močového měchýře společně s karcinomem prostaty, 1x karcinom hrtanu, 1x světlobuněčný karcinom ledviny a 1x karcinom tlustého střeva). Pouze karcinom střeva byl radikálně odoperován v časném stadiu onemocnění, ostatní tři duplicitní malignity byly příčinou úmrtí těchto pacientů. Jinou příčinu úmrtí jsme zaznamenali u šesti pacientů. Tři zemřeli na infarkt myokardu, dva na plicní embolii a jedna pacientka na akutní hemoragickou cévní mozkovou příhodu. Ve studii ANITA došlo ke zlepšení 5-letého přežití o 8,6% ve skupině s chemoterapií [75]. Medián celkového přežití byl ve skupině s adjuvantní chemoterapií 65,7 měsíce u adenokarcinomu a 69,4 měsíce ve skupině spinocelulárních karcinomů. U pacientů, kteří byli pouze observováni po operaci byl medián OS 43,7 měsíce. Očekávaný medián celkového přežití (OS) našeho celého souboru je 72,16 měsíce a očekávaný medián doby do progresu (PFS) 60,62 měsíce, což odpovídá výsledkům adjuvantních studií [75]. Pokud jsme ze souboru vyloučili pacienty, kteří nezemřeli na maligní onemocnění, pak ještě mediánu OS nebylo dosaženo. Neprokázali jsme signifikantní rozdíly v celkovém přežití a v době do progresu v závislosti na pohlaví a kouření. Pokud jsme srovnávali OS a PFS u jednotlivých stadií onemocnění, pak byl long rank testem prokázán signifikantní rozdíl mezi st.IB a ostatními st.II a IIIA. Mezi st. II a IIIA jsme tento rozdíl neprokázali. Tato data odpovídají významu stadia onemocnění v době diagnózy na jeho prognózu [32]. V našem souboru jsme dosáhli 2-leté přežívání 74,66%, což odpovídá i

výsledkům studie ANITA, kde bylo dosaženo 2-letého přežívání 67,9% u pacientů s adjuvantní chemoterapií a 63,2% u pacientů jen sledovaných [213]. 3-leté přežívání našeho souboru je 56,5% a 5-leté přežití dosáhlo 39,65% pacientů. To je zatím horší výsledek ve srovnání se studií ANITA, kde bylo dosaženo 5-letého přežití 51,3%. Tento rozdíl může být způsoben i tím, že do této statistiky zatím není zahrnuto 17 pacientů, kteří žijí bez příznaků onemocnění méně než 5 let od operace. V časovém odstupu tak lze očekávat zlepšení tohoto parametru.

U pacientů, kteří neměli prokázanou generalizaci do mediastinálních uzlin (N0), jsme sledovali celkové přežití a dobu do progresu v závislosti na velikosti primárního nádoru. Rozdělili jsme je na skupiny pacientů s nádorem do 3 cm, 3-5 cm, 5-7 cm a s nádorem větším než 7 cm. Šlo tedy o pacienty se stadiem onemocnění IB (T1-2bN0M0) a IIB (T3N0M0). Nejistili jsme signifikantní rozdíl v celkovém přežití ani v době do progresu u těchto pacientů. Vzhledem k tomu, že bylo prokázáno signifikantní zlepšení přežití i doby do progresu pro samotné stadium IB, lze předpokládat lepší přežití u pacientů bez postižení lymfatických uzlin i při rozsáhlých tumorech.

Prorůstání tumoru do viscerální pleury bylo prokázáno u 12 pacientů (16%), ani zde jsme nenalezli signifikantní rozdíl v celkovém přežití a době do progresu mezi pacienty s postižením pleury nebo bez něj.

Angioinvaze byla prokázána u 26 pacientů (34,7%). V našem souboru byla prokázána statisticky významně vyšší pravděpodobnost přežití u pacientů bez angioinvaze,  $p = 0,028$ . V době do progresu jsme rozdíl nepotvrdili.

V našem souboru jsme nenalezli signifikantní rozdíl v celkovém přežití a době do progresu pokud jsme srovnávali stupeň diferenciaci nádoru (grading) ani pokud jsme porovnávali jednotlivé histologické typy.

I když dle literárních údajů je vysoká exprese tubulinu  $\beta$  III (TUBB3) je spojena s rychlejší progresí onemocnění a kratší dobou přežití, v našem souboru jsme nezjistili signifikantní rozdíly v celkové době přežití a době do progresu v závislosti na míře exprese TBB3. Pokud jsme ale zároveň s expresí TUBB3 brali v úvahu i histologický typ nádoru a stupeň diferenciaci, pak pacienti s vysokou expresí TUBB3 se spinocelulárním karcinomem grade 2 a 3 měli delší bezpříznakové období než pacienti s adenokarcinomem se srovnatelnou mírou exprese TUBB3 a stejným stupněm diferenciaci. Zde by mohla hrát roli zvolená chemoterapie, protože v řadě studií byl prokázán u adenokarcinomů a velkobuněčných karcinomů lepší účinek pemetrexedu a tento histologický typ má význam v predikci užití této chemoterapie u lokálně pokročilého a metastatického onemocnění. [120,121,122,123,124].

Pokud jsme vyčlenili pouze pacienty s vysokou expresí TUBB3 byl dosažen medián celkového přežití pro spinocelulární karcinom 49 měsíců a pro adenokarcinom 45 měsíců, což je nepatrně lepší výsledek než medián pacientů bez adjuvantní chemoterapie ve studii ANITA, který byl 43,7 měsíce, ale horší než medián pacientů s adjuvantní chemoterapií ( 65,7 měsíce adenokarcinom, 69,4 měsíce spinocelulární karcinom), což by potvrdilo vysokou expresi TUBB3 jako negativní prognostický faktor. V řadě studií bylo prokázáno prodloužení celkového přežití u pacientů s vysokou expresí TUBB3 po resekci, pokud byla v adjuvanci podávána chemoterapie ve složení platinový derivát s vinorelbínem [75,76], možná právě díky podání vinorelbínu v adjuvantní chemoterapii, kdy právě vysoký stupeň exprese TUBB3 může hrát roli pozitivního prediktivního faktoru pro upřednostnění podání vinorelbínu.

Sedmnáct pacientů bylo léčeno cisplatinou, zbylá část karboplatinou. Ani zde jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl v celkovém přežití a době do progresu, i když cisplatinou byli léčeni mladší pacienti bez komorbidit.

Při molekulárně biologickém vyšetření byla zjištěna u pěti žen s adenokarcinomem pozitivní EGFR mutace, tedy u 20% pacientů s histologicky prokázaným adenokarcinomem. Všechny pacientky měly aktivační mutace, které jsou spojeny s lepší odpovědí na inhibitory tyrozinkinázy. Ve třech případech šlo o delecii v exonu 19, jedenkrát o mutaci v exonu 18 G719X a v jednom případě u mutaci v exonu 21 L858R [148]. I když se popisuje, že častěji se mutace EGFR vyskytují u nekuřáků, z našich pozitivních pacientek byly tři kuřáčky. Dále je zajímavé, že u čtyř z těchto pacientek došlo k progresi onemocnění, kdy medián doby do progresu byl 28 měsíců. K progresi došlo u pacientek s delecí v exonu 19 a u pacientky s mutací v exonu 18. Tři pacientky s progresí byly léčeny inhibitorem tyrozinkinázy, erlotinibem, a u všech došlo k léčebné odpovědi, což podporuje pozitivní prediktivní význam mutací pro tuto léčbu. Medián trvání odpovědi byl 10 měsíců, což odpovídá publikovaným údajům [156-160, 178]. Medián celkového přežití pacientek s EGFR mutací činil 36 měsíců. Přežití těchto nemocných bylo tedy kratší než ve studii ANITA u pacientů bez adjuvantní léčby. Je tedy otázkou, zda pacienti s EGFR mutací profitují s adjuvantní léčby a nebylo by přežití srovnatelné, pokud by byli léčeni až při progresi inhibitory tyrozinkinázy. Možnost spojení pozitivní mutace EGFR s horší prognózou onemocnění by měla být ověřena na větším souboru nemocných.

Pozitivní KRAS mutace byla nalezena u 11 pacientů (14,7%). Všichni tito pacienti byli kuřáci nebo bývalí kuřáci, u kterých je popisován častější výskyt těchto mutací [38,41,42]. V našem souboru byly zastoupeny tyto mutace u všech histologických typů nádorů. Deset se vyskytlo v kodonu 12, jedna v kodonu 13, kde se vyskytuje až 90% těchto mutací [38,39]. ]

Ani u našich pacientů s KRAS mutací se neprokázalo horší celkové přežití [46,47], generalizace základního onemocnění se objevila u čtyř pacientů, zajímavé je, že tři z nich měli mutaci typu Gly12Cys. Jde ale o malý počet pacientů, takže může jít jen o shodu náhod. V jednom případě jsme zaznamenali pozitivní ALK translokaci, která se vyskytuje asi ve 2-7% NCLC [191-195]. Šlo o ženu, kuřačku s adenokarcinomem. Po 5 letech byla u této pacientky prokázána generalizace do skeletu a na pleuru. Translokace ALK je pozitivním prediktivním faktorem pro léčbu crizotinibem. My jsme měli možnost zařadit pacientku do léčby tímto preparátem v rámci programu časného přístupu. Po nasazení crizotinibu došlo u této nemocné ke kompletní remisi onemocnění, která trvá déle než 2 roky [205-209,212]. Nezaznamenali jsme současný výskyt ALK translokace a mutace EGFR nebo KRAS ve shodě s literárními údaji [200-202].

U jednoho pacienta jsme zjistili pozitivní mutaci genu BRAF. I zde šlo o nejčastější typ mutace v kodonu 600. I když se vyskytuje spíše u adenokarcinomů, v našem případě šlo o muže se spinocelulárním karcinomem. Jedná se o mutaci, která je spojena s horší prognózou onemocnění [59,60], která se potvrdila i u našeho pacienta. Již 3 měsíce po ukončení adjuvantní chemoterapie došlo u něj ke generalizaci onemocnění do skeletu a následně do CNS a jater. Pacient zemřel 11 měsíců po operaci. U tohoto pacienta se v našem souboru pacientů vyskytly zároveň dvě mutace. Společně s mutací BRAF to byla amplifikace C-MET genu.

Mutace genu C-MET byla prokázána u 13 pacientů z 60 vyšetřovaných. Jednou šlo o delecii, dvanáctkrát o amplifikaci tohoto genu. Všichni pacienti s mutací byli kuřáci nebo bývalí kuřáci. Spinocelulární karcinom se prokázal u osmi pacientů, adenokarcinom u čtyř a velkobuněčný karcinom u jednoho. Pacienti s mutací genu C-MET měli signifikantně horší celkové přežití, v době do progresu nebyly signifikantní rozdíly mezi pacienty s mutací a bez mutace. Medián přežití těchto pacientů byl 54 měsíců pro spinocelulární karcinom a 50 měsíců pro adenokarcinom, což je opět lepší výsledek, než medián přežití jen observovaných pacientů ve studii ANITA. I tito pacienti tedy jednoznačně profitovali s podáním adjuvantní chemoterapie.

## 6. ZÁVĚR

V našem souboru 75 pacientů s radikálně odoperovaným NSCLC ve stadiu IB-IIIa s následnou adjuvantní chemoterapií ve složení platinový derivát s vinorelbinem jsme dosáhli očekávaného mediánu přežití 72,16 měsíce a očekávaného mediánu doby do progresu ( PFS) 60,62 měsíce. Pokud jsme vyřadili šest pacientů, kteří zemřeli z jiných příčin, než bylo maligní onemocnění, tak ještě nebylo mediánu dosaženo. Ve studii ANITA byl medián celkového přežití ve skupině s adjuvantní chemoterapií 65,7 měsíce u adenokarcinomu a 69,4 měsíce ve skupině spinocelulárních karcinomů, u skupiny pacientů, kteří nedostali adjuvantní léčbu to bylo jen 43,7 měsíce. Naše výsledky celkového přežívání tedy odpovídají výsledkům této studie. V našem souboru jsme dosáhli 2-letého přežívání 74,66%, což odpovídá i výsledkům studie ANITA, kde bylo dosaženo 2-letého přežívání 67,9% u pacientů s adjuvantní chemoterapií a 63,2% u pacientů jen sledovaných. 3-leté přežívání našeho souboru je 56,5% a 5-letého přežití dosáhlo 39,65% pacientů. To je relativně horší výsledek ve srovnání se studií ANITA, kde bylo dosaženo 5-letého přežití 51,3%. Tento rozdíl může být způsoben i tím, že zatím není do této statistiky zahrnuto 17 pacientů, kteří byli operováni v letech 2010 a 2011 a zatím žijí bez příznaků onemocnění.

V našem souboru nebyl prokázán signifikantní rozdíl v celkové době přežití a době do progresu v závislosti na kouření, pohlaví, gradingu tumoru, histologii, prorůstáním do pleury, zvoleném platinovém derivátu. Může to být způsobeno velikostí souboru. V souladu s publikovanými údaji byl prokázán signifikantní rozdíl v celkovém přežití i době do progresu mezi st. IB a ostatními stadii II a IIIa.

Zvýšená exprese tubulinu $\beta$  III se neukázala v našem souboru jako negativní prognostický faktor, ale tato data mohla být ovlivněna i zvolenou adjuvantní chemoterapií s vinorelbinem, kde se uplatňuje TUBB3 jako pozitivní prediktivní faktor. V našem souboru byl prokázán i statisticky významný rozdíl v době do progresu u pacientů s vysokou expresí tubulinu s adenokarcinomem gr.2 a spinocelulárním karcinomem gr.2 ve prospěch spinocelulárního karcinomu. V tomto případě se histologický typ může podílet na predikci chemoterapie, která by prokázala lepší výsledky ( pemetrexed?).

Ve shodě s publikovanými poznatky bylo statisticky významnější celkové přežití u pacientů bez angioinvasze, v době do progresu významné rozdíly nebyly nalezeny.

V souboru byla vyšetřována i přítomnost řady mutací. Z celého souboru došlo k progresi základního onemocnění u 27 pacientů. Z těchto 27 pacientů jsme u 18 prokázali jeden typ mutace, u jednoho pacienta byly přítomny mutace 2. Signifikantně horší přežití jsme

prokázali u pacientů s mutací genu C-MET. Ale i zde medián celkového přežití těchto pacientů byl 54 měsíců ve skupině se spinocelulárním karcinomem a 50 měsíců ve skupině s adenokarcinomem, což jsou lepší výsledky přežití než bylo dosaženo u pacientů bez adjuvantní chemoterapie ve studii ANITA ( 43,7 měsíců). I pacienti s touto mutací tedy profitují s adjuvantní chemoterapie. Ostatní typy mutací byly zastoupeny malými počty, takže se nedají signifikantně porovnat. Pokud jsme sledovali 5 pacientek s pozitivní aktivační EGFR mutací, tak medián do progresu těchto žen byl 28 měsíců a medián celkového přežití 36 měsíců. Zde jsou výsledky horší, než ve studii ANITA u observovaných pacientů. Tři z těchto pacientek byly léčeny inhibitory tyrozinkinázy s dobrou léčebnou odpovědí, což potvrdilo pozitivní prediktivní význam mutací pro tuto zvolenou léčbu.

Pokud jsme se zaměřili na pacienty s progresí onemocnění, tvořili pacienti s mutacemi 66,7%. Je otázkou dalších let, zda se při rostoucím počtu vyšetřovaných pacientů na přítomnost mutací neprokáže jejich nepříznivý prognostický význam.



## 7.ABSTRAKT

### Prognostické a prediktivní faktory u bronchogenního karcinomu

**Úvod:** Bronchogenní karcinom je celosvětově nejčastějším onkologickým onemocněním. Incidence tohoto onemocnění má stoupající tendenci zejména u žen. V České republice je 3. nejčastější malignitou u mužů i u žen. U mužů v ČR je však nejčastější příčinou úmrtí na malignitu. Podle morfologie a biologického chování jej dělíme na skupinu malobuněčných plicních karcinomů ( Small Cell Lung Cancer ) a nemalobuněčných plicních karcinomů ( Non Small Cell Lung Cancer), které tvoří zhruba 80% plicních karcinomů, a které pak dále dělíme na další histologické typy. Hlavním etiologickým faktorem vzniku bronchogenního karcinomu je kouření cigaret. Časná stadia tohoto onemocnění bývají bezpříznaková, proto je u více než poloviny nemocných nádor diagnostikován v době přítomnosti vzdálených metastáz, s nemožností radikální chirurgické léčby. I přes výrazný pokrok v diagnostice i terapii, jsou výsledky léčby stále neuspokojivé. V poslední době dochází k tzv. “personalizaci“ léčby, která je založena na výsledcích molekulárně genetických charakteristik nádorových buněk.

**Cíl:** Cílem práce bylo vyhodnocení souboru pacientů s radikálním odstraněním NSCLC ve stadiu IB-IIIa, kterým byla podávána adjuvantní chemoterapie. Posuzovali jsme, zda parametry pohlaví, kouření, angioinvaze, invaze tumoru do pleury, stadium onemocnění, hladina tubulinu  $\beta$ III, přítomnost jednotlivých mutací nebo volba platinového derivátu ovlivňují prognózu přežívání. Dále jsme zkoumali, zda lze posoudit prediktivní význam sledovaných parametrů při použití historických údajů o přežívání bez adjuvantní chemoterapie.

**Metodika:** Zařazeno bylo 75 pacientů s radikálně odoperovaným NSCLC v letech 2005-2011, s následnou adjuvantní chemoterapií ve složení platinový derivát + vinorelbin. U všech pacientů bylo stanoveno stadium nemoci dle TNM klasifikace, patologem byl hodnocen grade tumoru, angioinvaze, prorůstání tumoru do pleury a stanovena hladina tubulinu  $\beta$ III. Následně byl histologický vzorek vyšetřován v Laboratoři experimentální medicíny na přítomnost EGFR mutací, KRAS mutací, ALK-translokací, C-MET mutací a mutací BRAF. Po ukončení adjuvantní léčby byli pacienti kontrolováni v tříměsíčních intervalech, celkové přešetření stran možné recidivy onemocnění nebo generalizace bylo prováděno 1x ročně nebo při potížích.

**Výsledky:** Skupinu 75 pacientů tvořilo 50 mužů a 25 žen. Pacienti s mediánem 65 let věku

( 29-78). U 42 se jednalo o spinocelulární karcinom, u 25 o adenokarcinom, který byl nejčastějším nádorem u žen a v 8 případech o velkobuněčný karcinom. Etiologie onemocnění je úzce spojena s kouřením, v našem soboru bylo 45 kuřáků, 22 bývalých kuřáků a jen 8 nekuřáků. Nejčastěji zastoupeno bylo stadium onemocnění IB u 35 pacientů, stadium II u 21 pacientů a stadium IIIA u 19 pacientů. Nejčastějším resekcčním výkonem byla lobektomie u 50 pacientů, následovala pneumonektomie u 15 pacientů z toho se jednalo 5x o pravostrannou pneumonektomii a 10 x o levostrannou pneumonektomii. Méně častými výkony byly bilobektomie, u 6 pacientů, a rozšířená pneumonektomie u 4 pacientů. Ke komplikacím v pooperačním období došlo u 20 pacientů. Z toho u pěti šlo o komplikace kardiální, které byly zvládnuty farmakologickou léčbou, u třech pacientů došlo k infekčním komplikacím, déle trvající únik (air leak) se vyskytl u 8 pacientů. Ve třech případech přetrvával pneumotorax v pooperačním období s nustností pleurodézy hypertonickým roztokem glukózy. Operační revize byla provedena pouze u jednoho pacienta, a to z důvodu hemotoraxu. Adjuvantní chemoterapii jsme zahajovali 4-6 týdnů po resekcii, používali jsme kombinaci vinorelbinu s cisplatinou nebo karboplatinou. Cisplatinou s vinorelbínem jsme léčili 17 pacientů ( 22,7%), u 58 pacientů ( 77,3%) jsme použili kombinaci vinorelbinu s karboplatinou. CBDCA jsme volili u pacientů starších, kardiaků, diabetiků a u pacientů s renální insuficiencí. Všechny 4 cykly adjuvantní chemoterapie byly podány 70 pacientům. 3 pacienti odmítli podání 4.cyklu chemoterapie, u jednoho pacienta byla chemoterapie ukončena po 2 cyklech pro infekční komplikace s nutností hospitalizace a u dalšího pacienta byla chemoterapie ukončena po 3.cyklu pro hematologickou toxicitu. U 24 pacientů ( 32%) bylo podání chemoterapie odloženo, většinou pro hematologickou toxicitu, u 4 pacientů (5,3%) jsme byli nuceni dávky cytostatik redukovat na 50%, rovněž s ohledem na hematologickou toxicitu. Pouze 3 pacienti museli být hospitalizováni z důvodu nežádoucích účinků. Jeden pacient pro febrilní neutropenii a dva pro infekční komplikaci ( pneumonii). Nejčastějším nežádoucím účinkem chemoterapie byla neutropenie, která se vyskytla ve více než polovině případů, Dalšími, již méně častými nežádoucími účinky byla leukopenie, anémie, trombocytopenie, anorexie, nausea, zvracení, slabost a infekce. Dyspeptické potíže byly čtenější u pacientů, kterým byla podávána cisplatinou.

Přežívání souboru pacientů bylo sledováno k datu 31.10.2013. K tomuto datu zemřelo celkem 36 pacientů (48%). K progresi základního onemocnění došlo u 27 nemocných a to pouze v jednom případě došlo k lokální recidivě, zbytek případů představovalo generalizované onemocnění. U čtyřech pacientů jsme zaznamenali duplicitní malignitu. Šest pacientů zemřelo na jiné, než maligní onemocnění. Tři na infarkt myokardu, dva na embolii

plicní a jeden na cévní mozkou příhodu. Očekávaný medián celkového přežití (OS) našeho celého souboru je 72,16 měsíce a očekávaný medián doby do progresu (PFS) 60,62 měsíce, což odpovídá výsledkům adjuvantních studií [75]. Pokud jsme ze souboru vyloučili pacienty, kteří nezemřeli na maligní onemocnění, pak ještě mediánu OS nebylo dosaženo. Neprokázali jsme signifikantní rozdíly v celkovém přežití a v době do progresu v závislosti na pohlaví, kouření, prorůstání tumoru do pleury, podání cisplatiny nebo karboplatiny, gradingu tumoru ani závislost na míře exprese tubulinu  $\beta$  III. Prokázali jsme signifikantní rozdíl v OS a PFS mezi st.IB a ostatními st.II a IIIA. Mezi st. II a IIIA jsme tento rozdíl neprokázali. V našem souboru jsme dosáhli 2-leté přežívání 74,66 %, 3-leté přežívání 56,5% a 5-leté 39,65% . Prokázali jsme signifikantně vyšší pravděpodobnost přežití u pacientů bez angioinvaze ve srovnání s těmi, u kterých byla angioinvaze prokázána. Samotná míra exprese TUBB3 významně neovlivnila celkové přežití ani dobu do progresu. Ale pacienti s vysokou expresí TUBB3 se spinocelulárním karcinomem gr.2 a 3 měli statisticky významně delší bezpříznakové období než pacienti se stejnou expresí TUBB3, ale adenokarcinomem gr.2 a 3.

Vyšetření mutací prokázalo přítomnost 5 aktivačních mutací genu EGFR u žen s adenokarcinomem, u 4 z nich došlo k progresi nemoci. Medián doby do progresu byl 28 měsíců. KRAS pozitivní mutaci jsme našli u 11 pacientů, nebyla spojena s horší prognózou onemocnění. V jednom případě byla prokázána pozitivita translokace ALK, u ženy s adenokarcinomem. I v tomto případě došlo k progresi onemocnění po 60 měsících od operace. Mutace BRAF se vyskytla u jednoho pacienta, u kterého došlo záhy ke generalizaci onemocnění a pacient zemřel necelý rok od operace. U 13 pacientů jsme prokázali mutaci genu C-MET. Dvanáctkrát šlo o amplifikaci tohoto genu v jednom případě o jeho delecii. Pacienti s touto mutací měli signifikantně horší celkové přežití než pacienti bez mutace.

**Závěr:** V našem souboru 75 pacientů s radikálně odoperovaným NSCLC ve stadiu IB-III A s následnou adjuvantní chemoterapií ve složení platinový derivát s vinorelbinem jsme dosáhli očekávaného mediánu přežití 72,16 měsíce a očekávaného mediánu doby do progresu (PFS) 60,62 měsíce. Pokud jsme vyřadili šest pacientů, kteří zemřeli z jiných příčin, než bylo maligní onemocnění, tak ještě nebylo mediánu dosaženo. Ve studii ANITA byl medián celkového přežití ve skupině s adjuvantní chemoterapií 65,7% měsíce u adenokarcinomu a 69,4 měsíce ve skupině spinocelulárních karcinomů, u skupiny pacientů, kteří nedostali adjuvantní léčbu to bylo jen 43,7 měsíce. Naše výsledky celkového přežívání tedy odpovídají výsledkům této studie. V našem souboru jsme dosáhli 2-leté přežívání 74,66%, což odpovídá i výsledkům studie ANITA, kde bylo dosaženo 2-letého přežívání 67,9% u pacientů s adjuvantní chemoterapií a 63,2% u pacientů jen sledovaných. 3-leté přežívání našeho

souboru je 56,5% a 5-letého přežití dosáhlo 39,65% pacientů. To je relativně horší výsledek ve srovnání se studií ANITA, kde bylo dosaženo 5-letého přežití 51,3%. Tento rozdíl může být způsoben i tím, že zatím není do této statistiky zahrnuto 17 pacientů, kteří byli operováni v letech 2010 a 2011 a zatím žijí bez příznaků onemocnění.

V našem souboru nebyl prokázán signifikantní rozdíl v celkové době přežití a době do progresu v závislosti na kouření, pohlaví, gradingu tumoru, histologii, prorůstáním do pleury, zvoleném platinovém derivátu. Může to být způsobeno velikostí souboru. Bylo v souladu s publikovanými údaji prokázán signifikantní rozdíl v celkovém přežití i době do progresu mezi st.IB a ostatními stadii II a IIIA.

Zvýšená exprese tubulinu $\beta$  III se neukázala v našem souboru jako negativní prognostický faktor, ale tato data mohla být ovlivněna i zvolenou adjuvantní chemoterapií s vinorelbinem, kde se uplatňuje TUBB3 jako pozitivní prediktivní faktor. V našem souboru byl prokázán i statisticky významný rozdíl v době do progresu u pacientů s vysokou expresí tubulinu s adenokarcinomem gr.2 a spinocelulárním karcinomem gr.2 ve prospěch spinocelulárního karcinomu. V tomto případě se histologický typ může podílet na predikci chemoterapie, která by prokázala lepší výsledky ( pemetrexed?).

Ve shodě s publikovanými poznatky bylo statisticky významnější celkové přežití u pacientů bez angioinvaze, v době do progresu významné rozdíly nebyly nalezeny.

V souboru byla vyšetřována i přítomnost řady mutací. Z celého souboru došlo k progresi základního onemocnění u 27 pacientů. Z těchto 27 pacientů jsme u 18 prokázali jeden typ mutace, u jednoho pacienta byly přítomny mutace 2. Signifikantně horší přežití jsme prokázali u pacientů s mutací genu C-MET. Ale i zde medián celkového přežití těchto pacientů byl 54 měsíců ve skupině se spinocelulárním karcinomem a 50 měsíců ve skupině s adenokarcinomem, což jsou lepší výsledky přežití než bylo dosaženo u pacientů bez adjuvantní chemoterapie ve studii ANITA ( 43,7 měsíců). I pacienti s touto mutací tedy profitují s adjuvantní chemoterapie. Ostatní typy mutací byly zastoupeny malými počty, takže se nedají signifikantně porovnat. Pokud jsme sledovali 5 pacientek s pozitivní aktivační EGFR mutací, tak medián do progresu těchto žen byl 28 měsíců a medián celkového přežití 36 měsíců. Zde jsou výsledky horší, než ve studii ANITA u observovaných pacientů. Tři z těchto pacientek byly léčeny inhibitory tyrozinkinázy s dobrou léčebnou odpovědí, což potvrdilo pozitivní prediktivní význam mutací pro tuto zvolenou léčbu.

Pokud jsme se zaměřili na pacienty s progresí onemocnění, tvořili pacienti s mutacemi 66,7%. Je otázkou dalších let, zda se při rostoucím počtu vyšetřovaných pacientů na přítomnost mutací neprokáže jejich nepříznivý prognostický význam.

**Klíčová slova:** bronchogenní karcinom, adjuvantní chemoterapie, EGFR mutace, ALK translokace, KRAS mutace, mutace C-MET

## 8.SUMMARY

### **Prognostic and predictive factors in bronchogenic carcinoma**

**Background:** Bronchogenic carcinoma or lung cancer is the most common cancer worldwide. The incidence of the disease tends to increase, particularly in women. In the Czech Republic, it is the third most frequent malignancy in both males and females. In Czech males, however, it is the most frequent cause of death due to malignancies. Based on its morphology and biological behavior, lung cancer is classified into small cell lung cancer and non-small cell lung cancer (NSCLC), accounting for approximately 80% of lung cancer cases. These are further divided into histological subtypes. The main etiological factor for the development of bronchogenic carcinoma is cigarette smoking. Early stages of the disease are without symptoms. That is why in more than a half of patients, the disease is only diagnosed when distant metastases are present and radical surgery is impossible. Despite significant advances in the diagnosis and therapy, the treatment outcomes remain unsatisfactory. Recently, the therapy has been “personalized”, that is, based on results of molecular genetic characteristics of tumor cells.

**Objective:** The aim was to study a group of patients with radical surgical resection of stage IB-IIIa NSCLC who were administered adjuvant chemotherapy. Parameters such as gender, smoking, angioinvasion, pleural invasion, stage,  $\beta$ III tubulin levels, presence of individual mutations or selection of platinum derivatives were studied to determine whether they influence the survival prognosis. Another objective was to find out whether the predictive value of the studied parameters may be assessed using historical data on survival without adjuvant chemotherapy.

**Methods:** Included in the study were 75 patients with NSCLC radically resected in 2005–2011 and subsequently receiving adjuvant chemotherapy with a platinum derivative + vinorelbine. In all patients, the disease was staged in accordance with the TNM classification and a pathologist determined the grade, angioinvasion, pleural invasion and  $\beta$ III tubulin levels were measured. Subsequently, histology samples were analyzed in the Laboratory of Experimental Medicine to determine the presence of EGFR mutations, KRAS mutations, ALK translocations, c-MET mutations and BRAF mutations. After their adjuvant therapy was completed, the patients were checked at 3-month intervals; a general examination for possible

recurrence or generalization of the disease was carried out annually or when difficulties occurred.

**Results:** The group of 75 patients, with a median age of 65 years (range, 29–78), comprised 50 males and 25 females. Of those, 42 had squamous cell carcinoma, 25 had carcinoma (the most frequent cancer in female patients) and 8 had large cell carcinoma. The etiology of the disease is closely associated with smoking; the group consisted with 45 smokers, 22 ex-smokers and only 8 non-smokers. The most frequent stage was I B (35 patients), followed by II (21 patients) and IIIA (19 patients). The most frequent type of resection was lobectomy (50 patients), followed by pneumonectomy in 15 patients (right-side and left-side pneumonectomy in 5 and 10 cases, respectively). Less frequent procedures were bilobectomy (6 patients) and extended pneumonectomy (4 patients). Postoperative complications occurred in 20 patients. Of those, 5 suffered from cardiac complications managed by pharmacological therapy and 3 developed infections; prolonged air-leak was observed in 8 patients. In 3 cases, pneumothorax persisted in the postoperative period, requiring pleurodesis with a hypertonic glucose solution. In only 1 patient, revision surgery due to hemothorax was needed. Adjuvant chemotherapy was initiated 4–6 weeks after resection with combinations of vinorelbine with cisplatin or carboplatin (CBDCA). Vinorelbine + cisplatin was administered to 17 patients (22.7%); in 58 patients (77.3%), vinorelbine was combined with carboplatin. CBDCA was selected in elderly, cardiac and renally impaired patients. All 4 adjuvant chemotherapy cycles were administered to 70 patients; three patients refused the 4th cycle, in 1 patient, chemotherapy was discontinued after 2 cycles due to infectious complications requiring hospital admission and in another patient, chemotherapy was withdrawn after the 3rd cycle because of hematologic toxicity. Chemotherapy was postponed in 24 patients (32%), mostly due to hematologic toxicity; in 4 patients (5.3%), doses of cytostatic drugs had to be reduced to 50%, once again due to hematologic toxicity. Only 3 patients had to be hospitalized for adverse effects, namely febrile neutropenia (1 patient) and infectious complications (pneumonia; 2 patients). The most frequent adverse effect of chemotherapy was neutropenia, accounting for more than a half of the cases. Less frequent adverse effects included leukopenia, anemia, thrombocytopenia, anorexia, nausea, vomiting, fatigue and infections. Dyspepsia was more common in patients receiving cisplatin.

Patient survival was assessed as of 31 October, 2013. As of that date, a total of 36 patients (48%) died. The underlying disease progressed in 27 patients. Of those, local recurrence was observed in only one case; the remaining patients had generalized disease. Four patients were noted to have double malignancy. Six patients died of other than malignant diseases, namely

myocardial infarction (3 patients), pulmonary embolism (2 patients) and stroke. The expected median overall survival (OS) in the entire group is 72.16 months and the expected progression-free survival (PFS) is 60.62, which is consistent with results from adjuvant studies [75]. When excluding patients who did not die of malignancies, the median OS has not been achieved. There were no significant differences in the OS and PFS with respect to gender, smoking, pleural invasion, administration of cisplatin or carboplatin, tumor grade or  $\beta$ III tubulin expression level. Significant differences in the OS and PFS were found between stage IB and the other stages II and IIIA. The difference was not found between stages II and IIIA. Two-year survival was achieved in 74.66% of the group, 3-year survival in 56.5% and 5-year survival in 39.65%. There was a significantly higher probability of survival in patients without angioinvasion as compared with those with confirmed angioinvasion.  $\beta$ III tubulin expression alone did not significantly affect either the OS or PFS. However, patients with high  $\beta$ III tubulin expression levels and grade 2 or 3 squamous cell carcinoma had statistically significantly longer time without symptoms than those with the same  $\beta$ III tubulin expression and grade 2 and 3 adenocarcinoma.

Mutation testing revealed the presence of 5 activating mutations in the EGFR gene in females with adenocarcinoma; the disease progressed in 4 of them. The median PFS was 28 months. KRAS-positive mutations were found in 11 patients and were not associated with a poorer prognosis of the disease. One case, a female with adenocarcinoma, was positive for ALK translocation. Also in this case, the disease progressed 60 months postoperatively. A BRAF mutation occurred in one patient in whom the disease became generalized soon after and the patient died less than one year postoperatively. In 13 patients, mutations of the c-MET gene were detected. The gene was amplified in 12 cases and deleted in one case. Patients with this mutation had significantly worse OS than those without it.

**Conclusion:** In the group of 75 patients with radically resected stage IB–IIIA NSCLC with subsequent adjuvant therapy consisting of a platinum derivative + vinorelbine, the expected OS was 72.16 months and the expected PFS was 60.62 months. When six patients who died of causes other than malignancies were excluded, the median has not been achieved. In the ANITA study, the median OS for a group receiving adjuvant chemotherapy was 65.7 months in adenocarcinoma and 69.4 months in squamous cell carcinoma; in patients without adjuvant chemotherapy, it was only 43.7 months. That is, these survival rates are consistent with those in the present study. The 2-year survival was achieved in 74.66% which corresponds with ANITA 2-year survival rates of 67.9% in patients with adjuvant chemotherapy and 63.2% in observed patients. The 3-year survival was achieved by 56.5% and 5-year survival was



achieved by 39.65% of patients in the present study. These rates are relatively worse than those in the ANITA study showing the 5-year survival in 51.3%. The difference may be explained by the fact that so far, the statistical analysis has not involved 17 patients undergoing surgery in 2010 and 2011 who have been without symptoms so far.

The present study showed no significant differences in the OS and PFS with respect to smoking, gender, tumor grade, histology, pleural invasion and platinum derivative selected. This may be due to the sample size. In agreement with the published data, there was a significant difference in both the OS and the PFS between stage IB and the other stages II and IIIA.

In the present study, increased  $\beta$ III tubulin expression did not appear to be a negative prognostic factor. The data, however, may be influenced by the selected adjuvant chemotherapy with vinorelbine in which  $\beta$ III tubulin is a positive predictive factor. There was also a statistically significant difference in the PFS between patients with high  $\beta$ III tubulin expression levels and grade 2 adenocarcinoma and those with grade 2 squamous cell carcinoma, with more favorable results in squamous cell carcinoma. In this case, histological subtypes may contribute to prediction of chemotherapy with better outcomes (pemetrexed?). In accordance with the published findings, the OS was statistically more significant in patients without angioinvasion; there were no significant differences in the PFS.

The presence of numerous mutations was investigated as well. Among all patients, the underlying disease progressed in 27 individuals. Of those, eighteen were found to have one type of mutation; one patient had two mutations. Significantly worse survival was found in patients with mutations in the c-MET gene. Once again, the median OS of these patients was 54 months in the squamous cell carcinoma group and 50 months in the adenocarcinoma group. These outcomes are better than those achieved in patients without adjuvant chemotherapy in the ANITA study (43.7 months). Also patients with this mutation, therefore, benefit from adjuvant chemotherapy. The other types of mutations were much less numerous and cannot be significantly compared. When studying 5 females with positive activating mutations in the EGFR gene, their median PFS and OS were found to be 28 months and 36 months, respectively. These results are less favorable than those in observed ANITA patients. Three of those patients were treated with tyrosine kinase inhibitors providing good treatment response, confirming the positive predictive role of mutations for this selected therapy. When focusing on patients with disease progression, those with mutation accounted for 66.7%. It may be that in the future, with increasing numbers of patients tested for the presence of mutations, their negative prognostic role may be confirmed.

**Key words:** bronchogenic carcinoma, adjuvant chemotherapy, EGFR mutations, ALK translocations, KRAS mutations, C-MET mutations

## 9.PŘEHLED ZKRATEK

AIS	adenokarcinoma in situ
ALK	anaplastic lymphoma kinase
AUC	area under the curve
BAC	bronchioloalveolární karcinom
BRAF	homolog B1 virového antigenu v-raf odvozeného od myšího sarkomu (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)
BRCA1	breast cancer susceptibility gene 1
CLL	chronická lymfatická leukémie
C-MYC	lidský homolog genu v-MYC izolovaný z viru ptačí myelocytomatózy (v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog)
CT	počítačová tomografie
CYP	Cytochrome P450
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor )
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)
ERCC1	excisní reparační protein komplementační skupiny 1 (excision repair cross-complementing group 1)
ERS	Evropská respirační společnost ( European Respiratory Society)
FISH	fluorescenční in-situ hybridizace
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
Hb	hemoglobin
HGF	hepatocytární růstový faktor (hepatocyte growth factor)
HGFR	receptor pro hepatocytární růstový faktor (hepatocyte growth factor receptor)
IHC	imunohistochemické vyšetření
i.v.	intravenózní podání
KRAS	lidský homolog virového onkogenu v-Ki-ras2 izolovaného z krysího Kirsten sarkomu ( v-Ki ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)
LDH	laktát dehydrogenáza
MIA	minimálně invazivní adenokarcinom
miRNA	mikroRNA
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer – nemalobuněčný plicní karcinom
NSE	neuron specifická enoláza
OS	celkové přežití ( overall survival)

ORR	četnost odpovědí ( overall response rate)
PCR	polymerázová řetězová reakce ( polymerase chain reaction)
PDGFR	receptor pro růstový faktor odvozený od krevních destiček (platelet-derived growth factor receptor)
PD	progrese onemocnění ( progressive disease)
PFS	přežití bez progrese ( progression free survival)
PNO	pneumotorax
p.o.	perorální podání
PS	stav tělesné výkonnosti ( performance status)
QPCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RTK	receptorové tyrozinkinázy ( receptor tyrosine kinase )
SCLC	Small Cell Lung Cancer – malobuněčný plicní karcinom
TKI	inhibitory tyrozinkinázy
TS	thymidylát syntetáza
TUBB3	$\beta$ -tubulin třídy III
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor receptor)
95CI	95% konfidencí interval

## 10.LITERATURA

1. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world>
2. [http://www.wcrf.org/cancer\\_statistics/data\\_specific\\_cancers/lung\\_cancer\\_statistics.php](http://www.wcrf.org/cancer_statistics/data_specific_cancers/lung_cancer_statistics.php)
3. <http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incm>
4. <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-key-statistics>
5. Nat.Genet 2012, publikováno online 11.listopadu 2012; DOI:10.1038/ng.2456
6. Yoshida R, et al: Genetic polymorphisms in human CYP2A6 gene causing impaired nicotine metabolism. Br.J.Clin.Pharmacol. 2002. Vol.54; no5, 511-517
7. Subramanian J, Govindan R: Lung cancer in never smokers: a review. J.Clin.Oncol.2007; 25:561-570.
8. Raimondi S, et al: Metabolic gene polymorphisms and lung cancer risk in non-smokers. An update of the GSEC study. Mutat. Res.2005; 592: 45-47
9. Hung RJ, et al: CYP19A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. Carcinogenesis 2003; 24: 875-882
10. Timofeeva MN, Chirvina ED, Mironenko TV et al: Hormonal balance in women with lung cancer and its change after combined treatment, Vopr.Onkol. 1986; 32:26-30
11. Cote ML, et al: Combinations of cytochrome P-450 genotypes and risk of early-onset lung cancer in Caucasian and African Americans: A population – based study. Lung cancer 2007; 55: 255-262
12. Gemignani F, et al: Development of lung cancer before the age of 50: the role of xenobiotic metabolizing genes. Carcinogenesis 2007; 28: 1287-1293
13. Zhang J, et al: CYP19A1 gene polymorphisms and risk of lung cancer. J Int Med Res, 2013 Jun; 41(3): 735-742
14. Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, et al: 50-Year Trends in Smoking-Related Mortality in The United States. N Engl J Med 2013; 368: 351-364
15. Škodová Z, Cífková R., Adámková V et al: Development of smoking habits in the population of Czech Republic during 1985-1997/98. Čas.lék.čes.139, 2000;5: 143-147
16. Sovinová H, Sadílek P, Csémy L : Vývoj prevalence kuřáctví v dospělé populaci ČR. Názory a postoje občanů ČR k problematice Kouření ( období 1997-2011), Výzkumná zpráva, vydal SZÚ 2012

17. Sovinová H, Csémy L: Smoking behavior of Czech adolescents: results of the Global Youth Tobacco Survey in the Czech Republic, 2002. *Cent Eur J Public Health*, 2004, Mar; 12(1): 26-31
18. Skříčková J, Kolek V: *Základy moderní pneumoonkologie*. Praha: Maxdorf, 2011
19. Travis WD, Colby TV, Corrin B et al: *Histopathological typing of lung and pleural tumours*. Berlin Springer-Berlag, 1999
20. Dundr P, Hornychová H, Matěj R et al: Doporučený postup pro histologické vyšetření karcinomu plic. Společnost českých patologů ČLS JEP, 2013
21. National Institute for Health and Clinical Experience (NICE). The diagnosis and treatment of lung cancer. National Collaborating Centre for Cancer, 2011, Cardiff, Wales
22. Marel M.: Vývojové trendy a léčba nemalobuněčného plicního karcinomu. *Postgraduální medicína* 09/2012; 61-70
23. Grygárková I., Kolek V., Neoral Č. et al: Výsledky diagnostiky a operability bronchogenního karcinomu na Klinice plicních nemocí a tbc FN Olomouc. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2010; 70(6): 227-232
24. Feit J, Feitová V., Hermanová M. et al: *Atlas patologie pro studenty medicíny*, Brno 2007
25. Skříčková J., Tomíšková M., Kaplanová J: Nemalobuněčný karcinom plic, *Onkol péče* 4/08: 5-9
26. Pešek M.: Bronchogenní karcinom a jeho prognostické a prediktivní faktory. *Onkologie* 2009; 3(5), 299-302
27. Petruželka L, Vočka M: Personalizovaný přístup k farmakoterapii nemalobuněčných plicních karcinomů v éře cílené (terčové) biologické léčby. *Postgraduální medicína* 04/2012: 296-401
28. Kadlec B., Skříčková J.: Malobuněčný karcinom plic. *Lékařské listy* 2012, roč.61, č.2: 27-29
29. Zatloukal P, Petruželka L, Fiala P, et al: Léčba karcinomu plic. *Postgraduální medicína* 7/2003, 803-807
30. Goldstraw P.. *IASCL Staging Manual in Thoracic oncology*. IASCL publication, Editorial RxPress, USA 2009, 163 p.
31. Sobin LH: Gospodarowitz MK, Wittekind CH: *TNM klasifikace zhoubných nádorů*, 7.vydání 2009, české vydání verze 2011, 116-121
32. <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/non-small-cell-lung-cancer-survival-rates>
33. Dořáčková J.: *Prognostická a prediktivní medicína*.

w

34. Liotta LA, Tryggvason K, Gabrish A et al:metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membráne collagen. *Nature* 1980; 284: 67-68
35. Dano K, Romer J, Nielsen BS et al: Cancer invasion and tissue remodeling-cooperation od protease systems and cell types. *AMIS* 1999; 107: 120-127
36. Allgayer H, Heiss MM, Schildberg FW: Prognostic factors in gastric cancer. *Br J Surg* 1997;84: 1651-1664
37. Harvey JJ: An Unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature* 204:1104-1105, 1964
38. Aggarwal CH, Somaiah N, Simon GR: Biomarkers with Predictive and Prognostic Function in Non-Small Cell Lung Cancer: Ready for Prime Time? *Journal of National Comprehensive Cancer Network*, 2010; Vol8,Num7:822-832
39. Jimeno A., Messersmith WA, Hirsch FR et al: KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer :practical application of patient selection. *J Clin Oncol* 27(7); 1130-1138, 2009
40. Loupakis F., Ruzzo A., Cremolini C. et al: KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wildtype metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 101(4); 71-721, 2009.
41. Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA et al: Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2001;92:1525-1530
42. Mao C, Qiu LX, Liao RY et al: KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* 2010;69(3):272-278
43. Fusek M, Vitek L, Blahoš J et al: *Biologická léčiva*, Grada Publishing, a.s 2012, ISBN 978-80-247-3727-0
44. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O et al K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323:561-565
45. Mascaux C, Lannino N, Martin B et al: The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systemic review of the literature with the meta-analysis. *Br J Cancer* 2005, 17;92(1):131-139
46. Tsao MS, Aviel-Ronen S, Ding K et al: Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5240-5207

47. Winton T, Livingston R, Johnson D et al: vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;352(25):2589-2597
48. Marks JL, Broderick S, Zhou Q et al: Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2008;3(2):111-116
49. Fiala O, Pešek M, Finek J et al: Gene mutations in squamous cell NSCLC: insignificance of EGFR, KRAS and PIK3CA mutations in prediction of EGFR-TKI treatment efficacy. *Anticancer research*, 2013; roč. 33, č. 4: 1705-1711
50. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC et al: Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005;23:5900-5909
51. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T et al: Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005;353:123-132
52. Garnett MJ, Marais R: Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 6:313-319, 2004
53. Davies H, Bignell GR, Cox C et al: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417; 949-954, 2002
54. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T et al: Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353: 2135-2147, 2005
55. Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z et al: High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: Genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63: 1454-1457, 2003
56. Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J et al: Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite/stable colon cancers. *Cancer Res* 65:6063-6069, 2005
57. Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y, et al: Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95:484-486, 2003
58. Brose MS, Volpe P, Feldman M et al.: BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62:6997-7000, 2002
59. Yosem SA, Nikiforova M, Nikiforov Y: The histopathology of BRAF-V600E-mutated lung adenocarcinoma, *Am J Surg Pathol* 32:1317-1321, 2008
60. Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S et al: Klinické charakteristiky a výsledky u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic s mutacemi BRAF. *Journal of Clinical Oncology* 3/8, 343-348, 2011



61. Planchard D, Mazieres J, Gregory J et al: Interim results of phase II study BRF113928 of dabrafenib in *BRAF* V600E mutation–positive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. <http://meetinglibrary.asco.org/content/112427-132>
62. Neri A, Barriga F, Knowles DM et al: Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988, Apr, 85(8):2748-52
63. Miller DM, Thomas SD, Islam A et al: C-MYC and cancer metabolism. *Clin Cancer res* 2012 Oct 15;18(20):5546-53
64. Eilers, M., and Eisenman, R.N. (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev*. 22, 2755–2766.
65. Lin CY, Lovén J, Rahl PB et al: Transcriptional amplification in Tumor Cells with Elevated C-MYC, *Cell* 151; 56–67, September 28, 2012
66. Beroukhi, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899–905.
67. Johnson BE, Ihde DC, Makuch RW et al: MYC-family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course, *J Clin Invest*. 1987 June;79(6):1629–1634.
68. Kolek V: Karcinom plic- současná léčebná strategie z pohledu pneumoonkologa, *Posgraduální medicína* 2010;3:338-352
69. Pešek M: Individualizovaná léčba u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic, *Remedia* 2012;21(6):478-486
70. Sandler A, Gray R, Perry MC et al: Paclitaxel-Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542-2550
71. Reck M, von Pavel J, Zatloukal P et al: Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer. *AVAil. J.Clin Oncol* 2009;27:1227-1234
72. Laskin J, Garrido P, Thatcher N et al: MO19390 (SAiL): first-line bevacizumab-based therapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)-outcome by chemotherapy regimen. Abstracts 13th World Conference of Lung Cancer –C2.5
73. Jirásek T, Matěj R, Pock L et al: Karcinom z Merkelových buněk – imunohistochemická studie v souboru 11 pacientů, *Čes.-slov-Patol*, 2009;45(1):9-13
74. [http://www.aldebaran.cz/bulletin/2010\\_07\\_nan.php](http://www.aldebaran.cz/bulletin/2010_07_nan.php)

- 75.Kolek V: Současné trendy adjuvantní chemoterapie u nemalobuněčného karcinomu plic. *Klin Onkol* 2013;26(4):245-250
- 76.Seve P, Lai R, Dink K et al:Class III beta-tubulin expression and benefit from adjuvant cisplatin/vinorelbine chemotherapy in operable non-small cell lung cancer:analysis of NCIC JBR.10. *Clin Cancer Res* 2007;13:994-999
- 77.Burkhart CA, Kavallaris M, Horwitz SB: The role of  $\beta$ -tubulin isotypes in resistance to antimitotic drugs. *Biochim Biophys Acta* 2001;147:1-9
- 78.Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA et al: Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression od specific  $\beta$ -tubullin isotypes. *J Clin Invest* 1997;100:1282-1293
- 79.Ranghanathan S, Benatatos CA, Colarusso PJ et al:Altered  $\beta$ -tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* 1998;77:562-566
- 80.Liu B, Staren ED, Iwamura T, Appert HE et al:Mechanism of taxotere-related drug resistance in pancreatic carcinoma. *J Surg Res* 2001;99:179-186
- 81.Monzó M, Rosell R, Sánchez JJ et al:Paclitaxel Resistance in Non-Small-Cell Lung cancer Associated With Beta-Tubulin Gene Mutations. *Journal of Clin Oncol*, 1999;17(6):1786-1793
- 82.Kavallaris M: Microtubules and resistance to tubulin-binding agents.*Nat Rev Cancer*, 2010;10:194-204
- 83.Seve P, Dumontet C: Is class III beta-tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding adents? *Lancet Oncol* 2008;9:168-175
- 84.Dumontet CH, Isaac S, Souquet PJ et al:Expression of class III  $\beta$  tubulin in non-small cell lung cancer is correlated with resistance to taxane chemotherapy. *Bull Cancer* 2005;92(2): 25-30
- 85.Seve P, Mackey J, Isaac S et al: Class III  $\beta$ -tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. *Mol Cancer Ther* 2005;4:2001-2007
- 86.Slabý O., Svoboda M. et al:MikroRNA v Onkologii. Galén 2012
- 87.Si ML, Zhu S., Wu H. et al: miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007;26:2799-2803
- 88.Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ et al: MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008;299:425-436
- 89.Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson T et al: mikroRNAS in cancer management. *The Lancet Oncology* 2012;13:249-258

90. Boyerinas B, Park SM, Hau A et al: The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010;17:19-36
91. Perona R: Cell signaling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol* 2006;8:77-82
92. Webster RJ, Giles KM, Price KJ et al: Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cell by mikroRNA-7. *J Biol Chem* 2009;284:5731-5741
93. Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E et al: EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefinitib and EGFR expression in cell lines. *Ann Oncol* 2008;19:1053-1059
94. Wei J, Gao W, Zhu CJ et al: Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer* 2011;30:407-414
95. Hennessey PT, Sanford T, Choudhary A et al: Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2012;7:e32307
96. Xie Y, Tod NW, Liu Z et al: Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;127:10-176
97. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E et al: Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006;9:189-198
98. Wang XC, Tian LL, Jiang XY et al: The expression and function of miRNA-451 in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2011;311:203-209
99. Duncavage E, Goodgame B, Sezhiyan A et al: Use of microRNA expression levels to predict outcomes in resected stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5:1755-1763
100. Wang XC, Du LQ, Tian LL et al: Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2011; 72:92-99.
101. Ranade AR, Cherba D, Sridhar S et al: MicroRNA 92a-2\*: a biomarker predictive for chemoresistance and prognostic for survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5:1273-1278
102. Zatloukal P: Karcinom plic. *Medicína pro praxi* 2008;5(1):23-27
103. Adam Z, Vorlíček J, Koptíková J: *Obecná onkologie a podpůrná léčba*. Grada, Praha 2003, 787 s., ISBN 80-247-0677-6
104. Klener P., Vorlíček J et al: *Podpůrná léčba v onkologii*. Galén, Praha 1998, 231 s., ISBN 80-90501-2-2

105. Tomíšková M, Tomiška M, křičková J et al: Nutritional risk screening predicts tumor response in lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2009;4(9),Suppl.1,S435, PD 2.2.1
106. Wagnerová M: Nádory plic v staršom veku. *Onkologie* 2007;1:28-31
107. Adam Z, Vorlíček J, Tomiška M: Obecné principy léčby nádorové nemoci a problémy rozhodování o léčbě cytostatiky u biologicky starších osob. *Čes Ger Rev* 2005;3(2):5-16
108. Ferguson MK, Skosey C, Hoffman PC et al: Sex-associated differences in presentation and survival in patients with lung cancer. *J Clin Oncol* 1990;8:1402-1407
109. Hsu LH, Chu NM, Tsai SY et al: Sex-associated differences in non-small cell lung cancer in the new era: is gender an independent prognostic factor? *Lung Cancer* 2009;66(2):262-267
110. Wolf M, Holle R, Drings P et al: Analysis of prognostic factors in 766 patients with small cell lung cancer (SCLC): the role of sex as a predictor for survival. *Br J Cancer* 1991;63(6):986-992
111. Ou SH, Ziogas A, Zell JA: Prognostic Factors for Survival in Extensive Stage Small Cell Lung Cancer (ED-SCLC): The Importance of Smoking History, Socioeconomic and Marital Statuses, and Ethnicity. *Jour of Thor Oncol.* 2009;4(1):37-43
112. Soo RA, Kawaguchi T, Loh Met al: Differences in Outcome and Toxicity Between Asian and Caucasian Patients With Lung Cancer Treated With Systemic Therapy. *Future Oncol.* 2012;8(4):451-462
113. Kondo E, Ogura M, Kagami Y et al: Assessment of prognostic factors in follicular lymphoma patients. *Int J Hematol*, 2001;73:363-368
114. Ryberg M, Nielsen D, Osterlind K et al: Prognostic factors and long-term survival in 585 patients with metastatic breast cancer treated with epirubicin-based chemotherapy. *Ann. Oncol.* 2001;12:81-87
115. Yuce K, Baykal C, Genc A et al: Diagnostic and prognostic value of serum and peritoneal fluid lactate dehydrogenase in epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2001;22:228-232
116. Tas F, Aydinler A, Demir C et al: Serum lactate dehydrogenase levels at presentation predict outcome of patients with limited-stage small-cell lung cancer. *M J Clin Oncol.* 2001b;24:376-378
117. Argiris A, Murren JR: Staging and clinical prognostic factors for small-cell lung cancer. *Cancer J.* 2001;7:437-447
118. Ludwig H, Van belle S, Barrett-Lee P: The European Cancer Anaemia Survey: A large, multinational, prospective study defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *E J of Cancer*, 2004;40:2293-2306

119. Brejcha M, Gumulec J, Klodová D et al: Diagnostika a léčba anemií u onkologických pacientů. Doporučení pro klinickou praxi. 2006.  
<http://www.onkologickecentrum.cz/downloads/prirucky/guideline-anemie-onkologie-V06.pdf>
120. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV et al: Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22:1589-1597
121. Peterson P, Park K, Fossella FW et al: 12<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer. Is pemetrexed more effective in adenocarcinoma and large cell lung cancer than in squamous cell carcinoma? A retrospective analysis of a phase III trial of pemetrexed vs docetaxel in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). 12th World Conference on Lung Cancer; pp. P2-328. abstract.
122. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J et al: Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:205-221
123. Ciulenu TE, Brodowicz T, Belani CP et al: Maintenance pemetrexed plus best supportive care (BSC) versus placebo plus BSC a phase III study. *J Clin Oncol* 2008;26(Suppl 15):426
124. Koubková L: Současné možnosti léčby pokročilého/metastazujícího nemalobuněčného karcinomu plic. *Remedia* 2011;1:10-13
125. Paz –Ares LG, se Marinis F, Dediu M et al: PARAMOUNT: Final overall survival results of the phase III study of maintenance pemetrexed versus placebo immediately after induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(23):2895-2902
126. Kolek V: Pemetrexed vs. placebo u pokročilého neskvamózního NSCLC. *Medical tribune* 2001;7(21):B7, ISSN:1214-8911
127. Brabec V, Kašpárková J: Molecular aspects of resistance to antitumor platinum drugs. *Drug Resistance Updates* 2002; 5 (3-4): 147-161
128. Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW: Increased Nucleotide Excision Repair in Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cells, Role of ERCC1-XPF. *Biochemical Pharmacology* 2000; 60:1305-1313
129. Lord RV, Brabender J, Gandara D et al: Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:2286-2291
130. Olausen KA, Dunnant A, Fouret P et al: DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*, 2006; 355:983-991

131. Zheng Z, Chen T, Lix S et al: DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 356:800-811
132. Rosell R, Danenberg KD, Alberola V et al: Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004;10(4):1318-1325
133. Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ et al: Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(34):5808-5815
134. Ceppi V, Volante M, Saviozzi S et al: Squamous cell carcinoma of the lung compared with other histotypes shows higher messenger RNA and protein levels for thymidylate synthase. *Cancer* 2006; 107:1589-1596
135. Takezawa K, Okamoto I, Okamoto W et al: Thymidylate synthase as a determinant of pemetrexed sensitivity in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*.2011;104(10):1594-1601
136. Damsma GE, Alt A, Brueckner F et al: Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA. *Nature Structural and Molecular Biology* 2007;12:1127-1133
137. Gachechiladze M, Škarda J: The role of BRCA1 in non-small cell lung cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*2012;156:200-203
138. Kondo I, Shimizu N: mapping of the human gene for epidermal growth factor receptor (EGFR) on the p13-q22 region of chromosome 7. *Cytogenet. Cll. Genet.* 1983;35:9-14
139. Uberall I, Kolář Z: Receptory pro epidermální růstové faktory a jejich význam pro maligní transformaci solidních nádorů. *Klin Farmakol Farm.* 2006;20:190-196
140. Bunn PA Jr, Franklin W: Epidermal growth factor receptor expression, signal pathway, and inhibition in non small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2002;29:38-44
141. Ohsaki Y, Tanno S, Fujita Y et al: Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in nonsmall cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncol Rep* 2000;7:603-607
142. Skříčková J, Babišková L, Tomášková M et al: Biologická léčba nemalobuněčného karcinomu plic. *Interní medicína pro praxi.* 2011;13(7 a 8):292-295
143. Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C et al: Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridizations predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *Clin Oncol* 2008;26(20):3351-3357
144. Zhang Z, Stiegler AL, Boggo TJ et al: EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget* 2010;1(7):497-514

145. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ et al: Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(5):567-595
146. Gandara DR, Lara PN Jr, Mack P et al: Individualizing therapy for non-small-cell lung cancer: a paradigm shift from empiric to integrated decision-making. *Clin Lung Cancer* 2009;10(3):148-150
147. West H, Lienbaum R, Harpole D et al: Molecular analysis-based treatment strategies for the management of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009;4(9 Suppl 2):1029-1039
148. Balak MN, Gong Y, Riely G et al: Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2006;12(21):6494-6501
149. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD et al: Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 2005;7:301-311
150. Mendelson J, Balsega J: Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003;21(14):2787-2799
151. Levitzki A: EGF receptor as a therapeutic target. *Lung Cancer.* 2003;41:9-14
152. Mendelson J: Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor for Cancer Therapy. *Journal of Clinical Oncology* 2002;20(Suppl 15):1-13
153. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A et al: Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* 2009;373(9674):1525-1531
154. Lynch TJ, Patel T, Dreisbach L et al: Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. Results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. *J Clin Oncol* 2010;28:911-17
155. Tsao AS: Cetuximab combined with chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Community Oncology* 2010;7(1):17-22
156. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350(21):219-2139
157. Paez JG, Janne PA, Lee JC et al: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304(5676):1497-1500
158. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr et al: Molecular predictors outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24(31):5034-5042

159. Douillard JY, Shepherd FA, Hirsh V et al: Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer: data from the randomised phase III INTEREST trial. *J Clin Oncol* 2010;28(5):744-752
160. Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L et al: Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2010;11(6):521-529
161. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G et al: Multiinstitutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol* 2003;21:2237-2246
162. Kris MG, Natale RB, Herbst RS et al: Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with nonsmall cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2003;290:2149-2158
163. Thatcher N, Chang A, Parikh P et al: Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced nonsmall-cell lung cancer: results from randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005;366:1527-1537
164. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C et al: Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced nonsmall-cell lung cancer: a phase III trial: INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;22:777-784
165. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH et al: Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced nonsmall-cell lung cancer: a phase III trial: INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;22:785-794
166. Douillard JY, Kim E, Hirsh V et al: Gefitinib (IRESSA) versus docetaxel in patients with locally advanced or metastatic nonsmall-cell lung cancer pretreated with platinum-based chemotherapy: a randomized, open-label Phase III study (INTEREST): PRS-02. *J Thorac Oncol* 2007;2:305-306
167. Kim ES, Hirsch V, Mok T et al: Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer: a randomised Phase III trial (INTEREST). *Lancet* 2008;372:1809-1818
168. Yang CH, Fukuoka M, Mok TS et al: Final overall survival results from a phase III, randomised, open label, first-line study of gefitinib v. carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small cell lung cancer in Asia (IPASS). *Ann Oncol* 2010;21(Suppl 8):122-161



169. Pešek M, Skříčková J, Kolek V et al: Výsledky klinického hodnocení účinnosti a toxicity gefitinibu v rámci programu časného přístupu u nemalobuněčného karcinomu plic v České republice. *Studia Pneumologica et Phtiseologica* 2009;69(2):61-68
170. Pešek M, Tell M, Krákorová G: Gefitinib-zkušenosti s biologicky cílenou terapií nemalobuněčného karcinomu plic. *Studia Pneumologica et Phtiseologica* 2004;64:117-122
171. Zemanová M: Gefitinib v léčbě lokálně pokročilého a/nebo metastazujícího nemalobuněčného plicního karcinomu. *Remedia* 2009;3:115-119
172. Shepherd FA, Pereira JR, Ciuleanu T et al: Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer *N Engl J Med* 2005;353:123-132
173. Cappuzo F, Coudert B, Wierbicki et al: A phase III study of erlotinib as maintenance therapy in NSCLC to delay progression following first-line chemotherapy (SATURN). *Eur J Cancer Supplements* 2009;7:552
174. Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenás S et al: Efficacy and safety of erlotinib versus chemotherapy in second-line treatment of patients with advanced, non-small-cell lung cancer with poor prognosis (TITAN): a randomised multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncology* 2012;13(3):300-308
175. Miller VA, O'Connor P, Soh C et al: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIIb trial (ATLAS) comparing bevacozumab (B) therapy with or without erlotinib (E) after completion of chemotherapy with B for first-line treatment of locally advanced, recurrent, or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2009;27:18S(suppl. abstrLBA8002)
176. Johnson V, Miller L, Amler H et al: Biomarker evaluation in the randomizes, double-blind, placebo-controlled, Phase III ATLAS Trial, comparing bevacizumab (B) therapy with or without erlotinib (E) after completion of chemotherapy with B for first-line treatment of locally advanced, recurrent, or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Eur J Cancer Supplemets*, 2009;3.5
177. Skříčková J, Kadlec B, Babičková L: Erlotinib-jedna z možností léčby nemalobuněčného karcinomu plic ovlivněním receptoru pro epidermální růstový faktor. *Remedia* 2005;15
178. Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB: Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer* 2009;10(4):281-289
179. Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T et al: EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005;352(4):786-792

180. Pao W, Miller VA, Politi KA et al: Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2(3):e73
181. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S et al: Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008;359(4):366-37
182. Yang JCH, Schuler MH, Yamaoto N et al: LUX-Lung: A randomized open label, phase III study of afatinib versus pemetrexed and cisplatin as first-line treatment for patients with advanced adenocarcinoma of the lung harboring EGFR-activating mutations. *J Clin Oncol* 2012;(Suppl)abstractLBA7500
183. Venclíček O, Skříčková J: Možnosti afatinibu v léčbě nemalobuněčného plicního karcinomu. *Farmakoterapie* 2013;3(2):85-88
184. Bean J, Brennan C, Shoh JY et al: MET amplification occurs with or without 790M mutations in EGFR mutant lung cancer tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:20932-20937
185. Koudeláková V, Kneblová M, Hajdúch M: Personalizovaná medicína a biomarkery v onkologii, *Klin Farmakol Farm* 2012;26(4):181-185
186. Sequist LV, von Pawel J, Garmey EG et al: Randomized phase II study of erlotinib plus tivantinib versus erlotinib plus placebo in previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:3307-3315
187. Ou SH, Kwak EL, Siwak-Tapp C et al: Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal-epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification. *J Thorac Oncol* 2011;6:942-946
188. Mourali J, Bernard A, Lourenco F et al: Anaplastic lymphoma kinase is a dependence receptor whose proapoptotic functions are activated by caspase cleavage. *Mol Cell Biology* 2006;26(16):6209-6222
189. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB et al: Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodkin's lymphoma. *Science* 1994;263(5151):1281-1284
190. Shinmura K, Kageyama S, Tao H: EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas. *Lung cancer* 2008;61:163-169
191. Garber K: ALK, Lung Cancer, and Personalized Therapy: Portent of the Future? *Oxford Journal Medicine JNCI J Natl Cancer Inst* 2010;Vol 102, Issue 10 Pp:672-675

- 192.Soda M, Choi YL, Enomoto M et al:Identification of the transforming EML4-ALK Psion gene in non-small-cell lung cancer. Nature 2007;448:561-566
- 193.Choi AL, Takeuchi K, Soda M et al: Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. Cancer Res 2008;68:4971-4976
- 194.Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K et al: EML4-ALK Psion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. Clin Cancer Res 2008;14:4275-4283
- 195.Horn L, Pao W: EML4-ALK:honing in on a new target in non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 2009;27:4247-4253
- 196.Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y et al: EML4-ALK Psion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers J Thorac Oncol 2008;3:13-17
- 197.Sun Y, Ren Y, Fang Z et al: Lung adenocarcinoma from East Asia never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. J Clin Oncol 2010;28:4616-4620
- 198.Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M et al:Clinicopathologic features of non-small cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. Ann Surg Oncol 2010;17:889-897
- 199.Crystal AS, Shaw AT: New Targets in Advanced NSCLC:EML4-ALK. Clinical Advances in hematology & Oncology 2011;9(3):207-214
- 200.Pešek M: Crizotinib, inhibitor více signálních drah, v molekulárně cílené léčbě nemalobuněčných karcinomů plic. Farmakoterapie 2013;9(supplementum 1):23-30
- 201.Yang J, Zhang X, Su J et al: Concomitant EGFR mutation and EML4-ALK gene fusion in non-small cell lung cancer
- 202.Zhang X, Zhang S, Yang X et al: Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. Mol Cancer 2010;9:188
- 203.Crinó L, Kim D, Riely GJ et al: Initial phase II results with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer ( NSCLC):PROFILE 1005. J Clin Oncol 2011;29(suppl.abstr 7514)
- 204.<http://thoracicsymposium.org/meetingprogram/documents/PLRiely.pdf>
- 205.Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K et al:on behalf of all PROFILE 1007 investigators. Phase III study of crizotinib vs pemetrexed or docetaxel chemotherapy in patients with advanced ALK-Positive NSCLC (PROFLE 1007). Presented at the 13th ESMO Congress , Vienna, Austria 2012

- 206.Ou SH: Crizotinib:a novel first-in-class multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the treatment of anaplastic lymphoma kinase rearranged non-small cell lung cancer and blond. Drug Des Devel Rher 201+;5:471-485
- 207.Petruželka L, Miškovičková M, Georgiev P: Personalizovaná cílená léčba nemalobuněčných karcinomů plic jako klinická realita. Postgraduální medicína 2013;15(3):237-245
- 208.Zemanová M: Crizotinib vs. Pemetrexed nebo docetaxel v terapii pacientů s pokročilým ALK-pozitivním nemalobuněčným karcinomem plic- studie PROFILE 1007- komentář ke studii. Farmakoterapie 2013;2
- 209.Fabiánová J: Crizotinib vs. Pemetrexed alebo docetaxel v terapii pacientov s pokročilým ALK-pozitívnym nemalobunkovým karcinómom pl'úc – studia PROFILE 1007. Farmakoterapie 2013;3(1):39-40
- 210.Ottersson GA, Riely GJ, Shaw AT et al: Clinical characteristics of ALK + NSCLC patients (pts) treated with crizotinib beyond disease progression (PD): Potential implications for management. J Clin Oncol 2012;30(Suppl):Abstr 7600
- 211.Mologni L: Inhibitors of the anaplastic lymphoma kinase. Expert Opin Investig Drugs 2012;13:1195-1201
- 212.Pešek M, Grossmann P, Mukenšnabl P et al: První zkušenosti s vyšetřováním zlomu genu ALK ( anaplastické lymfomové kinázy) a s podáním crizotinibu u vybraných nemocných s nemalobuněčnými karcinomy plic (NSCLC). Studia Pneumologica 2012;72:159-162
- 213.Douillard JY, Rosell R, De Lena M et al: Adjuvant vinorebine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-III A-non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]):a randomized controlled trial. Lancet Oncol 2006;7(9):71-727

## 11. SEZNAM PUBLIKACÍ A PŘEDNÁŠEK

### Práce související s disertační prací:

#### Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

Jancik S, Drábek J, Berkovcová J, Xu Y, Stankova M, Klein J, Kolek V, Skarda J, Tichy T, **Grygárková I**, Radzioch D, Hajdúch M: A comparison of Direct sequencing, Pyrosequencing, high resolution melting analysis, TheraScreen DxS, and K-ras StripAssay for detecting KRAS mutations in non small cell lung carcinomas. J Exp clin Cancer Res 2012 Sep. Impact factor 3,066

#### Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. **Grygárková I**, Kolek V, Klein J, Bohanes T, Szkorupa M: Prospektivní studie neoadjuvantní chemoterapie s použitím kombinace docetaxelu a platinového derivátu u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem plic stadia IIIA. Studia pneumologica et phtiseologica 2009, roč.69, č.3: 91-95
2. **Grygárková I**, Kolek V, Klein J, Neoral Č, Szkorupa M, Bohanes T: Výsledky diagnostiky a operability bronchogenního karcinomu na Klinice plicních nemocí a tbc FN Olomouc. Studia pneumologica et phtiseologica 2010, roč.70, č.6: 227-232
3. Kolek V, **Grygárková I**, Hajdúch M, Klein J, Cwiertka K, Neoral Č, Langova K, Mihál V: Long term follow-up of neoadjuvant-adjuvant combination treatment of IIIA stage non-small-cell-lung cancer: results of neoadjuvant carboplatin/vinorelbine and carboplatin/paclitaxel regiment combined with selective adjuvant chemotherapy according to in-vitro chemoresistance test. Iomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2008, 152(2):259-266. MSM 6198959216, IGA NS 9959-3
4. Kolek V, **Grygárková I**, Chalupa J, Koubková L, Švecová J, Skříčková J, Ostřížková L, Sixtová D: Možnosti podání perorálního vinorelbinu v adjuvantní chemoterapii u nemalobuněčného karcinomu plic. Multicentrická studie proveditelnosti a snášenlivosti. Studia pneumologica et phtiseologica 2010, roč.70, č.3:102-105
5. Szkorupa M, Klein J, Bohanes T, Neoral Č, Kolek V, **Grygárková I**: Neoadjuvantní chemoterapie a chirurgická léčba u pokročilých stadií nemalobuněčného karcinomu plic. Rozhl. Chir., 2011;90(8):433-439
6. Skříčková J, Hejduk K, Bortlíček Z, Pešek M, Kolek V, Koubková L, Zatloukal P, zemanová M, Roubec J, Sixtová D, Salajka F, Čoupková H, Tomíšková M, **Grygárková I**,

Havel L, Hrnčiarik M: Účinnost a bezpečnost léčby pemetrexedem a cisplatinou u pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) typu adenokarcinomu a velkobuněčného karcinomu. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2012, roč.72, č.3:125-128

Přehledné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

**Grygárková I, Kolek V:** Léčba bronchogenního karcinomu gefitinibem v I.linii u pacienta s pozitivní mutací EGFR. *Onkologie* 2012, roč.6, č.2:110-112

Abstrakta ve sborníku

- 1.Grygárková I, Kolek V., Chalupa J., Skříčková J., Koubková L., Ostřížková L., Švecová J.:** Studie adjuvantní chemoterapie u nemalobuněčného karcinomu plic v ČR a SR. XVII Moravskoslezské dny pneumologie, Olomouc, 2008, s. 15
- 2.Grygárková I, Kolek V., Klein J., Neoral Č., Hajdúch M.:** Neoadjuvantní chemoterapie docetaxel + platinový derivát u pacientů s NSCLC st. III.A. XIV. Kongres Slovenskej a Českej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti. Bardejovské Kúpele, 2008.
- 3..Grygárková I, Kolek V.:** Výsledky léčby Tarcevou ve FN Olomouc. XVIII. Moravskoslezské dny pneumologie, 2009, s. 8-9.
- 4.Grygárková I, Kolek V., Klein J., Neoral Č., Johanes T., Szkorupa M.:** Vývoj časné diagnostiky bronchogenního karcinomu na Klinice plicních nemocí a tbc FN Olomouc. XVII. Západočeské pneumoonkologické dny, 2009, s. 22.
- 5.Klein K., Král V., Neoral Č., Bohanes T., Szkorupa M., Kolek V., Grygárková I.:** Chirurgie karcinomu plic od T1 po T4, od NO po N3. XVIII. Moravskoslezské dny pneumologie, 2009, s. 12.
- 6.Kolek V., Grygárková I., Chalupa J., Koubková, Švecová J., Ostřížková L., Sixtová D.:** Multicentrická studie s perorálním vinorelbinem v adjuvantní chemoterapii u radikálně operovaného nemalobunečného karcinomu plic. XVIII. Moravskoslezské dny pneumologie, 2009, s. 6.
- 7.Kolek V., Grygárková I., Chalupa J., Koubková L., Švecová J., Skříčková J., Ostřížková L., Sixtová D.:** Multicentrická česko-slovenská studie adjuvantní chemoterapie perorálním vinorelbinem u nemalobuněčného karcinomu plic. XVII. Západočeské pneumoonkologické dny, 2009, s. 23.
- 8.Kolek V., Grygárková I., Chalupa J., Koubková L., Švecová J., Skříčková J., Ostřížková L., Sixtová D.:** Adjuvantní chemoterapie perorálním vinorelbinem u nemalobuněčného

karcinomu plic (multicentrická studie proveditelnosti a snášenlivosti). XVI. Jihočeské onkologické dny, 2009, s. 134. (i poster)

9.Kolek V., **Grygarkova I.**, Chalupa J., Koubkova L., Svecova J., Skrickova J., Ostrizkova L., Sixtova D.: Oral vinorelbine in combination with cisplatin or carboplatin in adjuvant chemotherapy of non-small cell lung cancer: a prospective multicentre study of feasibility and tolerability. 13th World Conference on Lung Cancer, 2009; 31 Jul – 4 Aug 2. P2. 140, San Francisco. **IF**

10.Skřičková J., Keilová J., Janásková T., Kolek V., Chalupa L., **Grygárková I.**, Roubec J., Kadlec B.: Intravenózní vinorelbin (Vbiv) den 1 a perorální vinorelbin (Nebo) den 8 v kombinaci s karboplatinou v první linii léčby nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic: předběžné výsledky prospektivní studie. XV. Kongres České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti, 2009, s. 123.

11.Skřičková J., Keilová J., Janásková T., Kolek V., Chalupa J., Babičková L., Tomíšková M., Kadlec B., **Grygárková I.**, Roubec J.: Intravenózní vinorelbin a perorální vinorelbin v kombinaci s karboplatinou v první linii léčby nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic: předběžné výsledky prospektivní studie. XVIII. Moravskoslezské dny pneumologie, 2009, s. 7.

12.Skřičková J., Keilová J., Janásková T., Kolek V., Chalupa J., Babičková L., Tomíšková M., Kadlec B., **Grygárková I.**, Roubec J.: Intravenózní vinorelbin den 1. A perorální vinorelbin den 8. v kombinaci s karboplatinou v první linii léčby nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic. Předběžné výsledky prospektivní studie. XVI. Jihočeské onkologické dny, 2009, s. 125, Český Krumlov.

13.Skřičková J., Keilová J., Janásková T., Kolek V., Chalupa J., Babičková L., Tomíšková M., Kadlec B., **Grygárková I.**, Roubec J.: Intravenózní vinorelbin (VBIV) den 1 a perorální vinorelbin (nebo) den 8. V kombinaci s karboplatinou v první linii léčby nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic. XVII. Západočeské pneumoonkologické dny, 2009, s. 24.

14.Skřičková J., Keilová J., Janásková T., Kolek V., Chalupa J., Roubec J., Třasoň T., Tomíšková M., Kadlec B., Švecová J., **Grygárková I.**, Kohoutek M.: Intravenous vinorelbine (NVBiv) on D1 and oral vinorelbine (NVBo) on D8 in combination with carboplatin (CBDCA) as first line treatment in advanced non-small lung cancer (NSCLC) patients: preliminary results of a prospective study. 13 th World Conference on Lung Cancer, PD 3.3.3, 31 Jul – 4 Aug, 2009, San Francisco. **IF**

15.Szkorupa M., Klein J., Neoral Č., Bohanes T., Kolek V., **Grygárková I.**: Chirurgické

aspekty léčby karcinomu plic v neadjuvantním protokolu. XVIII. Moravskoslezské dny pneumologie, 2009, s. 13.

16. **Grygárková I.**, Kolek V., Klein J., Neoral Č., Bohanes T., Szkorupa M.: Diagnostika a operabilita bronchogenního karcinomu na Klinice plicních nemocí a tbc FN Olomouc v letech 1999-2008. XVI. Kongres Slovenskem a Českej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti. Bratislava, sborník abstrakt, s. 83, 2010.

17. Kolek V., **Grygárková I.**, Chalupa J., Koubková L., Skalová B., Švecová J., Skříčková J., Pavlíková E., Vlášek T., Roubec J., Janásková T., Križan K.: Perorální vinorelbin v adjuvantní léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). Multicentrická studie proveditelnosti a tolerance léčby. XVI. Kongres Slovenskem a Českej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti. Bratislava, sborník abstrakt, s. 83, 2010,

18. Kolek V., Hajdúch M., **Grygárková I.**, Klein J.: Vyhodnocení dlouhodobého sledování nemocných se stadiem IIIA nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) léčených adjuvantní chemoterapií podle výsledků in vitro testů chemorezistence. XXXIV. Brněnské onkologické dny a XXIV. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky. Brno, 2010, Edukační sborník, s. 282-283. IGA MZČR NS-9959-3

19. Kolek V., Hajdúch M., **Grygárková I.**, Szkorupa M., Klein J.: Selektivní adjuvantní chemoterapie podle výsledků in vitro testů chemorezistence: Dlouhodobé sledování nemocných s radikálně operovaným stadiem IIIA nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). XVIII. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová, 2010, s. 17. IGA MZČR NS-9959-3.

20. Salajka F., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Koubková L., Krejčí J., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Skalová V., Štícha .: Erlotinib u nemocných s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC): sledování účinnosti v České republice. XIV. Hradecké pneumologické dny, Hradec Králové, 2010, s. 20-21. Sborník abstrakt

21. Skříčková J., Janásková T., Keilová J., Kolek V., Chalupa J., Tomíšková M., Babičková L., **Grygárková I.**, Roubec J., Kadlec B. Perorální vinorelbin den 1. a den 8. v kombinaci s platinovým derivátem v léčbě nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic (SNCLC). XVIII. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová, 2010, s. 22-23.

22. Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., .... **Grygárková I.**: Registry TARCEVA a AVASTIN – nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC). XVIII. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová, 2010, s. 40-42.



23. **Grygárková I.**, Kolek V., Koubková I., Sixtová D., Skříčková J., Roubec J., Salajka F., Pešek M., Zatloukal P., Petruželka L., Vyzula R., Štícha M.: Pemetrexed v II. linii léčby NSCLC. Výsledky multicentrické studie. XX. Moravskoslezské dny pneumologie, Olomouc, 2011, Sborník abstrakt, s. 13.
24. Klein J., Srovnal J., Benedikova A., Kolar Z., Szkorupa M., Skalicky P., Chudacek J., Janaskova T., Skarda J., Kolek V., **Grygarkova I.**, Hajdúch M.: Markery minimální systémové nemoci u nemocných s rakovinou plic. XX. Moravskoslezské dny pneumologie, Olomouc, 2011, Sborník abstrakt, s. 17.
25. Kolek V., **Grygárková I.**, Chalupa J., Koubková L., Švecová J., Skříčková J., Ostřížková L., Sixtová D.: Perorální vinorelbin v adjuvantní léčbě NSCLC. Tříleté výsledky multicentrické studie. XX. Moravskoslezské dny pneumologie, Olomouc, 2011, Sborník abstrakt, s. 18-19.
26. Kolek V., **Grygárková I.**, Chalupa J., Koubková L., Janásková T., Roubec J., Popelková P., Bártek T., Sixtová D., Pavlíková E., Vlášek T., Chaloupka F., Skříčková J.: Perorální vinorelbin a karboplatina v adjuvantní léčbě nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). Multicentrická studie proveditelnosti a tolerance léčby. XIX. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová, 2011, Sborník abstrakt. 47.
27. Skříčková J., Tomíšková M., Janásková T., Kolek V., **Grygárková I.**, Chaloupka F., Švecová J., Chalupa J., Čoupková H., Vlášek T., Roubec J., Říhová P., Babičková L.: Perorální vinorelbin (NVBO) den 1 a den 8 s karboplatinou v první linii léčby u nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic (předběžné výsledky nerandomizované studie v neselektované populaci). XIX. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová, 2011, Sborník abstrakt, s. 45-46.
28. Skříčková J., Bortlíček Z., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Zemanová M., Sixtová D., Roubec J., Čoupková H., Košatová K.: Možnosti léčby pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) v 1. linii dle morfoloogické a molekulárně genetické diagnostiky v České republice (srovnání aktuálních doporučení s reálnou praxí). XIX. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová, 2011, Sborník abstrakt, s. 50-54.
29. Szkorupa M., Bohanes T., Klein J., Neoral Č., Kolek V., **Grygárková I.**, Flodr P., Zálešák B.: Vzácny typ nemalobuněčného karcinomu plic – sarkomatoidní karcinom. XX. Moravskoslezské dny pneumologie, Olomouc, 2011, Sborník abstrakt, s. 24-25.

30. **Grygárková I.**, Kolek V., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Salajka F., Roubec J., Sixtová D., Koubková L., Bortlíček Z.: Pacienti dlouhodobě léčeni Tarcevou. XX. Západočeské pneumoonkologické dny. Darová, 2012, s. 10-11.
31. Roubec J., Hejduk K., Bortlíček Z., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**, ..(17 spoluautorů) Analýza dat pacientů s NSCLC na léčbě erlotinibem a pemetrexedem v pneumoonkologickém centru Moravskoslezského kraje KOC FN Ostrava oproti datům České republiky z registru TULUNG, predikce potřeby léčby na rok 2013. XXI. Moravskoslezské dny pneumologie, Ostrava, 2012, s. 37-38
32. Roubec J., Hejduk K., Bortlíček Z., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Zemanová M., Sixtová D., Čoupková H., Košatová K.: Registr TULUNG: Analýza dat pacientů s neskvamózní formou (adenokarcinom, velkobuněčný karcinom) NSCLC a PS 0-1 na léčbě erlotinibem a pemetrexedem ve 2. linii léčby. XX. Západočeské pneumoonkologické dny. Darová, 2012, s. 31.
33. Skříčková J., Bortlíček Z., Hejduk K., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**... Možnosti nákladné pneumoonkologické léčby pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) v první linii dle morfologické a molekulárně genetické diagnostiky v České republice. XXXVI. Brněnské onkologické dny a XXVI. Konference pro nelékařské zdravotnické pracovníky. Brno, 2012, s. 169-172.
34. Skříčková J., Bortlíček Z., Hejduk K., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., .., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., ..(17 spoluautorů). Co limituje v České republice léčbu 1. linie NSCLC dle morfologické a molekulárně genetické diagnostice? XXI. Moravskoslezské dny pneumologie, Ostrava, 2012, s. 37.
35. Skříčková J., Hejduk K., Bortlíček Z., Pešek M., Kolek V., Koubková L., Zatloukal P., Zemanová M., Roubec J., Sixtová D., Salajka F., Čoupková H., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M.: Výsledky 1. linie léčby nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) kombinací pemetrexed (Alimta)/ cisplatina v klinické praxi. XX. Západočeské pneumoonkologické dny. Darová, 2012, s. 22-23.
36. Skříčková J., Bortlíček Z., Hejduk K., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Zemanová M., Sixtová D., Roubec J., Čoupková H., Košatová K.: Sledování nákladné pneumoonkologické léčby pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) v registru TULUNG v České

republice – výhody, nevýhody, srovnání se zahraničím. XX. Západočeské pneumoonkologické dny. Darová, 2012, s. 28-30.

37. Skříčková J., Kadlec B., Venclíček O., Janásková T., Kolek V., Chalupa J., Chaloupka F., Švecová J., Vlášek T., Tomíšková M., Jakubíková L., **Grygárková I.**, Čoupková H., Roubec J., Říhová P. et al. Perorální vinorelbin den 1. a den 8. v kombinaci s karboplatinou v léčbě nemocných s pokročilým nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). XX. Západočeské pneumoonkologické dny. Darová, 2012, s. 55-56.

38. **Grygárková I.**, Kolek V., Bohanes T., Szkorupa M.: Diagnostika a operabilita bronchogenního karcinomu na Klinice plicních nemocí a TBC FN Olomouc v letech 1993-2012. XXII. Moravskoslezské dny pneumologie, Brno, 2013, s. 47.

39. Kolek V., **Grygárková I.**, Fischer O., Pešek M., Skříčková J., Nováková L., Zermanová M.: Zkušenosti s crizotinibem v České republice (symposium Pfizer). XXI. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová 2013. s. 12.

40. Roubec J., Hejduk K., Bortlíček Z., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Zemanová M., Sixtová D., Čoupková H., Košatová K. Registr TULUNG: Analýza dat pacientů s neskvamózní formou (adenokarcinom, velkobuněčný karcinom) NSCLC a PS 0-1 na léčbě pemetrexedem ve druhé linii léčby. XVIII. Kongres Slovenskej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti a České pneumologické a ftizeologické společnosti, Horný Smokovec, Vysoké Tatry, 2013. s. 61.

41. Roubec J., Hejduk K., Bortlíček Z., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Zemanová M., Sixtová D., Čoupková H., Košatová K.: Registr TULUNG: Analýza dat pacientů s neskvamózní formou (adenokarcinom, velkobuněčný karcinom) NSCLC a PS 0-1 na léčbě pemetrexedem ve druhé linii léčby. XXII. Moravskoslezské dny pneumologie, Brno, 2013, s. 45-46

42. Roubec J., Hejduk K., Bortlíček Z., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Zemanová M., Sixtová D., Čoupková H., Košatová K.: Registr TULUNG: Analýza dat pacientů s neskvamózní formou (adenokarcinom, velkobuněčný karcinom) NSCLC a PS 0-1 léčených erlotinibem ve 2. linii léčby. XXI. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová, 2013, s. 51

43. Skříčková J., Bortlíček Z., Hejduk K., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Zemanová M., Sixtová D., Roubec J., Čoupková H., Košatová K. Vývoj léčby pokročilého nemalobuněčného

karcinomu plic (NSCLC) v České republice (ČR). XVIII. Kongres Slovenskej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti a České pneumologické a ftizeologické společnosti, Horný Smokovec, Vysoké Tatry, 2013. s. 62-63.

44. Skříčková J., Bortlíček Z., Hejduk K., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomášková M., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Zemanová M., Sixtová D., Roubec J., Čapková H., Košatová K., Černovská M., Marel M., Vašáková M.: Registr TULUNG (sledování nákladné pneumoonkologické léčby pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic) – zdroj informací pro všechny pneumology. XXII. Moravskoslezské dny pneumologie, Brno, 2013, s. 48-49.

45. Skříčková J., Kadlec B., Venclíček O., Janásková T., Bartoš J., Chalupa J., Kolek V., **Grygárková I.**, Čoupková H., Reiterer P. et. al.: Perorální vinorelbin den 1. a den 8. v kombinaci s karboplatinou v léčbě nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC): výsledky nerandomizované studie u neselektované populace 396 nemocných. XXI. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová 2013. s. 43-44.

46. Skříčková J., Bortlíček Z., Hejduk K., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomášková M., Šatánková M., Povolná Z., **Grygárková I.**, Havel L., Hrnčiarik M., Zemanová M., Sixtová D., Roubec J., Čoupková H., Košatová K., Černovská M., Marel M., Vašáková M.: Co vypovídá registr TULUNG o trendech ve využití nákladné léčby u NSCLC? XXI. Západočeské pneumoonkologické dny, Darová 2013. s. 48-49.

#### Abstrakta v časopisu

1. Kolek V., Hajduch M., **Grygarková I.**, Jiri Klein.: Selective adjuvant chemotherapy according to in-vitro chemoresistance test: Long term follow up of patients with resectable non-small cell lung cancer (BSCLC) stage III A. European Respiratory Journal. 20th ERS Annual Congress, Barcelona, Spain, september 2010; vol. 36, Suppl. 54. **IF**

2. **Grygárková I.**, Kolek V., Kultán J., Cwiertka K.: Konkomitantní chemoradioterapie CBDCA, vinorelbin u pacientů s NSCLC st. IIIB. Stud. Pneumol. Phthiseol, Supplement, XVII. Kongres ČPFS a SPFS, Plzeň 2011, s. 56.

3. Kolek V., Pešek M., **Grygárková I.**, Zatloukal P., Skříčková J., Vyzula R., Koubková L., Roubec J., Salajka F., Sixtová D., Petruželka L., Štícha M.: Pemetrexed in the second line chemotherapy of non small cell lung cancer. A multicentre prospective analysis of data from

clinical practice. Journal of Thoracic Oncology, 2011; 6(6): S1287-1288. 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer.

4.Kolek V., Chalupa J., **Grygárková I.**, Koubková L., Janásková T., Sixtová D., Roubec J., Pavlíková E., Chaloupka P.: Oral vinorelbine in combination with carboplatin in adjuvant chemotherapy of non-small cell lung cancer: A prospective multicentre study of feasibility and tolerability. Journal of Thoracic Oncology, 2011; 6(6): S1330. 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer.

5.Kolek V., **Grygárková I.**, Chalupa J., Kouibková L., Švecová J., Skříčková J., Ostřížková L., Sixtová D.: Oral vinorelbine in combination with cisplatin or carboplatin in adjuvant chemotherapy of non-small cell lung cancer: a prospective multicentre study of feasibility, tolerability and 3-year survival. Journal of Thoracic Oncology, 2011; 6(6): S1332-1333. 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer.

6.Kolek V., Zatloukal P., Pešek M., Salajka F., Marel M., Roubec J., Skříčková J., Sixtová D., Petruželka L., **Grygárková I.**, Koubková L., Štícha M.: Pemetrexed in the first line chemotherapy of malignant pleural mesotelioma. A multicentre prospective study. Journal of Thoracic Oncology, 2011; 6(6): S1360-1361. 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer.

7.Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Krejčí J., Tomíšková M., **Grygárková I.**: Léčba erlotinibem u nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) – srovnání výsledků léčby v České republice s výsledky zahraničních studií. Stud. Pneumol. Phthiseol, Supplement, XVII. Kongres ČPFS a SPFS, Plzeň 2011, s. 43.

8.Skříčková J., Keilová J., Janásková T., Kolek V., Chalupa J., Babičková L., **Grygárková I.**: Intravenózní vinorelbin den 1. a perorální vinorelbin den 8. v kombinaci s karboplatinou v první linii léčby nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem plic – konečné výsledky prospektivní studie. Stud. Pneumol. Phthiseol, Supplement, XVII. Kongres ČPFS a SPFS, Plzeň 2011, s. 55.

9.Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Zemanová M., Sixtová D., Roubec J., Coupková H., Tomíšková M., Hrciarik M., **Grygárková I.**, Štícha M.: Erlotinib (Tarceva®) in the treatment of a non-selected population of 1735 patients (PTS) with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) from the Czech Republic. Journal of Thoracic Oncology, 2011; 6(6): S1164-1165. 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer.

10.Skříčková J., Keilová J., Janásková T., Kolek V., Tomíšková M., Babičková L., Kadlec B., **Grygárková I.**, Bartoš J., Gruna J., Švecová J., Coupková H.: Intravenous vinorelbine (NVBIV) on D1 switch to oral vinorelbine (NVBO) on D8 in combination with carboplatin

(CBDCA) as first line treatment in advanced non-small lung cancer (NSCLC) patients: final results of a prospective study in nonrandomized population. *Journal of Thoracic Oncology*, 2011; 6(6): S1198-1199. 14<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer.

11. **Grygárková I.**, Kolek V., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Salajka F., Roubec J., Sixtová D., Koubková K., Hejduk K.: Group of patients with NSCLC treated with erlotinib in the Czech Republic Longer than 12 months. 13<sup>th</sup> Central European Lung Cancer Conference, Praha. *Lung Cancer*, 77, June 2012; Suppl.1, S31. Grant IGA MZ ČR NT/13569

**IF 3.356(2010)**

12. Kolek V., Pešek M., **Grygárková I.**, Zatloukal P., Skříčková J., Sixtová D., Koubková L., Roubec J., Salajka F., Petruželka L., Vyzula R., Štícha M.: A multicentre prospective study on pemetrexed in the second line chemotherapy of non small cell lung cancer. Data from routine clinical practice. 13<sup>th</sup> Central European Lung Cancer Conference, Praha. *Lung Cancer*, 77, June 2012; Suppl.1, S33. Grant IGA MZ ČR NT/13569 **IF 3.356(2010)**

13. Kolek V., **Grygárková I.**, Chalupa J., Koubková L., Švecová J., Skříčková J., Ostřížková L., Sixtová D.: Oral vinorelbine in combination with cisplatin or carboplatin in adjuvant chemotherapy of non-small cell lung cancer: A prospective multicentre study of feasibility, tolerability and 3-year survival. 13<sup>th</sup> Central European Lung Cancer Conference, Praha. *Lung Cancer*, 77, June 2012; Suppl. 1, S33-34. Grant IGA MZ ČR NT/13569 **IF 3.356(2010)**

14. Kolek V., **Grygárková I.**, Chalupa J., Koubková L., Janásková T., Roubec J., Popelková P., Bártek T., Sixtová D., Pavlíková E., Vlášek T., Chaloupková F., Skříčková J.: Oral vinorelbine in combination with carboplatin in adjuvant chemotherapy of non-small cell lung cancer (NSCLC): A prospective multicentre study of feasibility, tolerability and short time survival. 13<sup>th</sup> Central European Lung Cancer Conference, Praha. *Lung Cancer*, 77, June 2012; Suppl. 1, S34. Grant IGA MZ ČR NT/13569 **IF 3.356(2010)**

15. Skříčková J., Bortlíček Z., Hejduk K., Pešek M., Zatloukal P., Kolek V., Salajka F., Koubková L., Tomíšková M., **Grygárková I.**... Dostupnost „centrové“ pneumoonkologické léčby pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) ihned po stanovení diagnózy. Jak je na tom Česká republika? I. kongres České pneumologické a fytzeologické společnosti, XVI. Hradecké pneumologické dny. Hradec Králové, 2012, s. 101-103.

16. Skříčková J., Kadlec B., Venclíček O., Janásková T., Bartoš J., Chalupa J., Kolek V., **Grygárková I.**, Čoupková H., Reiterer P.: Full oral vinorelbine (NVBO) on D1 and D8 with carboplatin (CBDCA) as first line treatment in advanced non-small lung cancer (NSCLC) patients: Results of a prospective study in nonrandomized population of 259 patients.

13<sup>th</sup> Central European Lung Cancer Conference, Praha. Lung Cancer, 77, June 2012; Suppl. 1, S37-38.

17.Szkorupa M., Bohanes T., Klein J., Neoral Č., Chudáček J., Kolek V., **Grygárková I.** Chirurgie jako součást multimodální terapie stadia IIIA nemalobuněčného karcinomu plic. XVII. setkání pneumologů a I. setkání pneumologů a pneumochirurgů na Štíříně. Štířín, 2012, s. 31-32.

Seznam přednášek/posterů přednesených na veřejných odborných fórech

**1.Grygárková I.,** Kolek V., Chalupa J., Skříčková J., Koubková L., Ostřížková L., Švecová J.: Studie adjuvantní chemoterapie u nemalobuněčného karcinomu plic v ČR a SR. XVII Moravskoslezské dny pneumologie, Olomouc, 2008

**2.Grygárková I.,** Kolek V., Klein J., Neoral Č., Hajdúch M.: Neoadjuvantní chemoterapie docetaxel + platinový derivát u pacientů s NSCLC st. IIIA. XIV. Kongres Slovenskej a Českej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti. Bardejovské Kúpele, 2008.

**3..Grygárková I.,** Kolek V.: Výsledky léčby Tarcevou ve FN Olomouc. XVIII. Moravskoslezské dny pneumologie, 2009

**4.Grygárková I.,** Kolek V., Klein J., Neoral Č., Johanes T., Szkorupa M.: Vývoj časné diagnostiky bronchogenního karcinomu na Klinice plicních nemocí a tbc FN Olomouc. XVII. Západočeské pneumoonkologické dny, 2009

**5.Grygárková I.,** Kolek V., Klein J., Neoral Č., Bohanes T., Szkorupa M.: Diagnostika a operabilita bronchogenního karcinomu na Klinice plicních nemocí a tbc FN Olomouc v letech 1999-2008. XVI. Kongres Slovenskem a Českej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti. Bratislava, sborník abstrakt, s. 83, 2010.

**6.Grygárková I.,** Kolek V., Koubková I., Sixtová D., Skříčková J., Roubec J., Salajka F., Pešek M., Zatloukal P., Petruželka L., Vyzula R., Štícha M.: Pemetrexed v II. linii léčby NSCLC. Výsledky multicentrické studie. XX. Moravskoslezské dny pneumologie, Olomouc, 2011

**7.Grygárková I.,** Kolek V., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Salajka F., Roubec J., Sixtová D., Koubková L., Bortlíček Z.: Pacienti dlouhodobě léčeni Tarcevou. XX. Západočeské pneumoonkologické dny. Darová, 2012.

**8.Grygárková I.,** Kolek V., Bohanes T., Szkorupa M.: Diagnostika a operabilita bronchogenního karcinomu na Klinice plicních nemocí a TBC FN Olomouc v letech 1993-2012. XXII. Moravskoslezské dny pneumologie, Brno, 2013.

9. **Grygárková I.**, Kolek V., Kultan J., Cwiertka K.: Konkomitantní chemoradioterapie CBDCA, vinorelbin u pacientů s NSCLC st. IIIB. XVII. Kongres ČPFS a SPFS, Plzeň 2011
10. **Grygárková I.**, Kolek V., Skříčková J., Pešek M., Zatloukal P., Salajka F., Roubec J., Sixtová D., Koubková K., Hejduk K.: Group of patients with NSCLC treated with erlotinib in the Czech Republic Longer than 12 months. 13<sup>th</sup> Central European Lung Cancer Conference, Praha, Grant IGA MZ ČR NT/13569

#### Přednáška bez abstraktu

1. **Grygárková I.** Operabilita karcinomu plic na klinice. Odborný seminář Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy, Olomouc 18.11.2009
2. **Grygárková I.**, Kolek V., Kultan J. Biologická léčba – současnost a budoucnost. Přednáškový večer spolku lékařů v Olomouci. 2.12.2009
3. **Grygárková I.**, Kolek V., Klein J., Bohanes T., Szkorupa M. Vývoj diagnostiky a operability bronchogenního karcinomu na Klinice plicních nemocí a tuberkulózy FN Olomouc. VV.dny RAPL, Karlova Stánka 20.-24.1.2010
4. **Grygárková I.** Dlouhodobá léčba Tarcevou u pacienta bez pozitivní EGFR mutace. Kazuistická sdělení v rámci XVII. Kongresu ČaSPFS Plzeň 23.-25.6.2011
5. **Grygárková I.**, Hajdúch M., Drábek J., Tichý T: Význam vyšetřování mutací u karcinomu plic. . Odborný seminář Kliniky plicních nemocí a tuberkulózy, Olomouc 8.9.2010
6. **Grygárková I.**, Kultan J., Kulísková J., Fischer O: Novinky v pneumoonkologii – biologická léčba. Přednáškový večer spolku lékařů v Olomouci 27.11.2013
7. **Grygárková I.**: Hodnocení operability karcinomu. Odborný seminář Kliniky plicních nemocí a tbc – 29.1.2014

#### Ostatní publikace:

1. Jakubec P., **Grygárková I.**, Kolek V., Cwiertka K., Kapustová M: Mezotelin-nová vyšetřovací metoda u mezoteliomu pleury. Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL 7, ř.1:43-47
2. Jakubec P., **Grygárková I.**, Kolek V., Cwiertka K., Kapustová M: Mezotelin v detekci mezoteliomu pleury v diagnostice pohrudničního výpotku. Stud Pneumol Phthiseol, 79, 2010, č.6:s:243-247



### Ostatní přednášky

1. **Grygárková I**, Nakládalová M, Kolek V: Výskyt a léčba mezoteliomu pleury v České republice. Moravský mezikrajský seminář Hrotovice 4.-5.4.2008
2. **Grygárková I**, Kolek V, Palatka K: Vlastní zkušenosti s Alimtou v léčbě mezoteliomu pleury. XVII.Západočeské pneumoonkologické dny, Darová 12.-13.11.2009

